

## STANOVENÍ TOXICITY BINÁRNÍCH SMĚSÍ POMOCÍ HEPATOCYTŮ Z POTKANA

ADÉLA POKORNÁ, MILOŇ TICHÝ, JANA NERUDOVÁ, JANA TUMOVÁ a IVETA HANZLÍKOVÁ

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10  
mtichy@szu.cz

Došlo 23.12.08, přijato 29.1.09.

Klíčová slova: akutní toxicita, binární směsi chemikálií, test s hepatocyty, diklofenak, chlorid nikelnatý, dichloranilin

### Úvod

Současné působení chemických znečištěnin v životním prostředí na člověka a na samo životní prostředí je běžné. Chemické látky se do prostředí dostávají z různých oblastí lidské činnosti; ze zemědělství, průmyslové výroby, farmacie, a následně ze zdravotnictví, dopravy, a tak by se dala vypočítat veškerá činnost. Snadno tak mohou působit společně odpad z průmyslové výroby, léčiv a zemědělství. Sole niklu, diklofenak a 3,4-dichloranilin tvoří část znečišťujících látek a mohou tak být příkladem.

Nikelnaté ionty jsou pro organismy pravděpodobně esenciální, nicméně výroba tisíců tun sloučenin niklu má za následek kontaminaci půdy, vod i ovzduší. Do přírody se dostává z průmyslových emisí i ze zemědělství. Od roku 1990 se světová produkce niklu zdvojnásobila z 900 000 tun na 1 800 000 tun ročně, úměrně tomu bude vysoká i produkce chloridu nikelnatého<sup>1</sup>. Chlorid nikelnatý je klasifikován jako toxický se symbolem T. Je podezřelý z karcinogenity, genotoxicity, z alergizujících účinků a může mít vliv na rozmnožování<sup>2</sup>.

Rozkladem herbicidů diuronu, linuronu a propanilu, používaných v zemědělství k ochraně rostlin, se dostává do půdy 3,4-dichloranilin<sup>3</sup>. Tato látka se snadno váže na organický materiál v půdách a tam se kumuluje. Nejsou údaje, že by měl karcinogenní nebo mutagenní účinky, nicméně je zde podobnost s 4-chloranilinem, který z karcinogenity podezřelý je. Je nebezpečný pro vodní organismy, u lidí dráždí oči a kůži a může způsobit methemoglobinii (cyanosu)<sup>3</sup>. Není tedy zcela bezpečný a bývá klasifikován jako toxický se symbolem T.

Příkladem velmi využívané účinné látky v léčivech je diklofenak. Diklofenak, 2-aryloctová kyselina, je účinná protizánětlivá sloučenina, obsažená v nesteroidních protizánětlivých léčivech. Má i analgetické a antipyretické

vlastnosti, a proto je široce užíván v lécích tlumících bolest kloubů a svalů. Ani jeho toxické účinky však nejsou zanedbatelné. Diklofenak a jeho metabolity se vylučují a odpadními vodami značně kontaminují životní prostředí.

Odhad rizika expozice směsím chemických látek není jednoduchý. Není vždy známe, jak se složky navzájem v účincích ovlivňují. Pokud se předpokládá, že se velikosti účinků jednotlivých složek sčítají<sup>4</sup>, nemusí tomu tak být vždy<sup>5</sup>. Experimentálních podkladů je však nedostatek.

Při identifikaci nebezpečnosti (hazardu) styku organismů s chemickými látkami je jednou z důležitých vlastností akutní toxicita. V současné době je snaha i při stanovení akutní toxicity chemických látek použít alternativní testy k testům na zvířatech jak *in vitro*, tak i *in silico*<sup>6</sup>, které by původní testy na obratlovcích nahradili. Takovým testem by mohl být i test na primárních hepatocytech z potkana. Ten v sobě spojuje výhody testů na nižších organismech (práce s roztoky sloučenin a velký počet testovacích „jednotek“ – jaterních buněk) s výhodami testů na vyšších organismech (buňky savců).

Použití jaterních buněk pro testování toxicity není záležitost zdaleka nová. Od sedmdesátých let minulého století, kdy byla vyvinuta metoda jejich izolace, byly používány zejména pro zkoumání metabolismu xenobiotik<sup>7,8</sup>.

Cílem této práce bylo stanovit akutní toxicitu dvou směsí látek s rozdílným působením a rozdílného původu: chloridu nikelnatého s diklofenakem a s 3,4-dichloranilinem. Pro stanovení akutní toxicity těchto směsí byly použity primární hepatocyty z potkana. Byly stanoveny efektivní koncentrace EC50(M) pro ireversibilní poškození membrán buněk barvením trypanovou modří, viabilitu, a EC50(M) pro zásah do metabolických funkcí buněk testem ureogenese.

### Experimentální část

#### Chemické sloučeniny

Testované látky: chlorid nikelnatý hexahydrát, CAS 7791-20-0 čistoty p.a. firmy Lachema; 3,4-dichloranilin, CAS 95-76-1, 98%, ALDRICH, diklofenak sodný, CAS 15307-79-6, p.a., SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim, Německo.

Sloučeniny potřebné pro přípravu pracovních roztoků a pufrů byly čistoty p.a. firmy LACHEMA (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) p.a. firmy SIGMA (kat. č. H-3375), EGTA (ethylen glykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina), p.a. firmy MERCK, kolagenosa (816 IU) firmy SEVAC, albumin běžné čistoty firmy IMUNA. Trypanová modř pro testování životnosti (viability) od firmy LACHEMA, pro stanovení ureogenese ornitin, LACHEMA, močovina, diacetylmonoxim a thiosemikarbazid, MERCK. Pro práci se zvířaty narcotan a heparin firmy LÉČIVA ČR.

*Pracovní roztoky*

Hankův roztok: 80 g NaCl, 4 g KCl, 2 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do 1 litru destilované vody.

Modifikovaný Hankův roztok pro přípravu perfuzních roztoků: 25 ml Hankova roztoku, 222 ml destilované vody, 0,525 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,75 g HEPES.

Perfuzní Hankův roztok I: 150 ml modifikovaného Hankova roztoku, 0,0342 g EGTA

Perfuzní Hankův roztok II: 100 ml modifikovaného Hankova roztoku, 0,1 g kolagenosa, 0,588 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O.

Kultivační médium Krebsův-Henseleitův pufr pH 7,4: 6,9 g NaCl, 0,36 g KCl, 0,13 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,295 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,374 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 2,0 g NaHCO<sub>3</sub> do 1 litru destilované vody. Před použitím jsou roztoky probublávány pneumoxidem (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) a temperovány na 37 °C.

Pro barvení Trypanovou modří: 1 g Trypanové modře do 250 ml Krebsova-Henseleitova pufru a zfiltrovat přes 0,22 μm filtr.

Pro ureogenesi roztok ornitinu: 0,424 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,134 g ornitin do 40 ml Krebsova-Henseleitova pufru.

Roztok A: 300 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 200 ml destilované vody.

Roztok B: 600 mg diacetylmonoximu, 30 mg thiosemikarbazidu do 100 ml destilované vody.

*Pokusná zvířata*

Pro přípravu hepatocytů byla použita játra ze samců potkanů kmene Wistar hmotnosti 250–300 g od firmy Velaz, s.r.o. Potkani byli chováni po čtyřech v kleci ve zvěřinci Státního zdravotního ústavu, Praha, za podmínek v souladu se zásadami zacházení s pokusnými zvířaty podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Byl zaručen 12 hodinový cyklus světlo/tma při teplotě 22 °C a vlhkosti 55 % s volným přístupem k potravě i vodě. Játra byla potkanům vyjmuta v anestézii působením narkotanu a zvířata byla po té utravena.

*Metody**Izolace hepatocytů*

Hepatocyty byly izolovány popsáním postupem<sup>9</sup>. Po odstranění vápenatých iontů z jater perfuzí roztokem, obsahujícím chelatační činidlo EGTA jsou buňky uvolněny perfuzí roztokem, obsahujícím kolagenosu. Kolagenosa uvolní kolagenové vazby ve struktuře jaterní tkáně. Získaná suspence jaterních buněk se převede do kultivačního média.

Perfuzní aparatura se skládá z nádoby na perfuzní roztoky propojené přes oxygenátor a peristaltickou pumpu s kanylou, která je zavedena do portální žíly jater. K aparatuře je připojen přívod pneumoxidu a z vodní lázně pro udržování teploty perfuzních roztoků na 37 °C. Jako perfuzní roztoky jsou použity dvě modifikace Hankova solného roztoku. Nejprve se provádí perfuze s Hankovým roz-

tokem, který obsahuje chelatační činidlo EGTA pro odstranění vápenatých iontů, poté se provádí perfuze Hankovým roztokem s přidáním kolagenosou.

Suspence hepatocytů se přemísť do kultivačních baňek s kulatým dnem (obsahu 50 ml), které jsou připevněny na rotační odparce. K rotační odparce je připojen přestupník, umožňující spojení s pěti baňkami. Odparka je umístěna tak, aby baňky mohly procházet skrz vodní lázeň s konstantní teplotou 37 °C. Jako kultivační médium je použit Krebsův-Henseleitův pufr o pH 7,4. Do kultivačního média se přidává testovaná látka v různých koncentracích tak, aby bylo možné sestavit závislost účinnosti na koncentraci.

U každé šarže suspence hepatocytů je před dalšími pokusy stanovena životnost (viabilita) barvením Trypanovou modří. Průměrná životnost se pohybuje kolem 80 %. V mikroskopu se vitální hepatocyty zobrazí morfologicky bez poruchy, jako samostatné kulaté buňky. Pro další testy jsou hepatocyty ředěny na koncentraci kolem 2 · 10<sup>6</sup> živých (nebarevných) buněk/ml. Takto suspendovaná kultura hepatocytů přežívá v použitelném stavu asi 4 hodiny<sup>10</sup>.

*Barvení Trypanovou modří*

Optické rozlišení irreversibilního poškození buněčné membrány hepatocytů se provádí pozorováním v mikroskopu (Carl Zeiss Jena, zvětšení 125×) po obarvení Trypanovou modří s použitím Bürkerovy komůrky<sup>11</sup>. Barvivo neproniká do neporušených, živých buněk a obarví jen buňky s poškozenou buněčnou membránou, mrtvé buňky. To je možné opticky rozlišit. Viabilita, životnost, je kvantifikována jako poměr počtu živých buněk proti celkovému (živé i mrtvé) počtu buněk. Vynásobením stem ji dostaneme v procentech. Pokud z jakéhokoliv důvodu nedojde k úhynu a všechny jsou živé, byla by viabilita 100 %.

Počty živých a mrtvých buněk se počítají na začátku a po 60 minutové expozici v pěti čtvercích Bürkerovy komůrky a jejich součty se použijí k dalšímu výpočtu.

Kultivační baňky jsou naplněny roztokem (8,5 až 9,5 ml) testované chemické látky v kultivačním médiu. Suspence hepatocytů (0,5–1,5 ml) je přidána (celkový objem 10 ml) a po krátkém zamíchání se 50 μl výsledné suspence okamžitě napipetuje do zkumavky obsahující 0,5 ml roztoku Trypanové modří. Bürkerova komůrka se naplní obarvenou suspensí hepatocytů a počítá se počet čistých (živých, vitálních) a počet zbarvených (mrtvých) buněk v pěti čtvercích obou počítacích prostorů komůrky na její úhlopříčce. Průměr poměrů mezi živými buňkami a celkovým počtem (živé plus mrtvé) buněk je označen jako počáteční (nulová) životnost (viabilita) připravené suspence hepatocytů. Viabilita blanku (bez jakékoliv látky) po 60 min kultivace zmenšená o počáteční viabilitu je pokládána za 100% viabilitu. Účinnost všech koncentrací testované látky je počítána po 60 min expozici v procentech ze 100% viability blanku. Z výsledků jednotlivých vzorků je zkonstruována křivka závislost velikosti účinku, viabilita (100–0 %), na koncentraci a vypočítá se EC50.

*Tvorba močoviny (ureogenese)*

Tento test stanoví funkční integritu a metabolickou schopnost nebo neschopnost hepatocytů, nabourání jejich metabolických cest. Narušení metabolických cest je charakterizováno změnou schopnosti měnit ornitin v močovinu. Koncentrace močoviny se měří spektrofotometricky v suspensi hepatocytů při 520 nm pomocí kalibrační křivky<sup>12</sup>. Rozdíl mezi koncentrací močoviny na počátku pokusu před přidání testované látky a po 30 min expozice sledovanou látkou odpovídá tvorbě močoviny. Tento rozdíl ve vzorku, do kterého nebyla přidána žádná látka, je pokládáno za 100 %. Hodnoty exponovaných vzorků jsou k této kontrolní 100% hodnotě vztaženy.

Stanovení se provádělo v tomtéž roztoku, jako byla měřena životnost barvením Trypanovou modří. Objem 50  $\mu$ l roztoku ornitinu byl přidán těsně před přidáním suspence hepatocytů. Po krátkém promíchání bylo 200  $\mu$ l vzniklé suspence pipetováno do zkumavky, která obsahovala 2 ml směsi roztoků A a B (5 : 1)<sup>12</sup> a 30 min inkubována za stálého míchání při teplotě 37 °C. Tento postup byl opakován se vzorky, obsahujícími různou koncentraci testované látky tak, aby mohla být sestrojena úplná křivka závislosti velikosti účinku na koncentraci testované látky. Takto připravené vzorky mohou být přechovávány v chladničce. Jakmile všechny vzorky byly připraveny, byly přemístěny na 20 min do vroucí vody. Potom byly ochlazeny pod tekoucí studenou vodou a proměřena absorbance při 520 nm.

Rozdíl mezi koncentrací močoviny na počátku pokusu a po 30 min inkubace kontrolního vzorku bez testované látky bylo považováno za 100 %. Koncentrace močoviny ostatních vzorků s rozdílnou koncentrací testované látky byla přepočtena na procenta v tomto měřítku a sestrojena křivka závislosti velikosti účinku na koncentraci testované látky pro výpočet EC50.

*Křivka závislosti velikosti účinku na koncentraci*

Pro sestrojení závislosti odpovědi na koncentraci testované látky a výpočet EC50 byl použit program Origin 6.1. Hodnoty EC50 v molárních koncentracích udávají koncentraci testovaných látek v roztoku, při které dochází ke snížení životnosti buněk (viability) nebo metabolické aktivity na 50 %. Poměr látek v testovaném roztoku musí být vždy znám a uveden.

Účinek binárních směsí byl testován při různém molárním poměru látek ve směsi. Pokud to bylo možné, byla pro jednotlivé směsi stanovena EC50 (M) jako souhrnná koncentrace látek ve směsi, způsobující účinek. Takže

v případě směsi chloridu nikelnatého s 3,4-dichloranilinem je v tabulce uvedena normalizovaná log EC50<sub>n</sub> (M) spolu s nenormalizovanou, reálnou hodnotou EC50 proti molárnímu poměru směsi<sup>13</sup> (rovnice (1) a (2)). V případě směsi s diklofenakem sodným mohlo být uvedeno jen procento snížení původních hodnot ureogenese nebo životnosti.

*Normalizace účinku a molární zlomek*

Velikost účinku EC50 směsi chloridu nikelnatého (A) s 3,4-dichloranilinem (B) byla normalizována na hodnoty EC50 složek směsi (EC50<sub>n</sub>)<sup>13</sup>. K normalizaci byly použity následující rovnice (1) a (2):

$$EC50_n = EC50(A+B) / [EC50(A) R(A)_n + EC50(B) R(B)_n] \quad (1)$$

$$R(A)_n = c_A / EC50(A) [(c_A / EC50(A)) + (c_B / EC50(B))] \quad (2)$$

$$R(B)_n = 1 - R(A)_n \quad (3)$$

$c_A$ ,  $c_B$  příspěvky látek A nebo B v efektivní koncentraci směsi A+B, EC50 (A+B), spodní index n označuje normalizované hodnoty.

U směsi chloridu nikelnatého s diklofenakem nemohla být normalizace provedena vzhledem k špatné rozpustnosti diklofenaku. V tomto případě byl použit nasycený roztok sodné soli diklofenaku ve vodě, ve kterém bylo rozpuštěno patřičné množství naváženého chloridu nikelnatého. Molární koncentrace diklofenaku tedy byla pro všechny testované roztoky stejná. Molární poměr je rozdílný podle velikosti koncentrace chloridu nikelnatého.

Molárním poměrem rozumíme poměr molárních koncentrací obou látek, někdy se objeví termín molární zlomek, který v tomto sdělení znamená totéž: poměr molárních koncentrací složek ve směsi, kde je opomenuta třetí složka voda jako rozpouštědlo. Molární poměr „směsí“ s čistou látkou je roven jedné bez látky nule.

**Výsledky**

Hodnoty EC50 čistých testovaných látek jsou uvedeny v tabulce I. V tabulce II jsou shrnuty výsledky testování směsi chloridu nikelnatého s 3,4-dichloranilinem, v tabulce III směsi chloridu nikelnatého se sodnou solí diklofenaku.

Hodnoty EC50 chloridu nikelnatého a 3,4-dichloranilinu se liší o dva řády (tab. I). Podle toho se podstatně

Tabulka I

Účinek látek na metabolismus a životnost primárních hepatocytů z potkanů kvantitativně vyjádření jako EC50 [mM]

Látka	CAS	MW	Test ureogenese EC50 [mM]	Test životnosti EC50 [mM]
NiCl · 6 H <sub>2</sub> O	7791-20-0	237,70	155,2(±25,2)	236,0(±23,2)
3,4-Dichloranilin	95-76-1	162,02	1,09 (±0,01)	2,33 (±0,03)
Diklofenak sodium	15307-79-6	318,14	1,08 (±0,69)	2,05 (±0,03)

Tabulka II

Účinek binární směsi chloridu nikelnatého (hexahydrát) (A) s 3,4-dichloranilinem (B) na metabolismus a životnost primárních hepatocytů z potkana

% ve směsi <sup>a</sup>		$R_{\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}$ <sup>b</sup> [M]	Test ureogenese <sup>c</sup>		Test životnosti <sup>c</sup>	
A	B		EC50 [mM]	EC50 <sub>n</sub> [mM]	EC50 [mM]	EC50 <sub>n</sub> [mM]
0	100	0	1,09(±0,01) <sup>d</sup>	1,0	2,33(±0,15)	1,0
25	75	0,25	1,31(±0,03)	0,91	2,84(±0,1)	0,91
50	50	0,50	2,01(±0,01)	0,92	4,29(±0,3)	0,92
75	25	0,75	4,02(±0,30)	0,93	8,23(±0,1)	0,90
100	0	1	155,2(±25,2)	1,0	236,0(±23,2)	1,0

<sup>a</sup> mol.%, <sup>b</sup>  $R_{\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 1 - R_{3,4\text{-dichloranilin}}$ , <sup>c</sup> spodní index n označuje normalizovanou hodnotu, <sup>d</sup> v závorce je standardní odchyška počítaná ze závislosti velikosti účinku na koncentraci látek ve směsi

liší i hodnoty EC50 jejich směsí. Normalizované hodnoty EC50 směsí jsou stejné, poněkud statisticky nevýznamně, pod hodnotou jedna (tab. II). Nižší hodnoty EC50 znamenají vyšší toxicitu směsí (k úmrtí je třeba jejich menší molární koncentrace).

Směsi pro výsledky v tab. III byly tvořeny tak, že do roztoku 3,8 mM diklofenaku sodného bylo navázeno takové množství chloridu nikelnatého, aby výsledný roztok měl jeho v tabulce uvedenou molární koncentraci. Molární poměr pro diklofenak byl počítán z těchto koncentrací. Proto je v tabulce uváděn účinek směsí procentem změny životnosti, nikoliv hodnotou EC50. Je porovnána změna životnosti hepatocytů působením čistého chloridu nikelnatého s působením směsí s toutéž koncentrací chloridu nikelnatého ovlivněnou konstantní koncentrací diklofenaku sodného.

## Diskuse

Značný rozdíl v indexech toxicity EC50 chloridu nikelnatého a 3,4-dichloranilinu (tab. I) znemožňuje z naměřených hodnot posoudit, zda se ve směsi jejich toxicita ovlivňuje nebo pouze sčítá (tab. II). Pro toto posouzení je vhodné tyto hodnoty normalizovat. Normalizované EC50, označené jako EC50<sub>n</sub>, nabývají pro čisté látky hodnotu jedna. Pokud jde o aditivní účinek směsí, kde se velikosti účinků jednotlivých složek v účinku směsí pouze sčítají, nabývají i tyto směšné EC50 hodnoty jedna. Pokud jsou normalizované hodnoty od jedné významně odlišné, znamená to, že se látky v účinku ovlivňují. Důvody mohou být rozličné.

V tab. II jsou uvedeny hodnoty EC50 pro účinek směsí chloridu nikelnatého a 3,4-dichloranilinu na životnost

Tabulka III

Účinek binární směsi chloridu nikelnatého (hexahydrát) (A) se sodnou solí diklofenaku (B) na životnost primárních hepatocytů z potkana

Ve směsi <sup>a</sup>		$R_{\text{diklofenak}}$ <sup>b</sup>	% životnosti směsi	% životnosti $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (A)
A (M)	B <sup>a</sup> (M)			
0,00	0,0038	1,0	0	100
0,001	0,0038	0,79	45	
0,025	0,0038	0,13	81	100
0,050	0,0038	0,07	84	100
0,075	0,0038	0,048	95	
0,100	0,0038	0,037	93	100
0,150	0,0038	0,025	97	94
0,200	0,0038	0,019	95	68
0,250	0,0038	0,015	56	0
0,300	0,0038	0,013	3	0
0,350	0,0038	0,011	0	0
0,400	0,0038	0,009	0	0

<sup>a</sup> Koncentrace sodné sole diklofenaku je konstantní nad hodnotou EC50, je to nasycený roztok; <sup>b</sup>  $R_{\text{diklofenak}}$  je molární poměr molární koncentrace diklofenaku vůči celkové molární koncentraci látek ve směsi

a metabolismus primárních hepatocytů z potkana. Jejich normalizované hodnoty  $EC_{50}$  jsou přibližně o 10 % nižší než jedna. To by znamenalo, že směs těchto látek je toxičtější než jejich součet a že se v účinku ovlivňují. Avšak vzhledem k možnému rozptylu měření, které činí minimálně 10 %, je možné tento rozdíl považovat i za důsledek rozdílů v měření, tedy za šum.

Zajímavý výsledek přineslo uspořádání pokusu, jehož výsledky jsou v tab. III. Vzhledem k nízké rozpustnosti sodné soli diklofenaku nebylo možné stanovit hodnoty  $EC_{50}$  různých směsí s chloridem nikelnatým. Byla tedy měřena změna v životnosti hepatocytů ve směších se stejnou koncentrací sole diklofenaku, která byla připravena nasycením roztoku a převyšovala jeho  $EC_{50}$ , a měnící se koncentrací chloridu nikelnatého (tab. III). Při absenci chloridu nikelnatého byla životnost nulová, což odpovídalo  $EC_{50}$  sole diklofenaku. Se stoupající koncentrací toxicity klesala, a to již od malé koncentrace chloridu nikelnatého, kdy byl čtyřnásobný přebytek sole diklofenaku. Toxicita dosáhla minima při 30–50násobném přebytku chloridu nikelnatého, pak opět rostla a při asi 80násobném přebytku chloridu nikelnatého dosáhla životnost opět nuly. V roztoku se od počátku smíšení sodné sole diklofenaku s chloridem nikelnatým tvořila světle zelená sraženina. Porovnáním s toxicitou roztoku samotného chloridu nikelnatého je vidět (tab. III), že při vysokém přebytku převládla jeho toxicita; toxicita sole diklofenaku postupně byla eliminována vznikem sraženiny až k tomuto momentu. Toxicita sraženiny diklofenátu niklu se zřejmě neprojevovala. Pro vysvětlení snížení toxicity směsi diklofenaku a chloridem nikelnatým lze využít dvě skutečnosti: vliv nikelnatých iontů na metabolismus diklofenaku a tvorba sraženiny.

Komplexy diklofenaku s dvojmocnými kationty mědi, kobaltu, manganu i niklu byly syntetizovány a podrobně popsány<sup>14–16</sup> a další. Byly popsány jako mikrokrytalické sraženiny, stále na vzduchu a ve vodě nerozpustné. Tyto komplexy dokonce vykazují protizánětlivý účinek. Jsou připravovány v roztocích v ethanolu. Již po přidání několika kapek vody se komplex srazí.

O diklofenak je velký zájem pro jeho protizánětlivý účinek. Ani jeho toxické účinky však nejsou zanedbatelné. Diklofenak vykazuje v hepatocytech izolovaných z jater potkanů charakteristickou sigmoidální závislost cytotoxické účinnosti na koncentraci účinné látky. Účinnost na životnost hepatocytů barvením Trypanovou modří jsme stanovili po 60 min expozici  $EC_{50}$   $2,05 \pm 0,03$  mM, účinnost na metabolismus po 30 min expozici testem ureogenese  $1,08 \pm 0,69$  mM (tab. I). Toxický účinek diklofenaku na hepatocyty byl nalezen při koncentraci  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  vody<sup>17,18</sup>. Hodnota  $EC_{50}$  poškození hepatocytů získaná stanovením uvolněné laktát dehydrogenasy byla po 24 h expozici naměřena  $0,331 \pm 0,007$  mM (cit.<sup>19</sup>), testem MIT (kolorimetricky pomocí 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenyl formazanu<sup>20</sup>  $0,392 \pm 0,034$  mM (cit.<sup>21</sup>). Naše výsledky jsou s ohledem na délky expozice s těmito výsledky v dobré shodě.

Vedle diklofenaku jsou příčinou jeho toxicity pro

hepatocyty také jeho metabolity 4'-hydroxydiklofenak a 5-hydroxydiklofenak<sup>22</sup>, které vznikají díky cytochromu P450 3A. Inhibice metabolismu diklofenaku snižuje jeho toxicitu, indukce cytochromu P450 3A toxicitu zvyšuje<sup>23</sup>. Chlorid nikelnatý významně snižuje celkové množství cytochromu P450 v jaterních mikrosomech. Po sc. injekci potkanu ( $250 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) klesla mikrosomální aktivita asi na 40 % původní hodnoty, množství cytochromu P450 kleslo asi na 65 % (cit.<sup>24</sup>).

Přidání chloridu nikelnatého k diklofenaku, který je pro hepatocyty vysoce toxický, vedlo ke snížení toxicity této binární směsi velmi drasticky. Tento jev byl tak výrazný, že v určitém rozsahu koncentrací byla zaznamenána jen malá ztráta životnosti hepatocytů (tab. III). Zvyšování koncentrace chloridu nikelnatého vedlo pak ke zvyšování toxicity až k úplné ztrátě životnosti. Domníváme se proto, že hlavní příčinou ztráty toxicity diklofenaku s chloridem nikelnatým je tvorba nerozpustné sraženiny jejich komplexu.

## Závěr

Test s primárními hepatocyty z potkanů byl použit pro stanovení akutní toxicity binárních směsí chloridu nikelnatého s 3,4-dichloranilinem a chloridu nikelnatého se sodnou solí diklofenaku. Jsou to polutanty, které se do životního prostředí dostávají z různých zdrojů (farmacie, chemický průmysl, zemědělství) a působí rozdílnými mechanismy. Zatímco akutní toxicita směsi diklofenaku s 3,4-dichloranilinem je aditivní nebo se účinky složek jen nepatrně vzájemně ovlivňují, působením směsi diklofenaku s chloridem nikelnatým je ovlivnění výrazné. Ve směsi diklofenaku s chloridem nikelnatým se vytvoří světlezelená sraženina. V závislosti na poměru koncentrací složek toxicita směsi klesá až téměř k žádné. Vedle tvorby sraženiny nelze v některých případech vyloučit ani vliv nikelnatých iontů na metabolismus diklofenaku. Nicméně to znamená, že v přírodě může docházet ke snižování toxicity některé složky znečištění působením jiných složek.

*Tato práce byla podpořena částečně grantem evropské unie (evropská komise FP6, č. kontraktu 003956), částečně granty GA ČR 203/06/1265 a IGA MZ ČR NR/8780-3 a Státním zdravotním ústavem v Praze.*

## LITERATURA

1. British Geographical Council, Natural Environmenta Research Council, September 2008, podle [http://www.bgs.ac.uk/mineralsuk/downloads/comm\\_profile\\_nickel.pdf](http://www.bgs.ac.uk/mineralsuk/downloads/comm_profile_nickel.pdf).
2. Science Lab.com: Material Safety Data Sheet, Nickel chloride MSDS.
3. Summary Risk Assessment Report: 3,4-dichloroaniline. EUR 22234 EN 2006 (European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, ECB).

4. *Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures*. EPA/630/R-00/002, US Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Office of Research and Development, Washington D.C. 2000.
5. Tichý M., Rucki M., Reitmajer J., Feltl L.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75 (Suppl.), S133 (2002).
6. Tichý M.: *Chem. Listy* 102, 545 (2008).
7. Tyson C. A., Green C. E.: *Cytotoxicity measures: choice nad methods*. V knize: *The Isolated Hepatocytes: Use in Toxicology and Xenobiotic Biotransformations*, (Rauckman E. J., Padilla G. M., ed.), str. 119, Academic Press, Orlando 1987.
8. Kučera O., Lotková H., Kriváková P., Roušar T., Červinková Z.: *Česk. Fysiol.* 55, 103 (2006).
9. Moldéus P., Högberg J., Orrenius L.: *Isolation and use of liver cells*. V knize: *Methods of Enzymology: Membranes*, (Fleischer S., Packer L., ed.), part C, str. 60. Academic Press, New York 1978.
10. Berry M. N., Grivell A. R., Grivell M. B., Phillips J. W.: *Cell Biol. Toxicol.* 13, 223 (1997).
11. Phillips H. J.: *Dye exclusion test for cell viability*. V knize: *Tissue Culture. Methods and Applications* (Kruse Jr. P. F., Petterson Jr. M. K., ed.), str. 406. Academic Press, New York 1973.
12. Coulombe J. J., Favreau L.: *Clin. Chem.* 9, 102 (1963).
13. Tichý M., Bořek-Dohalský V., Matoušová D., Rucki M., Feltl L., Roth Z.: *SAR QSAR Environ. Res.* 13, 261 (2002).
14. Brown D. H., Smith W. E., Teape J. W., Lewis A. J.: *J. Med. Chem.* 23, 729 (1980).
15. Kovala-Demertzi D., Hadjidakou S. K., Demertzis M. A., Deligiannakis Y.: *J. Inorg. Biochem.* 69, 223 (1998).
16. Kovala-Demertzi D.: *J. Inorg. Biochem.* 79, 153 (2000).
17. Kobayashi K., Urashima K., Shimada N., Chiba K.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 889 (2002).
18. Kirchheiner J., Meineke I., Steinbach N., Meisel C., Roots I., Brockmöller J.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 55, 51 (2003).
19. Stierling H., Faigle J. W., Sallman A., Küng W., Richter W. J., Kriemler H. P., Alt K. O., Winkler T.: *Xenobiotika* 9, 601 (1979).
20. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D., Mitchel J. B.: *Cancer Res.* 47, 936 (1987).
21. Ponsoda X., Jover R., Castell J. V., Gómez-Lechón M. J.: *J. Tiss. Cult. Methods* 13, 21 1991.
22. Bort R., Ponsoda X., Jover R., Gómez-Lechón M. J., Castell J.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 288, 65 (1999).
23. Wang A. G., Xia T., Yuan J., Yang K. D., Chen X. M., Qu W., Waalkes M. P.: *Food Chem. Toxicol.* 42 (10) (2004).
24. Dewaga M., Arai H., Kubota M., Hashimoto Y.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 200, 1086 (1994).

**A. Pokorná, M. Tichý, J. Nerudová, J. Tumová, and I. Hanzlíková** (*National Institute of Public Health, Prague*): **Determination of Toxicity of Binary Mixtures Using Rat Hepatocytes**

Primary hepatocyte assay was used to determine acute toxicity of nickel(II) chloride – 3,4-dichloroaniline and nickel(II) chloride – sodium diclophenac mixtures. Although the components act by different mechanisms, their acute toxicity was almost additive; it decreased to zero in dependence on the molar ratio of the components. Toxicities of pollutants in environment may decrease due to interactions with other components.