

Cytotoxicita nízkomolekulárních produktů syntézy polyanilinu

Bc. Jana Hrušková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Hrušková**
Osobní číslo: **T13373**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Cytotoxicita nízkomolekulárních produktů syntézy polyanilinu**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o syntéze, vlastnostech a biologickém působení nízkomolekulárních produktů syntézy polyanilinu. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si pokročilé techniky práce v této laboratoři. V praktické části pak provede a vyhodnotí sérii testů zaměřených na stanovení cytotoxicity nízkomolekulárních produktů syntézy polyanilinu na eukaryotické buňky.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

ROSYTAL, S. Nový přehled biologie. . Praha: Scientia, 2003. ISBN 10: 80-7183-268-5.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů

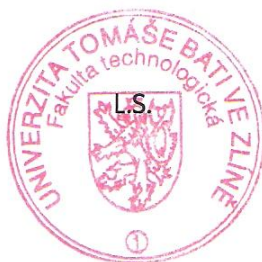
Datum zadání diplomové práce: **16. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan



Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.

ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 8. 5. 2015


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá toxicitou nízkomolekulárních produktů syntézy polyanilinu. Konkrétně se jedná o monomer polyanilinu anilin hydrochlorid, oxidační činidlo polymerační reakce amonium persulfát, dusíkaté deriváty anilinu 2-nitroanilin, 3-nitroanilin a 4-nitroanilin, dimerní jednotky polyanilinu azobenzen, benzidin, hydrazobenzen a trimerní fenazin. Teoretická část je zaměřena vedle vlastností testovaných látek na jejich toxické účinky a metody testování toxicity. V praktické části je vyhodnocován cytotoxický vliv těchto nízkomolekulárních látek na viabilitu buněčné linie myších fibroblastů NIH/3T3.

Klíčová slova: toxicita, amonium persulfát, anilin hydrochlorid, azobenzen, benzidin, hydrazobenzen, fenazin, 2-nitroanilin, 3-nitroanilin, 4-nitroanilin, polyanilin, buněčná linie NIH/3T3

ABSTRACT

This thesis deals with cytotoxicity of low molecular weight products of polyaniline synthesis, namely polyaniline monomer aniline hydrochloride, polymeration oxidizing agent ammonium persulfate, aniline nitrogen derivatives 2-nitroaniline, 3-nitroaniline and 4-nitroaniline, polyaniline dimers azobenzene, benzidine, 1,2-diphenylhydrazine and trimer phenazine. The theoretic part is focused on tested substances, their toxic effects and methods of toxicity testing. In the practical part the influence of these low molecular weight substances on the viability and cell death of the mouse fibroblast cell line NIH/3T3 is evaluated.

Keywords: toxicity, ammonium persulphate, aniline hydrochloride, azobenzene, benzidine, 1,2-diphenylhydrazine, phenazine, 2-nitroaniline, 3-nitroaniline, 4-nitroaniline, polyaniline, cell line NIH/3T3

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vzniku této práce. Mé poděkování patří také Ing. Zdence Kucekové, PhD., za ochotu a pomoc při získávání zkušeností nejen v laboratorní práci s buněčnými kulturami.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TESTOVÁNÍ TOXICITY	12
1.1 METODY TESTOVÁNÍ TOXICITY	12
1.1.1 <i>In vitro</i>	13
1.1.2 <i>In silico</i>	15
1.1.3 <i>In vivo</i>	16
1.2 TOXICKÉ ÚČINKY A JEJICH TESTOVÁNÍ	17
1.2.1 Podráždění kůže a sliznic	17
1.2.2 Inhibice přenosu kyslíku	18
1.2.3 Volné radikály	18
1.2.4 Reaktivní formy kyslíku	19
1.2.5 Inhibice funkce enzymů	19
1.2.6 Imunotoxicita	19
1.2.7 Reprodukční a vývojová toxicita	20
1.2.8 Genotoxicita	21
1.2.9 Karcinogenita	22
2 TOXICITA POLYMERŮ	24
3 POLYANILIN	26
4 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY SYNTÉZY POLYANILINU	29
4.1 AMONIUM PERSULFÁT	29
4.1.1 Akutní toxicita	29
4.1.2 Subchronická toxicita	30
4.1.3 Podráždění kůže a sliznic	30
4.1.4 Genotoxicita	31
4.1.5 Karcinogenita	31
4.2 ANILIN HYDROCHLORID	31
4.2.1 Subchronická toxicita	32
4.2.2 Karcinogenita	32
4.2.3 Teratogenita	33
4.3 2-NITROANILIN	33
4.3.1 Mutagenita	34
4.3.2 Vývojová toxicita	34
4.3.3 Interakce nitroanilinů s albuminem a její toxikologické důsledky	34
4.4 3-NITROANILIN	35
4.4.1 Subchronická toxicita	35
4.4.2 Mutagenita	35
4.5 4-NITROANILIN	36
4.5.1 Akutní toxicita	36
4.5.2 Chronická toxicita	37
4.5.3 Mutagenita	37
4.5.4 Karcinogenita	37

4.6	OLIGOMERY ANILINU	38
4.7	AZOBENZEN	40
4.7.1	Genotoxicita	40
4.7.2	Karcinogenita	41
4.8	BENZIDIN	41
4.8.1	Genotoxicita	42
4.8.2	Karcinogenita	42
4.8.3	Imunotoxicita	43
4.8.4	Vývojová toxicita	43
4.9	FENAZIN	43
4.9.1	Cytotoxicita	43
4.9.2	Genotoxicita	44
4.9.3	Ekotoxicita	44
4.10	HYDRAZOBENZEN	45
4.10.1	Akutní toxicita	45
4.10.2	Subchronická toxicita	46
4.10.3	Genotoxicita	46
4.10.4	Karcinogenita	47
II	PRAKTICKÁ ČÁST	48
5	MATERIÁL A METODIKA	49
5.1	TESTOVANÉ LÁTKY	49
5.2	POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE	49
5.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	50
5.4	EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ	50
5.4.1	Příprava roztoků testovaných látek	50
5.4.2	Prekultivace buněk	55
5.4.3	Aplikace roztoků	55
5.4.4	Stanovení buněčné viability	56
5.4.5	Stanovení poměru apoptických a nekrotických buněk	58
6	VÝSLEDKY	60
6.1	BUNĚČNÁ VIABILITA	61
6.1.1	Cytotoxicita testovaných látek bez „Recovery Time“	61
6.1.2	Cytotoxicita testovaných látek s „Recovery Time“	71
6.2	POMĚR APOPTICKÝCH A NEKROTICKÝCH BUNĚK	82
7	DISKUZE	87
	ZÁVĚR	93
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	113
	SEZNAM OBRÁZKŮ	114
	SEZNAM TABULEK	116

ÚVOD

Hlavním cílem této diplomové práce je stanovení cytotoxických účinků nízkomolekulárních látek, které se mohou vyskytovat v polyanilinu. Předmětem testování toxicity budou konkrétně anilin hydrochlorid (monomer polyanilinu), amonium persulfát (oxidační činidlo), dusíkaté deriváty anilinu 2-nitroanilin, 3-nitroanilin a 4-nitroanilin a dále oligomerní struktury azobenzen, benzidin, hydrazobenzen a fenazin.

Polyanilin je vodivý polymer, který má velký potenciál pro využití v klinické diagnostice a chirurgických aplikacích. Ačkoliv tento polymer vykazuje v současných studiích toxické účinky, není, jako makromolekulární látka, sám jejich příčinou. Jeho toxicita je dána obsahem nízkomolekulárních látek, které se v něm vyskytují. Z tohoto důvodu byly vybrány již zmiňované deriváty anilinu, monomer anilin hydrochlorid, oxidační činidlo polymerace amonium persulfát a oligomery polyanilinu, které se ve výsledném polymeru mohou v závislosti na přípravě vyskytovat. Smyslem zkoumání praktické části proto bude zejména zjištění koncentrací, které by ve výsledném materiálu nepůsobily toxicky. K tomuto účelu budou použity metody kvantitativního stanovení cytotoxického účinku, konkrétně test MTT a průtoková cytometrie. Výsledky testů, udávající viabilitu buněčných linií myšských fibroblastů NIH/3T3, které byly dříve vystaveny působení potenciálně toxické látky, budou doplněny o názorné tabulky a statisticko-matematické vyhodnocení. Do výzkumu bude zařazeno také mikroskopické vyšetření buněk, které slouží pro kvalitativní hodnocení toxicity, doložené mikrofotografiemi buněk vystavených jednotlivým koncentracím testovaných látek.

Teoretická část práce bude zaměřena především na dostupné informace o vlastnostech zkoumaných látek a jejich toxickém působení. Budou zde rozebrány jednotlivé toxické účinky, které se u daných chemikálií vyskytují, a zhodnoceny možné negativní účinky na organismus. Toxické účinky, kam patří mimo jiné teratogenní, genotoxický či karcinogenní potenciál, budou samostatně probány včetně postupů, kterých se k tomuto účelu v současné době používá.

I. TEORETICKÁ ČÁST

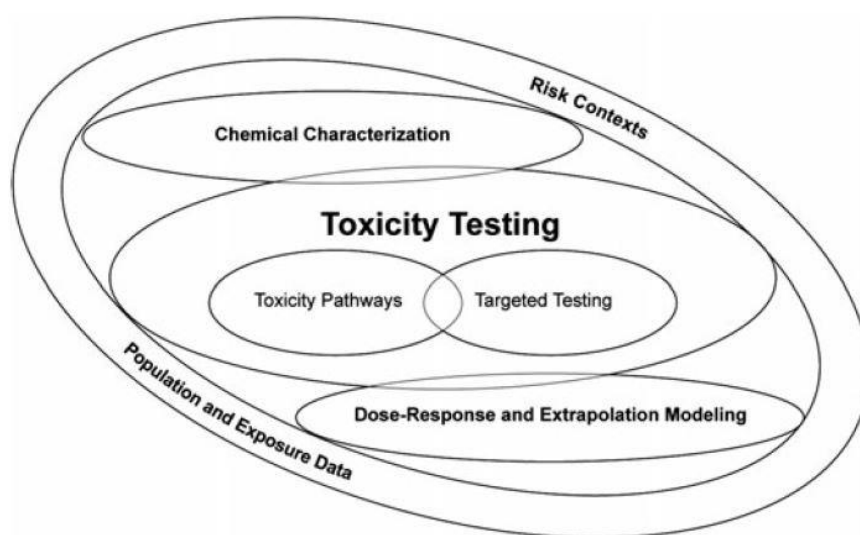
1 TESTOVÁNÍ TOXICITY

Testování toxicity má nezastupitelnou úlohu při zjišťování biologických účinků všech látek, které se vyskytují v životním prostředí. S tím souvisí široký rozsah metod používaných k hodnocení možných toxických účinků, nejen na člověka. Vzhledem k zaměření této práce na hodnocení toxicity nízkomolekulárních látek vyskytujících se v polyanilinu a k jeho potenciálnímu využití (viz kapitola 3 POLYANILIN), budou blíže rozebrány účinky a metody související s hodnocením rizik pro člověka, především ve zdravotnických prostředcích.

1.1 Metody testování toxicity

Hlavní cílem zkoušek toxicity je posuzování nebezpečnosti látek, které se obecně vyskytují v životním prostředí (Krewski et al., 2009). V posledních desetiletích bylo k tomuto poznání využíváno především testování na zvířatech. Snaha o pochopení mechanismu distribuce látky organismem se začala projevovat v průběhu posledních 30 let. Roku 2004 byla dosavadní metodika testování posouzena jako nedostačující a o tři roky později byla vydána publikace popisující novou vizi testování toxických účinků (Bhattacharya et al., 2011).

Obrázek 1 – hlavní složky posuzování toxicity (Krewski et al., 2009)



Na obrázku 1 pozorujeme schéma hlavních složek současného testování toxicity. Chemická charakterizace (Chemical Characterization) zahrnuje shromáždění chemických a fyzikálních vlastností, informace o stabilitě, reaktivitě, potenciálu pro bioakumulaci apod. Samotné testování toxicity (toxicity testing) musí být vhodně navrženo dle zamýšle-

né aplikace v souvislosti s možnými riziky (Risk Contexts) a známými expozičními účinky dané látky (Population and Exposure data). Testování zahrnuje techniky *in vitro* a *in vivo* (Toxicity Pathways, Targeted Testing). Testy na zvířatech prozatím není možné úplně vyřadit, jelikož jsou nutné pro upřesnění výsledků *in vitro* či jejich doplnění. *In vivo* testy jsou však omezeny na minimum. Další metodou, jejíž význam se s rozvojem výpočetní techniky zvyšuje, je využití technik *in silico* (Dose-Response and Extrapolation Modeling). Na základě zadaných dat informuje o koloběhu látek v organismu a umožňuje predikci odezvy těla na podanou látku v daném množství (Krewski et al., 2009).

1.1.1 *In vitro*

Testování toxicity na buněčných kulturách je v rozvoji od 70. let, kdy si toxikologové poprvé osvojili techniky buněčných a tkáňových kultur pro hodnocení biologických účinků (Akhtar et al., 2008). Dnes je testování *in vitro* základní metodou testování toxicity zahrnující velké množství různých testů (Bhattacharya et al., 2011).

Požadavky na biologické hodnocení materiálů *in vitro* udává 5. část ČSN EN ISO 10993: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* (ČSN EN ISO 10993-3). Vzhledem k obecnému uplatnění zmiňovaných *in vitro* testů a obrovské rozmanitosti zdravotních prostředků jsou požadavky testování koncipovány jako otevřené schéma zkoušení, které vyžaduje rozhodování výzkumníka na základě vlastností a aplikaci materiálu (Tinkler a Costigan, 2007). Norma uvádí tři kategorie zkoušek: zkoušku přímým nebo nepřímým kontaktem samotného materiálu a zkoušky extraktu. Danou kategorii vybíráme na základě charakteru vzorku, předpokládaného místa aplikace a charakteru použití, přičemž je možné využít i více než jednu z těchto možností. Zvolená kategorie pak specifikuje přípravu zkoušeného vzorku, buněčných kultur a způsob působení. Hodnocení přítomnosti a rozsahu toxického účinku není přesně definováno, což dává možnost použití širokého souboru zkoušek. Používané metody jsou pouze rozděleny do několika kategorií: posouzení poškození buněk morfologickými prostředky, měření poškození buněk, měření růstu buněk a měření specifických aspektů buněčného metabolismu (ČSN EN ISO 10993-3). Norma neobsahuje absolutní kritéria o splnění zkoušky, protože požadavky na konkrétní zdravotní prostředek jsou závislé na mnoha různých faktorech, kam může patřit např. stav pacienta, způsob aplikace, distribuce látky a jiné (Tinkler a Costigan, 2007).

In vitro testy jsou prováděny na zavedených buněčných liniích, které musí být získány z uznaných tkáňových bank. Je-li vyžadována specifická citlivost, je možné zařadit

do výzkumu primární buněčné kultury získané přímo z živých tkání, pokud je možné prokázat reprodukovatelnost (Peters et al., 2007).

Stanovení cytotoxicity se provádí kvalitativním nebo kvantitativním hodnocením. Kvalitativní hodnocení se provádí mikroskopickým vyšetřením, kdy je hodnocena obecná morfologie, případné odchlípení, lýza buněk či porušení celistvosti membrány. Kvantitativní postupy zahrnují stanovení počtu mrtvých buněk, inhibici buněčného růstu, proliferaci buněk či tvorbu kolonií. Mezi měřené kvantifikovatelné parametry patří počet buněk, množství bílkovin, enzymů, redukce či uvolnění vitálního barviva (ČSN EN ISO 10993-3). Mezi metody kvantitativního vyhodnocení patří test MTT a průtoková cytometrie, které budou použity pro hodnocení cytotoxicity v této práci. Kvalitativní hodnocení bude provedeno pozorováním buněk pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem.

1.1.1.1 Test MTT

Test MTT je založen na schopnosti živých metabolizujících buněk převádět žlutou tetrazoliovou sůl na modrý formazán (Abate, Mshana a Miorner, 1998). Při samotném provedení testu jsou buňky vystaveny působení potenciální cytotoxické látky. Po odebrání působící látky jsou ponechány v netoxickém prostředí média pro možnost obnovení proliferace, čímž rozlišíme buňky schopné a neschopné množení. Poté je k buňkám přidán 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromid (MTT), který je na mitochondriální membráně metabolizujících buněk redukován na zmiňovaný formazán (Freshney, 2005). Po uplynutí potřebné doby (cca 4 hodiny) je přidáno vhodné rozpouštědlo (dimethylsulfoxid). Množství přeživších buněk je pak stanoveno nepřímým měřením absorbance pomocí spektrofotometrického přístroje při vlnové délce 540 nebo 570 nm (Molecular probes, 2002). Vyšší hodnoty absorbance značí větší množství formazánu, tedy vyšší procento přeživších buněk. Je však nutná kontrola interakce MTT s testovanou látkou, jež může způsobit vznik detekovaného formazánu (Freshney, 2005).

1.1.1.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda standartně používána pro analýzu částic, nejčastěji buněk v suspenzi. Umožňuje detekci apoptózy, biofyzikální i biochemická stanovení buněčných procesů, kvantitativní analýzu DNA a jiné. Buněčná suspenze je hnací tekutinou transportována do průtokové komory (Šinkorová a Zárybnická, 2008). Buňky, většinou značeny specifickými flouorchromy, jsou hydrodynamicky soustředěny do tenkého proudu v kapiláře, kudy prochází jedna za druhou, což umožňuje rozpoznání jednotlivých buněk.

Po ozáření monochromatickým koherentním zářením je měřena fluorescence každé buňky. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barvivo. Mezi hlavní výhody této metody patří jednoduchá příprava vzorků, vysoká frekvence analýzy jednotlivých buněk a relativně nízké finanční náklady na analýzu jednoho vzorku (Slaninová et al., 2008).

V této práci bude průtoková cytometrie použita pro analýzu buněčné smrti. Programovaná buněčná smrt hraje velkou roli ve vývoji organismu, udržování homeostázy a reakci organismu na chemoterapii. Při analýze cytotoxicity různých látek je důležité rozlišit jednotlivé typy programované buněčné smrti – apoptózu, nekrózu a autofágii. Apoptóza, známá jako programovaná buněčná smrt, je spojena se specifickými morfologickými a biochemickými změnami. Důsledkem apoptózy není pouze smrt buňky, ale i účinné odstranění mrtvých buněk a jejich částí (Balvan et al., 2014). Mezi pozorovatelné znaky patří smrštění cytoplazmatické membrány, tzv. blebbing připomínající tvorbu bublinek na povrchu membrány, kondenzace chromatinu, fragmentace DNA či uvolnění protizánětlivých cytokinů (Bortner a Cidlowski, 2002). Nekróza má odlišné morfologické znaky. V první fázi dochází k otoku buněk a jejich organel s následným praskáním plazmatické membrány, ztrátou nitrobuněčného obsahu a rozkladu buňky, což způsobuje zánětlivou reakci okolní tkáně (Edinger a Thompson, 2004).

Analýzu buněčné smrti je možno provést na základě specifických znaků průběhu apoptózy a nekrózy. Pro identifikaci buněčné smrti v této práci bude využito barviv propidiumjodid (PI) a annexin V (AN-V). PI se stechiometricky váže k nukleovým kyselinám a pomocí něj je možné zjistit obsah fragmentů DNA o nízké molekulové hmotnosti a detekovat tak apoptické buňky. AN-V se váže k negativně nabitým fosfolipidům, které jsou u zdravých buněk umístěny výhradně uvnitř cytoplasmatické membrány. Při apoptóze dochází k prostupu těchto fosfolipidů na vnější stranu a je tak možná jeho interakce s barvivem. Při detekci apoptózy pomocí AN-V je nutné současné použití PI, jelikož AN-V je vázán i nekrotickými buňkami v důsledku ruptur membrány (Balvan et al., 2014).

1.1.2 *In silico*

Tradiční i alternativní testování toxicity umožnilo vytvoření dostatečně velkých souborů dat, které slouží jako predikční toxikologické výpočetní modely. Data použitá pro vytvoření těchto modelů pochází především z testů *in vivo*, proto jsou takto získané odhady téměř srovnatelné s pokusy na zvířatech, a to včetně možných chyb pokusných údajů (Ti-

chý et al., 2005). Metody *in silico* se již používají pro kontrolní a doplňující účely, ale předpokládá se, že jejich role bude do budoucna růst (Raunio, 2011). *In silico* modelů existuje řada, např. modely vytvořené a analyzované pomocí kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou, kinetické fyziologické simulační modely nebo modely založené na biologické podobnosti (Tichý et al., 2005). Vývoj a aplikace všech druhů metod je založena na principu podobnosti, tedy hypotéze, že podobné sloučeniny mají podobnou biologickou aktivitu (Raunio, 2011).

1.1.3 *In vivo*

Testování na zvířatech již několik desítek let vyznává tzv. princip 3 „R“ (z angl. replacement, reduction, refinement). V první řadě jde o náhradu zvířat v experimentech pomocí *in vitro* stanovení toxicity nebo pomocí počítačových simulací, dále o snížení počtu zvířat použitých v experimentu vhodnou volbou metody, zvířecího modelu a uspořádání pokusu, a nakonec zjemnění, čímž je chápána ohleduplná manipulace a vyloučení bolestivých zákroků (Šulcová et al., 2006).

Ačkoliv jsou dnes hojně využívány metody *in vitro* a *in silico*, není možné *in vivo* testování absolutně vyloučit (Bhattacharya et al., 2011). Pokusy na celém organismu (zvířeti) jsou nutné k ověření účinku dané látky na orgánové systémy se všemi vazbami (Šulcová et al., 2006). Použití těchto metod je však aplikováno až v poslední fázi testování nových materiálů (Bhattacharya et al., 2011).

Pro testování *in vivo* jsou používána zvířata geneticky definovaná, která tvoří standardizované zvířecí modely, ale i zvířata geneticky nedefinovaná (Nomura, 1997). V případě testování nových léčiv, tedy je-li hledán pozitivní účinek látky, bývají pozorovány dvě skupiny zvířat, jedna skupina zdravých jedinců a druhá skupina zvířat s modelovým onemocněním, které jsou zajištěny genetickými metodami (Šulcová et al., 2006). Jde především o transgenní živočichy, což jsou jedinci, u kterých byly pomocí indukovaných chromozomálních a genových mutací zajištěny vrozené vady (Lambert et al., 2005). V případě testování toxických vlivů látky jsou pozorovány opět dvě skupiny zvířat, tentokrát polovina zdravých zvířat, která nejsou vystavena účinku látky a slouží jako reference, a polovina zdravých zvířat vystavených účinku dané látky (Knejzlík a Ruml, 1999). I v tomto případě může být použito geneticky modifikovaných zvířat, většinou pro dosažení vyšší reprodukovatelnosti výsledků (Nomura, 1997). Nejčastější druhy používaných

zvířat jsou myši a potkani, kvůli relativně nízké ceně a krátké generační době (Knejzlík a Ruml, 1999).

Mezi nejobvyklejší testy patří hodnocení akutní toxicity (jednorázové podání), subchronické toxicity (opakované podání), reprodukční a vývojové toxicity, karcinogenity a imunotoxicity. Pro co nejlepší predikci účinků u člověka bývají často používány různé zvířecí druhy a různé typy modelových situací (Šulcová et al., 2006).

1.2 Toxické účinky a jejich testování

Expozice lidského těla toxické látce může vyvolat celou řadu důsledků včetně jejich kombinací. V této kapitole budou popsány pouze faktory, které se váží k nízkomolekulárním produktům syntézy polyanilinu. Vzhledem k zameření práce právě na polyanilin jsou v této kapitole zařazeny také známé informace o toxicitě anilinu. Dostupné údaje o toxických vlastnostech testovaných látek budou rozebrány níže v samostatné kapitole 4 Nízkomolekulární látky syntézy polyanilinu.

1.2.1 Podráždění kůže a sliznic

Mnoho látek vyvolává dráždivou reakci v místě aplikace ještě dříve, než se dostanou do krevního řečiště a mohou působit ve vnitřním prostředí. Mezi tyto látky patří především silné kyseliny, zásady a silná oxidační činidla (Tichý, 2004). Tento mechanismus účinku je důležitý u všech materiálů, které se dostávají do kontaktu s kůží a sliznicemi.

Postup pro posuzování zdravotnických prostředků a materiálů z hlediska jejich schopnosti vyvolávat podráždění a senzibilizaci kůže je popsán v desáté části souboru českých norem biologického hodnocení zdravotnických prostředků (ČSN EN ISO 10993), zabývající se zkouškami dráždivosti a senzibilizace kůže. Senzibilizace kůže neboli alergická kontaktní dermatitida, je imunologicky zprostředkovaná kožní reakce na testovanou látku. U člověka se tato reakce projevuje svěděním, zarudnutím kůže, otokem, pupenci, puchýřky nebo kombinací uvedených příznaků (ČSN EN ISO 10993-10).

Podráždění kůže a sliznic je velmi důležité u kosmetických přípravků, kde se například používá amonium persulfát jako zesvětlující přípravek na vlasy (Signorin et al., 2004). Testování kosmetických přípravků pro evropský trh pomocí *in vivo* technik je od r. 2013 zakázáno právními předpisy. Jsou k dispozici mnohé alternativní testy na buněčných liniích – testy oční dráždivosti na králičích buňkách rohovky (Takahashi et al., 2008), testy na červených krvinkách pro předpověď počáteční buněčné reakce na určité chemiká-

lie, testy založené na spektrofotometrických změnách při denaturaci hemoglobinu (Vinardell a Mitjans, 2008), testy oční dráždivosti použitím 3D modelů oční rohovky (Pflanzenbecker et al., 2013) nebo pomocí chorioalantoidní membrány fertilizovaného slepičího vejce (Marquardt, 2010), dále hodnocení kožní dráždivosti za použití rekonstituovaných modelů lidské kůže (Kim, 2010) nebo testování transdermální absorpce skrze lidskou kůži *in vitro* (Kotingová, Borská a Fiala, 2009). Pro kožní dráždivost je v první fázi užíván systém predikce na základě fyzikálně-chemických vlastností (Walker et al., 2005), dále pak testy *in vitro* na kožních buněčných liniích (Vinardell a Mitjans, 2008).

Anilin u lidí způsobuje kožní alergické reakce, zvláště u pacientů trpících ekzematickou dermatitidou. Účinek anilinu na zvířata se projevuje mírným až středním senzibilizačním potenciálem. Studie dokládají slabě dráždivý účinek na kůži králíků a silnou dráždivost pro oči králíků (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003).

1.2.2 Inhibice přenosu kyslíku

Přenos kyslíku je základem zachování životních funkcí. Některé látky mají mnohonásobně vyšší afinitu pro vazbu na hemoglobin a jsou tak schopné kyslíku zabránit v přenosu, jiné reagují přímo s kyslíkem a snižují tak jeho dostupnost. Příznaky se projevují bolestmi hlavy, dušností, závratěmi, bezvědomím až smrtí (Tichý, 2004).

1.2.3 Volné radikály

Volné radikály vznikají v průběhu oxidačních reakcí, při kterých dochází k přenosu elektronů mezi jednotlivými reakčními složkami. Přitom se jedna složka oxiduje (odevzdává elektrony) a druhá se redukuje (elektrony přijímá). Vzniklé atomy jsou pro organismu toxické svou vysokou reaktivitou (Velíšek, 2002). Oxidačním reakcím jsou přisuzována závažná onemocnění, jako rakovina, ateroskleróza a jiné. Sloučeniny, které brání vzniku volných radikálů, nazýváme antioxidanty. Jsou to látky, které radikálům dodávají volný elektron a zabraňují tak možným škodlivým reakcím (Blache et al., 1999). Se zvyšující se koncentrací antioxidantů se zvyšuje četnost terminačních reakcí a zkracují se délky radikálových řetězců (Velíšek, 2002).

Míru antioxidačního působení je možné posuzovat pomocí metod založených na eliminaci radikálů nebo na redoxních vlastnostech látek, v obou případech *in vitro*. K de-

tekci se využívá spektrofotometrického stanovení, úbytku fluorescence či vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Paulová, Bochořáková, Táborská, 2004).

1.2.4 Reaktivní formy kyslíku

Některé látky způsobují změny v metabolismu kyslíku, jejichž důsledkem je vznik abnormálně vysoké produkce tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS) na úkor kyslíku. Mezi látky známé tímto účinkem patří i nitroaromatické sloučeniny způsobující produkci superoxidů (Sies a De Groot, 1992). Reaktivní kyslíkové druhy mohou souviset s oxidačním poškozením tkáně (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny). Tyto účinky je možné hodnotit jak testováním na zvířatech, tak *in vitro* (Bagchi, 1995). ROS způsobují trvalou proliferaci buněk, buněčnou smrt (apoptózu i nekrózu), vznik jaderných i mitochondriálních mutací DNA. Mohou způsobovat neurodegenerativní a kardiovaskulární choroby, mohou se podílet na karcinogenezi jater a kůže (Roberts et al., 2010). ROS, případně reaktivní formy dusíku (RNS), mohou způsobovat též teratogenní důsledky. I relativně netoxická látka může být v embryu enzymaticky aktivována na vysoce toxické meziprodukty elektrofilní povahy či volné radikály. Elektrofilní meziprodukty mají schopnost kovalentní vazby s DNA či proteiny, zatímco volné radikály mohou s molekulárním kyslíkem iniciovat tvorbu ROS. Ty u plodu mohou způsobit oxidativní poškození nebo ovlivovat buněčnou signalizaci, která je pro správný vývoj a růst důležitá (Wells et al., 2005).

1.2.5 Inhibice funkce enzymů

Enzymy ve své struktuře obsahují tzv. aktivní místa, která vazbou se substrátem zajišťují průběh dané reakce a přeměnu struktury substrátu. Těmto látkám však mohou konkurovat jiné sloučeniny, tzv. inhibitory, které se mohou na enzym navázat dříve a tím jej zablokovat pro jiné látky (Nečas, 2000).

Inhibicí enzymů a studiem vazebných míst se zabývá mnoho studií a svědčí o tom i práce zabývající se anilinem. Publikace Sousa et al. pojednávající o inhibici serinproteáz anilinem a 4-nitroanilinem prokázala sklon anilinu ke konkurenční inhibici (2001).

1.2.6 Imunotoxicita

Imunitní systém je soustava vzájemně kooperujících molekul, buněk a tkání, která se spolu s endokrinní a nervovou soustavou účastní na udržení integrity organismu a zajištění jeho stálého vnitřního prostředí, a která umožňuje vyvolávat imunitní odpověď při rozpoznání antigenu (Bartůňková, 2011). Imunotoxikologie zkoumá interakce imunitního

systemu s chemickými látkami, jejichž průběh vyúsťuje v nežádoucí účinky. Pro hodnocení vlivu dané látky na imunitní systém je nutné zjištění imunotoxického potenciálu a míry rizika pro určitou populaci či jedince (Petanová, 2007). Jelikož existuje i jistá závislost na věku jedince, byl vyvinut podobor vývojová imunotoxikologie (DIT). DIT se zabývá touto problematikou a zaměřuje se na expozice v raných vývojových stádiích člověka látkám, které interagují právě se složkami imunitního systému, a mohou způsobovat zvýšenou vnímavost vůči nemocem souvisejícím s imunitou v průběhu života (Collinge et al., 2012).

Pro vysokou složitost imunitního systému a zejména omezené pochopení mechanismů účinků mnohých látek či vakcín byla vyvinuta imunogenomika. Jde o podobor genomiky, což je vědní obor zabývající se studiem a analýzou veškeré genetické informace daného organismu (genom), a proteomiky, popisující soubor proteinů kódovaný genomem (Penka a Slavíčková, 2011). Imunogenomika využívá těchto informací pro sestavení databází, identifikaci imunologicky významných genů a proteinů a v konečném důsledku také k lepšímu porozumění imunitního systému a jeho reakcí (Ohara, 2009).

Imunotoxikologie je navzdory složitosti imunitního systému studována i na buněčné a molekulární úrovni (Batista-Duharte et al., 2011). *In vitro* se provádí ve dvou stupních. První test se provádí na buněčné linii myelocytů, buněk kostní dřeně. Pokud testy neukáží jednoznačně imunotoxický účinek, přistupuje se ke druhému stupni testování, které je vyhodnocováno na linii lymfocytů (Lankveld et al., 2010). Kvůli složitosti systému nelze hodnotit imunotoxicitu jedním způsobem, a proto byla vyvinuta celá řada specifických testů *in vitro*, založených na změnách produkce protilátek, proliferaci, aktivitě T-buněk, exprese cytokinu a jiné (Ulleras et al., 2005).

1.2.7 Reprodukční a vývojová toxicita

Reprodukční a vývojová toxicita stanovují potenciální účinky testovaných vzorků na reprodukční funkci a embryonální morfologii. Teratogenita představuje nežádoucí účinky zkoušené látky na embryo nebo plod a prenatální a ranně postnatální vývoj, přičemž reprodukční funkce mohou být danou látkou ovlivňovány bez jiných, zjevných příznaků toxicity a negativní efekt se může projevit od snížení fertility až po úplnou sterilitu (ČSN EN ISO 10993-3).

Účinky teratogenních látek jsou závislé na několika faktorech, období těhotenství, při kterém dochází k expozici, délce samotné expozice, dávce a genotypu matky i plodu. I velmi malé dávky teratogenu, které nezpůsobují anatomické změny, mohou u plodu způ-

sobit biochemické a fyziologické poruchy či změny chování. Tyto abnormality mohou zůstat skryté i několik let po narození dítěte (Schwarzová, 2010).

Testování teratogenity je možné provádět *in vitro* za použití embryonálních buněk (Stewart a Bolt, 2011). Pro test mohou být použity i neplacentární živočichové, nejčastěji kuřecí embrya, ale je zde velký předpoklad falešných pozitivních kontrol vůči savcům (Knejzlík a Ruml, 1999). V dnešní době jsou nejčastěji používány myší embryonální kmenové buňky nebo kultury krysích embryí (Eckardt a Stahlmann, 2010). I když je vždy nutné dodatečné porovnání s testováním *in vivo*, současné studie podporují používání testování teratogenity *in vitro* jako predikci vývojové toxicity (Robinson et al., 2011).

Při studii chronické toxicity anilinu na potkanech byl zaznamenán pokles hmotnosti vaječníků u skupiny samic, které dostávaly vysoké dávky této látky. Při pozorování postnatálních účinků anilinu se u samic vyskytovaly známky hemotoxicity a změny hmotnosti sleziny. U plodů i novorozenců pak byly zaznamenány mírné změny hematologických parametrů. Na základě této studie byla stanovena kritická úroveň expozice pro potenciální vývojovou toxicitu na 15 mg/osoba/den nebo 15 mg/m³ (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003).

1.2.8 Genotoxicita

Dle ČSN EN ISO 10993 je pojem genotoxicita chápán jako schopnost způsobovat, u buněk savců nebo i nižších organismů, genové mutace, změny struktury chromozomů či jiné změny DNA a genů. Genotoxický účinek stojí na počátku chemické karcinogeneze, která je procesem vedoucím v konečném důsledku ke vzniku nádorového onemocnění.

Ve 3. části ČSN EN ISO 10993 se tedy pojednává o potenciálu zdravotnických prostředků k indukci genetických změn u člověka, které pak mohou být přenášeny zárodečnými buňkami na budoucí generace. Jde o složitý komplex vlastností, jejichž společný efekt je na molekulární úrovni obtížně kvantifikovatelný. Proto je při interpretaci výsledků nutná značná opatrnost (ČSN EN ISO 10993-3). U testování genotoxicity dochází k častému výskytu irelevantních pozitivních výsledků. Vhodná volba buněčné linie nebo úprava buněčných linií pomocí genetického inženýrství může těmto výsledkům předcházet (Kirkland et al., 2007). V současné době jsou zkoušky genotoxicity dle legislativy založeny na kombinaci dvou či tří testů. Jedna z možností zahrnuje kombinaci zkoušky na genové mutace na bakteriích a zkoušky na genové mutace pomocí buněk myšího lymfomu. Druhou alternativou jsou zkoušky genové mutace na bakteriích a savčích buňkách

v kombinaci se zkouškou na klastogenitu (ČSN EN ISO 10993-3). Klastogenita představuje schopnost látky vyvolávat zlomy chromozomů a výměny jejich částí mezi sebou, zatímco mutagenita schopnost vyvolávat změny v nukleotidové sekvenci zahrnující malý počet nukleotidů - bodové mutace, inserce, delece a substituce (Corvi et al., 2013).

Mutagenní aktivita monocyklických aromatických aminů byla studována pro kmeny *Salmonella*, přičemž anilin vykazoval negativní výsledky, 3-nitroanilin a jeho deriváty vykazovaly vyšší aktivitu než 2-nitroanilin a od něj odvozené deriváty. Mutagenní aktivita se zdála být závislá na poloze nitro, amino či hydroxy skupin (Chung et al., 1997). Anilin byl testován při mikronukleárních studiích na buňkách kostní dřeně u myši po intraperitoneálním podání. Po aplikaci vyšších koncentrací 300 mg/kg/den vykazoval známky klastogenního potenciálu (Environmental Protection Agency, 2006).

1.2.9 Karcinogenita

Karcinogenita vyjadřuje schopnost činidla vyvolávat zhoubné bujení buněk a tkání (Horák, Linhart, Klusoň, 2004). Příčinou karcinogeneze je postupný mnohastupňový proces, při němž dochází ke kumulaci poruch (mutace aj.) určitých genů, což vede k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů podílejících se zejména na regulaci dělení a diferenciaci buňky a stabilitě genomu (Stratil a Kubáň, 2004).

Požadavky na testování karcinogenity jsou definovány v 3. části ČSN EN ISO 10993. Karcinogenita materiálů je studována na základě pozorování vývoje nádorového bujení u pokusných zvířat během jejich života. Studie karcinogenity *in vivo* se provádí jako další stupeň po zkouškách genotoxicity a to pouze v případech, kdy genotoxicita nebyla stanovena. Byl-li tedy materiál vyhodnocen jako genotoxický, je považován za nebezpečný i z hlediska karcinogenity (ČSN EN ISO 10993-3).

V září roku 2014 byla publikována práce o alternativních přístupech pro predikci karcinogenity. Jsou zde zahrnuty již zmíněné testy genotoxicity *in vitro*, dále hodnocení reaktivity k DNA a schopnosti rozkládat tkáň, nové aplikace ómických technologií a porovnávání s látkami o podobných vlastnostech, čímž lze konkretizovat nejasné interpretace výsledků předchozích testů (Benigni, 2014). Ómické technologie zahrnují postupy používané pro studium genů, proteinů, nukleových kyselin a možných metabolitů v biologických vzorcích (Horgan a Kenny, 2011). Jsou založeny na předpokladu, že fyziologické, farmakologické a toxikologické vlivy mění strukturu proteinů, buněčnou aktivitu a tím i jejich strukturální a funkční vlastnosti. Ómické studie slibují rozluštění mechanismů

toxicity, pochopení specifických biomarkerů citlivosti na dané toxické látky a jejich aplikaci jako časných indikátorů toxických účinků (Bhogal et al., 2005). Mezi často užívané testy patří např. hmotnostní spektroskopie či metoda „microarray“ pro identifikace oligonukleotidů (Horgan a Kenny, 2011).

V průmyslu s anilinovými barvivy bylo zaznamenáno nadměrné množství úmrtí pracovníků v důsledku rakoviny močového měchýře. Pracovníci však byli vystaveni různým aromatickým aminům (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003). Následné epidemiologické studie samotného anilinu neprokázala zvýšené riziko karcinogenity (CANCER, International Agency for Research on, 1982).

2 TOXICITA POLYMERŮ

Z hlediska možných aplikací polymerů je nutné, aby daný materiál neobsahoval zbytkové koncentrace toxických nízkomolekulárních látek, které by mohly difundovat do okolního prostředí (Nelson et al., 2011). Polymerní látky obecně nejsou samy o sobě považovány za toxické, ale přísady používané při jejich výrobě být toxické mohou. Delilah Lithner hodnotila akutní toxicitu 83 náhodně vybraných polymerních materiálů pomocí hrotnatek velkých (*Daphnia Magna*). Testované látky byly ponechány luhotvat v destilované vodě po dobu 1 – 3 dnů. Třetina z testovaných materiálů uvolňovala do vody toxické látky. Na obrázku 3 pozorujeme vyhodnocení cytotoxicity těchto materiálů pomocí hodnoty EC50, tedy hmotnosti materiálu v gramech, jejíž výluh o objemu 1 litr způsoboval reakci u 50 % zástupců (2011).

Obrázek 2 – 28 testovaných vzorků, jejichž výluhy vykazovaly cytotoxický účinek pro použitý kmen *Daphnia magna* (Lithner, 2011)

Product	Plastic type	48 h EC50s g plastic/L		TIE indication of toxicant	Leaching test
		Repl 1	Repl 2		
Plastic products					
I. Artificial leather, brand S	Plasticised PVC	8	8	organics (& metals)	24 h shaking 22°C
I. Artificial leather, brand.G	Polyurethane	38	31		24 h shaking 22°C
I. Artificial leather, brand M	Plasticised PVC	26	22	organics (& metals)	24 h shaking 22°C
I. Floor	Plasticised PVC with polyurethane surface	54	50		24 h shaking 22°C
I. Children's handbag	Polyurethane	44	54		24 h shaking 22°C
I. Bath tub squirt toys	Plasticised PVC	≈ 100	59		24 h shaking 22°C
I. Inflatable bathing ring	Plasticised PVC	71	75		24 h shaking 22°C
I. Table cloth	Plasticised PVC	62	76		24 h shaking 22°C
II. Watering can	High-density-polyethylene	17	24		3 d diffusion 50°C
II. Laboratory gloves	Plasticised PVC	2	4	metals	3 d diffusion 50°C
II. Boat fender	Plasticised PVC	21	11	organics	3 d diffusion 50°C
II. Arm pads for floating	Plasticised PVC	79	70	organics	3 d diffusion 50°C
II. Rain poncho	Plasticised PVC	172	160	organics (& metals?)	3 d diffusion 50°C
II. Wet room wall carpet	Plasticised PVC	235	219		3 d diffusion 50°C
II. Super epoxy (filler) ^a	Epoxy (cured)	10	2	organics	3 d diffusion 50°C
II. Marine epoxy (filler) ^a	Epoxy (cured)	9	6	organics	3 d diffusion 50°C
II. Quick epoxy glue ^a	Epoxy (cured)	44	39		3 d diffusion 50°C
II. Laminating epoxy ^a	Epoxy (cured)	>80	27		3 d diffusion 50°C
II. Epoxy putty (sealant) ^a	Epoxy (cured)	114	99		3 d diffusion 50°C
Synthetic textiles					
III. Awning cloth ^b	Polyacrylonitrile (acrylic) impregnated with polytetrafluoroethylene (PTFE: Teflon®)	1	1	organics	3 d diffusion 50°C
III. Furniture fabric	Polypropylene	4	3		3 d diffusion 50°C
III. Mesh fabric ^b	Plasticised PVC coated polyester (PET)	7	8	organics	3 d diffusion 50°C
III. Baby diaper outer material ^c	Polypropylene and polyethylene	75	68		24 h shaking 22°C
III. Knitted muffler	Polyacrylonitrile (acrylic)	108	131		3 d diffusion 50°C
III. Furniture fabric	Polyacrylonitrile (acrylic; 73%), polyester (27%)	176	185		3 d diffusion 50°C
III. Curtain	Polyamide (nylon)	172	145		3 d diffusion 50°C
III. Wool imitation fabric	Polyacrylonitrile (acrylic)	124	180		3 d diffusion 50°C
III. Stretch pants (golden)	Polyester (92%), thermoplastic polyurethane (elastane; 8%)	210	201		3 d diffusion 50°C

^a Cured epoxy resin

^b Technical fabric

^c The non-woven material was tested, excluding the absorbing core and covering top sheet. Some unspecified elastic material was also present.

Charakterizace syntetických polymerů je náročná disciplína v důsledku jejich heterogenity, složitého rozdělení molekulových hmotností, chemického složení, architektury řetězců apod. Jsou používány různé detekční metody, jako je infračervená spektroskopie, nukleární magnetické rezonance s Fourierovou transformací, hmotnostní spektroskopie nebo chromatografické metody (Chang, 2003). Mezi chromatografickými metodami je užívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie či vylučovací chromatografie s rozptylovým detektorem (měření rozptylu světla na částicích analytu) v kombinaci s refraktometrickým detektorem (založený na rozdílu indexu lomu mobilní fáze a unášené látky), která vykazuje dobré experimentální výsledky (Liu et al., 2010).

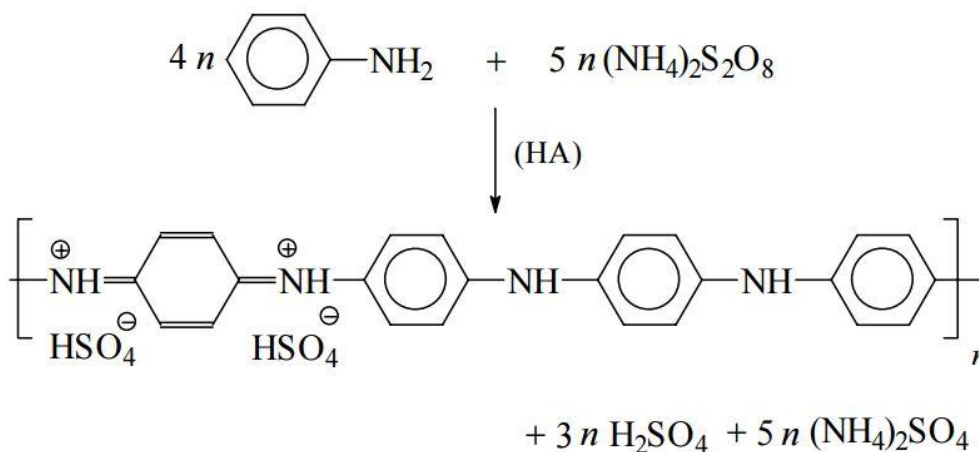
3 POLYANILIN

Polyanilin (PANI) je vodivý polymer, jehož vodivost je ve srovnání s kovy mnohonásobně nižší, ovšem o mnoho řádů vyšší než u obvyklých polymerů. Vodivost PANI je dána jeho strukturou, která sestává ze systému konjugovaných dvojných vazeb, v druhé řadě pak přítomností nositelů náboje, kteří zprostředkovávají jeho transport po řetězci (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).

Vodivé polymery mají velký potenciál pro použití v biomedicínských a biotechnologických aplikacích. Jde především a zamýšlené použití v klinické diagnostice pomocí tepelných biosenzorů nebo v chirurgických sondách zajišťujících zpětnou vazbu o změnách povrchových vlastností tkáně (Nambiar a Yeow, 2011) či aplikaci ve tkáňovém inženýrství, jako jsou elektricky aktivní scaffoldy pro srdeční tkáň (Hsiao et al., 2013). Toxicita polyanilinu byla testována mnohými studii, které přinášely v důsledku různých testovaných forem a modifikací materiálu a taktéž různých přístupů testování rozporuplné výsledky. Některé z nich však udávají zánětlivé reakce emeraldinových filmů implantovaných u potkanů (Wang et al., 1999) nebo prokazatelný cytotoxický efekt vodivé soli a nevodivé báze (Humpolíček et al., 2012). Toxicita polyanilinu není způsobována samotným polymerem, ale přítomností zbytků reaktantů, nízkomolekulárních meziproductů nebo vedlejších produktů (Exnerová et al., 2012).

Standartní způsob přípravy PANI spočívá v oxidaci 0,2 M anilin hydrochloridu (AH) s 0,25 M amonium persulfátem (APS) v kyselém vodném prostředí za vzniku PANI ve formě emeraldinu.

Obrázek 3 – oxidace anilin hydrochloridu peroxydisíranem amonným v kyselém prostředí za vzniku polyanilinu



Při praktickém provedení se připraví odděleně roztoky AH a APS. Rozpustí se 2,59 g (20 mmol) AH v 50 ml vody a odděleně 5,71 g (25 mmol) APS taktéž v 50 ml vody (Stejskal a Gilbert, 2002). Spojení monomerních anilinových jednotek je pravděpodobně nejpomalejší krok polymerace, který dává vznik jedné z možných dimerních struktur p-aminodifenylaminu, N-N'-difenylhydrazinu či benzidinu (Gospodinova a Terlemezyan, 1998). Reakční směs nejdříve získává barvu modrou, což je důsledkem vzniku anilinových oligomerů, po skončení polymerace zezelená. Reakce probíhá při pokojové teplotě asi 10 minut (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Následující den se vzniklá sraženina odfiltruje, promývá se třemi 100 ml dávkami 0,2 M kyseliny chlorovodíkové a stejným způsobem acetonem. Produkt se suší na vzduchu, dále se dosušuje při 60 °C ve vakuu (Stejskal a Gilbert, 2002). Stejným způsobem lze připravit filmy PANI na předmětech stálých v kyselém prostředí a to jejich ponořením do reakční směsi. Přidáním ve vodném prostředí rozpustného polymeru do reakční směsi lze získat místo sraženiny koloidní polyanilinovou disperzi (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).

Chemická struktura polyanilinu (PANI) byla hodnocena několika studiemi. Publikace Trchové et al. popisuje vliv výroby PANI na jeho složení s detekcí pomocí UV-VIS, FTIR a Ramanovy spektroskopie. V případě oxidace anilinu ve vodě (nepřítomnost kyselin a zásad) je popisována produkce různých oligomerních jednotek PANI, které jsou pak v poměrně malém množství obsaženy i v produktu polymerace. Pokud je polymerace započata v alkalických podmínkách, je zjevný rychlý vznik oligomerů, což se projeví zhnědnutím reakční směsi. Krátké oligomery jsou nerozpustné ve vodě, v důsledku toho agregují nebo krystalizují. Další oxidací krystalů sice vznikají delší oligomerní jednotky, ale nedochází k polymeraci, proto je produktem této reakce pouze směs anilinových oligomerů. Naopak, je-li reakce prováděna v kyselém prostředí, jsou hnědé oligomery produkovány pouze v nepatrném množství (2012). Tenké PANI filmy byly charakterizovány pomocí Ramanovy spektroskopie, doplňované charakterizací pomocí FTIR a UV-VIS spektroskopie. Byly hodnoceny meziprodukty časně oxidace anilinu, které prezentují přítomnost p-benzochinonu a fenazinu (Trchová et al., 2014). Práce zabývající se výskytem meziproduktů polymerace anilinu v alkalickém prostředí pomocí infračervené spektroskopie potvrzuje výskyt benzochinonu a fenazinu. Dále byla zaznamenána dvojná vazba s dusíkem, což naznačuje obsah azobenzenu (Šeděnková, Stejskal a Trchová, 2014). Laska a Widlarz publikovali roku 2004 studii spektroskopické a strukturní charakterizace nízkomolekulárních frakcí polyanilinu. Vedlejší produkty oxidační polymerace byly extrahovány organickými

rozpouštědly. Téměř polovina sloučenin extrahovaných metanolem může být interpretována jako typické produkty oxidace aminů – nitro a nitrososloučeniny. K jejich vzniku může docházet v kyselém prostředí v přítomnosti silně oxidačních činidel.

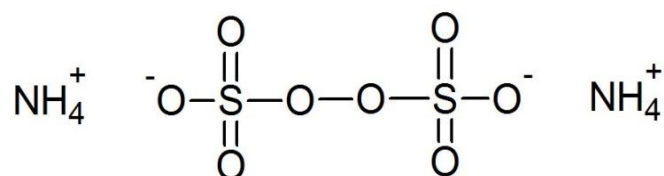
Oligomery PANI mají zásadní roli při tvorbě filmů, jsou produkovány v raných fázích oxidace, adsorbují na povrch materiálu, který je dispozici, a následně slouží jako iniciační centra pro růst polymerních řetězců (Trchová et al., 2013).

4 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY SYNTÉZY POLYANILINU

V této kapitole budou podrobněji probrány dostupné informace o jednotlivých látkách, které se mohou vyskytovat v polyanilinu a které budou předmětem testování v praktické části diplomové práce. Informace se budou vztahovat ke známým fyzikálním a chemickým vlastnostem, s důrazem na přístupná data týkající se toxických účinků těchto látek.

4.1 Amonium persulfát

Obrázek 4 – strukturní vzorec amonium persulfátu
(vytvořeno v programu ChemSketch)



Amonium persulfát je bílá, slabě zapáchající látka pevného skupenství. Je to nehořlavá látka rozpustná ve vodě, má silně oxidační vlastnosti. Molární hmotnost APS je 228,20 g/mol, relativní hustota je 1,982 g/cm³, sypaná hustota 950 – 1050 kg/m³, hodnota pH = 3 (pro 100g/l). Teplota tání je 160 °C (Lach-Ner, 2011).

APS je klasifikovaná jako oxidující (O), zdraví škodlivá (Xn) a dráždivá látka (Xi). Dotek APS s hořlavým materiálem může způsobit požár (R8). Je zdraví škodlivý při požití (R22), dráždí oči, dýchací orgány a kůži (R36/37/38) a může vyvolat senzibilizaci při vdechování a při styku s kůží (R42/43). Dle bezpečnostního listu jsou známé hodnoty akutní toxicity LD50 u krys po orálním podání 689 mg/kg a po kožní aplikaci pak hodnoty vyšší než 2000 mg/kg (Sigma-Aldrich, 2014a).

4.1.1 Akutní toxicita

Akutní toxicita při perorálním podání byla testována na potkanech za stanovení hodnoty LD50 na 820 mg/kg (Smyth et al., 1969). Studie, která pozorovala rozdílnost působení dle pohlaví, vyhodnotila LD50 600 mg/kg u samců a 495 mg/kg u samic. Při testování akutní toxicity s aplikací dermální cestou byla stanovena LD50 na 2 g/kg, kdy byl APS aplikován na neporušenou kůži potkanů, a 10 g/kg při aplikaci neředěného APS na kůži králíků. Akutní toxicita je vyvolávána také inhalací APS. Po čtyřhodinové inhalaci APS potkany byla vyhodnocena LC50 2,95 mg/l (Cosmetic Ingredient Review Expert, 2001).

4.1.2 Subchronická toxicita

Perorální cestou byl APS podáván samcům CR-CD potkanů v dávkách 0, 100, 300 nebo 600 ppm po dobu 28 dní. Během výzkumu nedošlo k žádnému úmrtí. Jako LOAEL byla stanovena dávka 600 ppm (National industrial chemicals and assessment scheme, 2001). Příznaky toxicity APS nebyly pozorovány při výzkumu, ve kterém byla psům podávána mouka obsahující 15 g/45 kg APS 6 dní v týdnu po dobu tří měsíců. Změny nebyly zaznamenány ani u psů a potkanů, kteří byli krmeni moukou upravenou pomocí APS po dobu několika měsíců (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001).

Inhalaci aerosolu APS o koncentracích 0, 1, 4, 9, 17 a 20 mg/m³ byli vystaveni potkani během 7 dní, 23,5 hodin denně. Jako NOAEL byla stanovena hodnota 1 mg/m³. Při vyšších koncentracích byly zaznamenány poklesy hmotnosti a náznaky plicního edému (Last et al., 1982). Třináctidenní studie toxicity APS inhalační cestou u králíků nezpůsobila žádné úmrtí související s expozicí APS. Vyskytovaly se však mnohé zdravotní problémy, jako šelesty na plicích či změna jejich hmotnosti. NOAEL byl stanoven na 10,3 mg/m³ (Signorin et al., 2001).

4.1.3 Podráždění kůže a sliznic

Dermální dráždivost APS byla zjišťována pomocí náplastí aplikovaných jak na neporušenou, tak i na odřenou kůži králíků. Na poraněné kůži způsobil APS silné dráždění a otoky s následným zajizvením. Na neporušené kůži jen mírné zarudnutí a otok. Studií byl proto vyhodnocen jako kůži nedráždivá látka. Tyto výsledky se pak shodují s výzkumem z roku 1994, kde nebyly pozorovány dráždivé účinky APS (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001).

Schopnost APS dráždit oční sliznice byla vyhodnocena indexem dráždivosti rovným hodnotě 10,5 - mírně dráždivý. Studie CTFA pozorovala reakce u králíků, z nichž třem byly oči po aplikaci promývány po dobu třiceti sekund. APS vykazoval mírnou dráždivost u zástupců, jejichž oči nebyly promývány, a téměř nulovou u těch, kterým byly oči promyty (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001).

4.1.4 Genotoxicita

APS v množství 1 až 1000 $\mu\text{g}/\text{miska}$ byl podroben testům mutagenity na bakteriích. Testy byly posuzovány na *Salmonella typhimurium* s metabolickou aktivací i bez ní. Všechny zkoušky poskytly negativní výsledky (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001). Mutagenní potenciál byl testován v koncentracích až do 10 mg/misku , opět za použití *Salmonella typhimurium*. Výsledky mutagenity byly negativní ve všech hodnocených koncentracích (Ishidate et al., 1984).

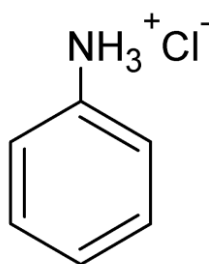
Při testech chromozomálních aberací APS vykazuje též negativní výsledky. Testy byly provedeny na CHL buňkách inkubovaných v koncentraci 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ po dobu 48 hodin bez metabolické aktivace (National industrial chemicals and assessment scheme, 2001).

4.1.5 Karcinogenita

Karcinogenita APS byla zjišťována ve studii zaměřené na potenciál této látky pro tvorbu kožních nádorů. Výzkum probíhal 51 týdnů a byl prováděn na myších samicích. Ve výsledcích byly náznaky tvorby nádorů spojované s APS, ale nebylo možné jej označit jako aktivně podpůrný ani kompletní karcinogen (Kurokawa et al., 1984).

4.2 Anilin hydrochlorid

Obrázek 5 – strukturní vzorec anilin hydrochloridu
(vytvořeno v programu ChemSketch)



Anilin hydrochlorid (AH) je bílá až slabě naředlá nebo šedozelená krystalická látka (při 20 °C), téměř bez zápachu. Je to hořlavá látka, rozpustná ve vodě a ethanolu. Molární hmotnost AH je 129,59 g/mol , relativní hustota je 1,2 g/cm^3 , sypaná hustota 500 kg/m^3 . Teplota tání je 197 – 200 °C, teplota varu 245 °C (Lach-Ner, 2005).

Anilin hydrochlorid je klasifikován jako toxická (T) a dráždivá látka (Xi) nebezpečná pro životní prostředí (N). Je toxický při vdechování, styku s kůží a při požití (R23/24/25) a je podezřelý z hlediska karcinogenních účinků (R40). U AH hrozí nebezpečí

vážného poškození očí (R41), může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží (R43) nebo může při dlouhodobé expozici (vdechování, styk s kůží, požití) způsobovat vážné poškození zdraví (R48/23/24/25). Je zde možné nebezpečí nevratných účinků (R68). Je vysoce toxický pro vodní organismy (R50). Dle bezpečnostního listu je známa hodnota akutní toxicity LD50 u krys při orálním podání – 840 mg/ml. Kožní a oční dráždivost je zaznamenána po 24 hodinách vystavení králíků. Dle *in vitro* testů AH vykazuje mutagenní účinky a je zde také podezření na karcinogenní vlastnosti (Sigma-Aldrich, 2015).

4.2.1 Subchronická toxicita

Byla provedena studie subchronické expozice AH na potkanech Sprague-Dawley, při které byly pozorovány hematologické, biochemické a histopatologické odpovědi. Jedna skupina samců dostávala 600 parts per million (ppm) AH v pitné vodě, druhá skupina pouze čistou vodu. U zástupců vystavených AH byla pozorována změna hmotnosti orgánů. Šlo především o zvýšení hmotnosti sleziny (až 61 %), pokles hmotnosti varlat a kolísání hmotnosti jater. Počty erytrocytů ukázaly velmi významný pokles ve všech časových intervalech, hematokryt a hemoglobin vykazovaly snížení po 30 a 90 dnech léčby (Firoze et al., 1993).

4.2.2 Karcinogenita

Testy možné karcinogenity AH byly prováděny vždy u 50 samců a 50 samic potkanů a myši. Koncentrace v potravě činily u potkanů 0,6 a 0,3 %, u myši 1,2 a 0,6 %. Do výzkumu byly zahrnuty též kontrolní skupiny od každého pohlaví. Výzkum trval 108 týdnů. U potkaních samců bylo zjištěno několik typů statisticky významných mezenchymálních tumorů, zejména sleziny. AH byl vyhodnocen jako karcinogenní při perorálním podání. U myši nebyl ve srovnání s kontrolní skupinou prokázán výskyt tumorů (Carcinogenesis, National Cancer Institute, 1978).

AH byl testován na kancerogenitu v jednotlivých experimentech na myších a potkanech při perorálním podání. U myši nebylo zjištěno žádné zvýšení výskytu nádorů. U potkanů byl pozorován výskyt fibrosarkomů, zhoubných nádorů pojivových tkání a sarcomů sleziny a peritoneální dutiny (CANCER, International Agency for Research on, 1982).

V nedávné studii byl AH testován po dva roky při perorálním podání na potkanech. U samců výsledky vykazovaly zvýšený výskyt různých typů sarkomů sleziny (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003).

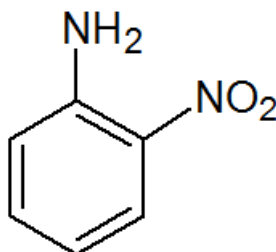
4.2.3 Teratogenita

AH byl po perorálním podání potkanům hodnocen jednak z hlediska teratogenity a jednak z hlediska postnatálních účinků. Při nejvyšší dávce, 100 mg AH/kg/den, byly u samic pozorovány známky hematotoxicity. U skupiny s nejnižší dávkou, 10 mg AH/kg/den, bylo u těhotných samic zjištěno významné zvýšení relativní hmotnosti sleziny (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003).

U plodů i novorozenců ze skupiny samic, kterým byly podávány vysoké dávky AH, byly indikovány změny v hematologických parametrech. Na základě toho byla stanovena NOAEL vývojové toxicity na 30 mg AH / kg hmotnosti / den (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003).

4.3 2-nitroanilin

Obrázek 6 – strukturní vzorec 2-nitroanilinu (vytvořeno v programu Chem-Sketch)



2-nitroanilin nebo-li o-nitroanilin je krystalická látka s molekulovou hmotností 138,12 g/mol. Bod tání leží v rozmezí od 70 do 73 °C, bod varu je 284 °C, bod vzplanutí je 167 °C.

2-nitroanilin je klasifikován jako toxická látka (T). Je toxický při vdechování, styku s kůží a při požití (R23/24/25), udává se nebezpečí kumulativních účinků (R33) a je škodlivý pro vodní organizmy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R52/53). Bezpečnostní list udává hodnoty akutní toxicity po orálním podání krysám LD50 1,6 mg/kg, po čtyřhodinové inhalaci u krys LC50 2554,29 mg/m³ (Sigma-Aldrich, 2013).

4.3.1 Mutagenita

Nitroaniliny byly testovány na mutagenní potenciál v Amesově testu. V této zkoušce genotoxického účinku se používá bakteriálních kmenů *Salmonella typhimurium* s uměle vyvolanými mutacemi, které zodpovídají za ztrátu schopnosti buněk tvořit histidin. Tato látka je nezbytná pro růst buňky, proto je nutné tyto speciální kmeny udržovat v prostředí obsahující histidin. Je-li testovaná látka mutagenem, dojde k reverzní mutaci a návratu schopnosti histidin tvořit (Havelková, Kachlík a Lefnerová, 2005). 2-nitroanilin nevykazoval zvýšenou rychlost mutace, ale byla zaznamenána jeho toxická koncentrace pro testovaný kmen 2515 $\mu\text{g}/\text{miska}$ (Aßmann et al., 1997). Dle výsledků testování Agentury pro ochranu životního prostředí nevykazuje 2-nitroanilin známky klastogenity při mikronukleárních studiích na savčích buňkách kostní dřeně. V této zkoušce byly hodnoceny koncentrace 0 – 500 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$ intraperitoneální injekcí u myši (Environmental Protection Agency, 2006).

4.3.2 Vývojová toxicita

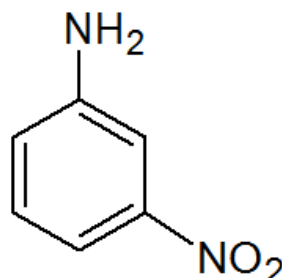
2-nitroanilin byl podroben zkouškám na teratogenní potenciál a reprodukční toxicitu. Ani jeden ze jmenovaných efektů nebyl prokázán. Zkoušky však ukázaly podezření na vývojovou toxicitu u potkanů, přičemž NOAEL pro teratogenitu byla stanoven na koncentraci 300 - 400 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$ (United Nations Environment Programme, 2001).

4.3.3 Interakce nitroanilinů s albuminem a její toxikologické důsledky

Vazba nitroanilinů na albumin má toxikologický význam, protože ovládá volné, účinné koncentrace těchto látek v organismu a ovlivňuje tak jejich délku a intenzitu účinku. Nitroaniliny byly zkoumány na interakce s hovězím sérovým albuminem (BSA), přičemž nejvyšší afinitu k BSA měl 4-nitroanilin (vázáno cca 74 %), dále 2-nitroanilin (cca 68 %) a nejslabší vykazoval 3-nitroanilin (cca 56 %). V praxi to znamená, že stanovené hodnoty akutní toxicity perorálním podáním u krys (LD50 1600 g/kg pro 2NA, 536 g/kg pro 3NA a 750 g/kg pro 4NA) nejsou přesné, jelikož téměř 74 % 4-nitroanilinu je vázáno na albumin, čímž se ve skutečnosti sníží jeho koncentrace natolik, že LD50 4NA bude nižší než u 3NA. U koncentrací látek, které byly testovány v použité studii (276 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethanolu) však nebylo zjištěno relevantní procentuální zastoupení vazeb mezi nitroaniliny a BSA (Xiang, Tong a Lin, 2007).

4.4 3-nitroanilin

Obrázek 7 – strukturní vzorec 3-nitroanilinu (vytvořeno v programu Chem-Sketch)



3-nitroanilin (jinak m-nitroanilin) je žlutá krystalická látka o molekulové hmotnosti 138,12 g/mol. Bod tání této látky leží v rozmezí 111 – 114 °C, bod varu je 306 °C, bod vzplanutí 196 °C. Relativní hustota této látky je 0,9 g/cm³ při 25 °C.

2-nitroanilin je klasifikován jako toxická látka (T). Toxický je při vdechování, styku s kůží a při požití (R23/24/25), hrozí u něj nebezpečí kumulativních účinků (R33) a je škodlivý pro vodní organizmy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R52/53). Byla stanovena hodnota LD50 pro akutní toxicitu u krys po orálním podání jako 535 mg/kg (Sigma-Aldrich, 2012a).

4.4.1 Subchronická toxicita

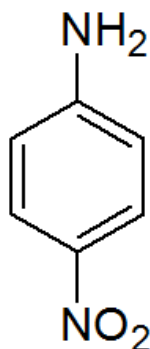
Toxicita 3-nitroanilinu byla testována během 28 dní po opakovaném perorálním podání potkanům v koncentracích 0 – 170 mg/kg/den. Ve výzkumu nedošlo k úmrtí v důsledku podání testované látky, ale u vysokých dávek byly zaznamenány mnohé negativní efekty, jako změna hmotnosti jater, sleziny a ledvin, či prokazatelný pokles spermatogeneze. Závěrem práce byla hodnota NOEL koncentrace nižší než 15 mg/kg/den. Při vyšších koncentracích hrozí výskyt toxických účinků pro mužské pohlavní orgány nebo krevní buňky, včetně tzv. methemoglobinemie, čili zvýšené koncentraci methemoglobinu, který pak brání přenosu kyslíku (Yoshida et al., 1991).

4.4.2 Mutagenita

3-nitroanilinu byl hodnocen na genotoxicitu pomocí Amesově testu. Tato látka se projevila jako mutagenní pro *Salmonella typhimurium*, přičemž byla stanovena toxická koncentrace této látky pro dané kmeny 3308 µg/miska (Aßmann et al., 1997).

4.5 4-nitroanilin

Obrázek 8 – strukturní vzorec 4-nitroanilinu (vytvořeno v programu Chem-Sketch)



4-nitroanilin nebo-li p-nitroanilin je krystalická látka žluté barvy zapáchající po amoniaku. Molekulová hmotnost je 138,12 g/mol, pH této látky je rovno 7,0. Bod tání se pohybuje v rozmezí 146 – 149 °C, bod varu je 260 °C při 133 hPa, bod vzplanutí je roven 213 °C. Relativní hustota látky je 1,44 g/cm³.

4-nitroanilin je klasifikován jako toxická látka (T). Je toxický při vdechování, styku s kůží a při požití (R23/24/25), způsobuje nebezpečí kumulativních účinků (R33) a je škodlivý pro vodní organizmy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R52/53). Byla stanovena hodnota LD50 pro akutní toxicitu u krysu po orálním podání na 750 mg/kg, dále kožní aplikací u morčat na hodnotu LD50 vyšší než 500 mg/kg. Dle bezpečnostního listu je 4-nitroanilin při nadměrné expozici nebezpečný z hlediska poruch reprodukce (Sigma-Aldrich, 2014b).

4.5.1 Akutní toxicita

Toxicita 4-nitroanilinu byla testována u sladkovodních ryb *Cyprinus Carpio*. Látka vykazovala mírnou toxicitu, přičemž její intenzita se zvyšovala s koncentrací a dobou expozice. Byla vyhodnocena hodnota LC50 (94 hodin) 48,99 mg/l vody. Autoři také upozornili na fakt, že 4-NA ve směsi s jinou látkou (konkrétně p-nitrotoluenem) způsobuje značně vyšší toxickou aktivitu (Shen, Gao a Wang, 2012).

Roku 2005 došlo k otravě patnáctiletého chlapce v Berlíně, který se pravděpodobně předávkoval 4-nitroanilinem, s následným umrtím. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla později zjištěna koncentrace této látky v krvi 4,2 mg/ml. Bylo zjevné, že v těle mladého muže došlo k přeměně požití látky na další deriváty

(např. p-fenylendiamin, 4-nitroacetanilid), které se mohly účastnit na zdravotních důsledcích požití 4-nitroanilinu (Bakdash et al., 2006).

4.5.2 Chronická toxicita

4-nitroanilin byl studován z hlediska chronické toxicity po dobu dvou let u potkanů se zaměřením na onkogenní potenciál a reprodukční toxicitu. Šedesátičlenné skupiny od každého pohlaví dostávaly 4NA v koncentracích 0 – 9 mg/kg/den. Ve studii nebyl prokázán karcinogenní efekt ani reprodukční toxicita. Byly však pozorovány negativní efekty ve skupinách s vysokými dávkami látky, jako zvýšení hmotnosti sleziny nebo nárůst koncentrace methemoglobinu, což souvisí s inhibicí přenosu kyslíku (Nair, 1990).

4.5.3 Mutagenita

Ve studii genotoxické aktivity nitroanilinů v Amesově testu byl 4-nitroanilin vyhodnocen jako mutagenní látka. Nitroaniliny byly rozpouštěny v dimethylsulfoxidu a aplikovány na speciální kmeny *Salmonella typhimurium*. Na rozdíl od orto-nitroanilinu vykazovaly deriváty s nitroskupinou v poloze meta i para genotoxický účinek. Poloha substituentů aromatických nitrosloučenin se jeví jako důležitý prvek ovlivňující mutagenní potenciál látky. Toxické účinky 4-nitroanilinu pro dané kmeny byly pozorovány od koncentrace 2495 µg/miska (Aßmann et al., 1997). 4-nitroanilin byl testován při mikronukleárních studiích na buňkách kostní dřeně u myši po intraperitoneálním podání. U testovaných koncentrací 0 – 800 mg/kg/den nevykazoval žádné známky klastogenního potenciálu (Environmental Protection Agency, 2006).

4.5.4 Karcinogenita

Karcinogenní potenciál 4-nitroanilinu byl testován u myši v počtu 70 zástupců od každého pohlaví po dobu 103 týdnů. Testované koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0 - 100 mg/kg tělesné hmotnosti. U skupin zvířat, kterým byla látka podávána v koncentraci 30 a 100 mg/kg byly zaznamenány časté negativní hematologické efekty. U samců léčených nejvyšší koncentrací byl zvýšený výskyt hemangiosarkomů (Health Council of the Netherlands, 2008).

Podobná studie u potkanů, trvající 2 roky u 60 zástupců od každého pohlaví, zjistila hematologické nepříznivé účinky (změny hladiny hemoglobinu, počtu krevních buněk apod.), nebyly však pozorovány nádorová ložiska. Dle odborníků mohla být absence nádorů

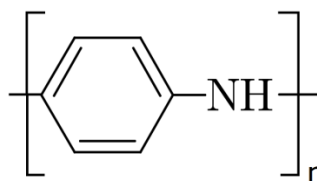
rů způsobena velmi nízkými koncentracemi látky (Health Council of the Netherlands, 2008).

4.6 Oligomery anilinu

Oligomery anilinu jsou molekuly, které se skládají ze dvou až deseti základních stavebních jednotek polyanilinu – z tzv. merů.

Obrázek 9 – strukturní vzorec meru polyanilinu

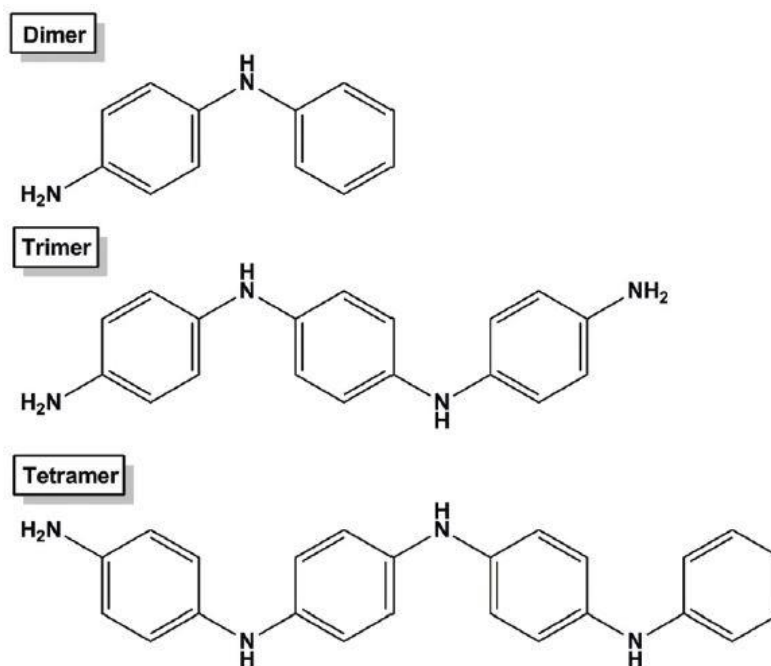
(vytvořeno v programu ChemSketch)



Tyto klasické oligomerní molekuly nejsou předmětem testování toxicity v této práci, jsou zde zmíněny vzhledem k jejich vlastnostem a vodivosti, kterými se zabývá mnoho studií. Vůči zmiňovanému polymeru jsou to molekuly s krátkými řetězci, i přesto sdílí jeho vodivost (Wan, 2008). Vodivost samotného oligomeru (tetramer) byla zkoumána ve srovnání s polyanilinem roku 2005 (Payerne et al.). V této studii bylo zjištěno, že tetramer anilinu má výrazně nižší vodivost než polyanilin. Dane et al. se roku 2012 zaměřili na vlastnosti tentkých vrstev (nanofilmů) tvořených oligomery anilinu s příměsí bis(ethyl,hexyl)fosfátu. Tyto vrstvy byly aplikovány na křemíkovém substrátu, dopování bis(ethyl,hexyl)fosfátem vedlo k lamelárnímu uspořádání se vzdáleností v rozmezí 2,15 až 2,35 nm. Od určité tloušťky filmu a v kombinaci se zmíněnou příměsí dokázali vyrobit vysoce dopovanou folii pro potenciální využití v elektronice. Roku 2013 Dane et al. publikovali výrazný vliv molekulární architektury oligomeru na výslednou strukturu látky a tedy i její elektronické vlastnosti. K tomuto výzkumu byly použity tetramery a oktamery anilinu jak v nativním oxidovaném stavu, tak ve stavu dopovaném pomocí bis(ethyl,hexyl)fosfátu. Cui et al. roku 2010 vydali práci o kopolymeru tvořeném segmenty polyethylenoxidu a oligomerů anilinu v hlavním řetězci, který vykazoval velmi vysoké hodnoty dielektrické konstanty při laboratorní teplotě, což je v některých aplikacích velmi žádané, jedná se například o energetická paměťová úložiště, vývoj umělého svalstva a užití v mikroelektrotechnice.

Toxicita krátkých oligomerů anilinu byla systematicky poprvé zkoumána roku 2012. Práce, která byla tohoto roku vydána, popisuje zkoušky cytotoxicity anilinových dimerů, trimerů a tetramerů na myších fibroblastech (NIH-3T3) a karcinogenních lidských alveolárních bazálních epiteliálních buňkách (A549).

Obrázek 10 – strukturní charakterizace anilinových oligomerů testovaných na cytotoxické účinky (Zhang et al., 2012)

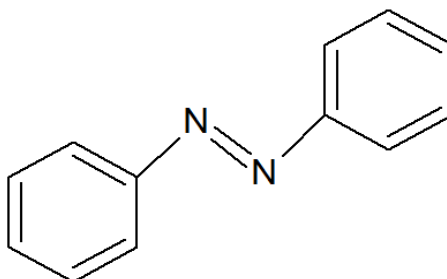


Výsledky demonstrují, že anilinové trimery vykazují vyšší cytotoxicitu než dimery či tetramery, a to na oba typy buněk. Nicméně i typ buněk výrazně ovlivňoval výsledky. U buněk A549 byla pozorována nižší cytotoxicita než u NIH-3T3 (Zhang et al., 2012).

Roku 2013 pak byly testovány toxické účinky delších oligomerních jednotek polyanilinu s různými koncovými skupinami. Konkrétně šlo o tetramer zakončený glukózou (T-G), pentamer s aminoskupinou (P-NH₂) a pentamer zakončený karboxylovou skupinou (P-COOH). Výsledky ukázaly, že koncové skupiny ovlivňují reaktivitu buněk. T-G vykazoval nejvyšší cytotoxicitu, jako u lidských alveolárních epitelových buněk (A549), tak u buněk lidského karcinomu (HeLa). Po 24 hodinách inkubace byly vyhodnoceny koncentrace IC₅₀. Pro buňky A549 byla koncentrace T-G rovna 170 $\mu\text{g/ml}$, pro P-COOH 329,8 $\mu\text{g/ml}$ a P-NH₂ 484,4 $\mu\text{g/ml}$. U buněčné linie HeLa byly koncentrace IC₅₀ nižší, a sice 110,2; 301,3 a 311,9 $\mu\text{g/ml}$ pro T-G; P-COOH a P-NH₂ (Qi et al., 2013).

4.7 Azobenzen

Obrázek 11 – strukturní vzorec azobenzenu (vytvoreno v programu ChemSketch)



Azobenzen je krystalická látka tmavě červené barvy. Jeho molekulová hmotnost činí 182,22 g/mol. Hustota azobenzenu při 25 °C je 1,09 g/cm³. Teplota tání se pohybuje mezi 65 – 68 °C, teplota varu je 293 °C, bod samovznícení je 477 °C (Sigma-Aldrich, 2014c).

Chemické symboly azobenzenu udávají toxicitu (T) a nebezpečí pro životní prostředí (N). Azobenzen může vyvolat rakovinu (R45), je zdraví škodlivý při vdechování a při požití (R20/22), hrozí nebezpečí vážného poškození zdraví při dlouhodobé expozici požíváním (R48/22), je vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R50/53) a je u něj možné nebezpečí nevratných účinků (R68) (Sigma-Aldrich, 2014c).

Deriváty azobenzenu jsou v současné době hojně používány jako potravinářská barviva. Z tohoto důvodu byla testována úroveň interakcí azobenzenu i jeho derivátů s lysozymem, což je enzym běžně se vyskytující v liském těle. Daná studie odhalila, že míra interakce mezi danou látkou a příslušnou aminokyselinou, a tím pádem i míra toxicity, je závislá na druhu substituentu. Čistý azobenzen bez substitucí nebyl schopen vytvářet silné interakce a jeho afinita k lysozymu byla nejnižší ze všech testovaných sloučenin. Sloučeniny azobenzenu však mohou být kvůli jeho struktuře snadno metabolizovány na aromatické aminy, které mohou vést k toxickým produktům či reaktivním formám kyslíku (Peng et al., 2013).

4.7.1 Genotoxicita

Azobenzen a jeho deriváty byly posuzovány na genotoxicitu na potkanech. Testy některých derivátů azobenzenu prokázaly silnou mutagenitu, zatímco azobenzen vyvolával pouze velmi slabý mutagenní účinek (Cheung et al., 1994). Bezpečnostní list udává pode-

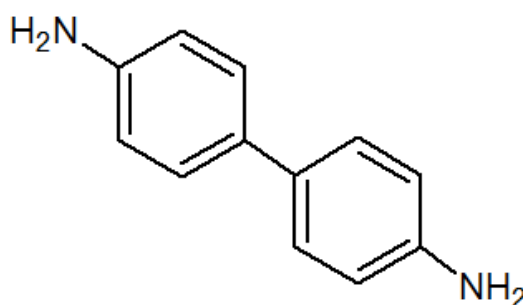
zření na genetické poškození (H341) a mutagenitu v zárodečných buňkách (Sigma-Aldrich, 2014c).

4.7.2 Karcinogenita

Azobenzen byl podáván v krmivu skupině 50 krys a 50 myší od každého pohlaví po dobu 105 až 106 týdnů. U obou pohlaví potkanů bylo nalezeno velké množství zhoubných nádorů pojivových tkání (především břišních orgánů), přičemž jejich výskyt se zvyšoval s podávanou dávkou azobenzenu. U myší se neprojevil prokazatelný karcinogenní účinek (National Toxicology Program, 1979). Novější studie karcinogenity azobenzenu pomocí technik *in vivo* poskytla taktéž pozitivní výsledky. Byly nalezeny u obou testovaných druhů, tzn. myší i potkanů. Po perorálním podání myším byl pozitivní v žaludku, tlustém střevě, močovém měchýři a plicích. U potkanů byl azobenzen vyhodnocen jako karcinogenní, přičemž nádory byly nalezeny v žaludku, tlustém střevě, játrech, ledvinách, močovém měchýři a plicích. Jediný nezasažený orgán byl v tomto případě mozek (Sekihashi et al., 2002).

4.8 Benzidin

Obrázek 12 – strukturní vzorec benzidinu (vytvořeno v programu ChemSketch)



Benzidin neboli 4,4'-diaminobifenyl je látka pevného skupenství ve formě prášku béžové barvy. Molekulová hmotnost činí 184,24 g/mol. Bod tání je 127 °C, bod varu je udáván 400 °C při 1,013 hPa. Relativní hustota benzidinu při 20 °C je 1,25 g/cm³ (Sigma-Aldrich, 2012b).

Benzidin je označován jako toxický (T) a nebezpečný pro životní prostředí (N). Tato látka může vyvolávat rakovinu (R45), je zdraví škodlivá při požití (R22) a vysoce toxická pro vodní organismy s potenciálem pro dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R50/53). Bezpečnostní list udává akutní toxicitu orálním podáním u krys

LD50 309 mg/kg. Jsou známy karcinogenní účinky benzidinu pro člověka, přičemž opakovaná absorpce může způsobit vznik nádorů močového měchýře (Sigma-Aldrich, 2012b).

4.8.1 Genotoxicita

Genotoxicita benzidinu byla prokázána pomocí technik *in vivo* skrze chromozomální aberace v buňkách kostní dřeně u myši (You et al., 1993). Benzidin byl vyšetřován na poškození DNA u lidských lymfocytů pomocí tzv. kometového testu, kdy byla prokázána jeho genotoxicita. Vzhledem k tomu, že lapače volných radikálů působily jako inhibiční faktory jeho genotoxických účinků, přiklání se autoři k mechanismu zprostředkovanému reaktivními formami kyslíku (Chen, 2002). Schopnost indukce genotoxicity benzidinu přes oxidační mechanismus byla testována na kmeni *Salmonella typhimurium*, který je citlivý na látky produkující reaktivní formy kyslíku. Benzidin byl vyhodnocen jako silně mutagenní látka (Makena a Chung, 2007). Mutagenní účinek této látky byl prokázán i u speciálního kmene *Escherichia Coli*, který byl vytvořen pro posouzení genotoxicity u člověka (Chen et al., 2006). Pomocí kometového testu, tentokrát na buňkách HepG2, bylo zjištěno poškození DNA v důsledku expozice benzidinu (50 – 200 μM). Autoři této studie došli k závěru, že benzidin způsobuje u použitých buněk zastavení buněčného cyklu (G2/M fáze) a apoptózu prostřednictvím indukce proteinu p53 a oprav DNA (Chen et al., 2011).

4.8.2 Karcinogenita

Benzidin je uznáván jako lidský karcinogen dle Agentury pro ochranu životního prostředí a Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (Choudhary, 1996). Karcinogenita benzidinu byla pozorována u potkanů, u nichž byl zaznamenán podstatně vysoký výskyt nádorů mléčné žlázy a žlázy zymbal (Morton et al., 1981).

Epidemiologické studie benzidinu u pracovníků vyrábějících benzidin a azobarviva ukazují významně vysoký výskyt aduktů hemoglobinu, což ukazuje na karcinogenní povahu těchto látek (Beyerbach et al., 2005). Také u pracovníků vystavených benzidinu a jiným arylaminům byla zjištěna vyšší frekvence rakoviny močového měchýře, tenkého střeva a měkkých tkání (Brown, Alberts a Schoengerg, 2011). Kvůli kombinaci benzidinu s jinými sloučeninami nelze z těchto údajů s jistotou posoudit karcinogenitu samotného benzidinu pro člověka.

4.8.3 Imunotoxicita

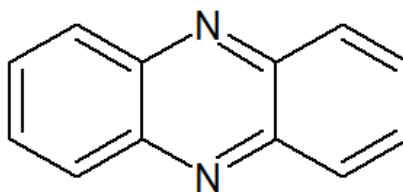
Výzkum toxicity benzidinu na myších po dobu pěti dnů shledal tuto látku jako imunotoxickou. V důsledku podání benzidinu zde docházelo ke změnám poměrů hmotnosti sleziny či brzlíku k tělesné hmotnosti, měnila se aktivita a četnost NK buněk a T-buněk imunitního systému, docházelo ke zpožděným přecitlivělým reakcím (Luster et al., 1991). Rao et al. už dříve sledovali imunotoxické příznaky u myši po aplikaci benzidinu po dobu 6 týdnů, jako je nadměrný nárůst počtu lymfatických buněk ve slezině a brzlíku (1971). Ani jedna ze jmenovaných studií nedokázala stanovit mezní koncentrace způsobující imunotoxické symptomy.

4.8.4 Vývojová toxicita

Jakožto možný karcinogen byl benzidin zkoumán i na vývojovou toxicitu za použití sladkovodních ryb *Danio rerio*. Embrya, která byla vystavena účinku benzidinu ukázala závislost úmrtí na čase a dávce. Benzidin vyvolával malformace, jako je nedostatečný vývoj mozku či mírný perikardiální edém. Vysoké koncentrace spouštěly rozsáhlou apoptózu v nervové soustavě, což může vést k abnormálnímu rozvoji některých částí mozku (Chen et al., 2014).

4.9 Fenazin

Obrázek 13 – strukturní vzorec fenazinu (vytvořeno v programu ChemSketch)



Fenazin nebo-li dibenzo[b,e]pyrazin je žlutá krystalická látka. Jeho molekulová hmotnost činí 180,21 g/mol. Bod tání se pohybuje v rozmezí 172 – 176 °C.

Fenazin není dle bezpečnostního listu klasifikovaný jako nebezpečná látka. Je známa hodnota LD50 pro akutní toxicitu u myši – 400 mg/kg (Sigma-Aldrich, 2012c).

4.9.1 Cytotoxicita

Cytotoxicita této látky byla posuzována také na buněčných liniích HepG2 (lidský hepatokarcinom) a T24 (lidské buňky karcinomu močového měchýře). Cytotoxicita byla po-

suzována pomocí RTCA testu (Real-time Cell Analysis) a testu MTT. Zkouška RTCA poskytla hodnoty IC50 (koncentrace látky, která způsobí změny vůči kontrolní odezvě ve 20 % případů) pro buněčnou linii HepG2 po 24 hodinách, kdy koncentrace fenazinu činila 50 µg/ml, po 48 hodinách pak 18 µg/ml. Test MTT udával pro linii HepG2 po 24 hodinách koncentraci IC50 21 µg/ml, po 48 hodinách koncentraci pouze 4 µg/ml (McGuigan a Xing-Fang, 2014).

Hodnocení toxicity fenazinu bylo testováno pomocí GFP testu (účinek na eukaryotické buňky, kmen *Saccharomyces cerevisiae*) a Toxi-Chromotestu (účinek na bakterie). Pro vyhodnocení byla použita hodnota IC20 (koncentrace látky, která způsobí změnu vůči kontrolní odezvě ve 20 %). Pomocí GFP testu byla stanovena koncentrace IC20 na 1,7 µg/ml fenazin. V Toxi-Chromotestu byla zjištěna koncentrace IC20 47,6 µg/ml (Bartoš et al., 2006).

4.9.2 Genotoxicita

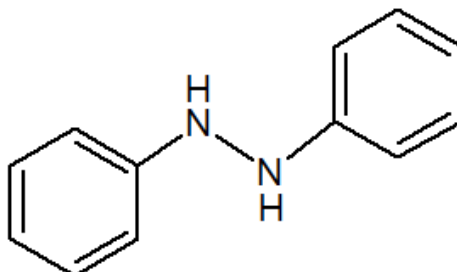
Fenazin byl posuzován z hlediska genotoxicity použitím GFP (green fluorescent protein) testu (na eukaryotických buňkách, kmen *Saccharomyces cerevisiae*) a SOS-chromotestu (na bakteriích). Vyhodnocení bylo provedeno formou minimální genotoxické koncentrace (MGC), přičemž GFP test udával koncentraci 0,38 µg/ml, SOS-chromotest pak koncentraci fenazinu 23,78 µg/ml (Bartoš et al., 2006).

4.9.3 Ekotoxicita

Fenazin byl také posuzován z hlediska ekotoxických účinků. Kobetičová et al. studovali jeho účinky na bezobratlých. Pro všechny testované druhy byly stanoveny hodnoty LC50, které činily u *Eisenia fetida* 2018 mg/kg půdy, u *Enchytraeus crypticus* 2488 mg/kg půdy a u *Folsomia Candida* 935 mg/kg půdy (Kobetičová et al., 2008).

4.10 Hydrazobenzen

Obrázek 14 – strukturní vzorec hydrazobenzenu (vytvořeno v programu ChemSketch)



Hydrazobenzen (synonyma 1,2-difenyhydrazin, N,N'-difenyhydrazin) je pevná krystalická látka žluté barvy. Jeho molekulová hmotnost činí 184,24 g/mol. Bod tání se pohybuje v rozmezí 123 – 126 °C.

Dle bezpečnostního listu je tato látka toxická (T) a nebezpečná pro životní prostředí (N). může vyvolávat rakovinu (R45), je zdraví škodlivá při požití (R22) a vysoce toxická pro vodní organismy, může vyvolávat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí (R50/53) (Sigma-Aldrich, 2012d).

O hydrazobenzenu je známo, že v kyselém prostředí organismu, např. v žaludku po perorálním podání, může dojít k jeho přesmyku na benzidin (Ghigo et al., 2011). Byly identifikovány i jiné metabolity po orální či intraperitoneální aplikaci hydrazobenzenu, mezi které patřil mimo jiné anilin či azobenzen. Při posuzování toxických vlastností hydrazobenzenu je proto nutné uvažovat i účinky jeho metabolitů, které mohou přispívat k jeho toxicitě, potažmo karinogenitě vzhledem k jejich známým účinkům (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990).

4.10.1 Akutní toxicita

Data o akutní toxicitě vycházejí z aplikace hydrazobenzenu ve vodní suspenzi pomocí sondy u potkanů. Studie udává hodnotu LD50 959 mg/kg, ale vzhledem k neúplné dokumentaci této práce je nutná opatrnost při interpretaci výsledků (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990).

4.10.2 Subchronická toxicita

Malé skupiny (pět zvířat) myši a potkanů obou pohlaví byly vystaveny různým koncentracím hydrazobenzenu po dobu 4 týdnů, po nichž následovaly 2 týdny bez expozice. Jako hodnota LOAEL u potkanů byla vzhledem ke zvýšené četnosti úmrtí zvolena koncentrace 54 mg/kg/den. U myši byla LOAEL stanovena na 390 mg/kg/den. Příčiny úmrtí nebyly uvedeny (National Toxicology Program, 1978).

Skupiny potkanů a myši byly vystaveny účinku hydrazobenzenu po dobu 78 týdnů s následným obdobím bez expozice 28 až 30 týdnů u potkanů a 18 týdnů u myši. Úmrtnost byla významně zvýšena u vysoké dávky samic potkanů, což dalo hodnotu LOAEL 5 mg/kg/den. Jako spolehlivá hodnota NOAEL úmrtnosti byla u samic označena koncentrace 2 mg/kg/den. NOAEL u samců potkanů byla nižší než 5 mg/kg/den. U myši byla úmrtnost zvýšena v případě obou pohlaví. Výsledná hodnota LOAEL u myši činila 52 mg/kg/den a NOAEL už 10 mg/kg/den. Jako časté komplikace vyšších dávek byly u potkanů zaznamenány intersticiální záněty plic či zvýšená koncentrace methemoglobinu a u myši střevní krvácení. U obou pohlaví byly zaznamenány degenerativní změny jater a proto byl tento orgán označen jako cílový pro toxické působení hydrazobenzenu (National Toxicology Program, 1978).

Roku 2013 byla vydána práce hodnotící subchronickou hepatotoxicitu hydrazobenzenu pomocí technik *in vivo*. Samci potkanů byly vystaveny různým koncentracím této látky po dobu 5 – 13 týdnů. U skupiny potkanů, které byly podávány vysoké koncentrace 200 a 300 ppm, byl zjištěn pokles tělesné hmotnosti a nárůst hmotnosti jater. U skupin, které byly exponovány po dobu 13 týdnů, se vyskytovaly mikroskopické nálezy na játrech ve formě hypertrofie, duplikace žlučových cest apod. Jako hodnota NOEL byla stanovena koncentrace 80 ppm, přepočteno 4,8 mg/kg/den (Dodd et al., 2013).

4.10.3 Genotoxicita

Hydrazobenzen způsobuje mutace u kmene *Salmonella typhimurium* a chromozomální aberace či výměny sesterských chromatid po metabolické aktivaci u křečka čínského. Ve studiích *in vivo* hydrazobenzen inhiboval syntézu testikulární DNA u myši po aplikaci jedné injekční dávky o koncentraci 100 mg/kg, což naznačuje toxické účinky pro reprodukční orgány u samic (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990).

4.10.4 Karcinogenita

Hydrazobenzen byl označen za karcinogenní látku u potkanů (4 mg/kg/den) a samic myší (52 mg/kg/den). Hodnocení vychází ze studie, ve které byla zvířata vystavena testované látce po dobu 78 dnů s následným několikatýdenním obdobím bez expozice. Samci potkanů měli zvýšený výskyt nádorů jater a buněk karcinomů v nadledvinkách a žláze zymbal. Samice potkanů trpěly na nádory mléčné žlázy a jater. Podobně bylo nádorové bujení jater zaznamenáno u myších samic (National Toxicology Program, 1978).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Testované látky

Nízkomolekulární látky obsažené v polyanilinu, které byly testovány na cytotoxicitu v této práci, jsou jednak **A**) prekursor polyanilinu: anilin hydrochlorid (AH) a amonium persulfát APS, **B**) deriváty anilinu 2-nitroanilin (2-NA), 3-nitroanilin (3-NA) a 4-nitroanilin(4-NA) a **C**) oligomery fenazin (FEN), benzidin (BENZ), azobenzen (AZO) a hydrazobenzen (HB).

Obrázek 15 – testované látky; zleva 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB, APS, AH



Anilin hydrochlorid (pure, kat. č.: 40008-CT0) byl vyroben a dodán firmou Lach-Ner. Amonium persulfát (reagent grade, 98%, kat. č.: A3678), azobenzen (98 %, kat. č.: 424633), benzidin (≥ 98 %, kat. č.: B3503), fenazin (98 %, kat. č.: P13207), hydrazobenzen (analytical standard, kat. č.: 442232), 2-nitroanilin (98 %, kat. č.: N9780), 3-nitroanilin (98 %, kat. č.: N9829) a 4-nitroanilin (>99 %, kat. č.: 185310) byly vyrobeny a dodány firmou Sigma-Aldrich.

5.2 Použité buněčné linie

V rámci obou vybraných testů byly použity buněčné linie NIH/3T3 (ATCC[®] CRL-1658[™]). Jedná se o buněčnou linii myších fibroblastů, které byly získány od firmy American Type Culture Collection (USA). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA The Cell Culture Company, Anglie), s vyšším obsahem glukózy. K médiu se dle návodu pro kultivaci buněk přidává 10 % fetálního bovinního séra (Biosera, Anglie) a antibiotika – konkrétně Penicillin/Streptomycin v koncen-

traci 100 U/ml (100 μ g/ml), (PAA Laboratories, Austrálie). Kultivační podmínky byly následující: teplota 37°C, 5% koncentrace CO₂, stabilní relativní vlhkost uvnitř inkubátoru.

5.3 Použité přístroje

Biologický inkubátor s řízenou atmosférou CO₂ – Inkubátor Heracell 150i (ThermoScientific, USA), mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus IX81, Japonsko), centrifuga Ependorf 5702 R (Ependorf, Německo), spektrofotometrický přístroj pro měření absorbance Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko), laminární flow box s řízenou cirkulací vzduchu (ThermoScientific, USA), průtokový cytometr BD FACSCantoTM II (BD BioSciences, Anglie).

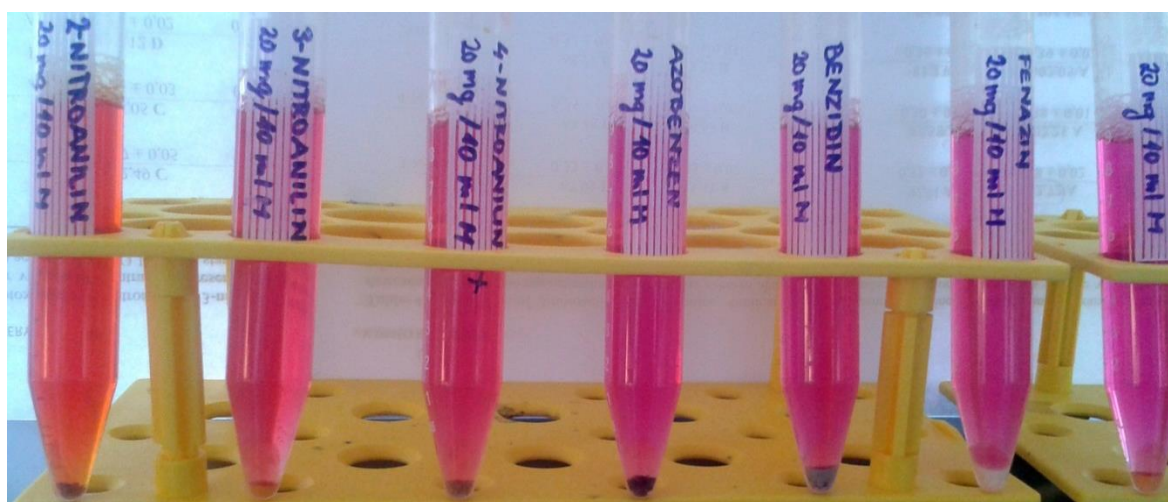
5.4 Experimentální uspořádání

5.4.1 Příprava roztoků testovaných látek

5.4.1.1 *Roztoky v kultivačním médiu*

Roztoky použitých chemikálií byly nejprve připraveny smícháním jednotlivých látek s používaným kultivačním médiem. U většiny látek (AZO, BENZ, FEN, HB, 2-NA, 3-NA, 4-NA) však byla pozorovaná značně omezená rozpustnost v médiu, jak můžeme pozorovat na obrázku 16.

Obrázek 16 – vzorky testovaných látek (zleva 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB) se špatnou rozpustností v kultivačním médiu po 24 hodinách homogenizace na laboratorní třepačce (320 ot/min)



I po intenzivní homogenizaci na laboratorní třepačce či v ultrazvukové lázni zůstávaly v roztocích nerozpuštěné částice. Při rozpouštění 2-NA byly pozorovány hnědé, relativně velké částice a roztok média intenzivně měnil barvu do červeného odstínu. 3-NA zůstával nerozpuštěný ve formě malých částic žluté barvy v roztoku s nepatrně tmavším odstínem růžové. 4-NA se v roztoku média vyskytoval ve formě žlutohnědých částic, které byly velikostně téměř beze změny vůči původní navážce, přičemž roztok byl lehce zbarven do červeného odstínu. Zbylé roztoky nevykazovaly vůči kultivačnímu médiu barevné změny. Velké krystaly zůstaly nerozpuštěné u AZO s červeným odstínem částic a u BENZ s šedohnědým zbarvením. Drobné částice světle žluté barvy byly pozorovány v případě FEN a jemné žluté částice pak u HB.

5.4.1.2 Roztoky v dimethylsulfoxidu

Z výše uvedeného důvodu špatné rozpustnosti některých testovaných látek bylo hledáno vhodné rozpouštědlo, ve kterém se konkrétní vzorky rozpouští a které zároveň nemá negativní vliv na viabilitu, metabolismus či fyziologii testovaných buněk. Norma ČSN EN ISO 10993 uvádí jako možné rozpouštědlo pro testování cytotoxicity dimethylsulfoxid (DMSO), přičemž jeho použitelná koncentrace v kultivačním médiu je limitována jeho toxickým působením na konkrétní buněčné linie. Tato látka je standartně používána při práci s buněčnými kulturami, jako např. kryoprotektant, pro rozpouštění krystalů formazanu při testu MTT (Freshney, 2005) a již byla úspěšně použita pro rozpouštění testovaných látek při hodnocení mutagenity (Aßmann et al., 1997).

Obrázek 17 – rozpuštěný BENZ, FEN, HB, AZO, 2-NA, 3-NA a 4-NA v DMSO



Po ověření rozpustnosti AZO, BENZ, FEN, HB, 2-NA, 3-NA a 4-NA v této polární látce byl DMSO (>99,9 %, Duchefa Biochemie, Netherlands) zvolen jako vhodné rozpouš-

tědlo. Vzhledem k jeho možnému toxickému působení byla v každé sérii testů hodnocena paralelně toxicita samotného rozpouštědla v dané koncentraci, jejíž výsledky prezentují tabulky 2 a 3.

Finální roztoky byly připraveny ve dvou sériích. V první sérii byly všechny testované vzorky aplikovány v čistém kultivačním médiu, v druhé sérii byly látky s omezenou rozpustností (2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB) rozpuštěny v minimálním množství DMSO (2 ml) a doplněny médiem (do 10 ml). Na základě dosavadních poznatků o toxicitě testovaných látek byly zvoleny jejich konečné koncentrace, přičemž koncentrace látek rozpuštěných v DMSO byly limitovány jejich rozpustností a toxicitou rozpouštědla. Finální koncentrace AH činily 3000; 2500; 2000; 1500; 1000; 750 a 500 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace APS 1000; 750; 500; 320; 160 a 80 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace zbylých látek aplikovaných jak v čistém médiu, tak v kombinaci s DMSO, byly 320; 160; 80; 40; 20 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Procentuální zastoupení DMSO u roztoků konkrétních koncentrací testovaných látek udává tabulka 1.

Tabulka 1 - koncentrace rozpouštědla u jednotlivých roztoků testovaných látek

koncentrace testované látky	[$\mu\text{g/ml}$]	320	160	80	40	20	10
koncentrace rozpouštědla DMSO	[%]	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1

Cytotoxicita DMSO byla v aplikovaných koncentracích (0,1 – 3,2 %) hodnocena paralelně se samotným testováním cytotoxicity zkoušených látek. Stejně koncentrace byly použity jak v testu MTT, tak v analýze buněčné smrti. Tabulky 2 a 3 popisují vyhodnocení cytotoxicity rozpouštědla, tabulka 3 prezentuje výsledky získané u buněk, které prošly dobou zotavení. Tzv. Recovery Time („Recovery Time“) neboli doba zotavení byla do testu zařazena jako doba, která umožní rozlišit mezi buňkami, které zůstávají životaschopné a zároveň jsou schopné proliferace a mezi těmi, které jsou životaschopné, ale dále nemohou proliferovat (Freshney, 2005). V tabulce 2 je patrný pokles viability u nejvyšší koncentrace rozpouštědla (3,2 %), je ale zřejmé, že DMSO nepůsobil ve zkoušce bez „Recovery Time“ cytotoxicky. Přesto je vhodné uvažovat u výsledků cytotoxicity testovaných látek rozpuštěných v 3,2% roztoku DMSO možné zatížení chybou v důsledku potenciálního spolupůsobení DMSO a dané chemikálie. U výsledků v tabulce 3, které byly získány zkouškou s „Recovery Time“, je zřejmý vyšší negativní dopad působení tohoto rozpouštědla. V tomto případě lze za bezpečné pokládat koncentrace nižší než 0,8 %. S ohledem na malý pokles viability v této koncentraci s výsledným necytotoxickým efektem lze hodnotit

i koncentrace testovaných látek rozpouštěných v tomto poměru DMSO vůči médiu, je ale nutné uvažovat možné zatížení chybou.

V následující části budou popsány postupy prekultivace a testování cytotoxicity, kterými byly získány i výsledky toxického účinku použitého rozpouštědla DMSO uvedené níže v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2 - cytotoxicita roztoků DMSO v kultivačním médiu vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		3,2 %	1,6 %	0,8 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %
DMSO	Abs	0,31 \pm 0,04	0,37 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02	0,38 \pm 0,03	0,38 \pm 0,02
	PV [%]	84,22 A	100,28 A	101,34 A	98,88 A	101,72 A	103,75 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,37 \pm 0,04 = 100 \%$

Tabulka 3 - cytotoxicita roztoků DMSO v kultivačním médiu u buněk s „Recovery Time“ vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		3,2 %	1,6 %	0,8 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %
DMSO	Abs	0,39 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	0,56 \pm 0,06	0,62 \pm 0,08	0,60 \pm 0,06	0,62 \pm 0,04
	PV [%]	64,46 B	79,11 B	92,63 A	103,14 A	100,06 A	103,24 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,60 \pm 0,05 = 100 \%$

5.4.2 Prekultivace buněk

Buňky byly prekultivovány v kultivační lahvi (TPP, Švýcarsko) do stavu konfluencie, tedy přibližně $2 \cdot 10^7$ adherovaných buněk. Po důkladném odsátí byl proveden oplach buněk pufovaným fyziologickým roztokem (PBS, phosphate-buffered saline, Gibco by Life Technologies, USA) v množství $0,2 \text{ ml/cm}^2$. Bezprostředně po oplachu byl PBS odsát. Poté byl k buňkám přidán trypsin (EDTA 1x, PAA Laboratories, Austrálie) v množství $0,1 \text{ ml/cm}^2$ a láhev byla vložena do inkubátoru. Stav trypsinizace byl průběžně kontrolován pod mikroskopem. Poté, co bylo mikroskopicky zpozorováno oddělení buněk od kultivační nádoby, bylo do nádoby přidáno kultivační médium ve stejném objemu, v jakém byl přidáván trypsin. Suspenze buněk pak byla pomocí pipety převedena do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla vložena do centrifugy, kde probíhalo odstředění po dobu 3 minut při rychlosti 1100 rotací za minutu (rpm) a teplotě $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vyjmutí zkumavky s buněčným sedimentem na dně, byl opatrně odsát supernatant. Samotné koncentrované buňky pak byly naředěny čerstvým médiem na požadovanou koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml. Takto připravená buněčná suspenze byla rozpipetována do jamek 96 jamkových destiček (TPP, Švýcarsko) v objemu $100 \text{ } \mu\text{l}$ na 1 jamku. Přípravené destičky byly vloženy do inkubátoru, kde probíhala prekultivace buněk před samotným testem po dobu 24 hodin.

5.4.3 Aplikace roztoků

Po 24 hodinách prekultivace bylo odsáto kultivační médium a místo něj byly do jamek s buňkami přidávány roztoky testovaných látek ve zvolených koncentracích, kterých bylo docíleno postupným ředěním nejkonzentrovějšího roztoku. Finální hodnocené koncentrace činily u roztoků:

AH: 3000; 2500; 2000; 1500; 1000; 500; $\mu\text{g/ml}$,

APS: 1000; 750; 500; 320; 160; 80 $\mu\text{g/ml}$,

2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB: 320; 160; 80; 40; 20; 10 $\mu\text{g/ml}$.

Roztoky AH a APS byly vzhledem k jejich výborné rozpustnosti hodnoceny pouze v čistém kultivačním médiu, roztoky zbylých látek byly hodnoceny jak v čistém kultivačním médiu, tak po rozpuštění v DMSO s následným naředěním kultivačním médiem. Koncentrace DMSO připadající na jednotlivé koncentrace testovaných látek v roztoku udává tabulka 1. Po aplikaci roztoků následovala kultivace buněk v inkubátoru po dobu 24 hodin.

5.4.4 Stanovení buněčné viability

Buněčná viabilita byla hodnocena pomocí testu MTT, který byl vyhotoven u všech vzorků dvojím uspořádáním: **A**) bez „Recovery Time“, kdy byla viabilita vyhodnocena třetího dne ihned po ukončení působení testovaných látek, a **B**) s „Recovery Time“, kde byly buňky po odstranění testovaných látek ponechány dalších 24 hodin v čistém kultivačním médiu, pro tzv. „Recovery Time“ („Recovery Time“) (Freshney, 2005).

5.4.4.1 Bez „Recovery Time“

U testu bez „Recovery Time“ byly buňky po 24 hodinách kultivace v přítomnosti roztoků opláchnuty roztokem PBS s následnou výměnou média. Do každé jamky byl přidán 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromid (MTT, Duchefa Biochemie, Holandsko) v koncentraci 0,5 mg/ml média. Destičky s buňkami byly poté vloženy do inkubátoru na 4 hodiny, během kterých docházelo u metabolizujících buněk k přeměně MTT na formazán. Po uplynutí této doby bylo z jamek pomocí mikropipety odebráno 40 μ l média, zbytek byl odsát a odpipetovaných 40 μ l bylo navraceno zpět do jamek. V dalším kroku bylo přidáno 80 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO byl ponechán účinkovat po dobu 15 minut. Potom byla změřena absorbance pomocí spektrofotometrického přístroje.

Obrázek 18 – fotografie spektrofotometrického přístroje při měření absorbance reference



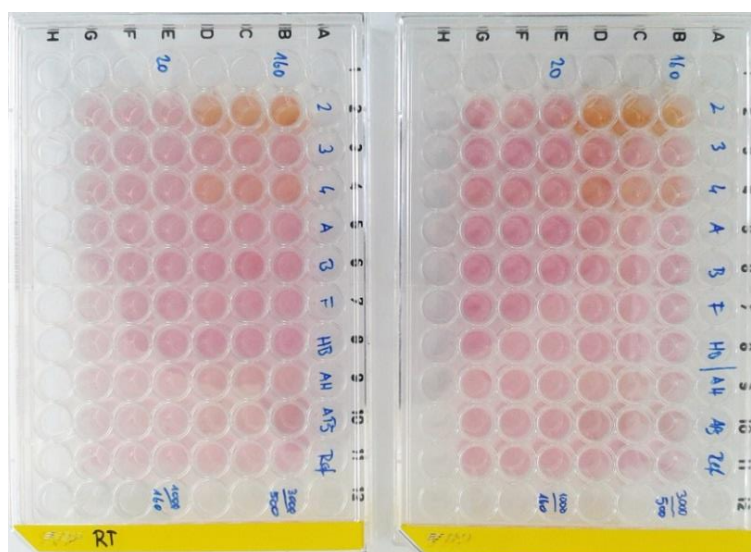
Tabulka 4 – naměřené absorbance roztoků testovaných látek v přítomnosti MTT; absorbance reference byla rovna $0,140 \pm 0,002$

ABSORBANCE ROZTOKŮ			
VZOREK	ROZPOUŠTĚDLO	KONCENTRACE	
		320 µg/ml	160 µg/ml
2-NA	DMSO	$0,138 \pm 0,005$	$0,154 \pm 0,006$
3-NA	DMSO	$0,129 \pm 0,004$	$0,096 \pm 0,004$
4-NA	DMSO	$0,112 \pm 0,003$	$0,100 \pm 0,002$
AZO	DMSO	$0,139 \pm 0,006$	$0,113 \pm 0,004$
BENZ	DMSO	$0,115 \pm 0,009$	$0,096 \pm 0,006$
FEN	DMSO	$0,119 \pm 0,005$	$0,130 \pm 0,007$
HB	DMSO	$1,55 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,07$
AH	MÉDIUM	$0,114 \pm 0,002$	$0,116 \pm 0,013$
APS	MÉDIUM	$0,111 \pm 0,002$	$0,114 \pm 0,009$

5.4.5 Stanovení poměru apoptických a nekrotických buněk

Prekultivace buněk, aplikace a působení roztoků byly provedeny dle výše popsaných postupů. Připravené roztoky byly na základě předchozího měření cytotoxicity aplikovány ve vybraných koncentracích: 20 a 160 µg/ml v případě látek 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB; 160 a 500 µg/ml v případě látky APS; 1000 a 3000 µg/ml u látky AH. Opět byla zkouška provedena jedenkrát s „Recovery Time“ a jedenkrát bez „Recovery Time“.

Obrázek 20 – fotografie 96 jamkových plátů s buňkami po aplikaci roztoků určených pro analýzu buněčné smrti



Po 24 hodinách působení testovaných látek byly jednotlivé roztoky kultivačního média, obsahující působící látky i odumřelé a neadherované buňky, odpipetovány do sterilních 96 jamkových plátů. U adherovaných buněk byl proveden oplach pomocí PBS a následná trypsinizace. Po oddělení buněk od stěn nádoby byly suspenze v médiu a suspenze buněk v trypsinu u daných jamek sloučeny.

Dále bylo provedeno barvení buněk přídatkem annexinu V a propidium jodidu (BD BioScience, Kanada). Koncentrace annexinu V činila 2,5 $\mu\text{g/ml}$, propidium jodidu pak 5 $\mu\text{g/ml}$. Po 15 minutách působení v temném prostředí byly buňky analyzovány průtokovým cytometrem.

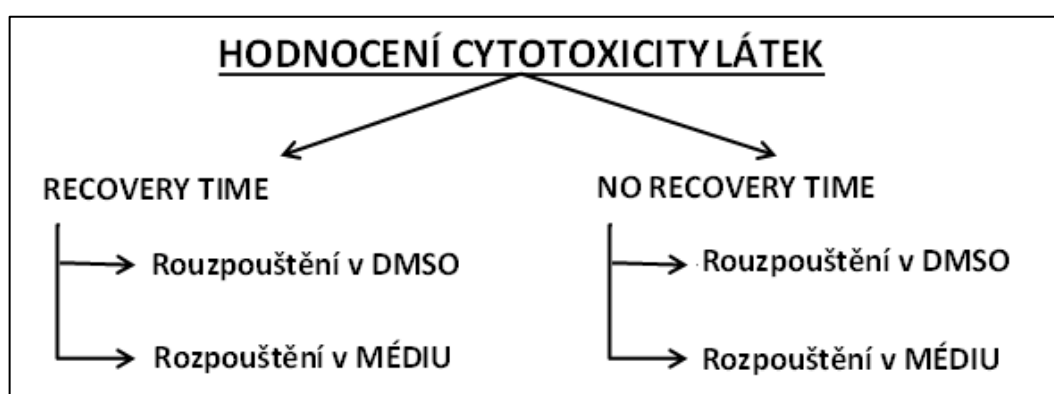
Obrázek 21 – fotografie měření na průtokovém cytometru



6 VÝSLEDKY

Níže jsou uvedeny výsledky testů cytotoxicity devíti látek, které se v závislosti na přípravě polyanilinu (PANI) mohou v tomto vodivém polymeru vyskytovat. Jedná se o monomer PANI anilin hydrochlorid (AH), oxidační činidlo amonium persulfát (APS), dusíkaté deriváty anilinu 2-nitroanilin (2-NA), 3-nitroanilin (3-NA), 4-nitroanilin (4-NA), dimerní struktury anilinu azobenzen (AZO), benzidin (BENZ), hydrazobenzen (HB) a trimer fenazin (FEN).

Obrázek 22 – schéma uspořádání hodnocení toxicity testovaných látek



Na obrázku 22 je možno pozorovat schéma uspořádání experimentu. Jednotlivé vzorky látek byly z hlediska cytotoxicity hodnoceny ve dvojitým uspořádání. V obou sériích byly buňky vystaveny působení toxických látek po dobu 24 hodin. Pouze v jedné sérii bylo buňkám dále umožněno projít časovým intervalem 24 hodin bez přítomnosti těchto látek označovaným jako doba zotavení, během kterého mohou přeživší buňky obnovit proliferaci (Freshney, 2005). Vzhledem k limitované rozpustnosti v kultivačním médiu některých vzorků bylo dále nutné použít rozpouštědlo DMSO. I když je DMSO standardně užíváno jako rozpouštědlo při práci s buněčnými kulturami, dle normy ISO 10 993 může mít u některých buněčných linií cytotoxický účinek a je nutná kontrolní zkouška toxicity samotného rozpouštědla v použitých koncentracích. Výsledky tohoto testu udávají tabulky 2 a 3. Výsledky cytotoxicity 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN aplikovaných v čistém kultivačním médiu byly do vyhodnocení zahrnuty pro úplnost výsledků a možnost hodnocení toxicity látek v přirozeném prostředí organismu, nicméně je nutné zohlednit jejich špatnou rozpustnost a tedy pravděpodobné zatížení výsledků chybou.

Toxický účinek hydrazobenzenu byl hodnocen pouze analýzou buněčné smrti, protože u něj byla zjištěna schopnost redukce MTT na formazán (viz obrázek 19, tabulka 4), což zkrusluje výsledky stejnojmenného testu.

6.1 Buněčná viabilita

Cytotoxicita jednotlivých látek byla hodnocena pomocí testu MTT na buněčné linii myších fibroblastů NIH/3T3. Viabilita buněk je znázorněna v tabulkách, které uvádějí výsledky průměrné absorbance a jejich směrodatné odchylky, přičemž jde vždy o průměr z pěti opakování. V tabulkách je také uvedeno vyhodnocení dle ISO 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“. ISO norma je primárně určena pro testování zdravotnických prostředků, přesto je v tomto případě způsob vyhodnocení aplikovatelný pro testy cytotoxicity samostatných sloučenin. Dle ISO se porovnává procentuální viabilita buněk reference s viabilitou jednotlivých vzorků, přičemž je aplikováno následující vyhodnocení: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; >80 vyjadřuje necytotoxický efekt; 60 - 80 slabá cytotoxicita; 40 - 60 střední cytotoxicita, <40 silná cytotoxicita.

Jak již bylo řečeno dříve, experiment byl sestaven ve dvojím uspořádání, přičemž látky byly rozpouštěny jednak v kultivačním médiu a jednak v DMSO. Navíc byla každá z těchto zkoušek vyhodnocena jedenkrát s dobou zotavení („Recovery Time“) buněk a jedenkrát bez „Recovery Time“.

6.1.1 Cytotoxicita testovaných látek bez „Recovery Time“

Níže jsou uvedeny výsledky cytotoxicity testovaných látek, které byly stanoveny na buněčné linii NIH/3T3 pomocí metodiky ISO normy č. 10993-5. Výsledky jsou rozděleny do několika tabulek: tabulka 5 udává cytotoxicitu amonium persulfátu (APS), tabulka 6 anilin hydrochloridu (AH), které byly rozpouštěny pouze v kultivačním médiu; tabulka 7 podává výsledky cytotoxicity 2-nitroanilinu (2-NA), 3-nitroanilinu (3-NA), 4-nitroanilinu (4-NA), azobenzenu (AZO), benzidinu (BENZ) a fenazinu (FEN) rozpuštěných v DMSO a tabulka 8 pak cytotoxicitu totožných vzorků aplikovaných v čistém kultivačním médiu. Vzhledem k nízké rozpustnosti těchto látek v médiu mohou být výsledky tabulky 8 zatíženy chybou aplikované koncentrace látky, přesto jsou pro úplnost výsledků uvedeny.

6.1.1.1 Cytotoxicita AH a APS v kultivačním médiu bez „Recovery Time“

Tabulka 5 – cytotoxicita roztoků APS v kultivačním médiu vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí ± směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		1000 µg/ml	750 µg/ml	500 µg/ml	320 µg/ml	160 µg/ml	80 µg/ml
APS	Abs	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,02
	PV [%]	50,58 C	49,30 C	55,70 C	78,77 B	92,18 A	97,01 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna 0,37 ± 0,04 = 100 %

Tabulka 6 - cytotoxicita roztoků AH v kultivačním médiu vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí ± směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		3000 µg/ml	2500 µg/ml	2000 µg/ml	1500 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml
AH	Abs	0,41 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,52 ± 0,05	0,66 ± 0,04	0,67 ± 0,04
	PV [%]	63,54 B	76,34 B	78,63 B	79,57 B	101,42 A	102,57 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna 0,66 ± 0,04 = 100 %

Tabulka 5 popisuje cytotoxicitu amonium persulfátu rozpuštěného v kultivačním médiu. Z naměřených hodnot absorbance vyplývá, že s rostoucím obsahem látky v médiu klesala viabilita buněk. Nejnižší koncentrace APS, která vykazovala cytotoxický efekt, byla 320 µg/ml. V tomto případě se jednalo o mírnou cytotoxicitu. Další zvýšení obsahu APS v roztoku působilo výrazný pokles viability. V rozmezí 500 - 1000 µg/ml látka vykazovala střední cytotoxicitu. Koncentrace 750 µg/ml se jevila jako limitní.

V tabulce 6 je možné pozorovat výsledky cytotoxicity anilin hydrochloridu. Negativní účinek této látky se u zvolené buněčné linie NIH/3T3 projevoval u roztoků o obsahu 1500 - 3000 µg/ml mírnou cytotoxicitou. Od koncentrace 1500 µg/ml média nedocházelo s rostoucím obsahem AH k výraznému poklesu buněčné viability, u nejkonzentrovanejšího roztoku 3000 µg/ml však hodnota viability poklesla téměř k hodnotám středního cytotoxického účinku. Přesto byl i tento roztok hodnocen jako mírně cytotoxický. Všechny cytotoxické koncentrace AH a APS byly statisticky průkazně odlišné od referenčních hodnot.

6.1.1.2 Cytotoxicita 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v roztoku DMSO bez „Recovery Time“

Tabulka 7 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v DMSO s kultivačním médiem vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		320 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2-NA	Abs	0,25 \pm 0,02	0,32 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01	0,36 \pm 0,03	0,42 \pm 0,03	0,45 \pm 0,05
	PV [%]	67,91 B	85,41 A	88,45 A	97,71 A	112,72 A	120,56 A
3-NA	Abs	0,23 \pm 0,00	0,28 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02	0,32 \pm 0,04	0,38 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02
	PV [%]	63,48 B	76,62 B	78,61 B	87,58 A	102,21 A	98,91 A
4-NA	Abs	0,25 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02	0,30 \pm 0,04	0,38 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02
	PV [%]	68,27 B	78,35 B	78,82 B	81,23 A	102,05 A	106,44 A
AZO	Abs	0,32 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03	0,34 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,39 \pm 0,03
	PV [%]	86,74 A	83,57 A	91,78 A	96,93 A	105,18 A	104,88 A
BENZ	Abs	0,25 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03	0,39 \pm 0,05	0,38 \pm 0,01
	PV [%]	66,47 B	64,13 B	71,97 B	79,82 B	105,69 A	102,64 A
FEN	Abs	0,22 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04	0,36 \pm 0,01
	PV [%]	58,41 C	59,99 C	63,65 B	70,97 B	92,09 A	97,39 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,37 \pm 0,04 = 100 \%$

Tabulka 7 hodnotí cytotoxický účinek látek rozpuštěných v DMSO pomocí testu MTT bez „Recovery Time“. Koncentrace tohoto rozpouštědla činily pro jednotlivé roztoky 3,2 – 0,1 % (tabulka 1), kdy tyto roztoky DMSO byly současně testovány na cytotoxický efekt stejným způsobem, jako hodnocené chemikálie (viz tabulka 2). Z výsledků vyplývá, že DMSO nebyl cytotoxický ani v jedné z koncentrací. Pouze u roztoku o obsahu 3,2 % DMSO byl zaznamenán mírný pokles viability. Proto mohou být výsledky cytotoxicity testovaných látek o koncentraci 320 µg/ml, na kterou připadá roztok obsahující 3,2 % DMSO, zatíženy chybou v důsledku spolupůsobení testované látky a rozpouštědla. Z tabulky vyplývá, že viabilita buněk klesala s rostoucí koncentrací všech testovaných látek. 2-nitroanilin (2-NA) způsoboval u testovaných koncentrací životnost buněk blízkou referenční hodnotě. Výrazný pokles viability nastával až u koncentrace 320 µg/ml, která byla zároveň nejvyšší testovanou. V této jediné koncentraci vykazoval 2-NA cytotoxicitu mírného účinku, která byla statisticky průkazně odlišná od reference. Zároveň se směrodatná odchylka absorbance tohoto roztoku potkávala s rozpětím absorbance 3,2% roztoku DMSO a nebylo ji tedy možné jednoznačně přisoudit cytotoxický efekt. Nápadné zvýšení viability buněk u nízkých koncentrací, zvláště 10 µg/ml, může naznačovat prospěšné působení 2-NA pro pozorované buňky. Vzhledem ke směrodatným odchylkám však nebyly tyto hodnoty statisticky průkazně odlišné od reference. Výsledky testu 3-nitroanilinu (3-NA) udávají necytotoxické působení v koncentracích do 40 µg/ml. Buňky vystavené těmto roztokům vykazovaly viabilitu blízkou referenci. Značný pokles nastal u koncentrace 80 µg/ml. Od této hodnoty způsoboval 3-nitroanilin mírný cytotoxický efekt, viabilita buněk však s rostoucím obsahem látky dále klesala a u nejvyšší koncentrace 320 µg/ml byla relativní viabilita blízká středně cytotoxickému účinku. Mírná cytotoxicita všech tří roztoků 3-NA (80 – 320 µg/ml) byla statisticky průkazně odlišná jak od reference v čistém médiu, tak od roztoků DMSO v daných koncentracích. 4-nitroanilin (4-NA) nevykazoval cytotoxický efekt v koncentracích 10 – 40 µg/ml, i když je u roztoku 40 µg/ml pozorován značný pokles viability. Ve zbylých koncentracích (80 - 320 µg/ml) dosahovala tato látka mírně cytotoxického účinku, který se prohluboval se zvyšujícím se obsahem látky. Cytotoxické působení 4-NA v nejvyšší koncentraci nebylo statisticky průkazně odlišné od 3,2% DMSO. Vzhledem k průkaznosti účinku u dvou zředěnějších roztoků 4-NA lze předpokládat mírnou cytotoxicitu i u nejkonzentrovějšího vzorku. Azobenzen (AZO) v testovaných koncentracích nevykazoval ve výsledcích bez doby zotavení („Recovery Time“) cytotoxický účinek. Viabilita buněk pozvolně klesala s rostoucím obsahem lát-

ky, nedosahovala však hraničních hodnot. Benzidin (BENZ) nedosahoval cytotoxického působení u nízkých koncentrací 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Výrazné snížení viability nastávalo u roztoku o obsahu 40 μg na ml roztoku s následným klesajícím trendem, nebylo možné jej však jednoznačně označit za cytotoxický, protože byla jeho absorbance stále blízká referenčním hodnotám. Koncentrovanější roztoky 4-NA (80 a 160 $\mu\text{g/ml}$) byly statisticky průkazně odlišné jak od reference, tak od připadajících roztoků DMSO. Mírnou cytotoxicitu tak lze předpokládat i u koncentrace 320 $\mu\text{g/ml}$, přestože se zde setkávaly směrodatné odchylky absorbance vzorku a roztoku DMSO. Fenazin (FEN) v této části zkoušení vykazoval nejvyšší cytotoxický potenciál. Za bezpečné lze považovat pouze koncentrace 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$, další zvyšování obsahu této látky způsobovalo u zvolené linie NIH/3T3 výrazný pokles viability. Koncentrace 40 a 80 $\mu\text{g/ml}$ vykazovaly mírnou cytotoxicitu, 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$ pak střední cytotoxický efekt. Jako limitní se jevil roztok o obsahu 80 μg FEN na ml roztoku. I výrazné zvýšení koncentrace dále způsobilo pouze mírné snížení viability buněk.

6.1.1.3 Cytotoxicita 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v kultivačním médiu bez „Recovery Time“

Tabulka 8 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v čistém kultivačním médiu vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka; dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		320 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2-NA	Abs	0,27 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03	0,38 \pm 0,04	0,39 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04
	PV [%]	73,45 B	92,83 A	102,61 A	101,76 A	106,62 A	105,17 A
3-NA	Abs	0,25 \pm 0,02	0,29 \pm 0,05	0,34 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,37 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03
	PV [%]	66,70 B	78,02 B	93,22 A	98,62 A	99,70 A	105,54 A
4-NA	Abs	0,31 \pm 0,05	0,39 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04
	PV [%]	83,65 A	105,18 A	99,58 A	94,88 A	104,91 A	110,56 A
AZO	Abs	0,38 \pm 0,02	0,39 \pm 0,04	0,39 \pm 0,02	0,38 \pm 0,03	0,38 \pm 0,02	0,39 \pm 0,04
	PV [%]	101,63 A	105,06 A	106,44 A	102,17 A	102,69 A	106,54 A
BENZ	Abs	0,26 \pm 0,01	0,28 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02	0,38 \pm 0,03	0,40 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04
	PV [%]	71,19 B	74,95 B	81,84 A	103,24 A	108,11 A	98,18 A
FEN	Abs	0,29 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01	0,37 \pm 0,04	0,35 \pm 0,03	0,31 \pm 0,03
	PV [%]	77,57 B	79,03 B	106,94 A	99,24 A	94,37 A	84,82 A

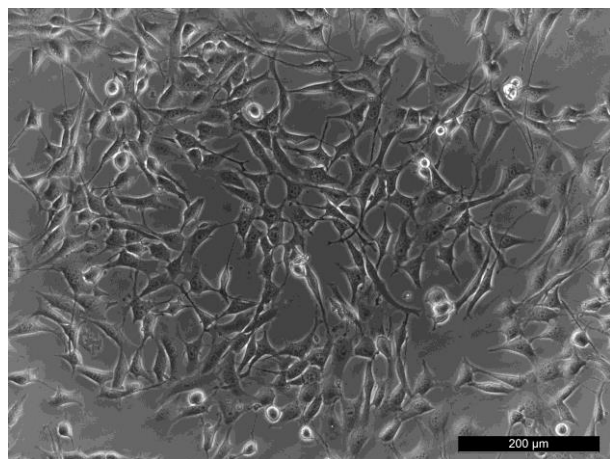
Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,37 \pm 0,04 = 100 \%$

Tabulka 8 hodnotí cytotoxicitu látek 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN aplikovaných v čistém kultivačním médiu. Jak již bylo uvedeno, rozpustnost těchto pevných látek v médiu je značně omezená (obrázek 16). Vzhledem k aplikačnímu potenciálu polyanilinu v biologickém prostředí bez přítomnosti vhodného rozpouštědla a faktu, že rozpouštědlo použité v této práci může vykazovat cytotoxický účinek, mohou být výsledky účinků látek v médiu přínosné. Je však nutné zohlednit nepřesnost uvedených koncentrací v testovaných roztocích.

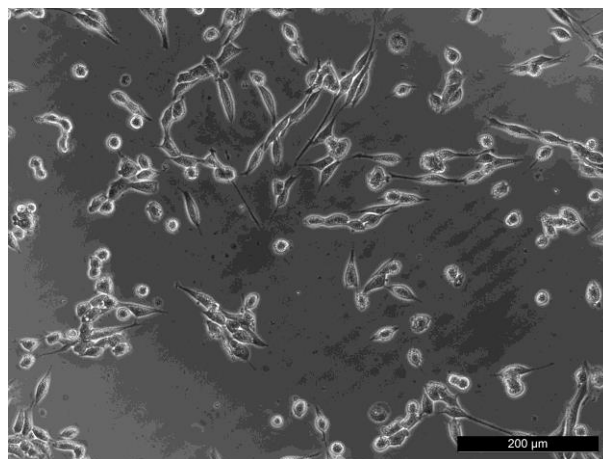
2-nitroanilin aplikovaný k buňkám v čistém kultivačním médiu vykazoval stejný průběh cytotoxicity jako po rozpuštění v DMSO. Byl zde patrný slabší účinek látky, což lze přisuzovat nedokonalému rozpuštění navážky vzorku. 2-NA v čistém kultivačním médiu byl pro zvolenou linii myších fibroblastů necytotoxický v koncentracích do 160 $\mu\text{g/ml}$. Roztok s obsahem 320 μg 2-NA na 1 ml média dosahoval mírné cytotoxicity, statisticky průkazně odlišné od reference. Viabilita buněk vystavených působení 3-nitroanilinu v čistém médiu dosahovala vyšších hodnot, než v roztoku s DMSO. Koncentrace 3-NA aplikované do kultivačního média nebyly cytotoxické v rozmezí 10 – 80 $\mu\text{g/ml}$. Roztoky s vyšším obsahem 3-NA vykazovaly mírný cytotoxický efekt, přičemž statisticky průkazně odlišná od reference byla pouze koncentrace 320 $\mu\text{g/ml}$. U 4-nitroanilinu bylo možné pozorovat výraznější rozdíly mezi roztokem v čistém médiu a roztokem s DMSO. Lze to přisoudit struktuře této látky ve formě velkých částic, které se ani po intenzivní homogenizaci v prostředí kultivačního média nerozkládaly a roztok média získával velmi slabé zbarvení do červeného odstínu. Vzhledem k velikosti částic se tak látka dostávala do kontaktu s buňkami pouze v omezené míře. Výsledky testu MTT ukázaly, že 4-NA aplikovaný v médiu nevykazoval cytotoxický účinek v žádné ze zvolených koncentrací. Výraznější pokles viability buněk byl zaznamenán pouze u roztoku s obsahem 320 μg na 1 ml média. Azobenzen v kultivačním médiu vykazoval vůči roztokům AZO v DMSO stejné hodnocení cytotoxicity, avšak s výrazně lepší viabilitou. Proti referenci nebyl u roztoku AZO v čistém kultivačním médiu zaznamenán jakýkoliv pokles viability buněk. Benzidin aplikovaný k buňkám v čistém médiu nebyl cytotoxický v koncentracích 10 – 80 $\mu\text{g/ml}$. Již u roztoku 80 $\mu\text{g/ml}$ však lze pozorovat výrazný pokles viability statisticky průkazně odlišný od reference. Obě vyšší koncentrace (160 a 320 $\mu\text{g/ml}$) byly vyhodnoceny jako mírně cytotoxické. Cytotoxicita fenazinu se projevila i v prostředí kultivačního média, její hranice však byly vůči vzorkům rozpuštěným v DMSO posunuty k vyšším koncentracím. Roztoky s obsahem této látky do 80 $\mu\text{g/ml}$ nevykazovaly cytotoxické působení, ale roztoky

s koncentrací 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$ byly statisticky průkazně odlišné od reference a způsobovaly mírnou cytotoxicitu.

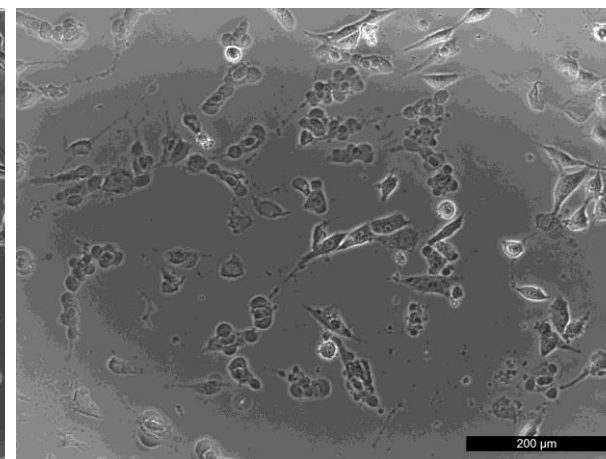
Obrázek 23 – mikrofotografie buněk pořízené před vyhodnocením testu MTT bez „Recovery Time“



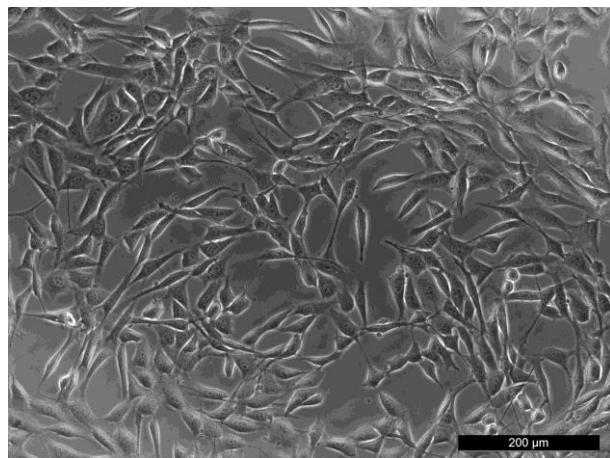
A) REFERENCE



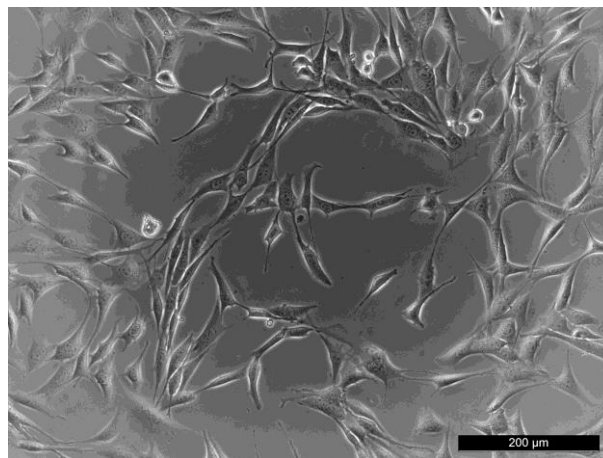
B) APS 320 μg/ml média



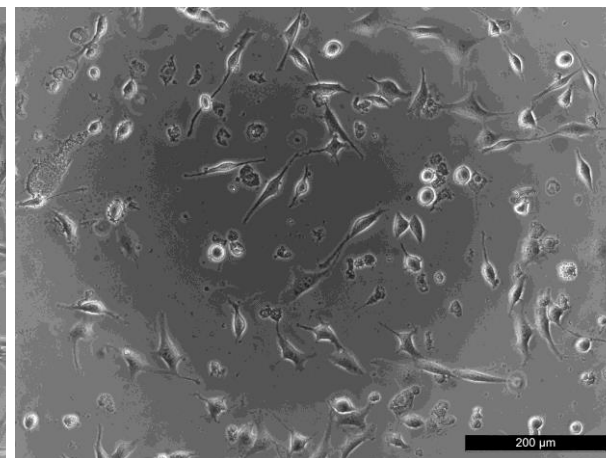
C) BENZ 320 μg/ml média



D) AZO 10 μg/ml média s DMSO



E) 3-NA 80 μg/ml média s DMSO



F) 2-NA 320 μg/ml média s DMSO

6.1.1.4 Mikroskopické snímky buněk doplňující test MTT bez „Recovery Time“

Obrázek 23 zachycuje několik mikrofotografií buněk pořízených při stonásobném zvětšení po odejmutí roztoků testovaných látek. Snímek A) představuje referenci pro zkoušky cytotoxicity bez „Recovery Time“ v čistém médiu. Buňky byly v dobrém fyziologickém stavu, měly zřetelně viditelná jádra a vysokou adhezi. Na snímku B) bylo možné pozorovat buňky vystavené účinku roztoku APS o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$ média, který byl vyhodnocen jako mírně cytotoxický. Tomuto výsledku odpovídá zřejmý úbytek buněk vůči referenci, snížená adheze a morfologické změny. Snímek C) zachycuje buňky, které byly kultivovány v přítomnosti BENZ v koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$, která vykazovala mírný cytotoxický účinek. Charakteristické bublinkovité útvary zachycují skupinu buněk, které prošly apoptickým procesem. V tomto případě lze předpokládat, že byly v kontaktu s nerozpuštěnými částicemi BENZ, a proto vykazovaly značné změny vůči přilehlému okolí. Mikrofotografie D) prezentuje buňky, které byly po dobu 24 hodin inkubovány v roztoku AZO o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ s DMSO. Obrázek koresponduje s kvantifikací dle testu MTT, buňky se vyskytovaly v množství a fyziologickém stavu srovnatelném s referencí. Na snímku E) jsou buňky vystavené účinku 3-NA v koncentraci 80 μg na 1 ml roztoku DMSO, který byl vyhodnocen jako slabě cytotoxický. Je zde zřejmé mírné snížení počtu buněk, nicméně morfologie i adheze buněk byla podobná jako u reference. Fotografie F) pak ukazuje různé buněčné útvary, ke kterým byl aplikován roztok 2-NA o obsahu 320 μg na 1 ml roztoku DMSO. Některé buňky se jevily relativně zdravé, jiné měly sníženou adhezi a bylo zde možné pozorovat i zbytky odumřelých buněk.

6.1.2 Cytotoxicita testovaných látek s „Recovery Time“

Níže jsou uvedeny výsledky testu cytotoxicity testovaných látek, které byly stanoveny na buněčné línii NIH/3T3 pomocí metodiky ISO normy č. 10993-5. V této části testu byl buňkám poskytnut „Recovery Time“. Výsledky jsou rozděleny do několika tabulek: tabulka 9 udává cytotoxicitu amonium persulfátu (APS), tabulka 10 anilin hydrochloridu (AH), které byly rozpouštěny pouze v kultivačním médiu; tabulka 11 podává výsledky cytotoxicity 2-nitroanilinu (2-NA), 3-nitroanilinu (3-NA), 4-nitroanilinu (4-NA), azobenzenu (AZO), benzidinu (BENZ) a fenazinu (FEN) rozpuštěných v DMSO a tabulka 12 pak cytotoxicitu totožných vzorků aplikovaných v čistém kultivačním médiu. Vzhledem k nízké rozpustnosti těchto látek v médiu mohou být výsledky tabulky 12 zatíženy chybou aplikované koncentrace látky, přesto jsou pro úplnost výsledků uvedeny.

6.1.2.1 Cytotoxicita AH a APS v kultivačním médiu s „Recovery Time“

Tabulka 9 - cytotoxicita roztoků APS v médiu u buněk s „Recovery Time“ vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		1000 $\mu\text{g/ml}$	750 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	320 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$
APS	Abs	0,18 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,30 \pm 0,06	0,53 \pm 0,03	0,63 \pm 0,06
	PV [%]	30,54 D	26,79 D	35,25 D	50,39 C	88,30 A	105,32 A

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,60 \pm 0,05 = 100 \%$

Tabulka 10 - cytotoxicita roztoků AH v médiu u buněk s „Recovery Time“ vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		3000 $\mu\text{g/ml}$	2500 $\mu\text{g/ml}$	2000 $\mu\text{g/ml}$	1500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
AH	Abs	0,42 \pm 0,02	0,44 \pm 0,04	0,52 \pm 0,06	0,53 \pm 0,07	0,53 \pm 0,05	0,55 \pm 0,06
	PV [%]	61,36 B	64,82 B	76,69 B	78,20 B	78,24 B	79,82 B

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,68 \pm 0,05 = 100 \%$

Tabulka 9 představuje výsledky cytotoxického potenciálu amonium persulfátu u použité buněčné linie NIH/3T3 s dobou zotavení. Viabilita buněk výrazně klesala od koncentrace 320 µg/ml od netoxického účinku přímo ke střední cytotoxicitě. Zvýšením koncentrace na 500 až 1000 µg/ml docházelo ke snížení viability na hodnoty udávající silnou cytotoxicitu. Zároveň se koncentrace 500 µg/ml jevila jako limitní, protože se cytotoxický efekt u vzorků s vyšším obsahem této látky dále neprohluboval. Vzhledem k naměřeným hodnotám absorbance a jejich směrodatným odchylkám byly koncentrace 320 až 1000 µg/ml průkazně odlišné od reference.

Tabulka 10 prezentuje vyhodnocení cytotoxicity AH získané pomocí testu MTT s „Recovery Time“. Z výsledku je zřejmé, že AH působil mírně cytotoxicky ve všech testovaných koncentracích, přestože viabilita buněk s rostoucí koncentrací látky pozvolně klesala a krajní koncentrace látky stály na hranicích mírně cytotoxického účinku. Všechny naměřené hodnoty byly statisticky průkazně odlišné od absorbance reference.

6.1.2.2 Cytotoxicita 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v roztoku DMSO s „Recovery Time“

Tabulka 11 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v DMSO s kultivačním médiem u buněk s „Recovery Time“ vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

Vzorek		320 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2-NA	Abs	0,25 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	0,39 \pm 0,05	0,44 \pm 0,04	0,58 \pm 0,05
	PV [%]	42,49 C	59,39 C	65,04 B	65,08 B	72,65 B	95,86 A
3-NA	Abs	0,27 \pm 0,05	0,33 \pm 0,04	0,38 \pm 0,04	0,46 \pm 0,02	0,56 \pm 0,04	0,63 \pm 0,06
	PV [%]	45,05 C	55,68 C	63,62 B	76,79 B	92,99 A	104,40 A
4-NA	Abs	0,23 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03	0,42 \pm 0,07	0,56 \pm 0,05	0,58 \pm 0,04
	PV [%]	38,12 D	48,92 C	49,66 C	70,10 B	92,56 A	97,22 A
AZO	Abs	0,22 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03	0,34 \pm 0,02	0,39 \pm 0,04	0,41 \pm 0,03	0,45 \pm 0,03
	PV [%]	36,19 D	42,40 C	56,57 C	64,50 B	68,23 B	74,29 B
BENZ	Abs	0,20 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,45 \pm 0,05
	PV [%]	33,37 D	36,81 D	38,86 D	40,24 C	47,79 C	74,23 B
FEN	Abs	0,20 \pm 0,1	0,19 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	0,48 \pm 0,02
	PV [%]	32,89 D	31,43 D	37,34 D	50,96 C	79,31 B	79,64 B

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,60 \pm 0,05 = 100 \%$

Tabulka 11 hodnotí cytotoxický účinek látek rozpuštěných v DMSO pomocí testu MTT s dobou zotavení („Recovery Time“). Koncentrace tohoto rozpouštědla činila pro jednotlivé roztoky 3,2 – 0,1 % (tabulka 1), kdy roztoky DMSO byly současně testovány na cytotoxický efekt stejným způsobem, jako hodnocené chemikálie (viz tabulka 3). Z výsledků vyplývá, že při ponechání buněk po dobu „Recovery Time“ 24 hodin vykazoval DMSO mírný cytotoxický efekt od koncentrace 1,6 %. Tato procentuální zastoupení DMSO v roztoku proto mohou zvyšovat cytotoxické působení testovaných látek od koncentrace 160 µg/ml a je třeba tento fakt při vyhodnocení zohlednit. Navíc byl zaznamenán mírný pokles viability již u roztoku o obsahu 0,8 % DMSO. Proto mohou být i výsledky cytotoxicity testovaných látek o koncentraci 80 µg/ml, na kterou připadá roztok obsahující 0,8 % DMSO, zatíženy chybou v důsledku spolupůsobení testované látky a rozpouštědla. Z tabulky vyplývá, že s rostoucí koncentrací všech látek se zvyšovalo jejich cytotoxické působení. Při ponechání buněk s „Recovery Time“ po dobu 24 hodin vykazoval 2-nitroanilin mírný cytotoxický efekt již od koncentrace 20 µg/ml a střední cytotoxicitu od 160 µg/ml se stálým klesajícím trendem. Všechny cytotoxické koncentrace byly statisticky prokazatelně odlišné jak od reference, tak od příslušných roztoků DMSO, bylo však možné spolupůsobení rozpouštědla DMSO s 2-NA v koncentraci vyšší než 80 µg/ml za současného prohloubení cytotoxického účinku testované látky. 3-nitroanilin byl dle výsledků hodnocen jako necytotoxický v koncentracích 10 a 20 µg/ml. Buňky vystavené těmto roztokům vykazovaly viabilitu blízkou referenci. Výrazné snížení viability nastávalo od koncentrace 40 µg/ml, která byla spolu s 80 µg/ml hodnocena jako mírně cytotoxická. Středně cytotoxické pak byly roztoky 160 a 320 µg/ml. Všechny toxické hodnoty byly průkazně odlišné od reference i roztoků DMSO v daných koncentracích. Vyhodnocení cytotoxického efektu u roztoků 80 – 320 µg/ml však pravděpodobně bylo ovlivněno synergickým působením látky a rozpouštědla DMSO. V případě 4-nitroanilinu byly necytotoxické koncentrace nižší než 20 µg/ml. Další zvýšení obsahu 4-NA způsobovalo výrazný pokles viability. Jako mírně cytotoxická se ukázala koncentrace 40 µg/ml, středně cytotoxické byly 80 a 160 µg/ml a silnou cytotoxicitu vykazovala koncentrace 320 µg/ml. Všechny cytotoxické roztoky dávaly hodnoty absorbance statisticky průkazně odlišné od reference, u roztoků koncentrovanějších než 40 µg/ml bylo opět možné spolupůsobení rozpouštědla. Azobenzen vykazoval u buněk ponechaných 24 hodin „Recovery Time“ cytotoxicitu v každé testované koncentraci, ve všech případech statisticky průkazně odlišnou od reference i od příslušných roztoků DMSO. Mírně cytotoxické byly roztoky o obsahu AZO do 40 µg

na 1 ml, střední cytotoxicitu vykazovaly roztoky 80 a 160 $\mu\text{g/ml}$, silnou cytotoxicitu pak nejvyšší testovaná koncentrace 320 $\mu\text{g/ml}$. U roztoků s obsahem AZO vyšším než 80 $\mu\text{g/ml}$ je pravděpodobné zatížení chybou v důsledků spolupůsobení látky a rozpouštědla. V případě benzidinu výsledky ukázaly výhradně cytotoxické koncentrace látky. Mírnou cytotoxicitu vykazovala pouze nejnižší testovaná koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, středně cytotoxické byly roztoky 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$, silně cytotoxické pak 80, 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$. V těchto silně toxických koncentracích lze očekávat ovlivnění výsledků způsobené synergickým účinkem BENZ a DMSO. Všechny hodnoty absorbance byly statisticky průkazně odlišné od reference i případajících roztoků DMSO. Podobně fenazin poskytoval ve všech testovaných vzorcích o různém ředění cytotoxické účinky. Mírný efekt cytotoxicity se projevoval u koncentrací 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$, střední v případě 40 $\mu\text{g/ml}$ a silný cytotoxický účinek dávaly roztoky o obsahu 80, 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$. Jako limitní se jevila koncentrace 160 $\mu\text{g/ml}$. Viabilita buněk byla založena na hodnotách absorbance průkazně odlišných od reference. Opět je zde pravděpodobné spolupůsobení rozpouštědla DMSO a FEN a je tedy vhodné uvažovat zatížení chybou u roztoků 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$, případně i 80 $\mu\text{g/ml}$.

6.1.2.3 Cytotoxicita 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v kultivačním médiu s „Recovery Time“

Tabulka 12 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v čistém kultivačním médiu u buněk s „Recovery Time“ vyjádřená pro různé koncentrace látek průměrnou absorbancí \pm směrodatná odchylka (Abs); dle normy ISO 10 993-5 je uvedena relativní hodnota v porovnání s referencí značená jako procentuální viabilita buněk (PV)

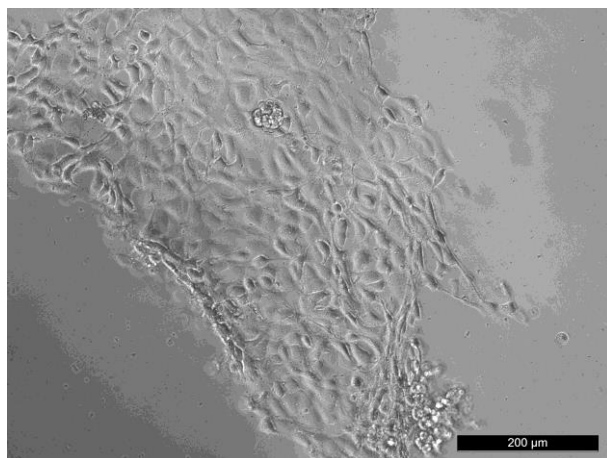
Vzorek		320 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2-NA	Abs	0,34 \pm 0,02	0,50 \pm 0,06	0,47 \pm 0,08	0,60 \pm 0,05	0,62 \pm 0,05	0,68 \pm 0,06
	PV [%]	56,62 C	83,36 A	77,85 B	100,60 A	103,68 A	113,60 A
3-NA	Abs	0,21 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02	0,43 \pm 0,05	0,49 \pm 0,05	0,56 \pm 0,06	0,59 \pm 0,03
	PV [%]	35,55 C	44,36 C	71,96 B	81,81 A	93,72 A	97,70 A
4-NA	Abs	0,45 \pm 0,03	0,46 \pm 0,05	0,53 \pm 0,04	0,52 \pm 0,05	0,58 \pm 0,06	0,54 \pm 0,08
	PV [%]	74,93 B	76,13 B	88,77 A	86,51 A	96,19 A	89,51 A
AZO	Abs	0,44 \pm 0,05	0,44 \pm 0,04	0,45 \pm 0,05	0,45 \pm 0,04	0,43 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03
	PV [%]	73,19 B	72,65 B	74,75 B	75,04 B	71,18 B	74,16 B
BENZ	Abs	0,20 \pm 0,03	0,19 \pm 0,01	0,27 \pm 0,03	0,33 \pm 0,06	0,44 \pm 0,03	0,44 \pm 0,04
	PV [%]	33,86 D	32,04 D	45,60 C	55,11 C	74,01 B	72,62 B
FEN	Abs	0,25 \pm 0,6	0,22 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03	0,46 \pm 0,02	0,46 \pm 0,04	0,43 \pm 0,03
	PV [%]	40,92 C	37,31 D	36,87 D	76,54 B	77,12 B	71,87 B

Procentuální viabilita buněk (PV) vyjadřuje procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí, přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; hodnoty >80 odpovídají látkám bez cytotoxického účinku (A); hodnoty v rozmezí 60 - 80 udávají mírnou cytotoxicitu (B); 40 - 60 střední cytotoxicitu (C) a hodnoty <40 silnou cytotoxicitu (D). Absorbance reference byla rovna $0,60 \pm 0,05 = 100 \%$

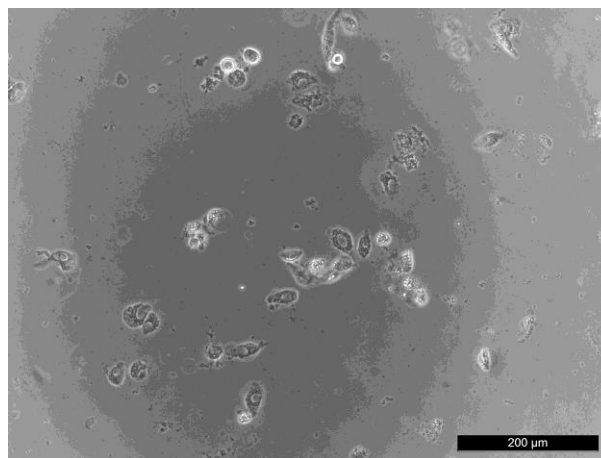
Tabulka 12 hodnotí cytotoxicitu látek 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN aplikovaných v čistém kultivačním médiu. Buňky byly v tomto případě vystaveny daným vzorkům po dobu 24 hodin, poté byly ponechány stejnou dobu v přítomnosti samotného kultivačního média (doba zotavení, „Recovery Time“). Vzhledem k nízké rozpustnosti těchto pevných látek v médiu (obrázek 16) je nutné zohlednit nepřesnost uvedených koncentrací v testovaných roztocích. Vzhledem k aplikačnímu potenciálu polyanilinu v biologickém prostředí, kde se vhodné rozpouštědlo nevyskytuje, a faktu, že použité rozpouštědlo DMSO může vykazovat cytotoxický účinek, mohou být výsledky účinků látek v médiu přínosné. 2-nitroanilin poskytoval v koncentracích 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ hodnoty viability velmi blízké referenci. V případě nejnižší koncentrace se zdála viabilita 2-NA vyšší než reference, nicméně s ohledem na směrodatné odchylky nebyla naměřená absorbance statisticky průkazně odlišná od referenční hodnoty. Všechny roztoky, s výjimkou koncentrace 80 a 320 $\mu\text{g/ml}$ vykazovaly necytotoxický efekt. Koncentrace 80 $\mu\text{g/ml}$ byla hodnocena jako mírně cytotoxická, vzhledem k dalšímu průběhu hodnocení a vysoké směrodatné odchylce překrývající se s referencí, mohlo být vyhodnocení zatížené chybou měření. Chyba mohla být v případě 2-NA způsobena zejména nedostatečnou homogenizací velkých nerozpuštěných částic ve vzorku. Přesto byl u roztoků 80 a 160 $\mu\text{g/ml}$ zaznamenán výrazný pokles viability a nejvyšší koncentrace 320 $\mu\text{g/ml}$ pak byla hodnocena se statistickou průkazností jako středně cytotoxická. V případě 3-nitroanilinu klesala viabilita buněk s rostoucím obsahem látky v roztoku. Jako necytotoxické koncentrace byly vyhodnoceny 10 – 40 $\mu\text{g/ml}$, mírně cytotoxická byla 80 $\mu\text{g/ml}$ a středně cytotoxické byly roztoky s obsahem 160 a 320 μg 3-NA na 1 ml média. Hodnoty absorbance u koncentrací 40 - 320 $\mu\text{g/ml}$ byly statisticky průkazně odlišné od reference. Výsledky cytotoxicity byly podobné, jako v případě hodnocení látky v roztoku DMSO, nicméně viabilita buněk byla vyšší než při rozpouštění v DMSO. 4-nitroanilin v čistém médiu vykazoval v porovnání s roztoky DMSO slabé cytotoxické účinky. Rozdílnost mezi výsledky mohla být dána velmi slabou rozpustností 4-NA v kultivačním médiu, který v roztoku setrvává ve formě velkých částic. Koncentrace 10 - 80 $\mu\text{g/ml}$ vykazovala necytotoxické působení. Roztoky o obsahu 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$ dávaly mírný cytotoxický účinek, statisticky prokazatelně odlišný od reference. Azobenzen v tomto případě vykazoval ve všech testovaných koncentracích mírně cytotoxický účinek statisticky průkazně odlišný od reference. Zdá se, že AZO v kultivačním médiu, při ponechání buněk po dobu 24 hodin „Recovery Time“, vykazoval limitní koncentrace již při 10 $\mu\text{g/ml}$. Další zvyšování obsahu látky v médiu nemělo výraz-

ný vliv na životnost buněk. Stejný pokles viability u všech koncentrací mohl být důsledkem zastavení buněčného cyklu při působení dané látky. Po výměně roztoků AZO za čisté médium by se tak buňky nemnožily a ve srovnání s referencí by měly sníženou hodnotu viability, což odpovídá těmto výsledkům. Benzidin v čistém kultivačním médiu způsoboval ve všech použitých koncentracích cytotoxické působení. Mírnou cytotoxicitu vykazovaly roztoky 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$, střední cytotoxicitu roztoky 40 a 80 $\mu\text{g/ml}$ a silnou cytotoxicitu pak vzorky o koncentraci 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$. Hodnocení cytotoxicity v čistém médiu bylo podobné jako v roztocích DMSO, avšak BENZ v kultivačním médiu dosahoval daných úrovní toxicity při vyšších koncentracích než tomu bylo v roztoku DMSO. To lze přisoudit špatné rozpustnosti BENZ v médiu. Všechny hodnoty byly statisticky průkazně odlišné od reference. Fenazin aplikovaný v kultivačním médiu v tomto případě také způsoboval cytotoxicitu u všech roztoků. Koncentrace 10 – 40 $\mu\text{g/ml}$ byly mírně cytotoxické, 80 a 160 $\mu\text{g/ml}$ vykazovaly silný cytotoxický účinek. Roztok 320 $\mu\text{g/ml}$ byl hodnocen jako středně cytotoxický. Vzhledem k tomu, že se zde cytotoxicita pohybovala na hranici střední/silný účinek a vzhledem k překryvu směrodatných odchylek těchto roztoků nešlo o významné zvýšení viability. Naopak lze předpokládat, že koncentrace 80 $\mu\text{g/ml}$ byla limitní a další zvýšení obsahu látky nemá vliv na viabilitu buněk. Všechny hodnoty byly statisticky průkazně odlišné od reference.

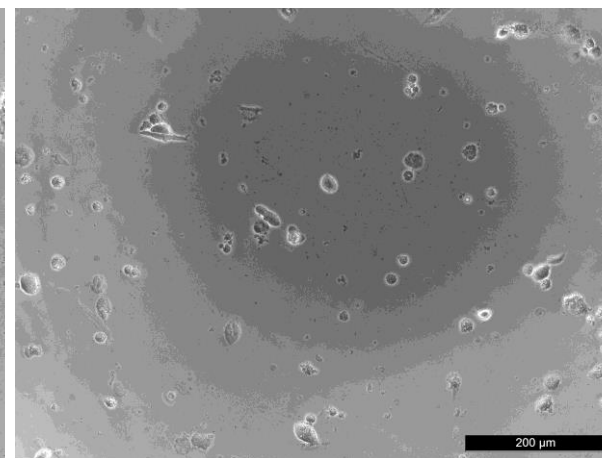
Obrázek 24 – mikrofotografie buněk před vyhodnocením testu MTT s „Recovery Time“



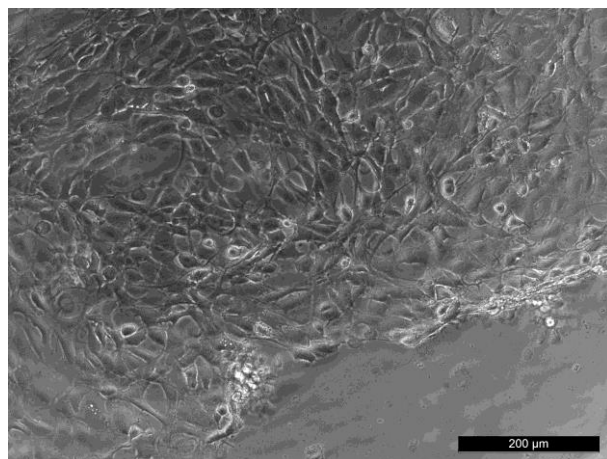
A) 2-NA 80 µg/ml média



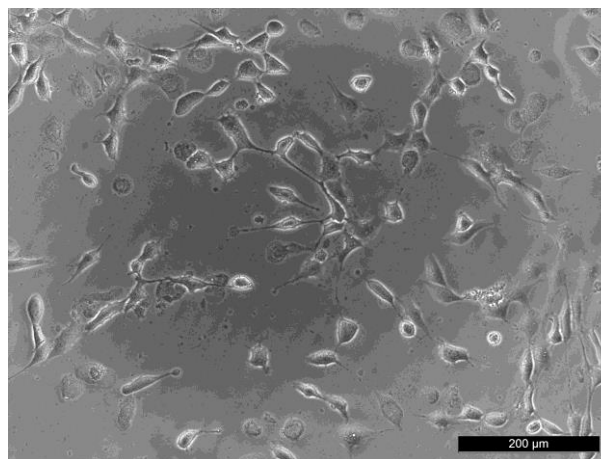
B) BENZ 320 µg/ml média



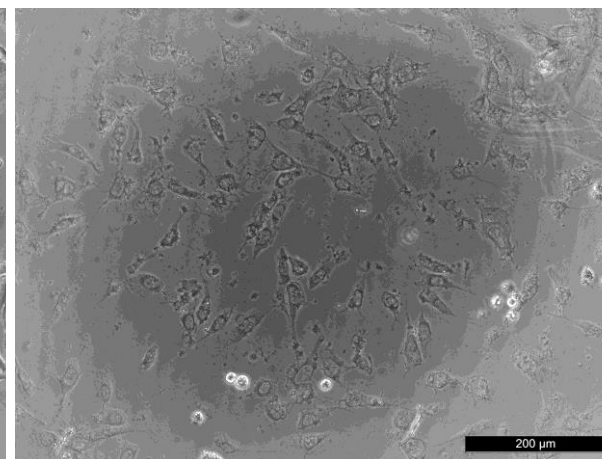
C) FEN 80 µg/ml média



D) 3-NA 10 µg/ml média s DMSO



E) AZO 80 µg/ml média s DMSO



F) BENZ 320 µg/ml média s DMSO

6.1.2.4 Mikroskopické snímky buněk doplňující test MTTs „Recovery Time“

Obrázek 24 zobrazuje mikrofotografie buněk po 24 hodinách „Recovery Time“, pořízené před hodnocením cytotoxicity pomocí testu MTT. Snímky A) a D) zachycují jev, který se vyskytoval pouze u zkoušky s „Recovery Time“. Jsou zde zřejmé trhliny a následné odlupování vrstvy buněk od substrátu při zachování vysoké viability. Tomuto lze přisuzovat značně vyšší směrodatné odchylky u celé série testování s „Recovery Time“, protože v důsledku menší plochy buněk, která byla zaznamenána u vybraných vzorků všech testovaných látek, může být snížena intenzita absorbance. Fotografie A) prezentuje buňky vystavené účinku 2-NA v koncentraci 80 $\mu\text{g/ml}$ média. Kromě zachování vysokého počtu buněk je zde zřejmé zhoršení morfologie. Jádra jsou špatně viditelná a adheze je narušena již zmíněným odlupováním. Obrázek B) poskytuje pohled na buňky, které byly inkubovány v prostřední BENZ o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$ média. Je zde možné vidět zbytky odumřelých buněk, což odpovídá výsledku dle testu MTT, který hodnotí tuto koncentraci BENZ jako silně cytotoxickou. Snímek C) zachycuje zbytky buněk, které odumřely v důsledku působení roztoku FEN o obsahu 80 μg na 1 ml kultivačního média. Fenazin již v této koncentraci působil jako silně cytotoxický, což koresponduje s vystavenou fotografií. Mikrofotografie D) představuje buňky kultivované v přítomnosti roztoku 3-NA o obsahu 10 μg na 1 ml roztoku DMSO v médiu. Vedle odlupování buněk od podkladu, čímž je narušena adheze celé vrstvy, jsou buňky přítomné ve velkém množství, srovnatelném s referenční skupinou, což souhlasí s výsledkem testu MTT. Na obrázku E) jsou buňky, které byly vystaveny působení roztoku AZO o obsahu 80 $\mu\text{g/ml}$ média s DMSO. Tvar buněk se značně liší od zdravých buněk reference, adheze i množství samotných buněk je sníženo a jsou zde přítomny i odumírající buňky. Stav buněk odpovídá hodnocení středního cytotoxického efektu. Na snímku F) lze pozorovat odumřelé zbytky buněk po vystavení účinku BENZ v koncentraci 320 μg na ml roztoku DMSO. Snímek koresponduje s hodnocením této koncentrace BENZ jako silně cytotoxické.

6.2 Poměr apoptických a nekrotických buněk

Níže je uvedeno vyhodnocení analýzy buněčné smrti měřené pomocí průtokového cytometru. Výsledky udávají procentuální rozdělení buněčných populací, které se vyskytovaly u daných koncentrací v době měření, mezi živé, apoptické a nekrotické bunky. Látky s omezenou rozpustností v kultivačním médiu (2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB) byly testovány ve dvou koncentracích (20 a 160 $\mu\text{g/ml}$) pouze v roztoku DMSO. Obsah DMSO v jednotlivých vzorcích byl aplikován v koncentracích 0,2 a 1,6 %, které byly pomocí testu MTT bez doby zotavení vyhodnoceny jako necytotoxické (viz tabulka 2). V případě zkoušky s dobou zotavení je možné ovlivnění výsledků u koncentrací 160 $\mu\text{g/ml}$ v důsledku spolupůsobení rozpouštědla, které v tomto případě způsobuje pokles viability (viz tabulka 3), a testované látky. AH a APS byly rozpuštěny v čistém kultivačním médiu, AH byl hodnocen v koncentracích 1000 a 3000 $\mu\text{g/ml}$ a APS 160 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 13 - výsledky analýzy buněčné smrti u látek testovaných bez „Recovery Time“

	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POPULACÍ bez doby zotavení		
	živé	nekrotické	apoptické
2NA_160	95,0	4,6	0,4
2NA_20	94,0	5,7	0,3
3NA_160	86,9	11,9	1,2
3NA_20	91,3	8,0	0,7
4NA_160	96,9	2,6	0,5
4NA_20	95,0	4,4	0,6
AZO_160	96,3	2,6	1,1
AZO_20	82,7	17,0	0,3
BENZ_160	96,3	2,6	1,1
BENZ_20	92,8	6,4	0,8
FEN_160	94,7	3,4	1,8
FEN_20	82,8	16,9	0,4
HB_160	94,1	4,7	1,2
HB_20	87,1	12,4	0,5
AH_3000	92,7	4,2	3,1
AH_1000	75,8	21,4	2,8
APS_500	87,9	7,4	4,8
APS_160	91,7	7,2	1,1
REF	80,3	16,6	3,1

Tabulka 13 prezentuje výsledky analýzy buněčné smrti ve formě procentuálního zastoupení živých, nekrotických a apoptických buněk u daných vzorků bez doby zotavení. Dle testu MTT byl 2-NA vyhodnocen jako necytotoxický v koncentraci 20 i 160 $\mu\text{g/ml}$, ale u vzorku s obsahem 160 $\mu\text{g/ml}$ byl vůči referenci zaznamenán pokles viability. Dle výsledků průtokové cytometrie však po 24 hodinách působení v obou případech docházelo ke zvýšenému zastoupení nekrotických buněk. 2-NA tedy pouze v koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$ mírně snižoval buněčnou populaci, ale u obou převládalo mezi poškozenými buňkami nekrotické odumírání, cca 4 – 6 % z celkové populace. 3-NA v koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$ vykazoval v testu MTT sníženou viabilitu na úroveň mírné cytotoxicity. V populaci, která přežila účinek této látky, převažovaly živé buňky, ale téměř 12 % z celkové populace bylo nekrotických, malé množství pak procházelo apoptickým procesem (1,2 %). U koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$ nedocházelo dle testu MTT k poklesu viability, poměr subpopulací byl ale podobný jako u koncentrovanějšího roztoku. Populace byla složena převážně z živých buněk, docházelo však i k poškození nekrózou (8 %), v malém množství se vyskytovaly i apoptické buňky (0,7 %). 4-NA byl dle MTT vyhodnocen jako necytotoxický v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a jako mírně cytotoxické v koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$. V rámci populace, která přežila působení těchto roztoků, docházelo dle analýzy buněčné smrti k poškození především nekrotickým procesem (cca 2,5 – 4,5 %), apoptóze podléhalo pouze cca 0,5 % celé populace. AZO dle testu MTT nepůsobil cytotoxicky v žádné ze zvolených koncentrací, nicméně u vzorku 160 $\mu\text{g/ml}$ byla zaznamenána značně snížená viabilita. V případě této koncentrace dle analýzy buněčné smrti dochází k poškození buněk nekrózou (2,6 %) i apoptózou (1,1 % z celkové populace). U koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$, kde dle MTT nedocházelo k úbytku buněčné populace, bylo zaznamenáno relativně velké zastoupení poškozených nekrotických buněk (17 %) a minimální množství buněk procházejících apoptózou (0,3 %). Dle výsledků testu MTT nedocházelo u BENZ o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ k významnému úbytku buněk. Analýza buněčné smrti však v této populaci zaznamenala zvýšený výskyt buněk poškozených nekrózou (6,4 %) a také malé množství apoptických buněk (0,8 %). Koncentrace 160 $\mu\text{g/ml}$ byla testem MTT vyhodnocena jako mírně cytotoxická. V populaci buněk, která přežila působení této látky, se vyskytovalo 2,6 % nekrotických a 1,1 % apoptických buněk. V případě FEN o koncentrace 160 $\mu\text{g/ml}$ byl dle hodnocení MTT zaznamenán pokles viability dosahující mírného cytotoxického účinku. V rámci buněk, které přežily působení této látky, bylo málo poškozených zástupců. Nekróze podléhalo 3,4 %, apoptóze 1,8 % celkové populace. Nižší koncentrace této látky nezpůsobila dle MTT výrazný pokles

viability, nicméně poměr buněčné smrti odhalil zvýšené zastoupení nekrotických buněk v celkové populaci (16,9 %) a nízký obsah buněk apoptických (0,4 %). HB nemohl být hodnocen testem MTT, jelikož u něj byla zjištěna schopnost interakce s MTT za tvorby formazánu, což může zkreslovat výsledky testu. Dle analýzy buněčné smrti tato látka způsobuje především nekrotické poškození buněk. U koncentrace 20 µg/ml bylo zaznamenáno až 12,4 % buněk podléhajících nekróze a pouze 0,4 % apoptických buněk. Koncentrace 160 µg/ml také vykazovala vyšší zastoupení nekrotických buněk (4,7 %) vůči apoptickým (1,2 %). AH byl testem MTT hodnocen v koncentraci 1000 µg/ml jako necytotoxický, při obsahu 3000 µg/ml vykazoval mírnou cytotoxicitu. Analýza buněčné smrti dokládá poškození buněk především formou nekrózy. U roztoku 1000 µg/ml je dokonce 21,4 % buněk poškozeno nekrotickým procesem, pouze 2,8 % apoptózou. V případě koncentrace 3000 µg/ml také mírně převažovala nekrotická subpopulace (4,2 %) vůči apoptické (3,1 %). APS vykazoval cytotoxicitu mírného účinku pouze u roztoku 500 µg/ml. Mezi buňkami, které překonaly působení této koncentrace, bylo zastoupeno 7,4 % nekrotických a 4,8 % apoptických buněk. Vyšší výskyt buněk poškozených nekrózou (7,2 %) vůči apoptóze (1,1 % z celkové populace) se vyskytoval i u koncentrace 160 µg/ml.

Tabulka 14 - výsledky analýzy buněčné smrti u látek testovaných s „Recovery Time“

	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POPULACÍ s dobou zotavení		
	živé	nekrotické	apoptické
2NA_160	89,24	9,85	0,92
2NA_20	92,58	6,38	1,04
3NA_160	95,77	2,91	1,32
3NA_20	92,53	7,09	0,37
4NA_160	96,37	2,34	1,30
4NA_20	86,77	13,01	0,22
AZO_160	95,80	2,76	1,44
AZO_20	94,73	5,08	0,18
BENZ_160	95,80	2,76	1,44
BENZ_20	95,86	3,78	0,37
FEN_160	99,19	0,33	0,47
FEN_20	97,26	2,06	0,68
HB_160	95,20	4,38	0,42
HB_20	98,34	1,47	0,19
AH_3000	96,31	3,43	0,26
AH_1000	96,28	3,24	0,48
APS_500	94,73	2,25	3,02
APS_160	96,57	3,11	0,32
REF	92,43	6,93	0,64

Tabulka 14 prezentuje výsledky analýzy buněčné smrti ve formě procentuálního zastoupení živých, nekrotických a apoptických buněk u daných vzorků s dobou zotavení. 2-NA při testu MTT s „Recovery Time“ v koncentraci 20 µg/ml vykazoval mírnou cytotoxicitu, v koncentraci 160 µg/ml pak střední cytotoxický účinek. V obou případech dle analýzy buněčné smrti převládá poškození buněk nekrotickou (6 – 10 %) s nižším zastoupením apoptických buněk (cca 1 %). 3-NA byl testem MTT vyhodnocen v koncentraci 20 µg/ml jako necytotoxická, při 160 µg/ml jako středně cytotoxická látka. Analýza buněčné smrti dokládá rozdělení populace mezi živé, nekrotické a apoptické buňky. Je zřejmé, že 3-NA vyvolával ve větší míře nekrotické poškození. V případě roztoku 20 µg/ml bylo zaznamenáno 7 % nekrotických buněk a 0,37 % apoptických. U koncentrace 160 µg/ml pak cca 3 % nekrotických a 1,32 % apoptických buněk. 4-NA vykazoval střední cytotoxický efekt pouze v koncentraci 160 µg/ml, u koncentraci 20 µg/ml byl hodnocen jako necytotoxický. V obou případech převládá nekrotické působení, v případě roztoku 20 µg/ml bylo naměřeno až 13 % nekrotických a pouze 0,22 % apoptických buněk. Test MTT vyhodnotil

u AZO pokles buněčné viability u obou roztoků. Také v případě obou z nich převažuje nekrotické poškození. Buňky, které přežily působení mírně cytotoxické koncentrace 20 µg/ml vykazují vyšší poškození nektrózou (5 %) než apoptózou (0,18 %). BENZ byl testem MTT vyhodnocen jako středně cytotoxický v koncentraci 20 µg/ml a silně cytotoxický při obsahu 160 µg/ml. Opět je zde vyšší zastoupení nekrotické (2 – 4 %) subpopulace vůči apoptické (0 – 2 %). FEN je dle testu MTT mírně cytotoxický v koncentraci 20 µg/ml a silně cytotoxický při 160 µg/ml. V případě silnější koncentrace bylo v průběhu „Recovery Time“ produkováno nekrotické poškození ve velmi omezené míře (0,33 % z celkové populace), podobně apoptóza se vyskytovala u 0,47 %. U koncentrace 20 µg/ml bylo poškození buněk tvořeno taktéž v malé míře, k nektróze docházelo u 2 %, k apoptóze u 0,7 % populace. HB nebyl hodnocen testem MTT. Analýza buněčné smrti s „Recovery Time“ poskytuje nižší hodnoty nekrotického zastoupení v populaci u roztoku 20 µg/ml. Zastoupení nekroticky poškozených buněk se zde pohybuje okolo 1,5 %, apoptických pak 0,2 %. U koncentrovanějšího roztoku je zaznamenán výskyt nekrotických buněk 4,4 %, obsah apoptických buněk je pak 0,4 %. Dle MTT vykazuje AH mírnou cytotoxicitu v obou koncentracích. Analýza buněčné smrti v tomto případě udává výskyt nekrotických (3,2 - 3,4 %) a apoptických (0,2 – 0,5 %) buněk podobný u obou zvolených koncentrací. Cytotoxický účinek dle MTT u APS nebyl zaznamenán u koncentrace 160 µg/ml, u roztoku 500 µg/ml byl vyhodnocen ve formě silného účinku. Analýza buněčné smrti popisuje složení populací, které přežily účinek těchto roztoků. Během doby zotavení docházelo u roztoku 160 µg/ml k produkci asi 3 % nekrotických buněk a pouze 0,3 % buněk apoptických. U koncentrovanějšího vzorku byl zaznamenán zvýšený výskyt apoptických buněk (3 %) vůči nekrotickým (2,3 %).

7 DISKUZE

Polyanilin je polymer s dobrou chemickou stabilitou, snadnou a poměrně levnou syntézou a mezi polymery vysokou vodivostí (Cruz-Silva et al., 2006). Díky svým vlastnostem nachází možnost značného uplatnění v elektronice, při výrobě senzorů (Bai et al., 2007), antistatických materiálů (Bowman a Mattes, 2005) nebo například vodivých nátěrů a lepidel (Hino, Taniguchi a Kuramoto, 2005). V důsledku širokých možností jeho využití jsou hojně studovány i jeho toxikologické vlastnosti, jejichž znalost může vést k jeho aplikaci ve zdravotnictví a medicínské technice. Nabízí se především využití ve formě biosenzorů a chirurgických sond (Nambiar a Yeow, 2011) nebo tkáňové inženýrství srdeční tkáně (Hsiao et al., 2013). Tyto aplikace jsou limitovány toxicitými projevy polyanilinu, které jsou jako u klasických polymerů zapříčiněny obsahem nízkomolekulárních látek (Wang et al., 1999; Humpolíček et al., 2012). Právě nízkomolekulárními produkty syntézy polyanilinu a jejich toxickým potenciálem se zabývala tato diplomová práce. Hlavním cílem práce bylo stanovení cytotoxického účinku monomeru anilin hydrochloridu, oxidačního činidla amonium persulfátu, dále hydrazobenzenu a benzidinu, které vznikají již v prvních krocích polymerace (Gospodinova a Terlemezyan, 1998), meziproductů fenazinu a azobenzenu, které se v PANI vyskytují, pokud reakce probíhá v alkalickém prostředí (Šeděnková, Stejskal a Trchová, 2014), a vzhledem k relativně vysokému obsahu nitrosloučenin v PANI připraveném v kyselém prostředí (Laska a Widlarz, 2004), byly zařazeny taktéž dusíkaté deriváty anilinu 2-nitroanilin, 3-nitroanilin a 4-nitroanilin. Cytotoxicita látek byla hodnocena na buněčné linii myšších fibroblastů NIH/3T3 pomocí testu MTT a pro doplnění informací o chování buněčných populací byla zařazena také analýza buněčné smrti měřená pomocí průtokové cytometrie. S ohledem na špatnou rozpustnost některých látek v kultivačním médiu (2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB) bylo pro jejich aplikaci použito jak čisté médium, tak rozpouštědlo DMSO.

Anilin hydrochlorid, který je používán jako monomer pro přípravu PANI, vykazuje dle dostupných toxikologických informací toxické účinky především ve formě karcinogenity a teratogenity. Subchronické studie u potkanů ošetřovaných AH o koncentraci 600 ppm ukázaly jeho vliv na kolísání hmotnosti sleziny, jater i varlat a změny hematologických parametrů (Firoze et al., 1993). Karcinogenní účinek této látky u potkanů se v největší míře projevoval také u sleziny (Carcinogenesis, National Cancer Institute, 1978; CANCER, International Agency for Research on, 1982; Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003). Teratogenní potenciál hodnocený u březích samic

potkanů odhalil komplikace ve formě hematotoxických účinků a změn hmotnosti sleziny. Podobně u novorozenců se vyskytovaly hematologické změny, na základě čehož byla stanovena NOAEL vývojové toxicity 30 mg/kg/den (Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment, 2003). Cytotoxicita této látky v souladu s ISO normami byla hodnocena v bakalářské práci, na kterou navazuje tato diplomová práce. Účinek AH byl pozorován u keratinocytů HaCaT, kdy se cytotoxicita projevovala od koncentrace 1000 µg/ml. Výsledek testu MTT bez doby zotavení („Recovery Time“) v praktické části této diplomové práce udává první cytotoxickou koncentraci 1500 µg/ml média. Příčinou rozdílných výsledků je s velkou pravděpodobností rozdílná buněčná linie. V této práci byly zvoleny myšší fibroblasty, lze tedy říci, že tato linie NIH/3T3 je k AH citlivější. S rostoucí koncentrací AH se viabilita buněk příliš neměnila, až u vzorku 3000 µg/ml došlo k výraznému poklesu téměř k hodnotám střední cytotoxicity. AH způsoboval dle analýzy buněčné smrti ve větší míře poškození vedoucí k nekróze nežli apoptóze. Do hodnocení byla zařazena série testů s „Recovery Time“, který projev cytotoxicity této látky zhoršoval. Mírný cytotoxický účinek se projevil ve všech testovaných koncentracích, což může být způsobeno zastavením buněčného cyklu v důsledku podání AH, který se po 24 hodinách „Recovery Time“ jeví vůči referenci jako toxický i v nejnižší koncentraci 500 µg/ml, přestože v tomto případě jiným způsobem buňky nepoškozoval.

Dle dostupných studií byl amonium persulfát, s ohledem na jeho časté využití v kosmetice, testován jak na schopnost podráždění kůže a sliznic, kdy byl klasifikován jako mírně dráždivý pouze pro oční sliznice (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001), tak pro akutní a subchronickou toxicitu, genotoxicitu a karcinogenitu. Akutní toxicita u potkanů udává po perorálním podání hodnotu LD50 u samců 600 mg/kg a u samic 495 mg/kg, přičemž akutních projevů bylo dosaženo i po inhalaci či dermální aplikaci (Cosmetic Ingredient Review Expert, 2001). Z hlediska genotoxických účinků byl APS hodnocen několika studii vždy s negativním výsledkem (Final report on safety assessment of ammonium, potassium, and sodium persulfate, 2001; National industrial chemicals and assessment scheme, 2001). Studie karcinogenity Kurokawa et al. (1984) udává výrazně zvýšený výskyt nádorů. APS byl z hlediska cytotoxicity hodnocen v mé bakalářské práci na buněčné linii keratinocytů, kdy vykazoval mírný cytotoxický efekt od koncentrace 250 µg/ml. Tento výsledek koresponduje s vyhodnocením testu MTT v experimentální části této práce. Zde APS působil mírnou cytotoxicitu od koncentrace 320 µg/ml. Zvýšení koncentrace na 500 až 1000 µg/ml vyvolalo prohloubení

účinku na střední cytotoxický efekt. Výsledky testu MTT s „Recovery Time“ naznačují, že buňky vystavené účinku cytotoxických koncentrací APS již nejsou schopny obnovit proliferaci.

2-nitroanilin byl dříve hodnocen na zkoušky mutagenity pomocí Amesova testu. Ačkoliv u této látky nebyla prokázána genotoxická aktivita, byla zjištěna jeho akutní toxická koncentrace pro *Salmonella typhimurium* 2515 µg/miska (Aßmann et al., 1997). Při zkouškách teratogenity a reprodukční toxicity výsledky ukázaly podezření na vývojovou toxicitu 2-NA u potkanů, přičemž hodnota NOAEL pro teratogenní potenciál byla stanovena na 300 – 400 mg/kg/den (United Nations Environment Programme, 2001). Hodnocení 2-NA z cytotoxického hlediska bylo v této práci provedeno pomocí testu MTT. 2-NA vykazoval cytotoxický efekt od koncentrace 320 µg/ml. Doba zotavení v případě 2-NA posunula hranice cytotoxicity k nižším koncentracím (od 20 µg/ml v DMSO, od 80 µg/ml v čistém médiu), je tedy pravděpodobné, že 2-NA zhoršoval schopnost buněčné proliferace či metabolismu i v koncentracích, které se bez „Recovery Time“ jeví jako necytotoxické.

3-nitroanilin byl roku 1991 testován na akutní toxicitu u potkanů *in vivo*. Jako NOEL byla hodnocena koncentrace 15 mg/kg/den, při podání vyššího množství 3-NA byl u potkanů zvýšený výskyt poškození mužských pohlavních orgánů nebo inhibice přenosu kyslíku (Yoshida et al.). U 3-NA byl roku 1997 testován na genotoxicitu pomocí Amesova testu. Výsledky prokázaly jeho mutagenitu u *Salmonella typhimurium* a u tohoto kmene stanovily toxickou koncentraci 3308 µg/miska (Aßmann et al.). 3-NA v této práci vykazoval mírný cytotoxický efekt od koncentrace 80 µg/ml v roztoku DMSO, od 160 µg/ml v čistém médiu. Tento rozdíl je možné přisoudit omezené rozpustnosti 3-NA v médiu. U série testů s „Recovery Time“ byl cytotoxický účinek posunut k nižším koncentracím a dříve mírné cytotoxické účinky byly prohloubeny na hodnoty střední cytotoxicity. Z těchto výsledků lze usuzovat, že poškozené buňky nebyly schopny obnovit proliferaci. U této látky bylo analýzou buněčné smrti zaznamenáno výrazně vyšší zastoupení nekrotických buněk vůči apoptickým, a to jak ve zkouškách s „Recovery Time“ i bez něj.

4-nitroanilin byl hodnocen z hlediska akutní toxicity u sladkovodních ryb *Cyprinus Carpio*, kde vykazoval mírnou toxicitu. Studie stanovila hodnotu LC50 po 94 hodinách na 48,99 mg/l vody (Shen, Gao a Wang, 2012). Chronické studie odhalily jeho vliv na hmotnost některých tělních orgánů, zejména sleziny, a nárůst koncentrace methemoglobinu v krvi, při jehož zvýšení dochází k inhibici přenosu kyslíku (Nair, 1990). 4-NA byl hodnocen jako pozitivní na mutagenní účinek v Amesově testu u kmene *Salmonella typhimurium*

s toxickou koncentrací 2495 µg/miska. Karcinogenní studie 4-NA u myši zaznamenala časté negativní hematologické efekty a u samců ošetřovaných touto látkou v koncentraci 100 mg/kg po dobu 103 týdnů byl odhalen zvýšený výskyt hemangiosarkomů. V podobné studii u potkanů nebyl prokázán karcinogenní potenciál, ale opět zde byly zjištěny hematologické nepříznivé účinky (Health Council of the Netherlands, 2008). Vyhodnocení cytotoxicity 4-NA v této práci udává mírně cytotoxický účinek od obsahu 80 µg látky na 1 ml roztoku DMSO, nicméně koncentrace 40 µg/ml poskytla viabilitu buněk velmi blízkou mírné cytotoxicitě. Potom, co buňky prošli „Recovery Time“ se tato koncentrace projevila jako mírně cytotoxická a při vyšším obsahu 4-NA dosahovaly hodnoty viability až silně cytotoxického efektu. Je tedy zřejmé, že buňky vystavené cytotoxickým koncentracím neobnovili svoji proliferaci. Analýza buněčné smrti s „Recovery Time“ navíc odhalila zvýšené množství nekrotických buněk během doby zotavení. Při aplikaci 4-NA v čistém kulturačním médiu nedošlo k projevu toxicity, což je přisuzováno velmi nízké rozpustnosti 4-NA v tomto prostředí a tedy silně omezenému kontaktu buněk s touto látkou.

Azobenzen byl při testech genotoxicity na potkanech hodnocen jako slabě mutagenní látka (Cheung et al., 1994). V případě testů karcinogenity u potkanů *in vivo* bylo nalezeno velké množství zhoubných nádorů břišních orgánů, přičemž jejich výskyt se zvyšoval s rostoucí koncentrací (National Toxicology Program, 1979). Také novější studie Sekihasi et al. (2002) vyhodnotila AZO jako pozitivní na karcinogenní potenciál u myši i potkanů s vysokým výskytem nádorů v různých orgánech dutiny břišní. Test MTT v praktické části této diplomové práce hodnotil AZO jak v čistém médiu, tak v roztoku DMSO. V žádné z testovaných koncentrací nebyl zaznamenán cytotoxický efekt, nicméně analýza buněčné smrti zaznamenala zvýšené poškození buněk nekrotickým procesem, což se v testu MTT projevilo až v průběhu „Recovery Time“. Výsledky, které hodnotily cytotoxicitu AZO v roztoku DMSO s „Recovery Time“, naznačují zvýšené cytotoxické chování od koncentrace 80 µg/ml, ale výsledky testu s „Recovery Time“ po aplikaci v čistém médiu udávají ve všech koncentracích mírnou cytotoxicitu. Proto je pravděpodobná možnost, že AZO způsoboval zastavení buněčného cyklu a v kombinaci s DMSO v rozmezí 160 - 320 µg/ml byla toxicita zesílená přítomností rozpouštědla.

Benzidin je považován za karcinogen močového měchýře u člověka (Choudhary, 1996), nicméně epidemiologické studie, ze kterých toto hodnocení vychází a které se v minulosti touto problematikou zabývaly, posuzovaly vždy benzidin v kombinaci s jinými chemikáliemi. I když byl prokázán zvýšený výskyt rakoviny močového měchýře,

nebylo možné tyto důsledky přisoudit samotnému BENZ (Beyerbach et al., 2005; Brown, Alberts a Schoengerg, 2011). Prokazatelného výskytu nádorových onemocnění v důsledku expozice pouhému BENZ bylo dosaženo u studie, která pozorovala účinky této látky na potkanech (Morton et al., 1981). Novější studie se zaměřují spíše na hodnocení genotoxického potenciálu BENZ, který byl prokázán skrze chromozomální aberace buněk kostní dřeně u myši (You et al., 1993), pomocí kometového testu u lidských lymfocytů a hepatocytů (Chen, 2002; Chen et al., 2011), přičemž genotoxicita BENZ je pravděpodobně zprostředkována reaktivními formami kyslíku (Chen, 2002; Makena a Chung, 2007). BENZ vykazuje také schopnost ovlivňovat imunitní systém, měnit aktivitu jeho buněk a zasahovat do správné funkce sleziny a brzlíku, kvůli čemuž je hodnocen jako imunotoxická látka (Rao et al., 1971; Luster et al., 1991). V práci Chen et al. (2014) byla prokázána i vývojová toxicita BENZ u embryí sladkovodních ryb *Danio rerio*, projevující se abnormálním vývojem mozku či perikardiálním otokem. V experimentální části této práce vykazoval BENZ rozpuštěný v DMSO mírný cytotoxický efekt, statisticky průkazně odlišný od reference, od koncentrace 80 µg/ml. Při aplikaci v čistém médiu pak od koncentrace 160 µg/ml. Rozdíl lze opět přisoudit snížené rozpustnosti této látky v médiu. Poté, co buňky prošli 24 hodinami „Recovery Time“, byla cytotoxicita v daných koncentracích prohloubena až k silné cytotoxicitě a mírný cytotoxický efekt byl zaznamenán už v nejnižších testovaných koncentracích. Vzhledem k těmto výrazným změnám, ke kterým došlo během „Recovery Time“, je zřejmé, že buňky nebyly schopné obnovit proliferaci, a že BENZ způsobil poškození i u buněk, které byly v první sérii srovnatelné s referencí. Jelikož mikroskopické vyšetření ukázalo buňky v relativně hojném počtu, mohlo se jednat o narušení buněčného cyklu či poruchy metabolismu. Poměr nekrotických a apoptických buněk vyhodnotil mírně vyšší zastoupení nekrózy.

Další testovanou látkou je fenazin, který byl dříve hodnocen i z hlediska cytotoxicity, a to na lidských hepatocytech. Hodnota IC₅₀ po 24 hodinách působení byla pomocí testu MTT stanovena na 21 µg/ml, pomocí testu RTCA 50 µg/ml (McGuigan a Xing-Fang, 2014). Zkoušky mutagenity udávají minimální genotoxickou koncentraci fenazinu u eukaryotických buněk kmene *Saccharomyces cerevisiae* 0,38 µg/ml, u bakterií 23,78 µg/ml (Bartoš et al., 2006). V partické části této práce byl FEN při rozpuštění v DMSO vyhodnocen jako mírně cytotoxický od koncentrace 40 µg/ml, středně cytotoxický od 160 µg/ml. Při aplikaci v čistém médiu byla cytotoxicita posunuta k vyšším koncentracím, tento rozdíl je ale přisuzován nízké rozpustnosti v médiu a náročné homogenizaci vzorku obsahujícího

pevné částice. U série testování s dobou zotavení buněk byla toxicita značně prohloubena jak u vzorků v čistém médiu, tak v roztoku DMSO. Vyhodnocení v obou případech dosahuje u nižších koncentrací (do 20 $\mu\text{g/ml}$) mírnou cytotoxicitu, u vysokých koncentrací (80 - 320 $\mu\text{g/ml}$) toxicitu silného účinku. Je patrné, že buňky nebyly schopny obnovit proliferaci, pravděpodobně také docházelo k zastavení buněčného cyklu či metabolismu během průběhu „Recovery Time“.

Hydrazobenzen byl testován na subchronickou toxicitu v několika zkouškách *in vivo*. Tato látka u potkanů způsobovala záněty plic, inhibici přenosu kyslíku, u myší pak střevní krvácení. Jako velmi časté komplikace se objevovaly degenerativní změny jater a proto byl tento orgán vyhodnocen jak cílový pro toxické účinky FEN. S ohledem na úmrtnost byla stanovena hodnota LOAEL u potkanů 5 mg/kg/den a u myší 52 mg/kg/den. V těchto koncentracích byl HB označen jako karcinogen jater, nadledvinek a mléčné žlázy (National Toxicology Program, 1978). V nejnovější subchronické studii na potkanech byly nalezeny opět komplikace u jater, jako NOEL byla vyhodnocena koncentrace 4,8 mg/kg/den (Dodd et al., 2013). Dřívější výsledky genotoxické studie u křečka čínského *in vivo* přinesly také náznaky reprodukční toxicity u samců (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990). Cytotoxicita HB nemohla být testována metodou MTT, protože v přítomnosti stejnojmenné látky vykazuje schopnost její redukce na formazán. Na tomto principu je založeno celé stanovení, proto by byly výsledky zatíženy chybou. Analýza buněčné smrti vyhodnotila v přítomnosti HB převažující zastoupení živých buněk. Mezi poškozenými buňkami však byl zřejmý vyšší výskyt nekrotických buněk. Během „Recovery Time“ byl obsah poškozených buněk v důsledku nekrózy snížen, ale stále vykazoval hodnoty srovnatelné s látkami, které byly vyhodnoceny jako cytotoxické.

ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovení cytotoxicity několika nízkomolekulárních látek, které se v závislosti na přípravě mohou vyskytovat v polyanilinu a které mohou působit toxicky. Stanovení bylo provedeno s ohledem na potenciální využití polyanilinu jakožto biomateriálu. Konkrétně byl hodnocen monomer anilin hydrochlorid, oxidační činidlo amonium persulfát, oligomerní jednotky azobenzen, benzidin, hydrazobenzen a fenazin a nakonec dusíkaté deriváty anilinu 2-nitroanilin, 3-nitroanilin a 4-nitroanilin.

Testy cytotoxicity byly provedeny na buněčné linii myšších fibroblastů NIH/3T3. Koncentrace jednotlivých látek byly vybrány na základě předchozího studia jejich toxikologických vlastností a do testu byly zařazeny taktéž referenční vzorky buněk, které byly inkubovány s nulovou koncentrací testovaných látek. Kvantitativně byla cytotoxicita hodnocena pomocí testu MTT a průtokové cytometrie, správnost testu byla ověřována porovnáním výsledků s pořizovanými mikrofotografiemi buněk.

Výsledky testů jsou rozděleny do dvou sérií. U jedné z nich byla cytotoxicita hodnocena ihned po ukončení expozice, v druhé části buňky prošly tzv. dobou zotavení, která umožňuje hodnotit schopnost obnovy proliferace. V druhé sérii testů s dobou zotavení byly hranice toxicity posouvány k nižším koncentracím a cytotoxicita dosahovala vyšších úrovní u všech hodnocených chemikálií, což znamená, že buňky, které byly vystaveny negativnímu účinku těchto látek, nebyly schopny dalšího buněčného dělení. Z tohoto důvodu jsou zde uvedeny výsledky testů s dobou zotavení, které udávají cytotoxické působení u AH od koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$; u APS od 320 $\mu\text{g/ml}$; 3-NA a 4-NA vykazovaly cytotoxicitu od 40 $\mu\text{g/ml}$; 2-NA od koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$ a AZO, BENZ i FEN projevíly cytotoxický potenciál již při nejnižší testované koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. HB nebylo možné hodnotit testem MTT, kvůli jeho schopnosti redukovat stejnojmennou látku MTT na nerozpustný formazán.

Tyto výsledky poskytují základní informace o toxickém potenciálu hodnocených látek a jsou nezbytné pro další studium biologických účinků polyanilinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABATE, G., M. R. MSHANA a H. MIORNER, 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* [online]. 1998, roč. 2, č. 12 [cit. 2014-11-11]. ISSN 1815-7920.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 1990. Toxicological profile for 1,2-diphenylhydrazine [online]. December 1990 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp136.pdf>

AKHTAR, A, P.M. KSHIRSAGAR, M.V. CHIKHALE, A.A. DESHMUKH a S.P. SURWASE, 2008. The rise o in-vitro toxicity testing. In: *Weterinary World* [online]. May 2008, roč. 1, č. 5, s. 150 - 151 [cit. 2014-11-11]. ISSN 2231-0916. Dostupné z: <http://www.veterinaryworld.org/2008/May/The%20Rise%20of%20In-Vitro%20Toxicity%20Testing.pdf>

AßMANN, N, M EMMRICH, G KAMPF a M KAISER, 1997. Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 1997, vol. 395, 2-3, s. 139-144 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/S1383-5718(97)00158-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571897001587>

BAGCHI, D., 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. In: *Toxicology* [online]. 1995, vol. 104, 1-3, s. 129-140 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1016/0300-483X(95)03156-A. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300483X9503156A>

BAI, Hua et al., 2007. Electrosynthesis of polypyrrole/sulfonated polyaniline composite films and their applications for ammonia gas sensing. *Polymer* [online]. Roč. 48, č. 14, s. 4015-4020 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.05.033.

BAKDASH, A, M GANSWINDT, S HERRE, T NADULSKI a F PRAGST, 2006. Lethal Poisoning with p-Nitroaniline. In: *Institute of legal Medicine: University Hospital Charité, Berlin*. 2006, vol. 73, issue 61 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/255595337_Lethal_Poisoning_with_pNitroaniline

BALVAN, Jan, M. RAUDENSKÁ, M. MASARŽÍK a R. KIZEK, 2014. Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií. In: *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, vol. 1, issue 3, s. 60 – 63 [cit. 2015-4-13]. ISSN: 2336-3940. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/journal2.pdf

BARTOŠ, T., S. LETZSCH, M. ŠKAREK, Z. FLEGROVÁ, P. ČUPR a I. HOLOUBEK, 2006. GFP assay as a sensitive eukaryotic screening model to detect toxic and genotoxic activity of azaarenes. In: *Environmental Toxicology* [online]. 2006, vol. 21, issue 4, s. 343 - 348 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1002/tox.20190. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.20190>

BARTUŇKOVÁ, Jiřina, 2011. *Výšetrovací metody v imunologii. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Editor Milan Paulík. Praha: Grada, 2011, 164 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-802-4735-337.

BENIGNI, Romualdo, 2014. Predicting the carcinogenicity of chemicals with alternative approaches: recent advances. In: *Expert Opinion on Drug Metabolism* [online]. 2014, vol. 10, issue 9, s. 1199-1208 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1517/17425255.2014.934670.

BEYERBACH, A., N. ROTHMAN, V. K. BHATNAGAR, R. KASHYAP a G. SABBIONI, 2005. Hemoglobin adducts in workers exposed to benzidine and azo dyes. In: *Carcinogenesis* [online]. 2005-12-12, vol. 27, issue 8, s. 1600-1606 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1093/carcin/bgi362. Dostupné z: <http://www.carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgi362>

BHATTACHARYA, Sudin et al, 2011. Toxicity Testing in the 21st Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. In: *PLOS ONE* [online]. June 20, 2011 [cit. 2013-04-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0020887.

BHOGAL, Nirmala, Christina GRINDON, Robert COMBES a Michael BALLS, 2005. Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. In: *Trends in Biotechnology* [online]. 2005, vol. 23, issue 6, s. 299-307 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779905000909>.

BLACHE, Denis, Laurence GESQUIÈRE, Nadine LOREAU, Phillipe DURAND a Jordan L. HOLTZMAN, 1999. Oxidant stress: the role of nutrients in cell-lipoprotein interactions.

In: *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 1999, vol. 58, issue 03, s. 211-239 [cit. 2014-09-11]. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-72347-1_9.

BORTNER, Carl D. a John A. CIDLOWSKI, 2002. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2002, vol. 42, issue 1, s. 259-281 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.083101.143836. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.42.083101.143836>

BOWMAN, D. a B.R. MATTES, 2005. Conductive Fibre Prepared From Ultra-High Molecular Weight Polyaniline for Smart Fabric and Interactive Textile Applications. *Synthetic Metals* [online]. 2005, vol. 154, s. 29-32 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.017.

CANCER, International Agency for Research on, 1982. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1982, vol. 27, 341 s., ISBN 92-832-1227-4.

CARCINOGENESIS, National Cancer Institute, 1978. Bioassay of aniline hydrochloride for possible carcinogenicity. In: *Technical Report Series*. 1978, č. 130, s. 113 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr130.pdf

COLLINGE, Mark et al., 2012. Developmental immunotoxicity (DIT) testing of pharmaceuticals: Current practices, state of the science, knowledge gaps, and recommendations. In: *Journal of Immunotoxicology* [online]. Apr 2012, roč. 9, č. 2, s. 1043-1055 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1547-691x. DOI: 10.3109/1547691X.2012.661486.

CORVI, Raffaella, Federica MADIA, Andrew WORTH a Maurice WHELAN, 2013. EURL ECVAM strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing. Publications Office of the European Union, 48 s. ISBN 978-92-79-34845-7.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT, 2001. Final Report on the Safety Assessment of Ammonium, Potassium, and Sodium Persulfate. In: *International Journal of Toxicology* [online]. Jan 2001, roč. 20, č. 4, s. 7-21 [cit. 2013-04-07]. DOI: 10.1080/10915810152630710.

CRUZ-SILVA, Rodolfo et al., 2007. Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 43, č. 8, s. 3471-3479 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.05.027.

CUI, Lili, Danming CHAO, Xiaofeng LU, Junfeng ZHANG, Hui MAO, Yongxin LI a Ce WANG, 2010. Synthesis and properties of an electroactive alternating multi-block copolymer of poly(ethylene oxide) and oligo-aniline with high dielectric constant. In: *Polymer International* [online]. 2010, vol. 59, issue 7, s. 975-979 [cit. 2014-04-14]. DOI: 10.1002/pi.2815. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2815>.

ČSN EN ISO 10993-5. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Český normalizační institut, 2005.

DANE, Thomas G., Philip T. CRESSWELL, Georgia A. PILKINGTON, Samuele LILLIU, John E. MACDONALD, Stuart W. PRESCOTT, Oier BIKONDOA, Charl F. J. FAUL a Wuge H. BRISCOE, 2013. Oligo(aniline) nanofilms: from molecular architecture to microstructure. In: *Soft Matter* [online]. 2013, vol. 9, issue 44, s. 10501 [cit. 2014-09-10]. DOI: 10.1039/c3sm51407b. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3sm51407b>.

DANE, Thomas G., Philip T. CRESSWELL, Oier BIKONDOA, Gemma E. NEWBY, Thomas ARNOLD, Charl F. J. FAUL a Wuge H. BRISCOE, 2012. Structured oligo(aniline) nanofilms via ionic self-assembly. In: *Soft Matter* [online]. 2012, vol. 8, issue 10, s. 2824 [cit. 2014-04-14]. DOI: 10.1039/C2SM06492H. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm06492h>.

DODD, D. E., L. J. PLUTA, M. A. SOCHASKI, H. G. WALL a R. S. THOMAS, 2013. Subchronic Hepatotoxicity Evaluation of Hydrazobenzene in Fischer 344 Rats. In: *International Journal of Toxicology* [online]. 2013-01-02, vol. 31, issue 6, s. 564 - 571 [cit. 2015-04-03]. DOI: 10.1177/1091581812465322. Dostupné z: <http://ijt.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1091581812465322>

ECKARDT, Kathrin a Ralf STAHLMANN, 2010. Erratum to: Use of two validated *in vitro* tests to assess the embryotoxic potential of mycophenolic acid. In: *Archives of Toxicology* [online]. 2010, vol. 84, issue 1, s. 85-85 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1007/s00204-009-0492-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-009-0492-1>.

EDINGER, Aimee L a Craig B THOMPSON, 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. In: *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2004, vol. 16, issue 6, s. 663 - 669 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.09.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067404001474>

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006. Anilines - Results of testing. [cit. 2015-04-11]. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Dostupné z: <http://www.epa.gov/oppt/chemtest/pubs/aniline2.pdf>

EXNEROVÁ, Milena, Miroslava TRCHOVÁ, Jaroslav STEJSKAL, Věra KAŠPÁRKOVÁ a Petr HUMPOLÍČEK, 2012. Úprava vodivého polymeru, polyanilinu, pro biomedicínální aplikace. In: *Chemické listy* [online]. 2012, roč. 106 [cit. 2014-11-10]. ISSN 0322-7340.

FIROZE, K. M., Bhupendra S. KAPHALIA, Paul J. BOOR a G. A. S. ANSARI, 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. In: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. Apr 1993, roč. 24, č. 3, s. 368-374 [cit. 2013-05-14]. DOI: 10.1007/BF01128736.

FRESHNEY, R. Ian, 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. vyd. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 642 s. ISBN 04-714-5329-3.

GHIGO, Giovanni, Silvio OSELLA, Andrea MARANZANA a Glauco TONACHINI, 2011. The Mechanism of the Acid-Catalyzed Benzidine Rearrangement of Hydrazobenzene: A Theoretical Study. In: *European Journal of Organic Chemistry* [online]. 2011, vol. 2011, issue 12, s. 2326-2333 [cit. 2015-04-03]. DOI: 10.1002/ejoc.201001636. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.201001636>.

GOSPODINOVA, N. a L. TERLEMEZYAN, 1998. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. In: *Progress in Polymer Science* [online]. 1998, vol. 23, issue 8, s. 1443-1484 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1016/S0079-6700(98)00008-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670098000082>.

HAVELKOVÁ, Marie, Petr KACHLÍK a Kateřina LEFNEROVÁ, 2005. Amesův test jako metoda detekce rizikových látek - praktické cvičení pro studenty. In: *Sborník z celostátní konference s mezinárodní účastí: XXXIII. Ostravské dny dětí a dorostu*. 1. vyd. 2005: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně., 2005. s.48-51, 4 s. ISBN 80-7329-107-X.

HEALTH COUNCIL OF THE NETHERLANDS, 2008. P-Nitroaniline, Evaluation of the carcinogenicity and genotoxicity [online]. Apr 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://gr.nl/sites/default/files/200808OSH.pdf>

HINO, Tetsuo, S. TANIGUCHI a N. KURAMOTO, 2005. Syntheses of conductive adhesives based on epoxy resin and polyanilines by using N-tert-butyl-5-methylisoxazolium

perchlorate as a thermally latent curing reagent. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. Roč. 44, č. 2, s. 718-726 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1002/pola.21085.

HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ, 2004. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2004, 188 s. ISBN 80-708-0548-X.

HORGAN, Richard P a Louise C KENNY, 2011. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. In: *The Obstetrician* [online]. 2011, vol. 13, issue 3, s. 189-195 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1576/toag.13.3.189.27672. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1576/toag.13.3.189.27672>

HSIAO, Chun-Wen et al., 2013.. Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials*[online]. Vol. 34, issue 4, s. 1063-1072 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.065.

HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012. Biocompatibility of polyaniline. In: *Synthetic Metals* [online]. 2012, roč. 162, s. 722-727 [cit. 2015-03-02]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

CHANG, Taihyun, 2003. Recent Advances in Liquid Chromatography Analysis of Synthetic Polymers. In: *Advances in Polymer Science* [online]. Vol. 163, s. 1 - 60 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1007/b11050. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b11050>.

CHEN, C. Ssu, You-Cheng HSEU, Jia-Chuen SUNG, Chin-Hui CHEN, Lei-Chin CHEN a King-Tom CHUNG, 2011. Induction of DNA damage signaling genes in benzidine-treated HepG2 cells. In: *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2011, vol. 52, issue 8, s. 664-672 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1002/em.20669. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.20669>

CHEN, Mark Hung-Chih, Li-Chi HSU, Jia-Lun WU, Chi-Wei YEH, Jen-Ning TSAI, You-Cheng HSEU a Li-Sung HSU, 2014. Exposure to benzidine caused apoptosis and malformation of telencephalon region in zebrafish. In: *Environmental Toxicology* [online]. 2014, vol. 29, issue 12, s. 1428-1436 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1002/tox.21873. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.21873>

CHEN, S.-C, 2002. Assessment of Genotoxicity of Benzidine and Its Structural Analogues to Human Lymphocytes Using Comet Assay. In: *Toxicological Sciences* [online]. Jul 2002, vol. 72, issue 2, s. 283-288 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1093/toxsci/kfg026. Dostupné z: <http://www.toxsci.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfg026>

CHEN, S.C., M.D. LIN, S.K. LIANG, M.C. ESPADAS-TORRE, B.H. HOOBERMAN a J.E. SINSHEIMER, 2006. Ortho-Substituent effects on the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of benzidine derivatives. In: *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2006, vol. 43, issue 1, s. 19-30 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01917.x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016512189390027B>

CHEUNG, Yen-Ling, Sarah M. PUDDICOMBE, Timothy J.B. GRAY a Costas IOANNIDES, 1994. Mutagenicity and CYP1A induction by azobenzenes correlates with their carcinogenicity. In: *Carcinogenesis* [online]. 1994, vol. 15, issue 6, s. 1257-1263 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1093/carcin/15.6.1257. Dostupné z: <http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/15.6.1257>

CHOUDHARY, Gangadhar, 1996. Human health perspectives on environmental exposure to benzidine: A review. In: *Chemosphere* [online]. 1996, vol. 32, issue 2, s. 267-291 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1016/0045-6535(95)00338-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004565359500338X>

CHUNG, King-Thom et al., 1997. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. Aug 1997, roč. 387, č. 1, s. 1-16 [cit. 2013-04-07]. ISSN 13835742. DOI: 10.1016/S1383-5742(97)00019-7.

ISHIDATE, M et al., 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. In: *Food and Chemical Toxicology* [online]. Aug 1984, roč. 22, č. 8, [cit. 2013-04-07]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/0278-6915(84)90271-0.

KIM, B.H, 2010. The validation of a new reconstructed human skin equivalent model, Keraskin for the alternative test methods for the skin irritation. In: *Toxicology Letters* [online]. 2010, vol. 196, S132- [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.03.461. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427410005904>

KIRKLAND, David, Stefan PFUHLER, David TWEATS, Marilyn AARDEMA, Raffaella CORVI, Firouz DARROUDI, Azeddine ELHAJOUJI, Hansruedi GLATT, Paul

HASTWELL, Makoto HAYASHI, Peter KASPER, Stephan KIRCHNER, Anthony LYNCH, Daniel MARZIN, Daniela MAURICI, Jean-Roc MEUNIER, Lutz MÜLLER, Gerhard NOHYNEK, James PARRY, Elizabeth PARRY, Veronique THYBAUD, Ray TICE, Jan van BENTHEM, Philippe VANPARYS a Paul WHITE, 2007. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2007, vol. 628, issue 1, s. 31-55 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.11.008.

KNEJZLÍK, Zdeněk a Tomáš RUML, 1999. Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. In: *Chemické listy* [online]. 1999, roč. 93 [cit. 2014-11-10]. ISSN 0322-7340.

KOBETIČOVÁ, K., J. BEZCHLEBOVÁ, J. LÁNA, I. SOCHOVÁ a J. HOFMAN, 2008. Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2008, vol. 71, issue 3, s. 650 - 660 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.01.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651308000225>

KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA, 2009. Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. In: *Chemické listy* [online]. roč. 103 [cit. 2014-11-11]. ISSN 0322-7340.

KREWSKI, Daniel, Melvin E. ANDERSEN, Ellen MANTUS a Lauren ZEISE, 2009. Toxicity Testing in the 21st Century: Implications for Human Health Risk Assessment. In: *Risk Analysis* [online]. 2009, vol. 29, issue 4 [cit. 2014-11-08]. DOI: 10.1111/j.1539-6924.2008.01150.x.

KUROKAWA, Yuji et al., 1984. Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis. In: *Cancer Letters* [online]. 1984, roč. 24, č. 3, s. 299-304 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03043835. DOI: 10.1016/0304-3835(84)90026-0.

LACH-NER, 2005. *Bezpečnostní list anilin hydrochlorid*. [cit. 2013-04-07]. LACH-NER, s.r.o. Neratovice. Dostupné z: <http://www.vitrum.cz/stazeni/Chemie/Anilin%20hydrochlorid.pdf>

LACH-NER, 2011. *Bezpečnostní list amonium persulfát*. [cit. 2013-04-07]. LACH-NER, s.r.o. Neratovice. Dostupné z: http://www.lach-ner.com/files/7727-54-0_Peroxodisiran_amonny_v2_CZ.pdf

LAMBERT, Iain B., Timothy M. SINGER, Sherri E. BOUCHER a George R. DOUGLAS, 2005. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2005, vol. 590, 1-3, s. 1-280 [cit. 2014-11-12]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2005.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574205000384>

LANKVELD, D. P. K., H. LOVEREN, K. A. BAKEN a R. J. VANDEBRIEL, 2010. *In Vitro* Testing for Direct Immunotoxicity: State of the Art. [online]. s. 401 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1007/978-1-60761-401-2_26. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-401-2_26

LASKA, Jadwiga a Joanna WIDLARZ, 2005. Spectroscopic and structural characterization of low molecular weight fractions of polyaniline. In: *Polymer* [online]. 2005, vol. 46, issue 5, s. 1485-1495 [cit. 2015-04-13]. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.12.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003238610401242X>

LAST, J. A. et al., 1982. Inhalation toxicology of ammonium persulfate, an oxidant aerosol, in rats. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 1982, roč. 63, č. 2, s. 257 - 263 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0041008x. DOI: 10.1016/0041-008X(82)90047-3.

LEIST, Marcel, Thomas HARTUNG a Pierluigi NICOTERA, 2008. The Dawning of a New Age of Toxicology. In: *ALTEX-ALTERNATIVEN ZU TIEREXPERIMENTEN* [online]. Feb roč. 25, č. 2 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0946-7785. Dostupné z: http://www.altex.ch/resources/Leist_E.pdf

LINHART, Igor, 2012. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 375 s. ISBN 978-807-0808-061.

LITHNER, Delilah, 2011. Environmental and Health Hazards of Chemicals in Plastic Polymers and Products. University of Gothenburg, 39 s. ISBN 978-91-85529-46-9

LIU, Cheng-guo, Hong-feng XIE, Zhi-liu WANG, Hu YANG a Rong-shi CHENG, 2010. Composition determination of binary polymer mixtures by size exclusion chromatography with light scattering detection. In: *Chinese Journal of Polymer Science* [online]. 2010,

vol. 28, issue 3, s. 291-297 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1007/s10118-010-0017-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10118-010-0017-7>

LUSTER, Michael I., Christopher PORTIER, Gayla D. PAIT, Kimber L. WHITE, Chris GENNINGS, Albert E. MUNSON a Gary J. ROSENTHAL, 1991. Risk assessment in immunotoxicity: Sensitivity and predictability of immune tests. In: *Fundamental and applied toxicology* [online]. Jul 1991, vol. 18, s. 200 – 210 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: http://service004.hpc.ncsu.edu/toxicology/websites/courses/TOX705/papers_04/Luster1992IT_A.pdf

MAKENA, Patrudu S. a King-Thom CHUNG, 2007. Evidence that 4-aminobiphenyl, benzidine, and benzidine congeners produce genotoxicity through reactive oxygen species. In: *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2007, vol. 48, issue 5, s. 404 - 413 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1002/em.20288. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.20288>

MARQUARDT, C, C MATUSCHEK, E BÖLKE, PA GERBER, M PEIPER, Jv SEYDLITZ-KURZBACH, BA BUHREN, M VAN GRIENSVEN, W BUDACH, M HASSAN, G KUKOVA, R MOTA, D HÖFER, K ORTH a W FLEISCHMANN, 2010. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). In: *European Journal of Medical Research* [online]. 2010, vol. 15, issue 5, s. 204 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1186/2047-783X-15-5-204. Dostupné z: <http://www.eurjmedres.com/content/15/5/204>

MCGUIGAN, Claire F. a Xing-Fang LI, 2014. Cytotoxicity and genotoxicity of phenazine in two human cell lines. In: *Toxicology in Vitro* [online]. 2014, vol. 28, issue 4, s. 607-615 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233313003317>

MOLECULAR PROBES, 2002. Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-12154). In: *Molecular Probes* [online]. Life technologies corporation. Mar 27, 2002 [cit. 2014-11-11]. Dostupné z: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp13154.pdf>

MORTON, Kenneth C., Ching Y. WANG, Charles D. GARNER, Tomoyuki SHIRAI, B.H. HOOBERMAN a J.E. SINSHEIMER, 1981. Carcinogenicity of benzidine, N,N"-diacetylbenzidine, and N-hydroxy-N, N'-diacetylbenzidine for female CD rats. In: *Carcinogenesis* [online]. 1981, vol. 2, issue 8, s. 747-752 [cit. 2015-03-31].

DOI: 10.1093/carcin/2.8.747. Dostupné z: <http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/2.8.747>

NAIR, R, 1990. Chronic toxicity, oncogenic potential, and reproductive toxicity of p-nitroaniline in rats*1. In: *Fundamental and Applied Toxicology* [online]. 1990, vol. 15, issue 3, s. 607-621 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/0272-0590(90)90045-L. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/027205909090045L>

NAMBIAR, Shruti a John T.W. YEOW, 2011. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. In: *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 26, č. 5, s. 1825-1832 [cit. 2015-02-05]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2010.09.046.

NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME (NICNAS), 2001. Ammonium, potassium and sodium persulfate. Sydney: NICNAS, Jun 2001, 103 s. ISBN 06-427-0985-8.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1978. Bioassay of hydrazobenzene for possible carcinogenicity [online]. In: *National Cancer Institute carcinogenesis technical report series*. 1978, č. 92. s. 120. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr092.pdf

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1979. Bioassay of azobenzene for possible carcinogenicity [online]. In: *National Cancer Institute carcinogenesis technical report series*. 1979, č. 154. s. 112. [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr154.pdf

NEČAS, Oldřich, 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vydání. Jinočany: H & H, 2000, 554 s. ISBN 8086022463.

NELSON, Chad P., Geoffrey W. PATTON, Kirk ARVIDSON, Helen LEE a Michelle L. NOMURA, T., 1997. Practical development of genetically engineered animals as human disease models. In: *Laboratory animal science* [online]. roč. 47, č. 2 [cit. 2014-11-12].

OHARA, Osamu, 2009. From transcriptome analysis to immunogenomics: Current status and future direction. In: *FEBS Letters* [online]. 2009, vol. 583, issue 11, s. 1662-1667 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.04.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579309003007>

PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ, 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. In: *Chemické listy* [online]. 2004, roč. 98 [cit. 2014-09-11]. ISSN 1213-7103.

PAYERNE, R., P. RANNOU, D. DJURADO, F. GENOUD a J.P. TRAVERS, 2005. New insight on local electronic transport properties of poly(aniline): A comparative study of oligo(aniline) model compound and polymer using spin dynamics techniques. In: *Synthetic Metals* [online]. 2005, vol. 152, 1-3, s. 193-196 [cit. 2014-04-14]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.290. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037967790500250X>

PENG, Wei, Fei DING, Yu-Kui PENG, Yu-Ting JIANG a Li ZHANG, 2013. Binding Patterns and Structure–Affinity Relationships of Food Azo Dyes with Lysozyme: A Multi-technique Approach. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013-12-18, vol. 61, issue 50, s. 12415-12428 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1021/jf4039327. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf4039327>

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s., 30, 8, 23 s. obr. příl. ISBN 978-802-4734-590.

PETANOVÁ, Jitka, 2007. Vliv prostředí na imunitní systém. In: *Medicína pro praxi* [online]. Jun 2007 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/06/04.pdf>

PETERS, Kirsten, Ronald E. UNGER, Günter KAMP, Joachim RYCHLY a C. James KIRKPATRICK, 2007. *In vitro* methodologies to evaluate biocompatibility: Status quo and perspectives. In: *Toxicology* [online]. 2007, vol. 240, issue 3, s. 136-137 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1016/j.tox.2007.06.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X0700340X>

PFANNENBECKER, U., S. BESSOU-TOUYA, C. FALLER, J. HARBELL, T. JACOB, H. RAABE, M. TAILHARDAT, N. ALÉPÉE, A. DE SMEDT, B. DE WEVER, P. JONES, Y. KALUZHNY, B. LE VARLET, P. MCNAMEE, M. MARREC-FAIRLEY a F. VAN GOETHEM, 2013. Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted human tissue test method for the prediction of eye irritation. In: *Toxicology in Vitro* [online]. 2013, vol. 27, issue 2, s. 619-626 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.11.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233312003165>

PROKEŠ, Jan, Jaroslav STEJSKAL a Mária OMASTOVÁ, 2001. Polyanilin a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů. In: *Chemické listy* [online]. Jan 24, 2001, roč. 95, č. 8 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z:

<http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>

QI, Hongxu, Meiyong LIU, Liangxin XU, Lin FENG, Lei TAO, Yan JI, Xiaoyong ZHANG a Yen WEI, 2013. Biocompatibility evaluation of aniline oligomers with different end-functional groups. In: *Toxicology Research* [online]. 2013, vol. 2, issue 6, s. 427 [cit. 2015-04-13]. DOI: 10.1039/c3tx50060h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tx50060h>

RAO, K. V., J. H. RUST, N. MIHAILOVICH a Jerry M. RICE, 1971. Subacute toxicity of benzidine in the young adult mice. Abstr. *Subject Strain Bibliography 1971*. Paper 2227. [cit. 2015-02-07].

RAUNIO, Hannu, 2011. In Silico Toxicology – Non-Testing Methods. In: *Frontiers in Pharmacology* [online]. vol. 2 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.3389/fphar.2011.00033. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fphar.2011.00033/full>

ROBERTS, Ruth A., Robert A. SMITH, Stephen SAFE, Csaba SZABO, Ronald B. TJALKENS a Fredika M. ROBERTSON, 2010. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. In: *Toxicology* [online]. vol. 276, issue 2, s. 85-94 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1016/j.tox.2010.07.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X1000288X>

ROBINSON, Joshua F., Peter T. THEUNISSEN, Dorien A.M. VAN DARTEL, Jeroen L. PENNING, Elaine M. FAUSTMAN a Aldert H. PIERSMA, 2011. Comparison of MeHg-induced toxicogenomic responses across *in vivo* and *in vitro* models used in developmental toxicology. In: *Reproductive Toxicology* [online]. vol. 32, issue 2, s. 180-188 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.05.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623811001602>

SCIENTIFIC COMMITTEE ON TOXICITY, ECOTOXICITY AND THE ENVIRONMENT (CSTEE), 2003. Opinion on the results of the Risk Assessment of : Aniline, human health part. Apr 2003 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sct/documents/out183_en.pdf

SEKIHASHI, Kaoru, Ayumu YAMAMOTO, Yukie MATSUMURA, Shunji UENO, Mie WATANABE-AKANUMA, Fekadu KASSIE, Siegfried KNASMÜLLER, Shuji TSUDA a Yu F SASAKI, 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2002, vol. 517, 1-2, s. 53-75 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/S1383-5718(02)00034-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571802000347>

SHEN, Hongyan, Jixi GAO a Jinsheng WANG, 2012. Assessment of toxicity of two nitroaromatic compounds in the freshwater fish *Cyprinus carpio*. In: *Frontiers of Environmental Science* [online]. 2012, vol. 6, issue 4, s. 518-523 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1007/s11783-012-0427-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11783-012-0427-6>

SCHWARZOVÁ, Jana, Mária BELOVIČOVÁ a Martin WAWRUCH, 2010. Teratogenita liečiv a jej význam pre racionálnu farmakoterapiu. In: *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. roč. 24, č. 3 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1212-7973. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2010/03/09.pdf>

SIES, H. a H. DE GROOT, 1992. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicology Letters* [online]. 64-65, s. 547-551 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1016/0378-4274(92)90230-H. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037842749290230H>

SIGMA-ALDRICH, 2012a. *Bezpečnostní list 3-nitroaniline*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=N9829&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fn9829%3Flang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2012b. *Bezpečnostní list benzidine*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=B3503&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fb3503%3Flang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2012c. *Bezpečnostní list phenazine*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language>

e=cs&productNumber=P13207&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fp13207%3Fflang%3Den

SIGMA-ALDRICH, 2012d. *Bezpečnostní list 1,2-diphenylhydrazine*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=442232-U&brand=SUPELCO&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsupelco%2F442232u%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2013. *Bezpečnostní list 2-nitroaniline*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=N9780&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fn9780%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2014a. *Bezpečnostní list ammonium persulfate*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=A3678&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fa3678%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2014b. *Bezpečnostní list 4-nitroaniline*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=185310&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F185310%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2014c. *Bezpečnostní list azobenzene*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=424633&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F424633%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH, 2015. *Bezpečnostní list aniline hydrochloride*. [cit. 2015-03-31]. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Praha. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language>

e=cs&productNumber=133310&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F133310%3Flang%3Den

SIGNORIN, John et al., 2001. 13-week inhalation toxicity study (including 6- and 13-week recovery periods) with ammonium persulphate dust in albino rats. In: *Inhalation Toxicology* [online]. 2001, roč. 13, č. 11, s. 1033-1045 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0895-8378. DOI: 10.1080/089583701753210399.

SLANINOVÁ, Iva et al., 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. In: *Chemické listy* [online]. c. 102, s. 427-433 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf

SMYTH, Henry F. et al., 1969. Range-Finding Toxicity Data: List VII. In: *American Industrial Hygiene Association Journal* [online]. Apr 8, 1969, roč. 30, č. 5, s. 470-476 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0002-8894. DOI: 10.1080/00028896909343157.

SOUSA, M.O., T.L.S. MIRANDA, E.B. COSTA, E.R. BITTAR, M.M. SANTORO a A.F.S. FIGUEIREDO, 2001. Linear competitive inhibition of human tissue kallikrein by 4-aminobenzamidin and benzamidin and linear mixed inhibition by 4-nitroanilin and anilin. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. vol. 34, issue 1, s. 35-44 [cit. 2014-11-13]. DOI: 10.1590/S0100-879X2001000100004. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

STEJSKAL, Jaroslav a R. G. Gilbert, 2002. Polyanilin. Preparation of a conducting polymer. In: *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. 2002, roč. 74, č. 5 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0033-4545.

STEWART, J. D. a H. M. BOLT, 2011. Stem cells in toxicity testing. In: *Archives of Toxicology* [online]. 2011, vol. 85, issue 2, s. 77-78 [cit. 2014-11-11]. DOI: 10.1007/s00204-011-0650-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-011-0650-0>

STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ, 2004. Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. In: *Chemické listy* [online]. 2004, roč. 98 [cit. 2015-03-10]. ISSN 0322-7340.

ŠEDĚNKOVÁ, Ivana, Jaroslav STEJSKAL a Miroslava TRCHOVÁ, 2014. In Situ Infrared Spectroscopy of Oligoanilin Intermediates Created under Alkaline Conditions. In: *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2014-12-12, s. 141212144725004

[cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1021/jp509619t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp509619t>

ŠINKOROVÁ, Zuzana a Lenka ZÁRYBNICKÁ, 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. In: *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2008, roč. 77, č. 3 [cit. 2014-11-11]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL3_2008/0-%8Ainkorov%E1.pdf

ŠULCOVÁ, Alexandra, Leoš LANDA a Jana NOVÁKOVÁ, 2006. VÝZKUM NOVÝCH LÉČIV od zrodu k registraci. Brno: LF MU Brno. 44 s. Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. ISSN 1801-6103. Dostupné z: <http://www.google.cz/url?sa=t&rc=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fportal.med.muni.cz%2Fdownl-ad.php%3Ffid%3D290&ei=o4ljVJGDHdTXave-gAg&usg=AFQjCNHeLW2m1ZkuAbQ6CLKRL5XUh6t39w&sig2=bMYq-iyJbwiAAccl9kc0vg&bvm=bv.79189006,d.d2s>

TAKAHASHI, Yutaka, Mirei KOIKE, Hiroshi HONDA, Yuichi ITO, Hitoshi SAKAGUCHI, Hiroyuki SUZUKI a Naohiro NISHIYAMA, 2008. Development of the short time exposure (STE) test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. In: *Toxicology in Vitro* [online]. vol. 22, issue 3, s. 760-770 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.11.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233307003359>

TALORETE, Terence P. N., Mohamed BOUAZIZ, Sami SAYADI a Hiroko ISODA, 2007. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. In: *Cytotechnology* [online]. 2007-5-1, vol. 52, issue 3, s. 189-198 [cit. 2015-04-20]. DOI: 10.1007/s10616-007-9057-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-007-9057-4>

TICHÝ, Miloň, 2004. *Toxikologie pro chemiky: toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 119 s. ISBN 80-246-0566-X.

TICHÝ, Miloň, Zdeněk ROTH, Karel BLÁHA a P. WORTH, 2005. Alternativní metody testování toxicity chemických látek *in silico*. In: *Chemické listy* [online]. roč. 99, s. 675 - 681 [cit. 2014-11-11]. ISSN 0322-7340.

TINKLER, Jeremy a Sandra C. COSTIGAN, 2007. Toxicity testing and regulations. *Toxicology* [online]. 2007, vol. 240, issue 3, s. 135-136 [cit. 2014-11-11].

DOI: 10.1016/j.tox.2007.06.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X07003393>

TRCHOVÁ, Miroslava, Zuzana MORÁVKOVÁ, Ivana ŠEDĚNKOVÁ a Jaroslav STEJSKAL, 2012. Spectroscopy of thin polyaniline films deposited during chemical oxidation of aniline. In: *Chemical Papers* [online]. 2012, vol. 66, issue 5, s. 415-445 [cit. 2014-11-14]. DOI: 10.2478/s11696-012-0142-6. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11696-012-0142-6>

TRCHOVÁ, Miroslava, Zuzana MORÁVKOVÁ, Jiří DYBAL a Jaroslav STEJSKAL, 2013. Detection of Aniline Oligomers on Polyaniline–Gold Interface using Resonance Raman Scattering. In: *ACS Applied Materials* [online]. vol. 6, issue 2, s. 942-950 [cit. 2014 11-14]. DOI: 10.1021/am404252f. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am404252f>

TRCHOVÁ, Miroslava, Zuzana MORÁVKOVÁ, Michal BLÁHA a Jaroslav STEJSKAL, 2014. Raman spectroscopy of polyaniline and oligoaniline thin films. In: *Electrochimica Acta* [online]. vol. 122, s. 28 - 38 [cit. 2014-11 14]. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.10.133. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468613021038>

ULLERAS, E, D TRZASKA, J ARKUSZ, T RINGERIKE, V ADAMCZEWSKA, MOLSZEWSKI, J WYCZOLKOWSKA, A WALCZAKDRZEWIECKA, K ALNEDAWI a G NILSSON, 2005. Development of the Cell Chip: a new *in vitro* alternative technique for immunotoxicity testing. In: *Toxicology* [online]. 2005-01-15, vol. 206, issue 2, s. 245 - 256 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.tox.2004.08.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X04005256>

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2001. Screening Information Data Set of 2-nitroaniline. Sept 2001, 96 s. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/NITROANILINE.pdf>

VELÍŠEK, Jan, 2002. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.

VINARDELL, M.P. a M. MITJANS, 2008. Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. vol. 97, issue 1, s. 46 - 59 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1002/jps.21088. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.21088>

WALKER, John D., Ingrid GERNER, Etje HULZEBOS a Kerstin SCHLEGEL, 2005. The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool (SICRET). In: *QSAR* [online]. vol. 24, issue 3, s. 378-384 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1002/qsar.200430906. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/qsar.200430906>

WAN, Meixiang, 2008. *Conducting polymers with micro or nanometer structure*. Beijing: Tsinghua University Press, 2008. ISBN 978-354-0693-239.

WELLS, P, Y BHULLER, C CHEN, W JENG, S KASAPINOVIC, J KENNEDY, P KIM, R LAPOSA, G MCCALLUM a C NICOL, 2005. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2005-09-01, vol. 207, issue 2, s. 354-366 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1016/j.taap.2005.01.061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X05003534>

XIANG, Guanghong, Changlun TONG a Haizhuan LIN, 2007. Nitroaniline Isomers Interaction with Bovine Serum Albumin and Toxicological Implications. In: *Journal of Fluorescence* [online]. 2007-8-17, vol. 17, issue 5, s. 512-521 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1007/s10895-007-0203-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-007-0203-3>

YOSHIDA, J, H ONODERA, Y MATSUSHIMA, M SHIBUTAMI, A MAEKAWA, K FURUTA a M TAKAHASHI, 1991. Twenty-eight day repeated dose toxicity test of m-nitroaniline in F344 rats. In: *Eisei Shikenjo Hokoku: Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences* [online]. roč. 1991, č. 109, 72 - 80 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1364408>

YOU, Z., M.D. BREZZELL, S.K. DAS, M.C. ESPADAS-TORRE, B.H. HOOBERMAN a J.E. SINSHEIMER, 1993. Ortho-Substituent effects on the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of benzidine derivatives. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology* [online]. 1993, vol. 319, issue 1, s. 19-30 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1016/0165-1218(93)90027-B. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016512189390027B>

ZHANG, Xiaoyong et al., 2012. Cellular responses of aniline oligomers: a preliminary study. *Toxicology Research* [online]. Aug 2012, roč. 1, č. 3, s. 201- [cit. 2013-05-20]. DOI: 10.1039/C2TX20035J.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AH	Anilin hydrochlorid
APS	Amonium persulfát
AZO	Azobenzen
BENZ	Benzidín
EC	Efektivní koncentrace, při které dochází k reakci určité části jedinců v souboru
ED	Efektivní dávka, která způsobuje reakci u určité části jedinců v souboru
FEN	Fenazin
HB	Hydrazobenzen
IC	Koncentrace, která způsobí pokles viability u určité části jedinců v souboru
LD	Letální dávka, při které zahyne určitá část jedinců v souboru
LOAEL	Nejnižší testovaná dávka s pozorovaným nepříznivým účinkem
MGC	Minimální genotoxická koncentrace látky
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NOAEL	Nejvyšší dávka, při které není pozorovaný nepříznivý účinek
NOEL	Nejvyšší dávka, při které není pozorovaný jakýkoliv účinek
PANI	Polyanilin
„Recovery Time“	Doba zotavení buněk
2-NA	2-nitroanilin
3-NA	3-nitroanilin
4-NA	4-nitroanilin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – hlavní složky posuzování toxicity (Krewski et al., 2009).....	12
Obrázek 2 – 28 testovaných vzorků, jejichž výluhy vykazovaly cytotoxický účinek pro použitý kmen <i>Daphnia magna</i> (Lithner, 2011)	24
Obrázek 3 – oxidace anilin hydrochloridu peroxydisíranem amonným v kyselém prostředí za vzniku polyanilinu	26
Obrázek 4 – strukturní vzorec amonium persulfátu.....	29
Obrázek 5 – strukturní vzorec anilin hydrochloridu.....	31
Obrázek 6 – strukturní vzorec 2-nitroanilinu.....	33
Obrázek 7 – strukturní vzorec 3-nitroanilinu.....	35
Obrázek 8 – strukturní vzorec 4-nitroanilinu.....	36
Obrázek 9 – strukturní vzorec meru polyanilinu	38
Obrázek 10 – strukturní charakterizace anilinových oligomerů testovaných na cytotoxické účinky (Zhang et al., 2012).....	39
Obrázek 11 – strukturní vzorec azobenzenu.....	40
Obrázek 12 – strukturní vzorec benzidinu.....	41
Obrázek 13 – strukturní vzorec fenazinu	43
Obrázek 14 – strukturní vzorec hydrazobenzenu	45
Obrázek 15 – testované látky; zleva 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB, APS, AH.....	49
Obrázek 16 – vzorky testovaných látek (zleva 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ, FEN, HB) se špatnou rozpustností v kultivačním médiu po 24 hodinách homogenizace na laboratorní třepačce (320 ot/min).....	50
Obrázek 17 – rozpuštěný BENZ, FEN, HB, AZO, 2-NA, 3-NA a 4-NA v DMSO.....	51
Obrázek 18 – fotografie spektrofotometrického přístroje při měření absorbance reference	56
Obrázek 19 – fotografie zkoušky interakce testovaných látek s MTT; vpravo referenece; AH a APS rozpouštěné v kultivačním médiu; vlevo látky rozpouštěné v DMSO i kultivačním médiu.....	57
Obrázek 20 – fotografie 96 jamkových plátů s buňkami po aplikaci roztoků určených pro analýzu buněčné smrti.....	58
Obrázek 21 – fotografie měření na průtokovém cytometru.....	59
Obrázek 22 – schéma uspořádání hodnocení toxicity testovaných látek.....	60

Obrázek 23 – mikrofotografie buněk pořízené před vyhodnocením testu MTT bez „Recovery Time“	70
Obrázek 24 – mikrofotografie buněk před vyhodnocením testu MTT s „Recovery Time“	80

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - koncentrace rozpouštědla u jednotlivých roztoků testovaných látek	52
Tabulka 2 - cytotoxicita roztoků DMSO v kultivačním médiu	54
Tabulka 3 - cytotoxicita roztoků DMSO v kultivačním médiu u buněk s „Recovery Time“	54
Tabulka 4 - naměřené absorbance roztoků testovaných látek v přítomnosti MTT	58
Tabulka 5 - cytotoxicita roztoků APS v kultivačním médiu	62
Tabulka 6 - cytotoxicita roztoků AH v kultivačním médiu	62
Tabulka 7 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v DMSO s kultivačním médiem	64
Tabulka 8 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v čistém kultivačním médiu	67
Tabulka 9 - cytotoxicita roztoků APS v médiu u buněk s „Recovery Time“	72
Tabulka 10 - cytotoxicita roztoků AH v médiu u buněk s „Recovery Time“	72
Tabulka 11 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v DMSO s kultivačním médiem u buněk s „Recovery Time“	74
Tabulka 12 - cytotoxicita roztoků 2-NA, 3-NA, 4-NA, AZO, BENZ a FEN v čistém kultivačním médiu u buněk s „Recovery Time“	77
Tabulka 13 - výsledky analýzy buněčné smrti u látek testovaných bez „Recovery Time“	82
Tabulka 14 - výsledky analýzy buněčné smrti u látek testovaných s „Recovery Time“	85