



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

# Chemické látky s antibakteriálním účinkem využívané v kosmetických výrobcích

## Chemicals with Antibacterial Effect Used in Cosmetic Products

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Michaela Stolaříková

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Hana Kalábová

---

Kladno 2022/2023

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Stolaříková** Jméno: **Michaela** Osobní číslo: **499636**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Chemické látky s antibakteriálním účinkem využívané v kosmetických výrobcích**

Název bakalářské práce anglicky:

**Chemicals with Antibacterial Effect Used in Cosmetic Products**

Pokyny pro vypracování:

V posledních letech narůstá množství kosmetických výrobků obsahujících antibakteriální látky. Například mýdla, krémy či gely na ruce obsahují látky, které účinně ničí bakterie na pokožce. Cílem bakalářské práce je poskytnout přehled takto používaných chemických látek a vytvořit přehled možných účinků na lidské zdraví. V teoretické části práce bude vypracována literární rešerše problému chemických látek s antibakteriálními účinky využívaných v kosmetických výrobcích. V rešerši bude popsán mechanismus antibakteriálního působení daných látek a jejich působení na lidské zdraví. Na základě rešerše bude vybrána konkrétní látka, u které bude popsán mechanismus působení, výskyt, účinky a bude využita v praktické části k testování na buněčných liniích. Na základě měření proliferace buněk bude hodnocena cytotoxicita dané látky pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyli-2H-tetrazolium-bromid) testu.

Seznam doporučené literatury:

- [1] WEATHERLY, Lisa M. a Julie A. GOSSE, Triclosan exposure, transformation, and human health effects, online, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, ed. 2017, ročník 20, číslo 8, Přístupné z: <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1399306>, ISSN 1093-7404
- [2] ALFHILI, Mohammad A. a Myon-Hee LEE, Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms, online, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, ed. 2019, ročník 2019, Přístupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/1607304>, ISSN 1942-0900
- [3] BEVER, Candace S., Amy A. RAND, Malin NORDING, et al, Effects of triclosan in breast milk on the infant fecal microbiome, online, Chemosphere, ed. 2018, ročník 203, Přístupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.186>, ISSN 00456535

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**Ing. Hana Kalábová**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

**Mgr. Romana Šíroká, Ph.D.**

Datum zadání bakalářské práce: **14.02.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2024**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.  
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
děkan

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Chemické látky s antibakteriálním účinkem využívané v kosmetických produktech vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2023

.....  
Michaela Stolaříková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych zde poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Haně Kalábové za cenné rady, věnovaný čas a za realizaci praktické části. Dále bych ráda poděkovala své rodině a svým blízkým za podporu nejen při psaní závěrečné práce, ale i při celém studiu.

## **ABSTRAKT**

Předmětem bakalářské práce jsou chemické antibakteriální látky užívané v kosmetických přípravcích a jejich možný dopad na lidské zdraví.

V teoretické části jsou nejprve představeny základní pojmy a obecné využití antibakteriálních látek v kosmetickém průmyslu. Dále jsou látky rozděleny dle jejich chemické struktury a je popsán jejich mechanismus účinku. Následná část se věnuje principu stanovení od přípravy vzorků k samotné analýze látek. V nadcházející kapitole jsou uvedeny dvě vybrané skupiny látek, ke kterým je přiložen jejich stručný popis. Kapitola se především zabývá vlivem zvolených kosmetických konzervantů na lidské zdraví. Poslední část rešerše je věnována látce triclosan, která byla na základně vypracování teoretické části vybrána pro provedení experimentu.

V praktické části práce jsou uvedeny použité metody, chemikálie, přístroje a pomůcky nezbytné pro samotné provedení experimentální části, jejíž hlavním cílem bylo provedení MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) testu a změření cytotoxicity vybrané látky na buněčné linii SNU-475.

Bakalářská práce prokázala cytotoxicitu triclosanu u nejvyšší zvolené koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$ .

### **Klíčová slova**

MTT test; triclosan; buněčná linie SNU-475; hepatotoxicita

## **ABSTRACT**

The subject of the bachelor thesis is chemical antibacterial substances used in cosmetic products and their possible impact on human health.

The theoretical part first introduces the basic concepts and general use of antibacterial substances in the cosmetic industry. Next, the substances are classified according to their chemical structure and their mechanism of action is described. The subsequent part deals with the principles of determination from sample preparation to the actual analysis of the substances. In the following chapter, two selected groups of substances are presented, accompanied by a brief description. The chapter mainly deals with the effects of selected cosmetic preservatives on human health. The last part of the study is devoted to the substance triclosan, which was selected for the experiment on the basis of the theoretical part.

In the practical part of the thesis, the methods, chemicals, apparatus and instruments used for the actual performance of the experimental part are presented, the main aim of which was to perform the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and to measure the cytotoxicity of the selected substance on the SNU-475 cell line.

The bachelor thesis proved the cytotoxicity of triclosan at the highest chosen concentration 10  $\mu\text{mol/l}$ .

## **Keywords**

MTT test; triclosan; cell line SNU-475; hepatotoxicity

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Antibakteriální látky v kosmetických produktech.....	12
3.2	Mechanismy účinku antibakteriálních látek .....	14
3.2.1	Organické kyseliny .....	14
3.2.2	Alkoholy, fenoly .....	15
3.2.3	Aldehydy a formaldehydy uvolňující látky.....	16
3.2.4	Isothiazolinony .....	16
3.2.5	Biguanidy .....	17
3.2.6	Kvartérní amoniové sloučeniny .....	17
3.2.7	Dusíkaté sloučeniny.....	18
3.2.8	Deriváty těžkých kovů .....	19
3.2.9	Anorganické sloučeniny.....	19
3.3	Stanovení antibakteriálních látek .....	20
3.3.1	Úprava vzorku.....	20
3.3.2	Extrakce konzervačních látek .....	21
3.3.3	Analytické metody .....	22
3.4	Antibakteriální látky v kosmetice s vlivem na lidské zdraví.....	22
3.4.1	Parabeny .....	23
3.4.2	Formaldehyd a jeho uvolňovače .....	24
3.5	Triclosan.....	25
3.5.1	Historie .....	25

3.5.2	Mechanismus účinku.....	26
3.5.3	Metabolismus.....	27
3.5.4	Vliv na lidské zdraví.....	27
4	Metodika.....	30
4.1	Použité metody.....	30
4.1.1	Kultivace buněk.....	30
4.1.2	MTT test.....	32
4.1.3	Ultrafialová a viditelná spektrofotometrie.....	33
4.2	Pracovní materiál a přístroje.....	33
4.2.1	Buněčná linie.....	33
4.2.2	Chemikálie.....	34
4.2.3	Pracovní pomůcky.....	34
4.2.4	Přístroje.....	35
4.3	Postup.....	35
4.3.1	Příprava živného média.....	35
4.3.2	Rozmrazení buněk.....	35
4.3.3	Pasážování a výživa buněk.....	37
4.3.4	Počítání buněk.....	38
4.3.5	Příprava roztoků triclosanu.....	38
4.3.6	Provedení MTT testu.....	39
5	Výsledky.....	43
5.1.1	Zkušební test metody.....	43
5.1.2	Výsledky MTT testu.....	43
6	Diskuze.....	49



7	Závěr .....	52
8	Seznam použitých zkratek.....	53
9	Seznam použité literatury.....	56
10	Seznam použitých obrázků .....	66
11	Seznam použitých tabulek.....	67

# 1 ÚVOD

Kosmetické přípravky, jakožto produkty obsahující vodu, organické a anorganické látky, musí být chráněné před mikrobiální kontaminací, aby se zaručila bezpečnost pro jejich spotřebitele. Tato ochrana je zajištěna fyzikálními a chemickými prostředky. Nejběžnější strategií výrobců bývá použití antimikrobiálních látek, které mohou být syntetické nebo přírodní, jež mají za cíl ochránit spotřebitele, zvýšit účinnost výrobku a jeho trvanlivost.

Chemické látky mají různé cesty svého antibakteriálního účinku, a to především v závislosti na svém chemickém složení. V Evropské unii je používání konzervačních látek regulováno nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích.

Nebezpečí antibakteriálních látek použitých v kosmetických přípravcích se skrývá ve vznikající rezistenci mikrobů proti těmto chemikáliím, která je zapříčiněna nízkou koncentrací antibakteriálních látek, avšak díky tomu není toxická pro spotřebitele. Dalším nebezpečím je již zmíněná toxicita látek samotných, případně jejich odpadních produktů, které mohou mít dopad na lidské zdraví.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na popis antibakteriálních látek přidávaných do kosmetických přípravků, na popis jejich chemického složení, mechanismů účinku a u vybraných látek také na jejich negativní vlivy na lidský organismus.

## 2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část bakalářské práce má za cíl vytvořit rešerši problematiky antibakteriálních látek používaných v kosmetických produktech. Bude zde objasněno chemické rozdělení antibakteriálních látek v kosmetice a jejich mechanismus účinku, u vybraných látek bude popsán jejich vliv na lidské zdraví. Následně se teorie zaměří na jednu určitou látku, které bude věnována i praktická část.

Cílem praktické části je změření cytotoxicity vybrané látky pomocí MTT testu, který bude prováděn na lidských jaterních buňkách SNU-475. Nezbytnou součástí metodiky je seznámení se se zásadami práce s buněčnými liniemi.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 Antibakteriální látky v kosmetických produktech

Kosmetika je definována jako prostředek přispívající k očištění lidského těla, ke kráse, k přitažlivosti, ke změně rysů, udržení mladé pleti a zdravých vlasů. Musí být pro lidský organismus šetrná, přichází totiž do styku s lidskou pokožkou v časovém rozmezí i několika desítek let. Kosmetické přípravky si lze libovolně vybírat, čímž se výrazně odlišují od léčiv, u nichž je použití a dávkování předem stanoveno, a i právě proto je nutné u kosmetiky zajistit její bezpečnost [1].



Obrázek 1 – Kosmetické obaly [2]

Kosmetické přípravky se vyrábějí v nesterilním, ale hygienicky kontrolovaném prostředí, nicméně může dojít k neúmyslné kontaminaci, jak na úrovni výroby, tak i při používání spotřebitelem. Kosmetické produkty představují za vhodných fyzikálně-chemických podmínek prostředí, jež je bohaté na živiny, což podporuje růst kontaminujících mikroorganismů. Proto dochází k úpravě kosmetických produktů, aby se zabránilo změnám, které se v produktu vytvářejí jak kvůli přítomnosti mikroorganismů, tak i v důsledku působení vzdušného kyslíku. K prevenci těchto účinků se mohou použít dvě odlišné skupiny látek. První skupinou jsou antimikrobiální konzervační látky, jež

mají vliv na mikroorganismy, druhou skupinou jsou antioxidační konzervační látky, schopné potlačovat oxidační jevy a tvorbu volných radikálů [3; 4].

Dle právních předpisů jsou konzervační látky přírodního či syntetického původu a slouží k potlačení rozvoje mikroorganismů. Tato inhibice by měla být účinná v širokém spektru působení a měla by mít trvání delší než samotný kosmetický přípravek. Ideální konzervační systém (vnitřní nebo vnější) by tedy měl chránit výrobek před mikrobiální degradací, a to jak v původním uzavřeném obalu až do prvního použití, tak v otevřeném obalu po celou dobu jeho používání. Dále by antimikrobiální aktivita měla mít takovou účinnost, aby se zabránilo adaptaci mikroorganismů a vzniku jejich rezistence [3; 4].

Vzhledem k množství použité antimikrobiální látky rozdělujeme látky na účinné a konzervační. U účinných látek se používají vysoké koncentrace antimikrobiálních látek a užívají se v antimikrobiální kosmetice, zatímco u látek konzervačních pracujeme s nižšími koncentracemi a jsou přítomné ve většině kosmetických přípravků [4].

Studie ukázaly, že mezi nejčastěji se vyskytujícími se bakteriemi v kosmetice patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter gergoviae* a *Serratia marcescens*. Kůže a sliznice jsou před mikroorganismy do určité míry chráněny, nicméně jejich přítomnost v produktech může zvýšit riziko mikrobiální infekce [4].

Nejčastěji používané antibakteriální látky lze rozdělit dle jejich chemické podstaty na:

- organické kyseliny;
- alkoholy a fenoly;

- aldehydy;
- uvolňovače (donoři) formaldehydu;
- isothiazolinony;
- biguanidy;
- kvartérní amoniové sloučeniny;
- dusíkaté sloučeniny;
- deriváty těžkých kovů;
- anorganické sloučeniny.

Každá z těchto konzervačních skupin má jiný způsob a spektrum účinku v závislosti na koncentraci a složení. Použití některých konzervačních látek může být zcela omezeno nebo může být omezena jejich koncentrace dle typu výrobku a oblasti použití. Například u oplachujících se přípravků, jako je šampon, se bude obvykle méně omezovat ve srovnání s přípravky, které se používají po umytí, jako jsou hydratační přípravky, u nichž dochází k dlouhodobému kontaktu s pokožkou [4].

## **3.2 Mechanismy účinku antibakteriálních látek**

### **3.2.1 Organické kyseliny**

Pro organické kyseliny je z chemického hlediska typický kladně polarizovaný atom vodíku. Organické kyseliny mají široké antimikrobiální spektrum, aktivita jednotlivých kyselin se liší v závislosti na několika vnitřních nebo vnějších faktorech, včetně změny potenciálu vodíku (pH). Organické kyseliny inhibují růst bakterií několika mechanismy. Prvním z nich je okyselení vnějšího prostředí, čímž se stává nepříznivým pro jejich růst. Mezi takto působící kyseliny řadíme kyselinu mravenčí, octovou, propionovou, máselnou a benzoovou. Druhým mechanismem je okyselení cytoplazmy, jež vzniká průnikem nenabitých organických kyselin do buněk, kde vnitřní pH vyvolá disociaci na ionty, které

následně snižují ono vnitřní pH. Tento děj ovlivňuje izoelektrický bod funkčních enzymů zapojených do glykolýzy, buněčnou signalizaci, aktivní transport a proton-motorické síly. Takový mechanismus účinku pozorujeme například u kyseliny propionové, benzoové, mravenčí nebo sorbové. Dalšími cestami účinku jsou změny tekutosti membrány, chelatace a eliminace klíčových nutričních stopových prvků nebo kovových iontů mikrobiálního obalu a jejich komplexací se záporně nabitými aniontovými kyselinami, dále také inhibice enzymů buněčného metabolismu, jako je inhibice fumarázy, aspartázy, sukcinátdehydrogenázy kyselinou sorbovou nebo inhibice aktivního transportu některých amino- a oxokyselin kyselinou benzoovou [4; 5].

### 3.2.2 Alkoholy, fenoly

Alkoholy představují chemické sloučeniny, jejichž hydroxylová skupina je vázána na  $sp^3$ -hybridizovaný atom uhlíku, zatímco u fenolů je skupina navázaná na  $sp^2$ -hybridizovaný atom uhlíku aromatického kruhu. Alkoholy a fenoly mají baktericidní účinek zejména u bacilů rezistentních vůči kyselinám. Základem mechanismu účinku alkoholů je denaturace proteinů či inhibice syntézy několika cestami. Jednou z cest je lýza membrán bakterií, kterou při nízkých koncentracích může vyvolat benzylalkohol a fenoxylethanol. Denaturace struktury proteinů probíhá vazbou na zbytky aminokyselin. Pokud se pohybujeme v nízkých koncentracích, fenoxylethanol také narušuje proton-motorickou sílu a triclosan inhibuje enzymy pro biosyntézu mastných kyselin. U parabenů je známo více mechanismů účinku, patří mezi ně například inhibice syntézy proteinů, DNA a RNA, ovlivnění transportu živin přes membránu a inhibici růstu bakterií otevřením membránových kanálů, následované kolapsem buněčného turgoru a únikem cytoplazmatického obsahu [4; 5; 6].

### 3.2.3 Aldehydy a formaldehydy uvolňující látky

Aldehydy jsou látky obsahující karbonylovou skupinu, ke které je navázán alespoň jeden atom vodíku. Aldehydy mohou reagovat s chemickými skupinami (amino, karboxy, thiol, hydroxyl, imino a s amidovými substituenty) na biomolekulách, včetně proteinů a DNA. Zástupcem aldehydů je formaldehyd, jehož mechanismus účinku spočívá v zesíťování proteinů, které vede k agregaci proteinů, což má za následek nevratnou chemickou modifikaci vedoucí k inhibici metabolismu a buněčného dělení [4].

Uvolňovače formaldehydu nelze klasifikovat jako jednotnou skupinu chemických sloučenin, jelikož jejich reaktivita není omezena pouze na uvolňovaný formaldehyd. V některých případech byla prokázána jak přímá reakce s celou molekulou, tak i reakce jejích degradačních produktů. Například u bronidoxu a bronopolu je mechanismem účinku oxidace thiolu bílkovin, která způsobí inhibici enzymatické aktivity a následné utlumení mikrobiálního růstu [4; 5; 7].

### 3.2.4 Isothiazolinony

Isothiazolinony (isothiazolin-3-ony) jsou organické sloučeniny obsahující pětičlenné heterocyklické kruhy. Isothiazolinony se používají v kosmetice pro svou bakteriostatickou a fungistatickou aktivitu. Jsou schopné difundovat přes buněčnou membránu bakterií. Ve vnitrobuněčném prostředí může elektronově deficitní síra ve vazbě s dusíkem reagovat s aktivními místy bílkovin nukleofilních skupin buněčných složek, jako jsou thioly z cysteinů či glutationů, čímž zablokuje jejich enzymatickou aktivitu a v konečném důsledku způsobí buněčnou smrt [8].



### 3.2.5 Biguanidy

Biguanidy představují sloučeniny, ve kterých jsou dvě guanidinové části sloučeny do konjugovaného systému, jenž je vysoce bazický, a proto jsou k dispozici ve formě solí. Biguanidy jsou již historicky dlouhou dobu známy svou antimikrobiální aktivitou proti široké škále grampozitivních a gramnegativních bakterií, plísní, kvasinek a virů. Bylo zjištěno, že podstatná není bisbiguanidová struktura, ale dlouhý alkylový řetězec, který zvyšuje rozpustnost molekuly v lipidech. Aby sloučeniny vykazovaly antibakteriální aktivitu, měly by být lipofilní, bazické, tedy s kladným nábojem, jež je klíčový pro narušení fosfolipidové dvojvrstvy, a tudíž i pro zajištění oné antibakteriální aktivity. Biguanidy tedy způsobují trvalé poškození buněčné membrány zvýšením propustnosti buněk – zpočátku se uvolňují draselné ionty, které jsou následované anorganickým fosforečnanem a pentosovými cukry. Látka polyhexamethylen biguanid se účinně váže s nukleovými kyselinami, při vyšších koncentracích dochází k takovému narušení DNA, které vede k buněčné smrti [9].

### 3.2.6 Kvartérní amoniové sloučeniny

Většina antibakteriálních polymerů je kladně nabitá, jelikož bakteriální buněčná stěna obsahuje až ze 70 % fosfatidylethanolamin a má tedy oproti polymerům záporný náboj. V případě kvarterních amoniových sloučenin (KAS) zajišťuje kladný náboj kvartérní amin v obecné chemické struktuře  $NR_4^+$ , kdy R představuje uhlovodíkové zbytky, jež jsou navázané na kladně nabitý dusík (N). Antibakteriální aktivita KAS závisí tedy na povaze organických sloučenin navázaných na dusík, na protiiontu, délce řetězce a počtu atomů dusíku přítomných ve struktuře. Alespoň jeden ze substituentů by měl být dlouhý alkylový řetězec, protože ten poskytuje hydrofobní segment kompatibilní s dvojvrstvou vnější buněčné stěny bakterií. Obecně se má za to, že kvartérní amoniové sloučeniny využívají mechanismu tzv. kontaktního zabíjení, kdy

dlouhý lipofilní řetězec proniká do membrány bakterií, váže se na její složky a způsobuje únik cytoplazmatického materiálu. Účinky KAS jsou rozděleny podle koncentrace, kdy při nízkých koncentracích vyvolávají ztrátu osmoregulační schopnosti iontů a při středních koncentracích narušují systémy spojené s membránou, jako je respirace, transport rozpuštěných látek a biosyntéza buněčné stěny. Při vysokých koncentracích rozpouštějí složky buněčné membrány tvorbou micelárních agregátů. KAS mohou také denaturovat strukturní proteiny a enzymy vyvoláním ultrastrukturálních změn a látka cetyltrimethylamonium bromid působí na DNA tím, že se váže na nukleové kyseliny a vyvolává jejich vysrážení. Protiiionty mají antibakteriální aktivitu pouze pokud mění rozpustnost svých hostitelských polymerů [4; 10; 11].

### 3.2.7 Dusíkaté sloučeniny

Dusík je ze všech prvků skupiny V.A nejvíce elektronegativní, tím propůjčuje sloučeninám vysoký stupeň reaktivity. O vztahu mezi chemickou strukturou a antibakteriální aktivitou alkyl-amidů a aminů byla provedena studie, v níž autoři došli k následujícím závěrům. Pokud se aminy a amino-sloučeniny nacházejí ve fyziologickém stavu, tak grampozitivní bakterie jsou k působení aminů citlivější než gramnegativní, přičemž substituované amidy C8 až C12 jsou nejaktivnější. V případě N-amidu na C18 se zdá, že přidání jedné epoxidové skupiny přispívá k antibakteriální aktivitě více než nenasycení nebo halogenace. Přídavek druhé epoxidové skupiny však tuto aktivitu nezlepšuje, nižší alkyl amid C12 je aktivnější než amidy s delším řetězcem. Oproti tomu se ukazuje, že přídavek druhé amidové skupiny v poloze 9 nebo 10 amidového alkylu zvyšuje antibakteriální aktivitu. Struktury obsahující pyridinovou část jsou díky strukturní podobnosti s nikotinamidem a pyridoxalem také vynikajícími antibakteriálními látkami [4].

Z dusíkatých sloučenin má pyrithion zinku a triclocarban široké spektrum antibakteriálních účinků, avšak triclocarban není aktivní proti gramnegativním bakteriím. Pyrithion zinku účinkuje pomocí dvou mechanismů, při prvním dochází k inhibici transportu přes membránu a k její depolarizaci, může docházet také k inhibici proton-motorové síly či začne působit jako komplex kovů. Triclocarban působí na membránu tím, že ničí její polopropustný charakter. Také vyvolává lýzu protoplastů v chloridu amonném tím, že zvyšuje propustnost pro chlorid [4].

### 3.2.8 Deriváty těžkých kovů

Některé kovy jsou součástí kosmetických výrobků jako konzervační látky, protože mají antibakteriální, ale také antimykotické vlastnosti. Mechanismus antibakteriálního působení kationtů těžkých kovů se liší kvůli rozdílům v chemických vlastnostech a v jejich účinku na různé biochemické dráhy v buňce. Tyto účinky mají za následek narušení normální funkce buněk mikroorganismů, což vede k nevratnému poškození a smrti buněk. Kationty kovů interagují s intracelulárními skupinami a mohou se zabudovat do buněčné membrány, což způsobí ztrátu její tekutosti. Následuje transport do buněčné cytoplazmy, kde inhibují životně důležité biochemické procesy, a tím narušují normální růst. V cytoplazmě mohou kationty kovů ovlivňovat různé buněčné procesy, mohou se například vázat na thiolové skupiny, což vede k inhibici různých enzymů [12; 13].

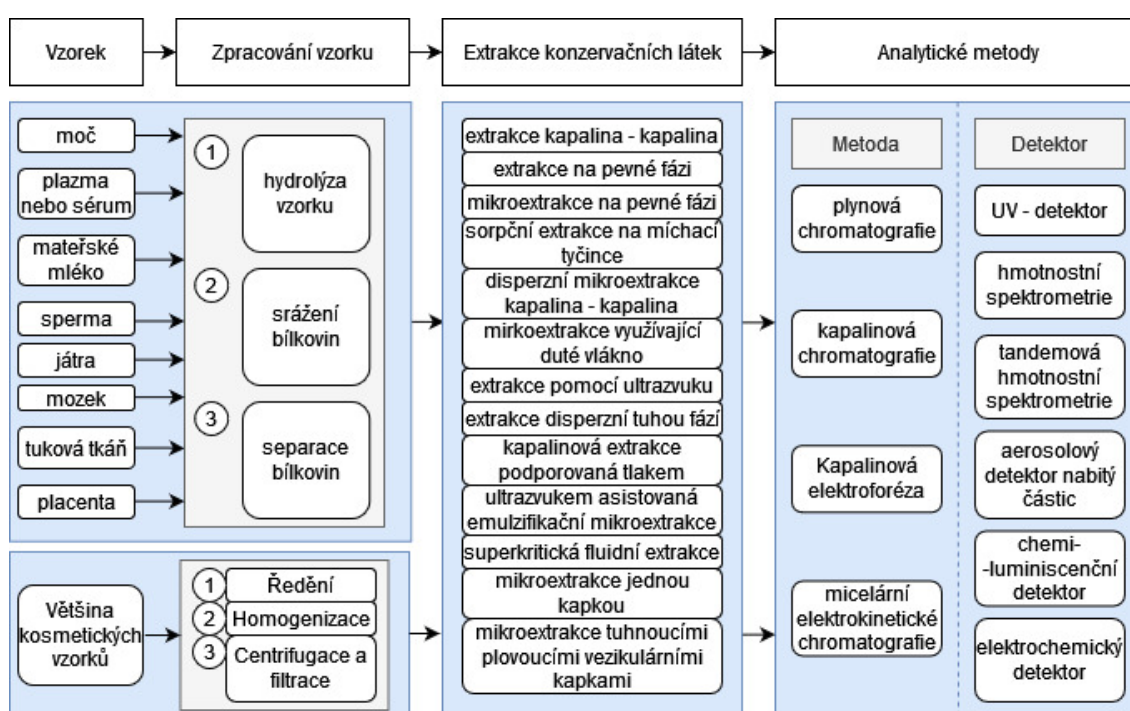
### 3.2.9 Anorganické sloučeniny

Tuto třídu představují anorganické siřičitany a hydrogensiřičitany. Hlavním faktorem ovlivňujícím jejich antibakteriální aktivitu je pH. Siřičitany pasivně difundují přes mikrobiální membránu. Mechanismy účinku siřičitanů závisí na reakcích s buněčným adenosintrifosfátem a na blokování disulfidových vazeb

cystinu, což vede k inhibici několika enzymů buněčného metabolismu, např. glykolýzy [4].

### 3.3 Stanovení antibakteriálních látek

Nedílnou částí procesu výroby kosmetických produktů a zjištění koncentrace antibakteriálních látek v těle, představuje jejich analytické stanovení z příslušného vzorku. Zjednodušený proces je znázorněn na Obrázku 2 [14; 15].



Obrázek 2 – Diagram stanovení antibakteriálních látek (zdroj vlastní, dle [16])

#### 3.3.1 Úprava vzorku

Tkáňové vzorky a tekutiny jsou zpracovány stejným způsobem. U orgánů, jako jsou například játra, mozek a tuková tkáň, probíhá před samotným zpracováním homogenizace. U placenty se používá homogenizační ultrazvuková sonda, umožňující rozrušení tkáně, která je poté protřepávána s deionizovanou vodou. Takto zpracované vzorky se hydrolyzují pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové či sírové nebo pomocí enzymů

$\beta$ -glukuronidázy či sulfatázy. Druhým krokem je precipitace proteinů za použití chladného acetonitrilu, methanolu nebo kyseliny mravenčí. Po precipitaci jsou proteiny odděleny pomocí centrifugace [14].

U většiny kosmetických prostředků probíhá prvním krokem přípravy vzorků ředění vhodným rozpouštědlem, jako je methanol, ethanol, ethylacetát či acetonitril, lze také ředit pufrům. Cílové složky se dají rovněž extrahovat organickými nebo hydro-organickými směsmi. Vzorek se po ředění zhomogenizuje mícháním na vortexu. Posledním krokem je centrifugace, popřípadě filtrace, prováděná pro odstranění nerozpustné frakce z kosmetické matrice [15].

### 3.3.2 Extrakce konzervačních látek

U extrakce složek z biologických vzorků je důležité důkladně přechistit a izolovat cílové sloučeniny, jelikož se jedná o složité matrice, často s nízkou koncentrací analytu. Mezi extrakční metody, které jsou široce používány, se řadí extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na pevné fázi (SPE). Pro zvýšení koncentrace a snížení množství rozpouštědla se využívají mikroextrakční techniky, jako je mikroextrakce na pevné fázi (SPME), sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE), disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) nebo mikroextrakce využívající duté vlákno (HF-LPME) [14].

Pro extrakci z kosmetických produktů jsou využívány některé metody jako pro extrakci biologických vzorků, jsou jimi například SPE, SPME, SBSE, DLLME. Mezi další používané techniky patří extrakce pomocí ultrazvuku (UAE), extrakce disperzní tuhou fází (MSPD), kapalinová extrakce podporovaná tlakem (PLE), ultrazvukem asistovaná emulzifikační mikroextrakce (USAEME), superkritická fluidní extrakce (SFE), mikroextrakce jednou kapkou (SDME) a mikroextrakce tuhneoucími plovoucími vezikulárními kapkami (SFVCDME) [15].

### 3.3.3 Analytické metody

Nejvíce používanou metodou pro detekci a kvantifikaci kosmetických konzervantů z biologického materiálu je plynová (GC) a kapalinová chromatografie (LC), jež se nejčastěji využívají ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) či tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Kapilární elektroforéze (CE) je prováděna také, avšak s menší frekvencí kvůli vysokým hodnotám mezi detekce oproti LC a GC. Jelikož se GC používá pro stanovení těkavých látek, je pro většinu případů nutná derivatizace látek ve vzorku. Pro potřeby derivatizace se uplatňují silylační nebo acylační činidla [14].

U vzorků pocházejících z kosmetických produktů představuje problém složitost i již extrahované směsi, která může obsahovat odlišné třídy jednotlivých složek, z tohoto důvodu se přistupuje k separačním metodám. Historicky se aplikovaly metody jako tenkovrstevná chromatografie (TLC) a elektroforetické metody. V dnešní době se používají metody shodné pro analýzu konzervantů z biologických vzorků, LC, GC, CE, a také micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Tyto metody jsou spojeny s různými selektivními detektory, z nichž je dle literatury nejběžnější detektor pro ultrafialové světlo (UV). Další často využívané detektory jsou chemiluminiscenční, elektrochemické, lze také použít MS, detektory hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem či aerosolový detektor nabitých částic [15].

## 3.4 Antibakteriální látky v kosmetice s vlivem na lidské zdraví

Trend spotřeby kosmetiky v posledních letech neustále narůstá. Se spotřebou výrobků ovšem narůstají i přísady dalších chemických složek, jako jsou vonné látky, povrchové aktivní látky a látky konzervační. Určité chemikálie ovšem mohou mít na lidský organismus negativní dopad. V následující kapitole bude některým z těchto látek věnována pozornost [17; 18].

### 3.4.1 Parabeny

Z chemického hlediska jsou parabeny (PB) estery kyseliny 4-hydroxybenzoové s arylovými (fenyl, benzyl) nebo alkylovými (butyl, ethyl, isobutyl, heptyl, methyl, propyl, isopropyl, pentyl) substituenty. Jako konzervanty v kosmetických přípravcích byly poprvé použity kolem poloviny 20. let 20. století, to odstartovalo jejich hojně aplikování. Mezi jejich výhodné chemické vlastností se řadí široké spektrum účinnosti na mikroorganismy, relativní chemická stabilita pro pH a teplotu, a především nízká výrobní cena. Na přelomu tisíciletí ovšem bylo publikováno několik studií, které naznačily estrogenní aktivitu a karcinogenní potenciál parabenů. Evropská unie tedy jejich užívání v kosmetice značně reguluje. Použití isopropylparabenu, isobutylparabenu, fenylparabenu, benzylparabenu a pentylparabenu jako antibakteriálních látek je dle Nařízení Komise (EU) č. 358/2014 zakázáno. Zatímco pro chemikálie jako methylparaben a ethylparaben je maximální povolená koncentrace 0,4 % v případě použití jednoho esteru, pro směs esterů činí koncentrace v přípravku 0,8 %, u butylparabenu a propylparabenu je maximální hranice 0,14 % pro součet jednotlivých koncentrací. V důsledku celosvětového rozšíření parabenů ve výrobě a užívání jsou detekovatelné ve všech složkách životního prostředí, avšak z něj je expozice pro člověka prakticky zanedbatelná oproti expozici z produktů osobní hygieny [18; 19; 20; 21].

Vliv PB na lidské zdraví patří mezi velmi kontroverzní témata. Přítomnost PB byla pozorována v lidském séru, moči, mateřském mléce, spermatu, plodové vodě a tukové tkáni, ale také v placentě a tkáni lidského karcinomu prsu, což odráží, jaké expozici je lidský organismus vystaven. Avšak u nálezů PB v lidských tkáních a tekutinách nebyl prokázán důkaz o toxicitě související s jejich přítomností. Při studiích na zvířatech byl objeven značný vliv PB na reprodukci, vývoj a homeostázu. Se současnou zátěží PB pro lidský organismus, se zdá být působení v těchto ohledech na člověka zanedbatelné. Přesto některé

studie našly určitý vztah koncentrací PB v moči s výskytem biomarkerů oxidačního stresu a s inverzními hladinami hormonů štítné žlázy v séru. V roce 2009 výzkum potvrdil proliferaci buněk lidského karcinomu prsu (MCF-7) při kombinované expozici PB, samostatné PB tuto schopnost nevykazují. I přesto, že nadále chybí přesnější vědecké poznatky o vlivu PB na lidské zdraví, je důležité tyto látky považovat preventivně za nebezpečné a je zapotřebí provést další výzkumy, které uzavřou kontroverzi vztahující se k tématu [19; 22; 23; 24].

### 3.4.2 Formaldehyd a jeho uvolňovače

Formaldehyd (FA) je nejjednodušším aldehydem, u kterého se využívá baktericidních a fungicidních vlastností a je běžně přítomen v potravinách, kosmetice, léčivých přípravcích, ale například i v prostředcích pro domácnost. V minulosti byly provedeny studie, které odhalily nežádoucí účinky FA na organismy. Dokázala se cytotoxicita pro lidské lymfocyty, NK buňky, endoteliální buňky a pro epitelální buňky bronchů. Byla studována souvislost FA a leukémií, pro kterou vědci doporučili další výzkum. Těmito faktory jsou nejohroženější skupinou pracovníci výroby FA. V roce 2006 Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny zařadila FA na seznam karcinogenů pro člověka na základě dostatečných důkazů získaných u lidí a pokusných zvířat [18; 25; 26; 27].

Dále se v kosmetických produktech uplatňují uvolňovače formaldehydu (FR), jedná se o skupinu přibližně 40 látek, které v důsledku rozkladu nebo chemické syntézy uvolňují FA. Mezi nejvýznamnější FR používané v kosmetice se řadí diazolidinyl urea, dimetylol dimetyl (DMDM) hydantoin, imidazolidinyl urea a bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol). Do této skupiny patří i quaternium-15, pro které ovšem v Evropské unii od roku 2019 platí zákaz užívání v kosmetických přípravcích, stejně jako pro FA. Maximální povolené koncentrace dle legislativy EU pro výše zmíněné látky jsou 0,1 % pro bronopol,

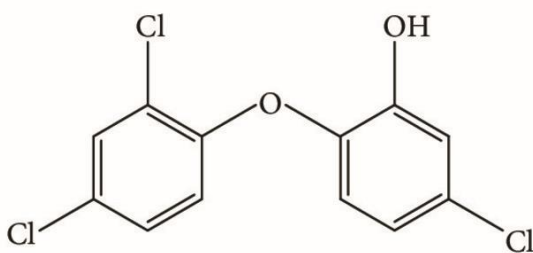


0,5 % pro diazolidinyl ureu, 0,6 % pro imidazolidinyl ureu a DMDM hydantoin. Kromě širokého užívání FA a FR v mnoha odvětvích, jsou látky hojně rozšířeny i do životního prostředí. Tento celkový profil dělá z FA všudypřítomný alergen a přispívá ke vzniku kontaktní alergie a alergické kontaktní dermatitidy – těmi trpí při používání kosmetiky především ženy středního věku. V Evropě díky omezením byla v posledních letech zaznamenána stabilní až klesající prevalence kontaktní alergie. Studie z roku 2018 prokázala, že imidazolidinyl urea a diazolidinyl urea jsou schopny snížit životaschopnost buněk, zvýšit produkci reaktivních forem kyslíku a vyvolat apoptózu nervových progenitorových buněk potkanů. [25; 28; 29; 30; 31].

### 3.5 Triclosan

#### 3.5.1 Historie

Triclosan (TCS) neboli 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol je syntetické širokospektré antimikrobiální činidlo vyvinuté v 60. letech 20. století.



Obrázek 3 – Chemický vzorec triclosanu [32]

TCS má bílou barvu, znatelný aromatický zápach a je slabě rozpustný ve vodě. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, jako je ethanol, dimethylsulfoxid a methanol. TCS si od svého původního použití v nemocničním prostředí v roce 1972 získal svou popularitu i pro užití v průmyslu, a to díky svým antibakteriálním, antivirovým a antimykotickým vlastnostem. Jeho účinnost vedla k širokému využití v řadě spotřebních výrobků,

jako byly mýdla, ústní vody, antiperspiranty, ale i kuchyňské vybavení, oděvní textilie, ložní prádla, plasty a hračky. Od roku 1977 do roku 2014 se světová výroba TCS zvyšovala. V září 2016 Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) zakázala používání TCS v mýdlových výrobcích. TCS je však stále povolen v zubních pastách, dezinfekčních prostředcích na ruce a ústních vodách. Podle poslední aktualizace Annex V. (11.09.2020) Evropské unie je povolena maximální koncentrace 0,3 % pro zubní pasty, mýdla na ruce, sprchová mýdla/gely, deodoranty (bez spreje), pudry na obličej, korektory a pro přípravky na čištění nohou a rukou před aplikací umělých nehtů. Druhá maximální koncentrace činí 0,2 % a je určena pouze pro ústní vody [33; 34; 35].

### 3.5.2 Mechanismus účinku

Jak již bylo zmíněno v kapitole výše, triclosan chemicky patří mezi fenoly a jeho mechanismus účinku je založen především na inhibici biosyntézy mastných kyselin. Studie na některých bakteriích prokázaly, že inhibuje redukovanou nikotinamidadeninukleotid (NADH) nebo nikotinamidadeninukleotidfosfát dependentní acyl-nosný protein (NADPH – dependentní ACP) reduktázu (FabI nebo jejího homologa InhA), což následně ovlivňuje syntézu lipopolysacharidů, lipoproteinů a fosfolipidů, které jsou důležité pro mnoho buněčných procesů a struktur, jako je funkce buněčné membrány a jejich proteinů a také aerobní dýchání. Principem inhibice je obsazení enoylového substrátového místa na reduktáze TCS, čímž se rapidně zvýší afinita k NAD<sup>+</sup>. Dojde k navázání MEKCTLC<sup>+</sup>, díky čemuž nemohou probíhat poslední reakce prodlužování mastných kyselin. V některých hypotézách byla zmíněná i inhibice RNA při vyšších koncentracích TCS (2 – 20 mg · ml<sup>-1</sup>), zatím však neexistují přesvědčivé experimentální důkazy tohoto procesu [4; 36; 37].

### 3.5.3 Metabolismus

Hodnota tělesné zátěže závisí na třech bodech: na měřeném místě (př. kůže, krev, moč), na koncentraci a na typu expozice. K expozici TCS dochází především prostřednictvím spotřebitelských výrobků, které ho obsahují, přičemž je více než 80 % tvořeno kosmetikou, spolu s výrobky pro osobní péči a prostředky pro domácnost. Ke kontaktu s látkou ovšem může docházet i ze životního prostředí, a to prostřednictvím vody, živočišných či potravinových produktů kontaminovaných TCS. Vstřebávání TCS může probíhat přes kůži, přispívají k tomu lipofilní vlastnosti TCS. Další možností je vstřebávání přes sliznici dutiny ústní, případně po orální expozici přes gastrointestinální trakt [18; 34; 38].

Metabolismus látky v těle probíhá ve dvou fázích. Ve fázi I. dochází k hydroxylaci TCS, ve fázi II. jsou hlavními procesy glukuronidace a fosforylace, kdy se k hydroxylové skupině TCS přidá kyselina glukuronová či sulfát. Tímto procesem dochází ke snížení cytotoxicity TCS. Hlavním orgánem metabolismu TCS jsou játra, avšak malé množství TCS je metabolizováno i v kůži, kde ovšem zůstává vyšší procento mateřského nezměněného TCS oproti metabolitům. TCS může rovněž podléhat metabolismu prostřednictvím cytochromu P450 (CYP450), který také snižuje cytotoxicitu TCS. V lidských buňkách CYP450 zajišťují štěpení difenyletherové vazby TCS, z čehož mohou vznikat tři metabolity: 4-chlorkatechol, 5'-hydroxytriklosan a 2,4-dichlorfenol. Primární cestou eliminace TCS u lidí je moč, sekundární je eliminace stolicí [34].

### 3.5.4 Vliv na lidské zdraví

Během několika posledních let se literatura o možných nepříznivých zdravotních účincích způsobených TCS rozšířila z prakticky neexistující na poměrně rozsáhlou. Epidemiologické studie odhalily přítomnost TCS nejen

v moči, ale také v mateřském mléce a krvi, což vyvolává obavy ohledně stálé expozice TCS a jejich vlivů na naše zdraví [18; 34].

Na úrovni buňky se jedná o účinky, které ovlivňují metabolické dráhy. V roce 2015 bylo zjištěno, že TCS působí jako rozpojovač komplexu V, adenosintrifosfát syntázy. Rozpojení mitochondrií, narušení membránového potenciálu a energetická deprivace se vyskytly v dalších studiích na různých modelech, například u jaterních mitochondrií (HepG2) a žírných buňkách (RBL-2H3) potkanů, na lidských žírných buňkách (HMC-1) a primárních keratinocytech a v poslední řadě i na myších fibroblastech (NIH-3T3). Mezi další působení TCS se řadí narušení homeostázy vápníku a zinku, což může mít za následek i narušení imunitního systému. TCS způsobuje oxidační stres, ohledně kterého proběhly studie na lidských buňkách periferní krve (PBMC), folikulárních buňkách štítné žlázy (Nthy-ori 3-1) a buňkách retinoblastomu (Y79 RB). Oxidační stres byl sledován také u těhotných žen, kdy bylo oxidační poškození měřeno 8-hydroxyguanosinem, tato pozorování se shodovala v Portoriku, Brazílii a Číně, jinde ve světě zatím nebyl zjištěn tento vztah mezi TCS v moči a 8-hydroxyguanosinem. Výzkumy byly prováděné i na myších a potkanech, přičemž po podání TCS probíhala snaha organismů o antioxidantaci. Toxicita látek závisí především na interakci s DNA. Ačkoliv proběhlo několik testování, v roce 2014 bylo prokázáno, že TCS je genotoxický výhradně *in vitro*, ne *in vivo* [33; 39; 40; 41].

Několik vědeckých studií se zabývalo vlivem TCS na endokrinní systém několika druhů organismů. U ryb se po vystavení nanomolárním koncentracím TCS zvýšila hladina jaterního vitellogeninu, prekursoru vaječného žloutku, jež představuje biomarker endokrinního narušení, v dalším výzkumu byl pozorován pokles počtu spermií. Snížení hladin hormonů, jako je progesteron, estradiol a testosteron, v séru nastalo u potkanů, kterým byl podáván TCS

perorálně, u mláďat docházelo k poklesu hladiny tyroxinu. U myší došlo ke snížení hladin tyroxinu i trijodtyroninu, mechanismus se zatím odhaduje na regulaci enzymů CYP450 fáze I a glukuronyltransferázy a sulfonyltransferázy fáze II. U lidí byla objevena spojitost s nízkou hladinou tyroxinu u matky a zhoršením kognitivních funkcí u dítěte, avšak doposud nebyla publikována studie, která by přímo zkoumala účinky TCS na kognitivní funkce. Otázka, zda je TCS karcinogenní, přetrvává dodnes. Vědci sice poskytli své výzkumy o karcinogenních účincích, ale pouze na zvířecích modelech. V dostupných údajích představuje TCS karcinogenní látku pouze u myší, a to pro játra a tlusté střevo. Nepřímou souvislost s karcinogenitou ovšem ukázala studie zkoumající NK buňky *in vitro*, kdy při šestidenní inkubaci s TCS o koncentraci 1  $\mu$ M, snížil TCS schopnost NK buněk lyzovat nádorové buňky. Některé vědecké publikace poukazují i na schopnost TCS způsobovat fibrotizaci tkání, která v pokusech nastala u myších jater a ledvin [33; 34; 41].

U TCS byl mimo jiné objeven možný terapeutický účinek pro nádorové buňky, jenž využívá jeho mechanismu inhibice tvorby mastných kyselin a následné apoptózy. Podařilo se to u buněk karcinomu prsu (MCF-7, SKBr-3), lidských melanomových buněk (A-375) a buněk karcinomu prostaty (IC50). Omezené informace z vědeckého bádání ale naznačují, že zvířatům, která již trpí existujícím nádorem, podávání TCS neprospívá, dokonce vede ke zhoršení jejich celkového stavu [33].

Navzdory narůstajícímu počtu provedených výzkumů se stále debatuje o účincích TCS na lidské zdraví a pokud existují, tak jaké koncentrace jsou pro člověka nebezpečné. Ovšem skutečnost, že byla objevena přítomnost v lidských tekutinách obyvatel různých věkových kategorií po celém světě, značí, že jsme celoživotně vystaveni působení TCS, s jehož bioakumulativní povahou by měly být možné zdravotní důsledky pečlivě přezkoumány [33; 41].

## 4 METODIKA

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na změření cytotoxicity antibakteriální látky TCS na jaterní buněčné linii SNU-475. Pokus byl proveden pomocí MTT testu, cytotoxicita se stanovovala po 24, 72, 120 a 168 hodinách inkubace s TCS. Experiment proběhl na Fakultě biomedicínského inženýrství Českého vysokého učení technického v Laboratoři biovzorků a v Laboratoři molekulární biologie.

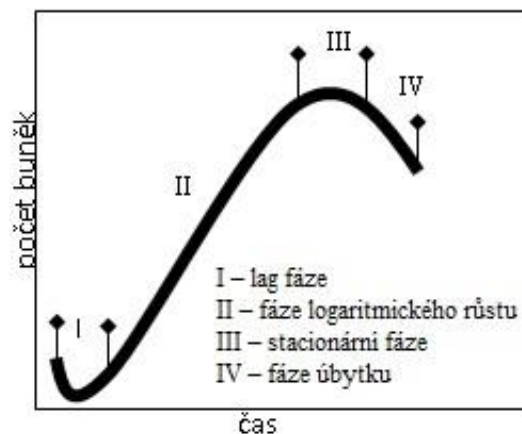
### 4.1 Použité metody

#### 4.1.1 Kultivace buněk

Experimenty na buněčných kulturách *in vitro* napomáhají k pochopení fyziologických a patologických procesů, k testování potenciálně léčivých přípravků, ale také k testování látek toxických. Pro výzkum se běžně používají buněčné linie, které jsou charakteristické uniformitou buněk a jejich nekonečnou možností dělení. To je zajištěno změnou jejich genetické informace, nebo buňky mohou pocházet již z nádorově změněné tkáně. Jejich udržení mimo přirozené prostředí vyžaduje speciální zacházení a laboratorní vybavení. Kultivace savčích linií probíhá v inkubátoru při teplotě 37 °C, s 5 % CO<sub>2</sub>, takové prostředí totiž nejvíce odpovídá podmínkám *in vivo*. Zajišťuje se také 90% vlhkost, aby nedocházelo k odpařování živného média, které je nezbytné pro správnou výživu buněk. Tyto parametry představují standartní inkubační podmínky pro kultivaci buněk *in vitro*. Živné médium bývá složeno ze 3 základních produktů. Patří k nim kultivační média – ta jsou vytvořena uměle dle nejnужnějších nutričních potřeb konkrétních buněk. Ve většině případů je důležité doplnit kultivační médium sérem, aby buňkám nescházely např. stopové prvky, hormony, cytokiny. Tyto dvě složky ovšem vystavují buněčné kultury riziku

kontaminace, proto je poslední složkou živného média antibiotikum, popřípadě antimykotikum [42].

Růst buněk v kultuře je charakterizován růstovou křivkou, která je znázorněna na Obrázku 4.



Obrázek 4 – Růstová křivka buněčné kultury [43]

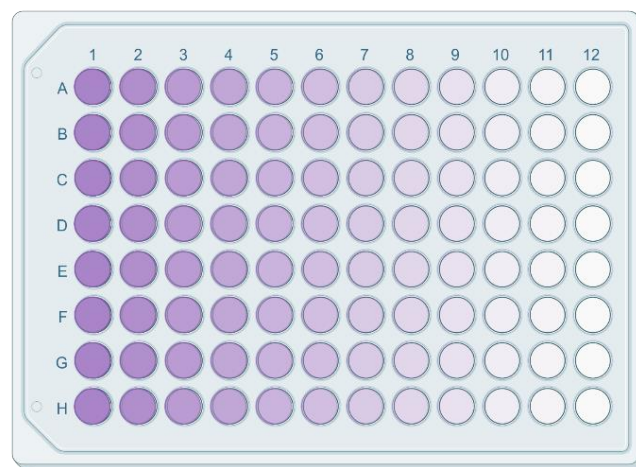
Založení kultury je počátkem tzv. lag fáze, která představuje adaptační proces buněk na nové prostředí a jejich regeneraci po zpracování, zpomaluje se či se úplně zastaví mitotická aktivita. Následuje fáze exponenciální, kdy se buňky pravidelně dělí geometrickou řadou. Lze říct, že v tomto období jsou buňky nejvíce vitální, a proto je tato fáze nejlepší pro pasážování. Z důvodu vyčerpání živin, produkce katabolických látek a úbytku prostoru kvůli dělení nastává fáze stacionární neboli plató, zde buňky setrvávají v klidové fázi. Z této fáze se překlenou do fáze deklinační, kde dochází k degradaci buněk. Aby k tomu nedocházelo, provádí se tedy již zmíněné tzv. pasážování. Jedná se o přenos buněk do nového prostředí, které jim opět zajistí ideální podmínky pro dělení [42].

Jediný možný způsob dlouhodobého zachování eukaryotických buněk je kryokonzervace. Buněčný materiál je uchováván v kryoampulích z polypropylenu v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , avšak pro potřeby

delšího skladování se buňky ukládají do tekutého dusíku. Buňky jsou před destruktivními následky mrazu chráněny kryoprotektivními látkami, jež jsou součástí kryoprotektivního média, které dále obsahuje kultivační médium, fosfátový pufr, albumin, popřípadě sérum. Zmrazování probíhá řízeně, a to pozvolným klesáním teploty o 1 až 2 °C za minutu, od teploty –40 °C je pokles teploty urychlen. Buňky lze takto skladovat několik měsíců [42].

#### 4.1.2 MTT test

Zkratka MTT testu pochází z názvu hlavní složky reakce, z methylnitrotetrazoliové soli, přesněji (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu). Jedná se o metodu, která hodnotí cytotoxické poškození buněk. Její princip je založen na vstupu methylnitrotetrazoliové soli do nitrobuňčného prostoru. Pokud je buňka živá, dochází pomocí enzymatické aktivity mitochondriální dehydrogenázy k redukci soli na formazán, tím dojde i ke změně barvy soli ze žluté na tmavě modrou až fialovou. Pro spektrofotometrické stanovení této změny je nutné krystaly rozpustit organickým rozpouštědlem, tímto krokem se ovšem znehodnotí buněčné kultury. K vyhodnocení se používají vlnové délky 540 nanometrů (nm) nebo 570 nm [42].



Obrázek 5 – Grafické znázornění zbarvení příkladu provedeného MTT testu [44]



### 4.1.3 Ultrafialová a viditelná spektrofotometrie

Ultrafialová a viditelná (UV-VIS) spektrofotometrie patří mezi optické spektrální metody, které jsou založeny na výměně energie mezi látkou a zářením. Tyto metody se dále dělí na metody emisní a absorpční. Hlavním principem absorpční metody je pohlcení (absorpce) ultrafialové nebo viditelné části elektromagnetického spektra vzorkem. Optické přístroje pro měření obou spektrálních metod nazýváme spektrometry. Mezi jejich hlavní součásti patří zdroj záření, optické prvky pro vedení paprsku přístrojem, prvek pro výběr vhodné vlnové délky, zařízení pro vzorek a detektor prošlého záření. V přístroji na určitý roztok dopadá proud světla, který nazýváme zářivý tok. Po průchodu záření vzorkem vychází tzv. prošlý zářivý tok, který je ochuzen o odražené, rozptýlené a absorbované světlo v důsledku interakce s molekulami ve vzorku. Největší část úbytku připadá absorbanci. S prošlým zářivým tokem se pojí pojem transmitance, jež představuje relativní část prošlého záření. Absorbance je záporný dekadický logaritmus transmitance, pokud by tedy byla absorpce roztoku nulová, byla by nulová také absorbance [45].

Pro praktickou část byl použit přístroj Synergy HT Biotek Multi-Detection Microplate Reader (mikrodestičková čtečka s více detekcemi). Přístroj využívá pro absorpční měření jako zdroj světla xenonovou zábleskovou lampu, pro výběr vlnové délky je použit monochromátor s difrakční mřížkou a detekce záření probíhá na fotodiodě [46].

## 4.2 Pracovní materiál a přístroje

### 4.2.1 Buněčná linie

Pro pokus byla použita lidská jaterní buněčná linie SNU-475. Jedná se o buňky, které jsou součástí sbírky buněčných linií Soulské národní univerzity

(SNU). Buňky pocházejí od korejského pacienta, trpícího karcinomem jater a hepatitidou B. Byly objednány z Americké sbírky typových kultur (ATCC) [47].

#### 4.2.2 Chemikálie

- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, šarže 0001653683);
- antibiotika Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, šarže 066M4791V);
- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) – s vysokým obsahem glukózy a s hydrogenuhličitanem sodným (D1145, Sigma-Aldrich, šarže RNBK1807);
- triclosan (Sigma-Aldrich, šarže 0000157940);
- 70% ethanol;
- roztok trypanové modři;
- 0,5% trypsin (roztok trypsin – EDTA), (Sigma-Aldrich, šarže SLBX940);
- MTT Solvent (Sigma-Aldrich, šarže SLCF4275, součást Cell Growth Determination Kitu);
- MTT Solution (Sigma-Aldrich, šarže SLCJ3260, součást Cell Growth Determination Kitu);
- dezinfekce na ruce.

#### 4.2.3 Pracovní pomůcky

- Ochranné rukavice;
- jednorázové sterilní špičky;
- odpadní nádoba;
- zkumavky (15 ml, 50 ml);
- sterilní Petriho misky s povrchem pro tkáňové kultury (TC), (Techno Plastic products);
- podložní a krycí sklo;
- 96jamková deska s povrchem pro tkáňové kultury (Thermofisher);

- sterilní plastové pipety;
- pipetovací nástavec;
- Bürkerova komůrka;
- jednokanálové pipety.

#### 4.2.4 Přístroje

- Laminární box Aura vertical S.D.4 (Bioair);
- vortexová třepačka Stuart (P-LAB a. s.);
- optický mikroskop XDS-1R (Panasonic);
- centrifuga 3-30 KS (Sigma);
- multidetekční čtečka Synergy HT (BioTek);
- inkubátor MCO-5MUV-PE (Panasonic);
- analytická váha CPA 225 D0CE (Sartorius);
- stolní počítač s programem Optika Vision a Gen5;
- hlubokomrazicí box ULT C75 (Nordic Lab).

### 4.3 Postup

Při provádění pokusu se dodržovaly metody sterilní práce a většina úkonů byla prováděna v laminárním boxu.

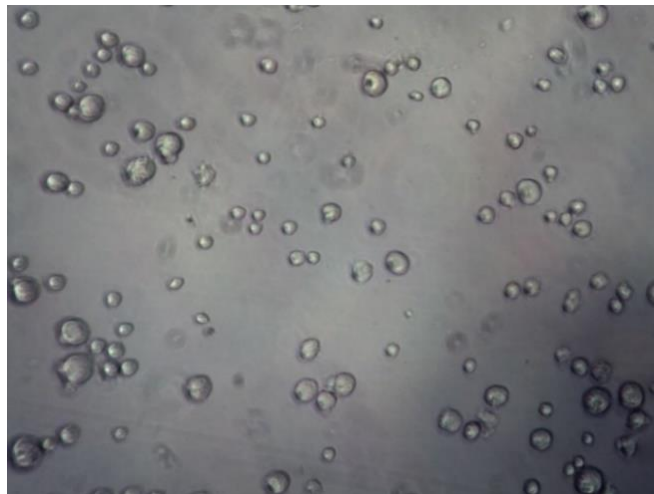
#### 4.3.1 Příprava živného média

Médium bylo připravováno ze tří složek, z 5 ml fetálního bovinního séra, z 0,5 ml antibiotik Penicilin/Streptomycin a 45 ml DMEM.

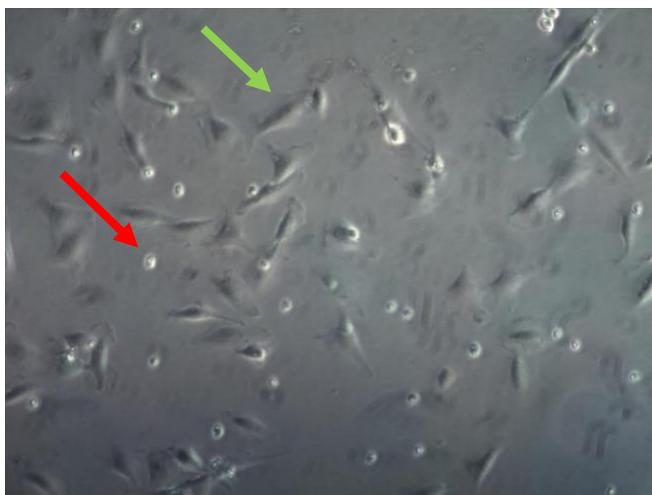
#### 4.3.2 Rozmrazení buněk

Buněčná linie se uchovávala pomocí kryokonzervace v kryoampuli v mrazicím boxu, po vyjmutí byla vložena do vodní lázně s teplotou vody kolem 35 °C na 2–3 minuty. Po rozmrazení byl obsah kryoampule o objemu 2 ml

přenesen do zkumavky o objemu 15 ml, ke kterému bylo po kapkách přikapáváno 6 ml živného média – tento postup bylo nutné dodržet, aby nedošlo k náhlé změně osmolarity a poškození buněk. Zkumavka byla uzavřena a vložena do centrifugy. Centrifugace byla provedena při 1100 otáčkách za minutu, při 27 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odlit tak, aby zbytkový objem činil zhruba 1 ml. Pelet a supernatant byly rozmíchány, načež byla výsledná suspenze přenesena do sterilní Petriho misky s TC povrchem (dále jen Petriho misky), do které bylo následovně přidáno 8 ml živného média. Takto připravená miska byla vložena na 24 hodin do inkubátoru se standartními inkubačními podmínkami uvedenými v kapitole 4.1.1. Po 24hodinové inkubaci bylo zkontrolováno uchycení tkáňových buněk v optickém mikroskopu, viz Obrázek 6. Uchycené buňky jsou na Obrázku 7 znázorněny zelenou šipkou, neuchycené neživé buňky červenou šipkou.



Obrázek 6 – Nasazení buněk SNU-475 na Petriho misku, zvětšení 100× (zdroj vlastní)



Obrázek 7 – Kontrola uchycení buněk SNU-475 po 24hodinové inkubaci, živá buňka je znázorněna zelenou šipkou a má polygonální tvar, neživá buňka je znázorněna červenou šipkou a má tvar kulovitý, zvětšení 100× (zdroj vlastní)

### 4.3.3 Pasážování a výživa buněk

Pasážování bylo opakováno každý týden, aby se předešlo překlenutí buněk do deklinační fáze z důvodu vyčerpání živin, přítomnosti metabolitů a nedostatku prostoru pro množení linie. Při pasážování bylo jako první krok provedeno odsátí živného média pomocí pipety, uchycené buňky na Petriho misce se poté promyly fosfátovým pufrém (PBS). Ten byl po promytí odsán a k buňkám byl na 5 minut přidán 0,5% trypsin. Po uplynutí 5 minut pomocí světelného mikroskopu provedena kontrola uvolnění buněk od Petriho misky a bylo přidáno 8 ml živného média pro zastavení účinku trypsinu. Suspenze byla přenesena do 15ml zkumavky a byla zcentrifugována při 27 °C a 1100 otáčkách za minutu, 5 minut. Supernatant byl odstát až na zbytkový 1 ml, ve kterém se buňky opět rozptýlily. V této části procesu bylo možné odebrat 8  $\mu$ l suspenze pro počítání buněk. Suspenze buněk se převedla do dvou nových Petriho misek – na každou misku připadlo 300  $\mu$ l buněčné suspenze a ke každé bylo přidáno 8 ml živného média. Takto připravené misky byly vloženy do inkubátoru se standardními inkubačními podmínkami. Tento proces byl před provedením MTT testu opakován třikrát, dokud nebylo dosaženo stabilizace buněčné kultury.

Výživa buněk byla prováděna výměnou živného média po 48 hodinách. Médium přítomné v Petriho misce bylo s opatrností odsáto a nahrazeno novým o objemu 8 ml.

#### 4.3.4 Počítání buněk

Před samotným počítáním buněk byl uskutečněn proces stejný jako u pasážování až po krok resuspenzace buněk. Po centrifugaci, slití supernatantu a rozptýlení buněk bylo z 15ml zkumavky odebráno 8  $\mu$ l suspenze buněk na podložní sklo, které byly smíchány s 8  $\mu$ l trypanové modře. Z této směsi bylo odebráno 8  $\mu$ l do Bürkerovy komůrky. Buňky byly počítány ve velkém čtverci (s hranou 1 mm) a výpočet buněk v 1 ml suspenze se provedl dle vzorce (1).

$$X = \frac{a \cdot 10^3}{n \cdot V} \cdot 2 \quad (1)$$

Ve vzorci  $X$  představuje koncentraci buněk v 1 ml suspenze,  $a$  značí stanovený počet buněk,  $n$  je počet spočítaných čtverců s hranou 0,2 mm a  $V$  představuje objem počítaného útvaru (0,1 mm<sup>3</sup>). Násobení číslem 2 probíhá z důvodu ředění suspenze trypanovou modří.

#### 4.3.5 Příprava roztoků triclosanu

Koncentrace roztoků TCS i počet nasazených buněk do jedné jamky mikrotitrační destičky byly zvoleny dle studie z roku 2021 od Donglei Sun [48]. TCS, jakožto látka rozpustná v organických rozpouštědlech, byla převedena na roztok pomocí ethanolu. Pomocí analytické váhy bylo naváženo 0,289 g TCS, který byl rozpuštěn ve 100 ml ethanolu, byl tedy vytvořen roztok o koncentraci 0,01 mol/l. 1 ml tohoto roztoku byl dále rozředěn 99 ml ethanolu na koncentraci TCS 100  $\mu$ mol/l. Tento roztok byl následně rozředěn živným médiem do finálního zásobního roztoku o koncentraci 10  $\mu$ mol/l o objemu 10 ml. Pro test se

použily tři koncentrace TCS: 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$ . Použité koncentrace a ředění pro zkoumání cytotoxicity jsou zaznamenány v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Koncentrace roztoků TCS použitých v MTT testu (zdroj vlastní)

	Objem zásobního roztoku ( $\mu\text{l}$ )	Objem média ( $\mu\text{l}$ )	Finální koncentrace TCS ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>Roztok 1.</b>	100	-	<b>10</b>
<b>Roztok 2.</b>	50	50	<b>5</b>
<b>Roztok 3.</b>	25	75	<b>2,5</b>
<b>Negativní kontrola</b>	-	100	<b>0</b>

Ředění bylo uskutečněno v mikrotitrační destičce za použití zásobního roztoku a živného média, objemy viz Tabulka 1. Objem v každé jamce byl roven 100  $\mu\text{l}$ . Z důvodu zajištění dostatečné výživy buněk byly roztoky měněny po 48 hodinách inkubace [48].

#### 4.3.6 Provedení MTT testu

Pro provedení MTT testu byly buňky převedeny do 96jamkové mikrotitrační destičky s polystyrenovým dnem pro jejich adhezi. Aby se dosáhlo rovnoměrného rozložení buněk ve všech jamkách, bylo provedeno počítání v Bürkerově komůrce stejným způsobem, jako popisuje předešlá kapitola 4.3.4. Do jedné mikrotitrační jamky se nasadilo 10 000 buněk v 100  $\mu\text{l}$ . Bylo obsazeno 45 jamek, což byl nejvyšší počet, kterého se dalo dosáhnout vzhledem k počtu vykultivovaných buněk. Po 24hodinové inkubaci v termostatu byla provedena kontrola uchycení buněk, viz Obrázek 8.



Obrázek 8 – Kontrola uchycení buněk SNU-475 na dno mikrotitrační destičky po 24hodinové inkubaci, zvětšení 100× (zdroj vlastní)

Po kontrole byly rozpipetovány jednotlivé roztoky TCS po tripletech, s výjimkou řádku D, do mikrotitrační destičky dle Tabulky 2.

Tabulka 2 – Rozložení roztoků v mikrotitrační destičce pro MTT test (zdroj vlastní)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	NK	NK	1	1	1	2	2	2	3	3	3
B	NK	NK	NK	1	1	1	2	2	2	3	3	3
C	NK	NK	NK	1	1	1	2	2	2	3	3	3
D	NK	NK	1	1	2	2	3	3	3	-	-	-

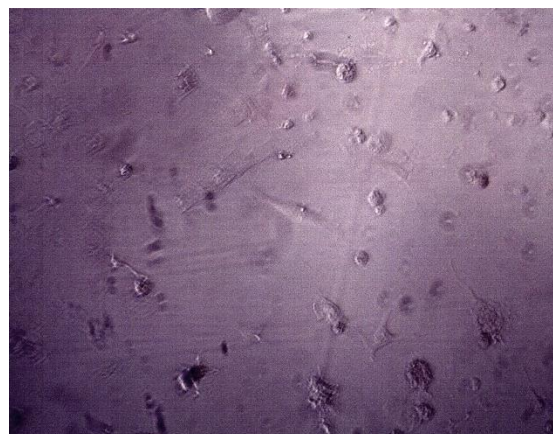
NK – negativní kontrola, 1 – roztok o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , 2 – roztok o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ , 3 – roztok o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$

Každému řádku mikrotitrační destičky byla přidělena jiná doba inkubace, pro řádek A 24 hodin, pro řádek B 72 hodin, pro řádek C 120 hodin a pro řádek D 168 h. Po příslušné době inkubace se mikroskopicky zkontrolovala životaschopnost buněk (Obrázek 9, 10) a poté bylo zrealizováno provedení samotného MTT testu pro každý řádek stejně.



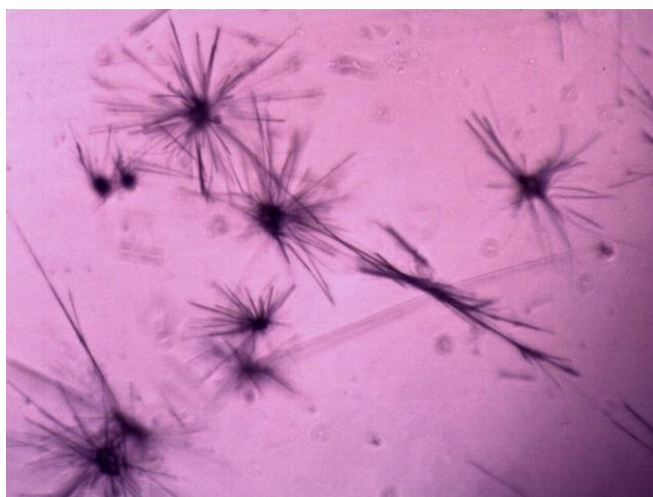


Obrázek 9 – Mikroskopická kontrola buněk SNU-475 po 72hodinové inkubaci s triclosanem o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , zvětšení 100 $\times$  (zdroj vlastní)



Obrázek 10 – Mikroskopická kontrola buněk SNU-475 po 72hodinové inkubaci s triclosanem o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , zvětšení 100 $\times$  (zdroj vlastní)

Po příslušné inkubaci byla mikrotitrační destička vyjmuta z inkubátoru a bylo k ní přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku MTT (MTT solution), který byl promíchán s původním obsahem jamky. Destička byla vrácena do inkubátoru na 4 hodiny. Po tomto časovém úseku se vykonala mikroskopická kontrola vytvoření krystalů formazanu u živých buněk, která je znázorněna na Obrázku 11.



Obrázek 11 – Krystaly formazanu vytvořené živými SNU-475 buňkami, zvětšení 100 $\times$  (zdroj vlastní)

Po kontrole bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  MTT rozpouštědla (MTT Solvent), zajišťujícího rozpuštění krystalů a zbarvení obsahu jamky do fialové barvy. U vzorků byla proměřena absorbance pro vlnové délky 570 nm a 690 nm. Vlnová

délka 690 nm byla měřena pro odečtení pozadí vzorku. Měření se uskutečnilo na multidetekční čtečce mikrodestiček Synergy HT Biotek. Výsledky byly vyhodnoceny programem Gen5.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1.1 Zkušební test metody

Před provedením samotného testu cytotoxicity byl proveden zkušební test metody. Vykultivované buňky v Petriho misce byly ve stejném množství přeneseny do mikrotitračních jamek na destičku. Po jejich 24hodinové inkubaci a kontrole uchycení byl proveden MTT test. K buňkám nebyl přidáván roztok TCS, pouze živné médium. Výsledky absorbancí po odečtení pozadí jsou zaznamenány v Tabulce 3. Výsledek 3A byl pro odlišnost od ostatních výsledků vyřazen.

Tabulka 3 – Výsledné absorbance zkušebního testu (zdroj vlastní)

<i>Výsledná absorbance</i>	1	2	3	4
A	0,046	0,044	0,063	0,047

Pomocí naměřených hodnot bylo ověřeno, že nasazení stejného množství buněk odpovídá stejné velikosti absorbance (až na menší nuance v tisícinách hodnot). Tímto byla ověřena funkčnost metody.

### 5.1.2 Výsledky MTT testu

První měření MTT testu bylo provedeno po 24hodinové inkubaci, další tři měření byla zrealizována vždy po 48 hodinách. Byly použity roztoky, uvedené v Tabulce 1. Rozložení příslušných vzorků v destičce bylo dodrženo dle Tabulky 2. Naměřené absorbance pro vlnové délky 570 nm a 690 nm byly od sebe vždy odečteny a z vypočtených tripletů byl spočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

Výpočet cytotoxicity byl proveden z aritmetického průměru hodnot tripletů pro každou inkubaci zvlášť dle vzorce (2).

$$Cytotoxicita = \left(1 - \frac{A}{A_{NK}}\right) \cdot 100 (\%) \quad (2)$$

A představuje aritmetický průměr absorbancí tripletů,  $A_{NK}$  značí aritmetický průměr negativní kontroly.

Výsledky absorbancí po 24hodinové inkubaci po odečtení pozadí jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 – Výsledná absorbance po 24hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní)

	NK			1			2			3		
vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,196	0,170	0,141	0,125	0,022	0,151	0,240	0,226	0,255	0,120	0,231	0,131

Vypočtené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky pro triplety po 24hodinové inkubaci jsou uvedeny v Tabulce 5. Hodnota 5A byla ze statistického zpracování vyřazena.

Tabulka 5 - Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 24hodinové inkubaci (zdroj vlastní)

Vzorek	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Finální výsledek absorbance	Cytotoxicita (%)
Negativní kontrola	0,169	0,028	0,169 ± 0,028	-
Roztok 1.	0,138	0,018	0,138 ± 0,018	18,343
Roztok 2.	0,240	0,015	0,240 ± 0,015	-42,209
Roztok 3.	0,161	0,061	0,161 ± 0,061	4,931

Výsledky měření absorbancí po 72hodinové inkubaci po odečtení pozadí jsou zapsány v Tabulce 6.

Tabulka 6 – Výsledná absorbance po 72hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní)

	NK			1			2			3		
vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>B</b>	0,185	0,207	0,210	0,113	0,109	0,032	0,200	0,215	0,177	0,212	0,205	0,161

Hodnota 6B byla ze statistického zpracování vyřazena. Aritmetické průměry, směrodatné odchylky pro 72hodinovou inkubaci jsou zaznamenány v Tabulce 7.

Tabulka 7 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 72hodinové inkubaci (zdroj vlastní)

Vzorek	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Finální výsledek absorbance	Cytotoxicita (%)
<b>Negativní kontrola</b>	0,201	0,014	0,201 ± 0,014	-
<b>Roztok 1.</b>	0,111	0,003	0,111 ± 0,003	<b>44,684</b>
<b>Roztok 2.</b>	0,197	0,019	0,197 ± 0,019	<b>1,661</b>
<b>Roztok 3.</b>	0,193	0,028	0,193 ± 0,028	<b>3,987</b>

Výsledky absorbancí po 120hodinové inkubaci po odečtení pozadí jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 – Výsledné absorbance po 120hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní)

	NK			1			2			3		
vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>C</b>	0,224	0,241	0,244	0,129	0,149	0,147	0,234	0,231	0,238	0,281	0,157	0,232

Vypočtené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky tripletů pro 120hodinovou inkubaci jsou uvedeny v Tabulce 9 spolu s výpočtem cytotoxicity.

Tabulka 9 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 120hodinové inkubaci (zdroj vlastní)

Vzorek	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Finální výsledek absorbance	Cytotoxicita (%)
Negativní kontrola	0,236	0,011	0,236 ± 0,011	-
Roztok 1.	0,142	0,011	0,142 ± 0,011	40,056
Roztok 2.	0,234	0,004	0,234 ± 0,004	0,846
Roztok 3.	0,223	0,062	0,223 ± 0,062	5,501

Výsledky absorbancí po 168hodinové inkubaci po odečtení pozadí uvádí Tabulka 10.

Tabulka 10 – Výsledná absorbance po 168hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní)

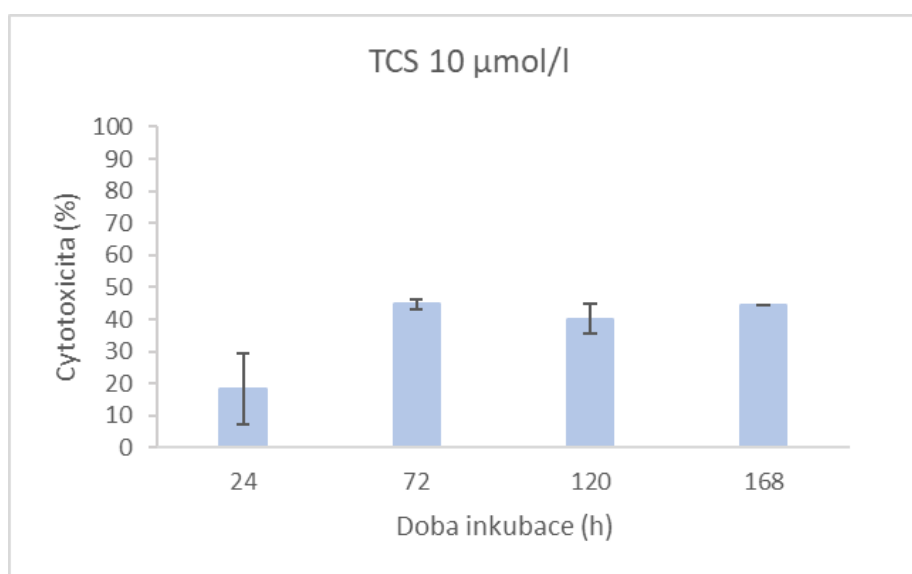
	NK		1		2		3		
vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D	0,195	0,162	0,099	0,164	0,197	0,207	0,177	0,167	0,093

Vypočtené hodnoty aritmetického průměru, směrodatné odchylky a cytotoxicity pro 168hodinovou inkubaci jsou uvedeny v Tabulce 11. Ze statistického zpracování byly vyloučeny hodnoty 4D a 9D. Z důvodu vyloučení hodnoty 4D nebyl proveden výpočet aritmetického průměru a směrodatné odchylky měření pro Roztok 1. Za finální výsledek byla tedy považována jediná změřená vyhovující hodnota.

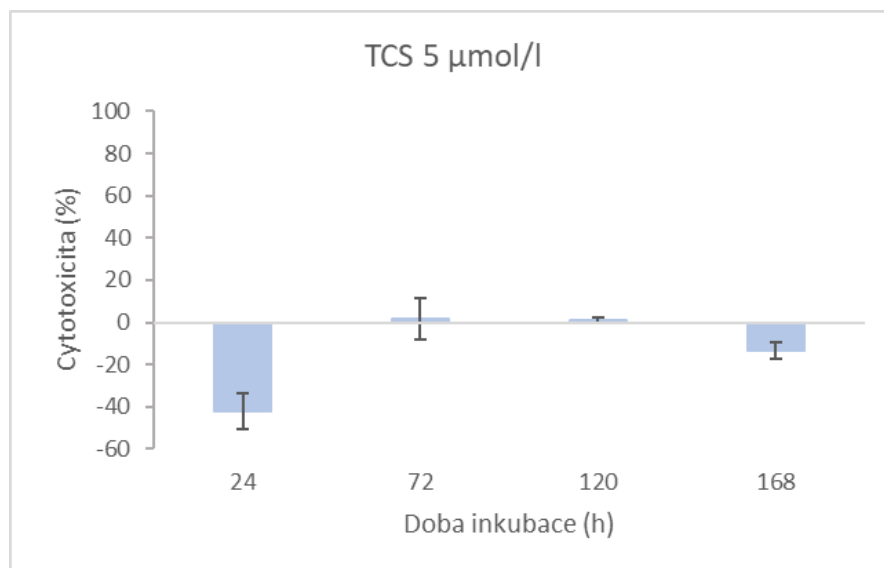
Tabulka 11 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 168hodinové inkubaci (zdroj vlastní)

Vzorek	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Finální výsledek absorbance	Cytotoxicita (%)
Negativní kontrola	0,179	0,014	0,201 ± 0,014	-
Roztok 1.	-	-	0,099	44,538
Roztok 2.	0,202	0,019	0,197 ± 0,019	-13,165
Roztok 3.	0,172	0,028	0,193 ± 0,028	3,641

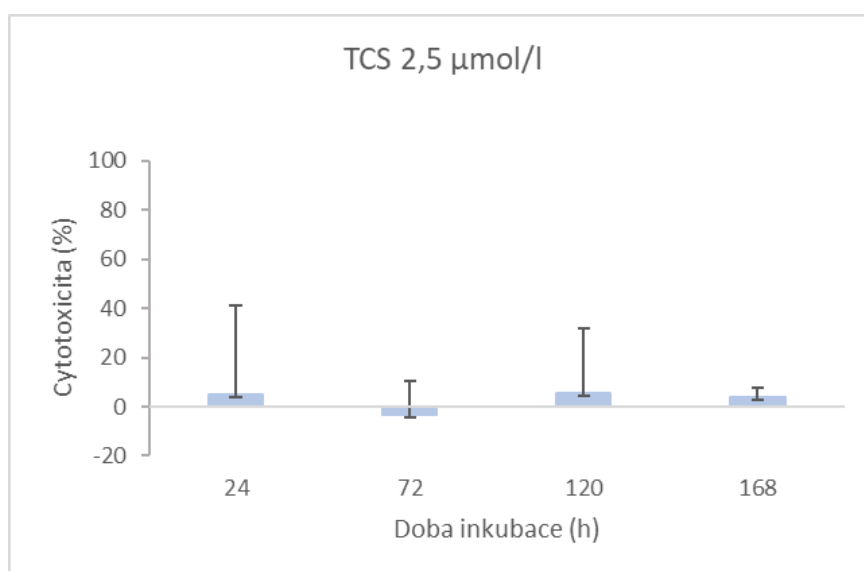
Cytotoxicita pro jednotlivé roztoky byla zpracována do grafů, které monitorují její účinek s ohledem na dobu inkubace (Obrázek 12, 13, 14).



Obrázek 12 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 10 µmol/l v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní)



Obrázek 13 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 5 µmol/l v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní)



Obrázek 14 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 2,5 µmol/l v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní)



## 6 DISKUZE

Výsledky experimentální části prokazují, že TCS má pro buněčnou linii SNU-475 cytotoxický účinek při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  s tím, že rapidní pokles životaschopnosti nastal při 72hodinové inkubaci. V této době dosáhla cytotoxicita v procentuálním vyjádření 44,7 %, viz Tabulka 7. Jedná se o nejvyšší naměřenou hodnotu experimentu. Po 24hodinové inkubaci byla při stejné koncentraci cytotoxicita přibližně poloviční oproti hodnotám následujícím při delší inkubaci, grafické zpracování je znázorněno na Obrázku 12. Po dosažení maximální cytotoxicity u koncentrace TCS 10  $\mu\text{mol/l}$  po 72 hodinách inkubace nebyl zaznamenán další nárůst cytotoxicity s delší dobou inkubace. Tato skutečnost by mohla vypovídat o nezávislosti doby inkubace na vliv životaschopnosti hepatocytů a zmírnit tak obavy z rizik chronického působení TCS na lidský organismus. Tato domněnka z výsledků experimentu ovšem nevylučuje možné ohrožení zdraví při vyšších koncentracích TCS.

U nižších koncentrací, tedy u 2,5 a 5  $\mu\text{mol/l}$ , nebyl tak markantní pokles živých buněk zaznamenán. Pro porovnání výsledků MTT testu byla zvolena studie z roku 2021 od Donglei Sun, kde byly použity stejné koncentrace TCS, avšak jiná buněčná linie, konkrétně HepG2, u níž se jedná o buňky hepatoblastomu [48]. Výsledky studie za dobu inkubace 24 hodin pro koncentrace 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$  v procentuální úmrtnosti buněk jsou 8,4 %, 24,5 % a 49,9 %. Tato studie dosahuje vyšší cytotoxicity u všech koncentrací, než jaké byly naměřeny experimentem této bakalářské práce, což mohlo být způsobeno použitím odlišné buněčné linie. Se studií z roku 2014, která byla provedena na buňkách plicního karcinomu H640, jsou výsledky cytotoxicity až na výsledek 5 $\mu\text{mol/l}$  koncentrace ve shodě [49]. V této studii nebyl po 24 hodinách u nižších koncentrací než 10  $\mu\text{mol/l}$  zjištěn významný cytotoxický účinek a cytotoxicita 10 $\mu\text{mol/l}$  koncentrace se pohybovala kolem 20 %. Výsledky práce po 24hodinové

inkubaci, prezentované v Tabulce 5, se tedy více shodují s výzkumem z roku 2014 [48; 49].

U 5  $\mu\text{mol/l}$  koncentrace v některých časových intervalech dochází dokonce k záporným číslům cytotoxicity, jak znázorňuje Obrázek 13. Díky vzájemné podobnosti výsledků absorbance v tripletu a dosažení hodnot vyšších, než je negativní kontrola, je pravděpodobnost chyby v postupu poměrně nízká. Pokud by měření nebylo zatíženo chybou, mohla by tedy tato koncentrace u buněk SNU-475 vést k proliferaci a antiapoptóze. Na buněčných kulturách byla v několika studiích zvýšená proliferace po podání TCS také pozorována, výzkum probíhal na buněčných liniích lidského karcinomu vaječníků BG-1, karcinomu prsu MCF-7, karcinomu prostaty LNCaP a na variantě modelu MCF-7 VM7Luc4E2. Triclosan byl v těchto průzkumech použit v rozmezí koncentrací 0,01–10  $\mu\text{mol/l}$ . Jako příčinu u většiny proliferací uvádějí autoři zvýšení hladiny proteinu cyklinu D1 a snížení hladiny proteinu p21, které se uplatňují v buněčném cyklu. Ovšem antagonistou těchto dějů byl ICI 182, 780, jenž je regulátorem estrogenových receptorů, což tedy poukázalo na podíl těchto receptorů v indukci proliferace u TCS, ale zároveň to spíše pojí TCS s vlivem na endokrinní systém. Ve vědecké práci z roku 2014 prováděné na myších se zjistilo, že dlouhodobé podávání perorálního TCS způsobilo chronické poškození jater a apoptózu, avšak přeživší hepatocyty podlehly kompenzační proliferaci, spolu s ní ale také fibrogenezi [50]. To by mohlo být vysvětlení, proč u koncentrace 5  $\mu\text{mol/l}$  po 24hodinové inkubaci nastala nejvyšší proliferace buněk, které mohly zahájit kompenzační proliferaci po mírném šoku z přenesení na mikrotitrační destičku a nasazení TCS. I když nebyla fibrotická změna na buňkách SNU-475 mikroskopicky zaznamenána, bylo by v případné následující studii přínosné otestovat zachování funkčnosti jaterních buněk a tím vyloučit jejich fibrotizaci. Ve výše zmíněné studii z roku 2014 byla fibróza odhalena zachycením exprese

určitých fibrogenních genů, zvýšením hladin superoxidů a v návaznosti na to i zvýšením exprese genů reagujících na oxidační stres [33; 50].

## 7 ZÁVĚR

V bakalářské práci byla zpracována rešerše o chemických antibakteriálních látkách používaných v kosmetických výrobcích, byl v ní představen jejich mechanismus účinku a vybrané látky, které mají nebo mohou mít vliv na lidské zdraví. Na základě tohoto zpracování teoretické části byla zvolena jedna konkrétní antibakteriální látka – triclosan. Ten byl vybrán na základě dostupných, zejména zahraničních článků, jelikož se jeho výzkum v posledních letech opět hojně rozšířil a vyvstalo kolem něj mnoho vědeckých otázek ohledně dopadu na lidské zdraví. V práci byla blíže popsána jeho chemická podstata, mechanismus účinku, metabolismus v lidském těle a vědecké poznatky o jeho vlivu na lidský organismus.

V praktické části práce byl triclosan použit pro změření cytotoxicity v různých koncentracích (2,5  $\mu\text{mol/l}$ ; 5  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ ) pro buněčnou linii SNU-475 v rozdílných dobách inkubace (24; 72; 120; 168 hodin). Prakticky nevýznamná cytotoxicita byla naměřena po celou dobu inkubace u koncentrací triclosanu 2,5  $\mu\text{mol/l}$  a 5  $\mu\text{mol/l}$ . U koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  došlo po 24 hodinách inkubace k cytotoxicitě ve výši 18,3 %. K nejvyšší naměřené cytotoxicitě došlo v 72. hodině inkubace, kdy se hodnota přiblížila k 45 %. Cytotoxicita s delší dobou inkubace pro koncentraci triclosanu 10  $\mu\text{mol/l}$  již více nestoupala.

Praktickou částí bakalářské práce jsme prokázali cytotoxický účinek triclosanu u koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  pro lidskou buněčnou linii SNU-475.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**ATCC** (American Type Cell Collection) Americká sbírka typových kultur

**C** (carboneum) uhlík

**CE** (capillary electrophoresis) kapilární elektroforéza

**CYP** (cytochrome P450) cytochrom P450

**DLLME** (dispersive liquid-liquid microextraction) mikroextrakce kapalina-kapalina

**DMDM** (dimethylol dimethyl) dimetylol dimetyl

**DNA** (deoxyribonucleic acid) deoxyribonukleová kyselina

**FA** (formaldehyde) formaldehyd

**FDA** (Food and Drug Administration) Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

**FR** (formaldehyde releasers) uvolňovače formaldehydu

**GC** (gas chromatography) plynová chromatografie

**HF-LPME** (hollow fiber-based liquid phase microextraction) mikroextrakce využívající duté vlákno

**KAS** (QACs; quaternary ammonium compounds) kvartérní amoniové sloučeniny

**LC** (liquid chromatography) kapalinová chromatografie

**LLE** (liquid-liquid extraction) extrakce kapalina-kapalina

**MEKC** (micellar electrokinetic chromatography) micelární elektrokinetická chromatografie

**MS** (mass spektrometry) hmotnostní spektrometrie

**MS/MS** (tandem mass spektrometry) tandemová hmotnostní spektrometrie

**MSPD** (matrix solid phase dispersion) extrakce disperzní tuhou fází

**MTT** (methyltetrazolium salt) methylnitrotetrazoliová sůl

**N** (nitrogenium) dusík

**NAD<sup>+</sup>** (oxidized nicotinamide adenine dinucleotide) oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

**NADH** (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu

**NADPH** (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) nikotinamidadenindinukleotidfosfát

**PBS** (phosphate buffered saline) fosfátový pufr

**pH** (potential of hydrogen) potenciál vodíku

**PHMB** (polyhexamethylene biguanide) polyhexamethylen biguanid

**PLE** (pressurized liquid extraction) kapalinová extrakce podporovaná tlakem

**R** chemický řetězec

**RNA** (ribonucleotic acid) ribonukleová kyselina

**SBSE** (Stir Bar Sorptive Extraction) sorpční extrakce na míchací tyčince

**SDME** (single-drop microextraction) mikroextrakce jednou kapkou

**SFE** (supercritical fluid extraction) superkritická fluidní extrakce

**SFVCDME** (solidified floating vesicular coacervative drop microextraction)  
mikroextrakce tuhnoucími plovoucími vezikulárními kapkami

**SNU** (Seoul National University) Soulská národní univerzita

**SPE** (solid-phase extraction) extrakce na pevné fázi

**SPME** (solid-phase microextraction) mikroextrakce na pevné fázi

**TC** (tissue culture) tkáňové kultury

**TCS** (triclosan) triclosan

**TLC** (thin layer chromatography) tenkovrstevná chromatografie

**UAE** (ultrasonic-assisted extraction) extrakce pomocí ultrazvuku

**USAEME** (ultrasound-assisted emulsification microextraction) ultrazvukem  
asistovaná emulzifikační mikroextrakce

**UV** (ultraviolet) ultrafialové

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TANAKA, Tomomi, Masako OISHI a Masayuki OKAZAKI. The Relationship Between the Preservative Efficacy and Cytotoxicity of Two Common Preservatives Used in Cosmetics. *Journal of Oral Tissue Engineering* [online]. 2018, **15**(3), 186-192 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.11223/jarde.15.186
- [2] Cosmetic products. In: *Beacon Regulatory Consulting: Regulatory Expertise In Food And Cosmetic Products* [online]. Groningen: Beacon Regulatory Consulting B.V [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <http://beaconregulatory.com/services/cosmetic-products>
- [3] MURPHY, Barry, Michael HOPTROFF, David ARNOLD, Richard ECCLES, Stuart CAMPBELL-LEE a Thomas DAWSON. In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome. *PLOS ONE* [online]. 2021, **16**(7) [cit. 2022-11-07]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0254172
- [4] HALLA, Noureddine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules* [online]. 2018, **23**(7) [cit. 2022-11-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23071571
- [5] MCMURRY, John. *Organická chemie*. 6. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-637-1.



- [6] NGUYEN, Thom, Brian CLARE, Wei GUO a Boris MARTINAC. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *European Biophysics Journal* [online]. 2005, **34**(5), 389-395 [cit. 2022-11-07]. ISSN 0175-7571. Dostupné z: doi:10.1007/s00249-005-0468-x
- [7] KIRECHE, Mustapha, Elena GIMENEZ-ARNAU a Jean-Pierre LEPOITTEVIN. Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde\*. *Contact Dermatitis* [online]. 2010, **63**(4), 192-202 [cit. 2022-11-07]. ISSN 01051873. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0536.2010.01770.x
- [8] SILVA, Vânia, Cátia SILVA, Pedro SOARES, Manuela GARRIDO, Fernanda BORGES a Jorge GARRIDO. Isothiazolinone Biocides: Chemistry, Biological, and Toxicity Profiles. *Molecules* [online]. 2020, **25**(4) [cit. 2022-11-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25040991
- [9] KATHURIA, Deepika, Akshay RAUL, Pravin WANJARI a Prasad BHARATAM. Biguanides: Species with versatile therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2021, **219** [cit. 2022-11-07]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2021.113378
- [10] MAKVANDI, Pooyan, Rezvan JAMALEDIN, Mostafa JABBARI, Nasser NIKFARJAM a Assunta BORZACCHIELLO. Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic

- review. *Dental Materials* [online]. 2018, **34**(6), 851-867 [cit. 2022-11-07]. ISSN 01095641. Dostupné z: doi:10.1016/j.dental.2018.03.014
- [11] *Kvartérní amoniové soli – syntéza a využití* [online]. 2017, [cit. 2022-11-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/99/99>
- [12] ARSHAD, Hamna, Moniba MEHMOOD, Munir SHAH a Arshad ABBASI. Evaluation of heavy metals in cosmetic products and their health risk assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2020, **28**(7), 779-790 [cit. 2022-11-07]. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2020.05.006
- [13] LOW, Wan-Li, Ken KENWARD, Stephen BRITLAND, Mohd AMIN a Claire MARTIN. Essential oils and metal ions as alternative antimicrobial agents: a focus on tea tree oil and silver. *International Wound Journal* [online]. 2017, **14**(2), 369-384 [cit. 2022-11-07]. ISSN 17424801. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12611
- [14] JIMÉNEZ-DÍAZ, Inmaculada, Alberto ZAFRA-GÓMEZ, Oscar BALLESTEROS a Alberto NAVALÓN. Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: An overview. *Talanta* [online]. 2014, **129**, 448-458 [cit. 2022-12-30]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.05.052
- [15] LORES, Marta, Maria LLOMPART, Gerardo ALVAREZ-RIVERA, Eugenia GUERRA, Marlene VILA, Maria CELEIRO, Pablo LAMAS a Carmen GARCIA-JARES. Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls – A review.

*Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **915**, 1-26 [cit. 2023-02-15]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.02.033

- [16] HALLA, Nouredine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO et al. Kroky při analýze kosmetických konzervačních látek od zpracování vzorku po analytické metody. In: *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. *Molecules*, 2018 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29958439/>
- [17] BILAL, Muhammad a Hafiz IQBAL. An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals — A review. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **670**, 555-568 [cit. 2023-02-23]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.261
- [18] BILAL, Muhammad, Shahid MEHMOOD a Hafiz IQBAL. The Beast of Beauty: Environmental and Health Concerns of Toxic Components in Cosmetics. *Cosmetics* [online]. 2020, **7**(1), 13 [cit. 2022-11-07]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics7010013
- [19] BłęDZKA, Dorota, Jolanta GROMADZIŃSKA a Wojciech WąSOWICZ. Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International* [online]. 2014, **67**, 27-42 [cit. 2023-02-23]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2014.02.007
- [20] COMMISSION REGULATION (EU) No 358/2014: amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. In: . Luxemburg: Official Journal of the European Union, 2014, ročník 2014, L 107/5. Dostupné také z:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32014R0358>

- [21] COMMISSION REGULATION (EU) No 1004/2014: amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. In: . Luxemburg: Official Journal of the European Union, 2014, ročník 2014, L 282/5. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32014R1004>
- [22] PETRIC, Zvonimir, Julia RUŽIĆ a Irena ŽUNTAR. The controversies of parabens – an overview nowadays. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2021, 71(1), 17-32 [cit. 2023-02-27]. ISSN 1846-9558. Dostupné z: [doi:10.2478/acph-2021-0001](https://doi.org/10.2478/acph-2021-0001)
- [23] KANG, Sungeun, Sunmi KIM, Jeongim PARK et al. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Science of The Total Environment* [online]. 2013, 461-462, 214-221 [cit. 2023-02-28]. ISSN 00489697. Dostupné z: [doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.097](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.097)
- [24] KOEPPE, Erika, Kelly FERGUSON, Justin COLACINO a John MEEKER. Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007–2008. *Science of The Total Environment* [online]. 2013, 445-446, 299-305 [cit. 2023-02-28]. ISSN 00489697. Dostupné z: [doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.052](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.052)

- [25] GOOSSENS, An a Olivier AERTS. Contact allergy to and allergic contact dermatitis from formaldehyde and formaldehyde releasers: A clinical review and update. *Contact Dermatitis* [online]. 2022, **87**(1), 20-27 [cit. 2023-03-04]. ISSN 0105-1873. Dostupné z: doi:10.1111/cod.14089
- [26] ALLEGRA, Alessandro, Giovanna SPATARI, Stefano MATTIOLI et al. Formaldehyde Exposure and Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Literature. *Medicina* [online]. 2019, **55**(10) [cit. 2023-03-05]. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina55100638
- [27] LI, Qi, Qibing MEI, Ting HUYAN, Li XIE, Su CHE, Hui YANG, Mingjie ZHANG a Qingsheng HUANG. Effects of formaldehyde exposure on human NK cells in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2013, **36**(3), 948-955 [cit. 2023-03-05]. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2013.08.005
- [28] DE GROOT, Anton, Mari-Ann FLYVHOLM a JunYe MIAO. Formaldehyde and Formaldehyde-Releasers. *Kanerva's Occupational Dermatology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, **53**(12), 521-542 [cit. 2023-03-04]. ISBN 978-3-319-68615-8. ISSN 1674-7305. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-68617-2\_37
- [29] COMMISSION REGULATION (EU) 2019/831: amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. In: . Luxemburg: Official Journal of the European Union, 2019, ročník 2019, L 137/29. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32019R0831>

- [30] *REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL: on cosmetic products*. In: . Luxemburg: Official Journal of the European Union, 2009, ročník 2009, L 342/59. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32009R1223>
- [31] RYU, Onjeon, Bo PARK, Minji BANG et al. Effects of Several Cosmetic Preservatives on ROS-Dependent Apoptosis of Rat Neural Progenitor Cells. *Biomolecules & Therapeutics* [online]. 2018, **26**(6), 608-615 [cit. 2023-03-07]. ISSN 1976-9148. Dostupné z: doi:10.4062/biomolther.2017.221
- [32] HUITAO, Li, Yu ZHAO, Chen LANLAN, Li XIAOHENG, Jin LIXU a Ge REN-SHAN. Structures of triclocarban and triclosan. In: *Hindawi* [online]. BioMed Research International, 2017 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8284097/fig1/>
- [33] ALFHILI, Mohammad a Myon-Hee LEE. Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2019, **2019**, 1-28 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1607304
- [34] WEATHERLY, Lisa a Julie GOSSE. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* [online]. 2017, **20**(8), 447-469 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1093-7404. Dostupné z: doi:10.1080/10937404.2017.1399306

- [35] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009: o kosmetických přípravcích. In: *EUR-Lex: Access to European Union law* [online]. 2022 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- [36] SALEH, S., R.N.S. HADDADIN, S. BAILLIE a P.J. COLLIER. Triclosan - an update. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2011, **52**(2), 87-95 [cit. 2022-11-07]. ISSN 02668254. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02976.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02976.x)
- [37] SCHWEIZER, Herbert P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, **202**(1), 1-7 [cit. 2022-11-07]. ISSN 03781097. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10772.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10772.x)
- [38] MILANOVIĆ, Maja, Larisa ĐURIĆ, Nataša MILOŠEVIĆ a Nataša MILIĆ. Comprehensive insight into triclosan—from widespread occurrence to health outcomes. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. [cit. 2023-02-23]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: [doi:10.1007/s11356-021-17273-0](https://doi.org/10.1007/s11356-021-17273-0)
- [39] RUSZKIEWICZ, Joanna, Shaojun LI, Maliya RODRIGUEZ a Michael ASCHNER. Is Triclosan a neurotoxic agent?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* [online]. 2017, **20**(2), 104-117 [cit. 2022-12-28]. ISSN 1093-7404. Dostupné z: [doi:10.1080/10937404.2017.1281181](https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1281181)
- [40] TAMURA, Ikumi, Yasuhiro KANBARA, Minoru SAITO, Kanna HORIMOTO, Masaya SATOH, Hiroshi YAMAMOTO a Yasuo OYAMA. Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular Zn<sup>2+</sup>

concentration in rat thymocytes: Its relation to oxidative stress.  
*Chemosphere* [online]. 2012, **86**(1), 70-75 [cit. 2022-12-28]. ISSN 00456535.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.09.009

- [41] YUEH, Mei-Fei a Robert TUKEY. Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2016, **56**(1), 251-272 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417
- [42] ŠEBEK, Jaroslav. *Buněčné kultury v medicíně*. První. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-380-7.
- [43] BÁRTOVÁ, Eva. Buněčné a tkáňové kultury. In: *Fakulta veterinární hygieny a ekologie: Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Biologie a genetika pro bakaláře VFU Brno* [online]. Brno, 2014 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne\\_a\\_tkanove\\_kultury&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz)
- [44] Example of an MTT assay performed in a 96-well microplate. As the intensity of the purple signal decreases from lane 1 to lane 12, so decreases the number of viable metabolically active cells per well. In: *AAT Bioquest* [online]. Pleasanton: AAT Bioquest, 2022 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/mtt-assay>
- [45] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.



- [46] The Synergy™ HT: A Unique Multi-Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery. In: *Agilent* [online]. 5301 Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA 95051 United States: BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., 2003 [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: [https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/127/synergyhtposter.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/127/synergyhtposter.pdf)
- [47] SNU-475. In: *ATCC* [online]. 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110-2209 USA: ATCC, 2021 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/crl-2236>
- [48] SUN, Donglei, Tianhe ZHAO, Keyan LONG, Mei WU a Zunzhen ZHANG. Triclosan down-regulates fatty acid synthase through microRNAs in HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2021, **907** [cit. 2023-03-22]. ISSN 00142999. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ejphar.2021.174261](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174261)
- [49] WINITTHANA, Thidarat, Somsong LAWANPRASERT, Pithi CHANVORACHOTE a Aamir AHMAD. Triclosan Potentiates Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Anoikis-Resistant Human Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(10) [cit. 2023-04-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0110851](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110851)
- [50] YUEH, Mei-Fei, Koji TANIGUCHI, Shujuan CHEN, Ronald EVANS, Bruce HAMMOCK, Michael KARIN a Robert TUKEY. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *PNAS* [online]. 2014, **111**(48) [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: [doi:10.1073/pnas.141911911](https://doi.org/10.1073/pnas.141911911)

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Kosmetické obaly [2].....	12
Obrázek 2 – Diagram stanovení antibakteriálních látek (zdroj vlastní, dle [16]) .....	20
Obrázek 3 – Chemický vzorec triclosanu [32].....	25
Obrázek 4 – Růstová křivka buněčné kultury [43].....	31
Obrázek 5 – Grafické znázornění zbarvení příkladu provedeného MTT testu [44].....	32
Obrázek 6 – Nasazení buněk SNU-475 na Petriho misku, zvětšení 100× (zdroj vlastní) .....	36
Obrázek 7 – Kontrola uchycení buněk SNU-475 po 24hodinové inkubaci, živá buňka je znázorněna zelenou šipkou a má polygonální tvar, neživá buňka je znázorněna červenou šipkou a má tvar kulovitý, zvětšení 100× (zdroj vlastní). 37	
Obrázek 8 – Kontrola uchycení buněk SNU-475 na dno mikrotitrační destičky po 24hodinové inkubaci, zvětšení 100× (zdroj vlastní).....	40
Obrázek 9 – Mikroskopická kontrola buněk SNU-475 po 72hodinové inkubaci s triclosanem o koncentraci 2,5 $\mu\text{mol/l}$ , zvětšení 100× (zdroj vlastní)..	41
Obrázek 10 – Mikroskopická kontrola buněk SNU-475 po 72hodinové inkubaci s triclosanem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ , zvětšení 100× (zdroj vlastní)...	41
Obrázek 11 – Krystaly formazanu vytvořené živnými SNU-475 buňkami, zvětšení 100× (zdroj vlastní) .....	41
Obrázek 12 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní).....	47
Obrázek 13 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní).....	48
Obrázek 14 – Graf cytotoxicity roztoku triclosanu o koncentraci 2,5 $\mu\text{mol/l}$ v závislosti na době inkubace (zdroj vlastní).....	48

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Koncentrace roztoků TCS použitých v MTT testu (zdroj vlastní) .....	39
Tabulka 2 – Rozložení roztoků v mikrotitrační destičce pro MTT test (zdroj vlastní) .....	40
Tabulka 3 – Výsledné absorbance zkušebního testu (zdroj vlastní) .....	43
Tabulka 4 – Výsledná absorbance po 24hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní).....	44
Tabulka 5 - Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 24hodinové inkubaci (zdroj vlastní) .....	44
Tabulka 6 – Výsledná absorbance po 72hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní).....	45
Tabulka 7 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 72hodinové inkubaci (zdroj vlastní) .....	45
Tabulka 8 – Výsledné absorbance po 120hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní).....	45
Tabulka 9 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 120hodinové inkubaci (zdroj vlastní) .....	46
Tabulka 10 – Výsledná absorbance po 168hodinové inkubaci po odečtení pozadí (zdroj vlastní).....	46
Tabulka 11 – Vypočtený aritmetický průměr a směrodatná odchylka absorbancí pro jednotlivé roztoky po 168hodinové inkubaci (zdroj vlastní) .....	47