

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra zoologie a rybářství**

**Principy absorpce a místa akumulace Pb v tasemnici
*Hymenolepis diminuta***

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Barbora Horáková

Školitel: Prof. Ing. Ivana Jankovská, Ph.D.

**Konzultant: Prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.,
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**

Praha 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že předloženou disertační práci na téma „Principy absorpce a místa akumulace Pb v tasemnici *Hymenolepis diminuta*“ jsem vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé školitelce Ivaně Jankovské za cenné rady, připomínky a osobní přístup. Velký dík patří konzultantce Jiřině Szákové za její věcné rady z oblasti toxikologie jakéhokoli prvku. Dále pak kolegyni Zuzce Čadkové, která se podílela na všech projektech, kterých jsem byla součástí, a bez jejíž pomoci by tato práce sotva vznikla, protože byla vždy ochotná s čímkoli pomoci a poradit. Dík patří také dalším kolegům, kteří se určitým dílem začlenili do našeho potkaního týmu – Danče Křivské a Hance Patočkové. Dále lidem, kteří mě zasvětili do chodu chemických laboratoří – Janě Najmanové, Janě Tremlové a za poslední dva roky Lukášovi Prausovi za to, že si na mě v harmonogramu laboratoře vždy udělal čas. Dík patří samozřejmě celé naší katedře za skvělou pracovní atmosféru. Zde musím vyzdvihnout vedoucí naší katedry, Ivu Langrovou za to, že mi vždy vyšla vstříc a celkově za její přístup. Z kolegů musím jmenovitě poděkovat Verče Svobodové a Tomášovi Husákovi za to, že nikdy neváhali a několikrát (občas pod nátlakem) mi svou pomocí vytrhli trn z paty. Zvláštní poděkování patří celé mé rodině, v čele s rodiči za nekonečnou podporu. Samozřejmě nesmím opomenout mé přátele, zvláště ty, kteří byli ochotni se do pomoci a podpory zapojit nejen pasivně, ale i aktivně.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Olovo	2
2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti olova	2
2.1.2. Zdroje kontaminace a expozice	3
2.1.3. Olovo v půdě a v rostlinách	5
2.1.4. Rostlinné hyperakumulátory	6
2.2. Toxikologie olova.....	7
2.2.1. Absorpce a distribuce olova.....	8
2.2.2. Ukládání olova	9
2.2.3. Exkrece olova.....	10
2.2.4. Monitoring hladiny olova v populaci.....	10
2.2.5. Účinky olova na nervový systém	12
2.2.6. Účinky olova na ledvinový systém	13
2.2.7. Účinky olova na kardiovaskulární systém	14
2.2.8. Další účinky olova	14
2.2.9. Projevy otravy olovem.....	15
2.2.10. Diagnostika.....	16
2.2.11. Terapie otravy olovem	17
2.3. Akumulace olova u zvířat.....	19
2.4. Akumulace olova v laboratorních podmínkách.....	22
2.5. Akumulace rizikových prvků v endoparazitech	24
2.6. Tasemnice krysí (<i>Hymenolepis diminuta</i>)	25
2.6.1. Morfologie tasemnice krysí	25
2.6.2. Fyziologie tasemnice krysí	26
2.6.3. Vývojový cyklus tasemnice krysí	27
2.6.4. Tasemnice krysí u lidí	30
2.6.5. In vitro kultivace tasemnice krysí	30
2.6.6. Akumulace olova u tasemnice krysí	33
2.6.7. Lokalizace rizikových prvků ve tkáni tasemnice krysí.....	34
3. Cíle práce.....	35
4. Hypotézy.....	35
5. Materiál a metody.....	36
5.1. Chov a infekce mezipřehoditelů	36

5.2.	Chov a infekce potkanů	37
5.3.	Stanovení akumulačního potenciálu pro jednotlivé formy olova	38
5.3.1.	Příprava jednotlivých forem olova	38
5.3.2.	Expozice jednotlivým formám olova	38
5.3.3.	Laboratorní analýzy	40
5.4.	Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro	41
5.4.1.	Získání tasemnic	41
5.4.2.	Příprava kultivačního média	42
5.4.3.	Kultivace	43
5.4.4.	Laboratorní analýzy	44
5.5.	Mapování olova ve tkáních tasemnice krysí	45
5.5.1.	Příprava histologických řezů tkání tasemnic	45
5.5.2.	Analýza histologických řezů tkání tasemnic	45
5.6.	Vyhodnocení získaných dat	46
6.	Výsledky	48
6.1.	Akumulační potenciál tasemnice krysí pro jednotlivé formy olova	48
6.2.	Toxokinetika odlišných forem olova v systému potkan/tasemnice krysí	50
6.2.1.	Koncentrace olova ve tkáních potkanů	50
6.2.2.	Koncentrace olova v krvi potkanů	53
6.2.3.	Koncentrace olova v moči a výkalech potkanů	53
6.3.	Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro	55
6.4.	Lokalizace olova ve tkáních tasemnice krysí	58
6.4.1.	Lokalizace pomocí laserové ablace	59
7.	Diskuze	62
7.1.	Akumulační potenciál tasemnice krysí pro jednotlivé formy olova	62
7.2.	Toxokinetika odlišných forem olova v systému potkan/tasemnice krysí	63
7.2.1.	Koncentrace olova ve tkáních potkanů	63
7.2.2.	Koncentrace olova v krvi potkanů	66
7.2.3.	Koncentrace olova v moči a výkalech potkanů	66
7.3.	Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro	68
7.4.	Lokalizace olova ve tkáních tasemnice krysí	70
7.4.1.	Lokalizace olova pomocí laserové ablace	71
8.	Závěr	74
9.	Seznam použitých zkratk	76
10.	Seznam literatury	77

1. Úvod

V uplynulých letech se mnohonásobně zvýšila koncentrace těžkých kovů v životním prostředí. Jejich negativní působení na živé organismy je známo již od starověku. V posledních dekádách se těmito vlivy zabývají vědci po celém světě, díky čemuž se poznatky o nich neustále rozšiřují. Olovo (Pb) je všudypřítomný kov, který byl lidmi objeven jako jeden z prvních. Jeho jedinečné vlastnosti z něj udělaly jeden z nejhodněji využívaných kovů. Přes jeho toxické účinky bylo ještě v první polovině 20. století hojně využíváno v nejrůznějších odvětvích průmyslu. Dnes patří mezi celosvětově nejrozšířenější polutanty. Díky poznatkům v toxikologii tohoto prvku docházelo a dochází k omezování jeho spotřeby a k nahrazování vhodnými a bezpečnějšími alternativami.

Schopnost živých organismů akumulovat do svého těla polutanty byla objevena již na počátku 20. století. Protože gastrointestinální parazité často akumulují vyšší koncentrace polutantů než jejich hostitelé, je kladen důraz na jejich význam jako ideálních bioindikátorů pro monitorování antropogenního znečištění životního prostředí.

Pro získání relevantních výsledků k využití parazitů jako bioindikátoru Pb je nutné, aby byli paraziti schopni akumulovat široké spektrum sloučenin. Tyto výsledky je možné získat pouze laboratorním experimentem, na který se zaměřuje předložená práce. Tasemnice krysí, *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi 1819) zde byla vystavována jednotlivým, jasně definovaným formám olova v předem daných koncentracích. Pro objasnění příjmu a ukládání olova touto tasemnicí byl realizován in vitro experiment.

2. Literární přehled

2.1. Olovo

Olovo je jedním z prvních kovů používaných lidmi. S přibývajícím využitím tohoto prvku a jeho sloučenin v různých oblastech života vzrostl zájem o objasnění jeho toxických účinků. První zmínky o otravách olovem se datují až do doby 3500 let před Kristem. Vyskytovaly se ve starověkém Řecku i Římě (Gilfillan, 1965). Pb patří mezi nejrozšířenější těžké kovy a za normálních podmínek není v přírodě rozložitelné. Je tedy tzv. perzistentní a jen velice těžko se odbourává (Patrick, 2006). Průměrný obsah olova v zemské kůře je 13 mg/kg (Cibulka et al., 1991; Bencko et al., 1995).

Přes přísnou regulaci dříve vyráběných olověných produktů zůstává stále Pb v životním prostředí. Jeho distribuce je důsledkem dlouhotrvající a rostoucí kumulace tohoto prvku. K nejvyššímu nárůstu množství olova v životním prostředí došlo během průmyslové revoluce (Skerfving et Bergdahl, 2007).

V přírodě se vyskytuje v půdě, vodách i v atmosférických komponentách biosféry. Předpokládá se, že v oblastech dosud nekontaminovaných lidskou činností by neměla koncentrace olova v ovzduší přesahovat 1 ng/m³. Některá měření provedená v Grónsku a na Nové Zemi tento předpoklad potvrdila (Bencko et al., 1995).

2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti olova

Olovo je nízkotavitelný, měkký, velmi těžký, dobře kujný kov, patřící do skupiny IV. A. Jeho atomové číslo je 82, relativní atomová hmotnost 207,2, hustota 11,34 g/cm³, bod tání 327,46 °C a bod varu 1749 °C (Maršálek, 2014).

Je modrobílé (modrošedé) barvy, na čerstvém řezu lesklé. Vyskytuje se ve třech oxidačních stavech – Pb⁰, Pb²⁺ a Pb⁴⁺. Za normálních podmínek je odolné a neomezeně stálé vůči atmosférickým vlivům. Elementární olovo se v přírodě vyskytuje jen vzácně, spíše se vyskytuje ve dvojmocné formě v anorganických sloučeninách s doprovodnými prvky (Maršálek, 2014).

Nejběžněji se s ním setkáme v olověné rudě galenit (sulfid, PbS), anglesit (síran, PbSO₄) a cerusit (uhličitan, PbCO₃). Nachází se ale také v řadě dalších minerálů – jamesoit (Pb₅FeSb₆S₁₄), boulangerit (Pb₅Sb₄S₁₁), mimetesis (mimetit, Pb₅(AsO₄)₃Cl), pyromorfit (Pb₅(PO₄)₃Cl), heyrovskýit (Pb₆Bi₂S₉), alkesit (PbBi₂Te₂S₂), altait (PbTe), kolarit (PbTeCl₂) nebo buronit (CuPbSbS₃). Nejvyšší obsah olova (92,83 %) je v nerostu jménem massicot (PbO). Celkem bylo popsáno přes 500 nerostů s obsahem olova (Maršálek, 2014). Olovnaté rudy jsou široce rozšířené a jejich komerční ložiska se nacházejí ve více než padesáti zemích (Greenwood et Earnshaw, 1993). U organokovových sloučenin převažuje forma čtyřmocná (Maršálek, 2014). Nejrozšířenější

organosloučeninou je tetraethylolovo (Skerfving et Bergdahl, 2007). Soli olova a sulfidy jsou těžce rozpustné ve vodě, výjimkou je octan olovnatý, dusičnan olovnatý a chlorečnan olovnatý (Maršálek, 2014).

Olovo je nejrozšířenějším těžkým prvkem. Přírodní olovo je směsí čtyř stabilních izotopů. Tři z nich (^{206}Pb , ^{207}Pb a ^{208}Pb) vznikají jako konečné produkty přirozených radioaktivních rozpadových řad uranu a thoria. Pouze izotop ^{204}Pb nevzniká radioaktivním rozpadem. Umělých izotopů olova byla připravena celá řada, s nukleovými čísly 181 – 215. Změny izotopického složení Pb podle jeho původu také vysvětlují proměnlivost jeho atomové hmotnosti a omezenou přesnost, se kterou může být stanovena (Greenwood et Earnshaw, 1993).

2.1.2. Zdroje kontaminace a expozice

V dnešních dnech se vytěží kolem 3 milionů tun olova ročně. Hlavními producenty jsou Čína, Austrálie, USA a Peru. Světová spotřeba je ale vyšší, protože zahrnuje i recyklované olovo. Pb se využívá převážně k výrobě baterií (71 %), barviv (12 %), broků (6 %), kabelů a obalů (3 %). Další využití zahrnuje výrobu slitin, pájek a použití jako stabilizátor v polyvinylchloridech (PVC) (Patrick, 2006).

Ke kontaminaci olovem dochází také emisemi z hutí zpracovávajících olověnou rudu (Kafka et Punčochářová, 2002). Jedny z nejvyšších koncentrací Pb v půdě byly nalezeny právě v půdách kontaminovaných odpadem z kovohutí. Tyto koncentrace dosahovaly až 9000 mg/kg (Cibulka et al., 1991). Dalšími důležitými zdroji jsou energetika, úpravny rud, rafinerie nebo chemický průmysl. Dále pak olovnaté sklo, hnojiva, insekticidy, spalování fosilních paliv nebo aplikace čistírenských kalů do půdy (Kafka et Punčochářová, 2002).

Důležitým mechanismem pro obohacení ekosystému olovem je gravitační depozice, která zahrnuje depozici deštěm, sněhem, kroupy, sedimentujícím prachem apod. (Cibulka et al., 1991). Dalším možným zdrojem expozice jsou olověné glazury na keramice. Skladování potravin v takto glazurovaných nádobách může způsobit jejich kontaminaci (Rojas-Lopez et al., 1994). Jako zdroj kontaminace byl také označen cigaretový kouř, okenní rolety, dětské hračky, sladkosti dovážené z rozvojových zemí nebo některé druhy kosmetiky (Norman et al., 1997; Patrick, 2006).

Zvýšené koncentrace olova je možné naměřit v blízkosti střelnic, kde jako zdroje kontaminace slouží náboje do zbraní (Mariussen et al., 2017). Bezolovnaté náboje přitom byly vyhodnoceny pro lov divokých zvířat stejně efektivní jako klasické náboje obsahující olovo (Trinogga et al., 2013). Olovo z munice se při kontaktu s kyselými trávícími tekutinami stává dobře biodostupné. Může totiž v tom případě být rozpuštěno na olovnaté soli a poté systematicky absorbováno (Hoffman et al., 1981). Pokud se munice nedostane do kontaktu s tekutinami trávícího

traktu, biodostupnost olova z ní je výrazně nižší a nedojde k akutní otravě. Tento případ může nastat v případě, že se vystřelená munice nachází ve tkáni živého zvířete (Guillemain et al., 2007). Z nábojů se tedy olovo do těla živých organismů může dostat dvojím způsobem. Jednak přímou konzumací, která je častá například u vodního ptactva (Mateo et al., 1998), nebo sekundárně, ingescí postřelených zvířat (Pain et Amiard-Triquet, 1993).

Dříve se olovo používalo jako přísada do barev, které sloužily jako ochrana proti korozi kovových konstrukcí (mostů, lodí, lokomotiv), ale také jako nátěry exteriérů i interiérů domů, dokonce jako nátěry nábytku. Podle Patricka (2006) je v USA odhad domácností, ve kterých se nacházejí olovené barvy, 38 milionů. Před padesátými lety 20. století obsahovaly bílé nátěry domů v USA až 50 % olova (Laraque et Trasande, 2005).

V Evropě bylo olovo používáno ve vodovodních rozvodech pitné vody. Pokud je protékající voda měkká nebo lehce kyselá, olovo se pomalu rozpouští a tato voda poté může obsahovat vysoké množství tohoto kovu (Skerfvig et Bergdahl, 2007). Také zvýšený obsah chloru ve vodě může způsobit zvýšenou korozi potrubí a tedy i uvolnění Pb do pitné vody (Stets et al., 2018). Dodnes nebyly stará olovená potrubí ani olovené nátěry zcela odstraněny (Skerfvig et Bergdahl, 2007).

Další rozsáhlé použití tohoto prvku bylo ve formě organosloučenin, jako je například tetraethylplumban, které sloužily jako antidetonační aditiva do benzínu. Do 70. let 20. století byl přídavek olova až 1 g/l benzínu. Během posledních let bylo používání olovnatého benzínu v řadě zemí zakázáno (v ČR v roce 2001) a tyto složky jsou nahrazovány (Ďurža et Khun, 2002). I dnes ale existují země, kde jeho používání stále přetrvává (Skerfvig et Bergdahl, 2007). Okolo dálnic byly nejvyšší koncentrace olova nalezeny do vzdálenosti 30 m, ve vzdálenosti 100 m a více obvykle již nebylo možno kontaminaci prokázat (Cibulka et al., 1991). Gilbert et Weiss (2006) označují přidání olova do benzínu za jednu z největších katastrof ohrožujících veřejné zdraví.

Hlavním zdrojem expozice olova je pitná voda (Patrick, 2006). Může dosahovat hodnot okolo 20 % denně přijatého olova (Russel, 1989). Bylo pozorováno, že koncentrace Pb v pitné vodě se mění v průběhu roku a v zimě je nižší než v létě (Ngueta et al., 2014). Olovo je také přítomno v mnoha potravinách. Hlavně jako důsledek depozice ze vzduchu. Dostává se do potravin při jejich produkci (při pěstování, z půdy), při manipulaci, balení, přípravě nebo uskladnění. Ke kontaminaci může dojít v případě konzervace pomocí olovených pájek (Dapul et Laraque, 2014). Nejčastějšími zdroji z potravy je ovoce, zelenina a cereálie (Skerfvig et Bergdahl, 2007). Ve studii, kterou prováděli Tirima et al. (2018) v Nigérii byla nejvyšší koncentrace Pb v kukuřici, dále pak v rýži, chlebu a zelenině.

Potenciálním zdrojem expozice mohou být také bylinné léčivé přípravky, používané v alternativní medicíně. Například tradiční medicína z Indie, Číny a dalších částí Asie. Konkrétním

příkladem je druh ajurvédské medicíny "Rasa Shastra", při které se používají kovy, nerosty nebo drahé kameny. Tyto součásti jsou přimíchány k bylinkám. Mimo esenciálních prvků jsou takto často využívány také toxické prvky, jako například rtuť, arsen nebo právě olovo (Koch et al., 2011). Tyto druhy medicíny se používají po celém světě. Kromě oblastí, kde se používají tradičně, byly zaznamenány i akutní otravy v západních zemích, například v USA (Aslam et al., 1979).

Vysoké riziko otravy olovem samozřejmě přetrvává u pracovní expozice. Sem spadají pracovníci průmyslu, zpracovávajícího kovy, ve výrobě baterií, střeliva, pájek, a mnoha dalších (Levin et Goldberg, 2000). Ohrožení nejsou jen samotní pracovníci, ale také lidé žijící s nimi, protože olověný prach se může usazovat na kůži, vlasech nebo oblečení a takto může být olovo přineseno domů, kde jsou mu vystaveni i rodinní příslušníci (Dapul et Laraque, 2014).

2.1.3. Olovo v půdě a v rostlinách

Olovo nacházející se v půdách nepředstavuje přímé ohrožení pro lidské zdraví. Přesto se může dostat do těl organismů požitím prachu, dermálním kontaktem nebo vdechnutím (Galušková et al., 2014). Skoro všechny formy olova uvolněné do půdy z antropogenních zdrojů jsou transformovány biotickými a chemickými procesy za vzniku adsorbované formy olova. Tyto procesy zahrnují vznik komplexů olova s vazebnými místy jílových minerálů, huminových kyselin a hydratovaných oxidů železa. Transformační procesy jsou závislé na půdním typu, pH půdy, obsahu organické hmoty, velikosti částic, obsahu anorganických koloidů a oxidů železa, a obsahu olova v půdě. Při neutrální hodnotě pH půdy převládají organokovové komplexy, při nižším pH půdy dominuje olovo v iontové formě a jako dvojvalné (Beneš, 1994).

Vysoce kontaminované půdy v ČR, jako například okolí Kovohutí města Příbram, obsahují až 35 300 mg/kg olova (Ettler et al., 2005). V půdách odebíraných v pražských parcích bylo naměřeno v průměru 74 mg/kg, v ostravských 62 mg/kg olova (Galušková et al., 2014).

Olovo v půdách je velmi málo mobilní, protože jeho soli jsou z většiny málo rozpustné a dobře se sorbují na půdní hmotu. Za průměrný obsah olova v půdách je považováno 5 – 50 mg Pb/kg a za přirozený obsah 2 – 300 mg/kg. Běžně se vyskytuje v rozmezí 10 – 20 mg/kg (Cibulka et al., 1991). Na sloučeniny olova je nejbohatší vrchní pěticentimetrová vrstva půdy a s přibývajícím hloubkou obsah Pb klesá. Rozpustnost olova v půdě roste s klesající hodnotou pH půdy. Na půdní humus je olovo vázáno pevněji než na jílovité minerály. Fulvokyseliny půdního humusu mohou naopak olovo chelatizovat a tím zvyšovat jeho mobilitu v půdě a dostupnost pro rostliny (Beneš, 1994).

Z půdy jsou všechny rizikové prvky, tedy i olovo, vstřebatelné rostlinami (Lindén et al., 2003), ve kterých se mohou akumulovat (Hall, 2002). Takto se snadno dostanou

do potravního řetězce a v případě, že nejsou z těla vyloučeny, akumulují i ve tkáních živočichů, což způsobuje řadu zdravotních komplikací již při nízkých koncentracích (Wilkinson et al., 2003, Sinicropi et al., 2010).

Olovo je v laboratorních podmínkách přijímáno ze živných roztoků kořeny v lineární závislosti na jeho koncentraci. Ve venkovních podmínkách se na celkovém obsahu olova v rostlinách značně podílí mimokořenový (foliární) příjem. Uvádí se, že 40 – 80 % olova obsaženého v rostlině je přijímáno foliárně. Sloučeniny olova působí na vegetaci ve formě aerosolu, který se zachytává na povrchu rostlin. Pouze 10 – 20 % olova z jeho obsahu v půdě je přijímáno kořeny rostlin a obvykle 90 % z tohoto olova zůstává v podzemních částech rostlin (Cibulka et al., 1991).

Příjem olova rostlinami je menší v zásaditých půdách než v kyselých. Rovněž lze snížit přístupnost olova pro rostliny využitím sorpce olova huminovými kyselinami. V rostlinách se olovo zpravidla nejvíce ukládá v kořenech (Beneš, 1994). Ukládání olova se může lišit u dalších jednotlivých orgánů (Akinci et al., 2010). V nadzemních částech rostlin jsou koncentrace olova i u velmi silně znečištěných půd celkem nízké. Normální obsahy Pb v rostlinách jsou v rozmezí 0,2 – 5,0 mg Pb/kg sušiny (Beneš, 1994).

Bylo zjištěno, že listy rostlin kumulují více olova než stonky a že rostliny s listy hladkými a tuhými kumulují méně olova než ty s měkkými a ochlupenými listy. Obsah olova v listech rostlin velmi dobře koreluje s koncentracemi atmosférického olova a je zpravidla nepřímo úměrný vzdálenosti od zdroje znečištění (Bencko et al., 1995).

2.1.4. Rostlinné hyperakumulátory

Přirozená citlivost nebo tolerance rostlin k akumulaci kovů je ovlivňována druhem rostliny a jejím genotypem. Rostliny se podle schopnosti akumulace dělí do tří skupin:

- 1) rostliny, které kovy vylučují
- 2) indikátory, u kterých je obsah kovů v jejich tkáních závislý na obsahu kovů v půdě
- 3) akumulátory, které ve tkáních akumulují vysoký počet kovů (Baker, 1987).

Zvláštní skupina akumulátorů jsou hyperakumulátory, které akumulují extrémně vysoký počet kovů (Baker et Brooks, 1989). Uvádí se, že mohou akumulovat koncentrace o 1 – 3 řády vyšší než rostliny, které nemají akumulární potenciál. Tyto rostliny mohou být dobře využitelné k fytoremediaci půd i vody od těžkých kovů (Ashraf et al., 2011). Pro olovo byl práh hyperakumulace stanoven na 1 mg/kg sušiny (Baker et Brooks, 1989).

Absorbce, distribuce a detoxifikace Pb v hyperakumulátorech probíhá jinak než v ostatních rostlinách. V těch probíhá detoxifikace přijatého olova jeho navázáním do ligandů

s vysokou molekulovou hmotností (např. fytochelatiny). Následně může být zabudováno do buněčných struktur. Hyperakumulátory disponují ve svých pletivech velkým množstvím malých organických molekul, kde se kationty Pb^{2+} mohou navázat na volné aminokyseliny (Callahan et al., 2006). V hyperakumulátorech tak zůstává absorbované Pb mobilní a může být transportováno z kořenů i do nadzemních částí rostlin (Visioli et Marmiroli 2013).

Babelka řezanovitá (*Pistia stratiotes*)

Mezi hyperakumulátory olova patří mimo jiné babelka řezanovitá (*Pistia stratiotes*), což je jednoděložní rostlina z čeledi aronovité (BioLib, 2017). Tato světle zelená rostlina volně pluje na vodní hladině pomalu tekoucích vodních toků a jezer. Při nízkém stavu vody může kořenit v mělčinách (Sainty et Jacobs, 1981). Původní výskyt byl v Jižní a Střední Americe a JV Asii, odkud se rozšířila celosvětově do tropických a subtropických oblastí.

Na mnoha místech se díky schopnosti rychlého množení a vysoké přizpůsobivosti k prostředí stala plevelem (Holm et al., 1977). Tuto rostlinu je možné použít k fytoremediaci vody od rizikových prvků, protože akumuluje řadu z nich (Fe, Zn, Cu, Cr, Cd, Hg a Pb) (Odjegba et Fasidi, 2004; Mishra et Tripathi, 2008). Obsah olova v *P. stratiotes* obvykle nebývá moc vysoký, ale u rostlin rostoucích na znečištěných místech může vzrůst až na 1,48 mg/kg (Yasar et al., 2013), uvádí se dokonce koncentrace 15,76 mg/kg (Sridhar, 1986). V umělých podmínkách bylo dosaženo koncentrace Pb 203 g/kg (Veselý et al., 2012).

2.2. Toxikologie olova

Průměrný obyvatel České republiky přijme denně 0,455 mg olova, přičemž 0,29 mg je přijato potravou, 0,075 mg vodou a 0,09 z ovzduší. U silných kuřáků je denní příjem ještě o 0,001–0,005 mg vyšší (Trebichavský et al., 1998).

Účinek olova na organismus nelze vyjádřit jednotně a jednoduše. Olovo je bivalentní kation, který se váže na sulfhydrylové skupiny na proteinech. Má k nim silnou afinitu a vede ke strukturální deformaci některých životně důležitých enzymů (Hermes-Lima et al., 1991). Inhibuje vazebná místa těchto enzymů, čímž ovlivňuje jejich působení a narušuje tím základní biochemické procesy v těle (Sinicropi et al., 2010). Dále je toxicita olova způsobena jeho vlivem na buněčné membrány (Lawton et Donaldson, 1991), interakcemi s hemoglobinem (Carrell et al., 1975), interakcemi s ALAD (enzym dehydrogenáza kyseliny δ -aminolevulinové) (Monteiro et al., 1991) a jeho vlivem na antioxidační obranný systém buněk (Christie et Costa, 1984).

Olovo zasahuje do metabolismu krevních bílkovin, do systému kyseliny nikotinové, do imunobiologických procesů, do tvorby hemoglobinu nebo do minerálního metabolismu. Jeho

biochemický účinek je tedy mnohostranný. Zjednodušeně lze jako hlavní vytknout účinek Pb na krevní barvivo a červené krvinky, na nervový systém, na svalstvo a na cévy. Olovo účinkuje i na zaživací systém, na ledviny a žlázy s vnitřní sekrecí. Jednotlivé účinky olova jsou popsány v následujících kapitolách.

2.2.1. Absorpce a distribuce olova

Olovo vstupuje do živočišného organismu inhalací, ingescí a skrz kůži (Sinicropi et al., 2010). Převažuje absorpce gastrointestinálním a respiračním systémem (Patrick, 2006). Před rokem 1970 bylo hlavní složkou inhalovaného olova olovo přidávané do benzínu. Po zákazu přidávání olova do benzínu množství inhalovaného olova kleslo (Dapul et Laraque, 2014). V oblastech s nízkými koncentracemi Pb ve vzduchu je hlavní cestou vstupu gastrointestinální trakt (GIT). V místech, kde jsou vysoké koncentrace Pb ve vzduchu může být inhalace dominantní cestou vstupu. Přibližně 50 % inhalovaného olova je absorbováno do krve (Ikeda et al., 2000). Množství vdechovaného olova závisí na velikosti vdechovaných částic (Papanikolaou et al., 2005). Gastrointestinální (GI) absorpce anorganického olova probíhá především v tenkém střevě (Mushak, 1991), konkrétně v duodenu za přítomnosti žluči. Poměrně snadno je olovo adsorbováno také v jejunu a v ileu (Conrad et Barton, 1978). U dětí je z GI adsorpce přijato 30 – 50 %, u dospělých jen 5 – 10 % přijímaného olova (Papanikolaou et al., 2005). Markowitz uvádí, že dospělí mohou absorbovat až 15 % přijímaného olova. Nejen věk, ale také nutriční stav jedince může absorpci ovlivnit (Markowitz, 2000).

V případě, že jedinec nepřijímá dostatek železa, dochází ke zvýšení koncentrace Pb v krvi (Ziegler et al., 1978). Zvýšený příjem železa naopak může množství olova v krvi snížit (Schell et al., 2004). Absorpce olova může být snížena zvýšeným příjmem vápníku (Mahaffey et al., 1986). Ke snížení může dojít také při zvýšeném příjmu hořčiku, fosfátu, alkoholu a některých tuků. Naopak ke zvýšení absorpce může dojít při zvýšeném příjmu tuků, sníženém příjmu minerálů nebo při nízkoproteinové i vysokoproteinové dietě (Barltrop et Khoo, 1975). Důkazy na vliv dalších složek potravy, jako například vitamínu C nebo zinku jsou neprůkazné a názory na jejich vliv jsou smíšené (Simon, 1998; Schell et al., 2004; Rosado et al., 2006). Ve studii, kterou prováděli Freeman et al. (1997) bylo u dětí ve věku 13 – 24 měsíců naměřeno po podávání hamburgerů, donutů a burákového másla více olova v krvi než u stejně starých dětí, které konzumovaly jogurt.

Po absorbování je 98 – 99 % přijatého olova vázáno do stěn erytrocytů po dobu 30 – 35 dní u mužů, 40 a více dní u dětí a těhotných žen. Zbylé 1 – 2 % se nachází v plazmě a krevním séru (Papanikolaou et al., 2005). Při vyšších koncentracích v krvi může frakce olova v plazmě stoupnout. Důvodem vazby na erytrocyty je zřejmě vysoká afinita olova k ALAD (Rabinowitz et al., 1976).

Tento enzym je přítomný ve všech buňkách, včetně erytrocytů. Proces navázání do erytrocytů je velice rychlý, neboť pouhých 5 minut po intravenózním podání Pb detekovali Hunder et al. (2000) v krvi 45 % administrovaného množství.

Pomocí krevního oběhu je následujících 4 – 6 týdnů olovo distribuováno do měkkých tkání. Olovo také překonává hematoencefalickou bariéru a proniká do mozku. Dále se dostává se do jater, ledvin, svaloviny, aorty, srdce, plic, sleziny a také kostí a zubů (Rabinowitz et al., 1976).

2.2.2. Ukládání olova

Absorbované olovo může být ukládáno a akumulováno v nejrůznějších tělních orgánech a může ovlivňovat řadu biologických aktivit na molekulární, buněčné i mezibuněčné úrovni. To může vést k řadě morfologických změn, které v těle zůstanou i po tom, co se sníží hladiny olova (Patrick, 2006). Mladší organismy, včetně dětí, mají sklon k akumulaci vyšších koncentrací olova než starší, protože jejich sliznice jsou více propustné a jejich obranný systém není plně vyvinut (Winiarska-Mieczan et Kwiecien, 2016). Bylo potvrzeno, že gravidní laboratorní myši akumulují výrazně vyšší koncentrace Pb než negravidní (Smith et al., 2012).

U dospělých je největší část (80 – 95 %) celkového Pb ukládáno do kostí. Množství olova v kostech narůstá se vzrůstajícím věkem (Nascimento et al., 2016). Na ukládání do kostí je možné pohlížet jakožto na mechanismus, jak limitovat distribuci tohoto prvku do citlivějších tkání (Gerhardsson et al., 1995). U dětí je tato hodnota jen 70 %, protože je u nich více olova ukládáno do měkkých tkání (Patrick, 2006). Jako hlavní cílové orgány z měkkých tkání jsou uváděny játra a ledviny. Podle Mudipalli (2007) je nejvyšší část Pb ukládána do jater (33 %). Podle Scheuhammera (1987) je nejvíce olova akumulováno do ledvin, až poté následují játra. Koncentrace olova v játrech nebo ledvinách vyšší než 20 µg/g je podle studie na orlech běloocasých již smrtelná. V této studii byla koncentrace olova vyšší v ledvinách u jedinců, v jejichž tkáních se akumulovalo méně než 6 µg Pb/g. Jedinci, v jejichž tkáních bylo více než 20 µg Pb/g, akumulovali více olova v játrech (Helander et al., 2009). Obecně platí, že koncentrace olova v krvi udává představu o tom, jakému množství olova byl organismus exponován v posledních hodinách, maximálně týdnech života, koncentrace v játrech a ledvinách o posledních týdnech nebo měsících života a koncentrace v kostech o dlouhodobé expozici (Binkowski et al., 2013). Tento fakt souvisí s poločasem rozpadu olova. Poločas odbourávání Pb v krvi je 30 – 35 dní, ve měkkých tkáních 40 dní (Papanikolaou et al., 2005) a v kostech tato doba dosahuje 5 – 10 let, maximálně se uvádí až 30 let (Kosnett et al., 1994; Papanikolaou et al., 2005).

Olovo uložené v kostech může přispět ke zvýšení hladiny Pb v krvi, i když už nedochází k další vnější expozici. K tomuto jevu dochází hlavně v momentech, při kterých dochází ke zvýšené

demineralizaci kostí (těhotenství, laktace, postmenopauzální osteoporóza). Tento jev nazýváme endogenní expozice (Patrick, 2006).

Stejně jako v kostech, také v zubech dochází k dlouhodobé akumulaci olova. V zubech jsou nejvyšší koncentrace olova v zubovině (Gulson et Wilson, 1994). U jednotlivých typů zubů nebyl prokázán rozdíl v akumulovaných koncentracích (Bercovitz et Laufer, 1991a). V trvalých zubech stoupá koncentrace olova s postupujícím věkem (Bercovitz et Laufer, 1991b). Koncentrace v zubech je vyšší u mužů než u žen (Al-Qattan et Elfawal, 2010).

2.2.3. Exkrece olova

Dospělý člověk je schopen vyloučit 50-60 % vstřebaného olova za dobu řádově týdnů a z dlouhodobého hlediska může vyloučit až 99 %. U dětí je schopnost vylučování olova výrazně snížena. U dětí do 2 let zůstává v těle přibližně třetina vstřebaného olova (Bencko et al., 1995).

Přijaté olovo je po vstupu do krevního oběhu krví distribuováno v těle. Dostává se i do jater, kde je většina z krve odstraněna a se žlučí vylučována zpět do trávicího traktu. Toto olovo může být zpětně absorbováno nebo vyloučeno z těla. Kromě výkalů se na vylučování olova z těla podílí také moč (Skerfving et Bergdahl, 2007). Podle Papanikolaou et al. (2005) je močí vylučováno především adsorbované olovo a výkaly obsahují převážně neabsorbované olovo. Neadsorbované olovo tvoří hlavní část olova ve výkalech i podle studie, kterou publikovali Gwiazda et al. (2005).

Při perorální expozici odchází společně s výkaly až 90 % a močí až 12 % přijatého olova (Rabinowitz et al., 1976). Podle Kaushal et al. (1996) byla při experimentu na potkanech dávka, která zůstala v těle potkanů, přibližně 15 % z podaného olova. Na vylučování se v jejich experimentu podílela hlavně žluč a moč. Další cesty exkrece olova jsou minoritní. Je to vylučování do slin, potu, vlasů a nehtů. Olovo je také inkorporováno do semene, placenty a mateřského mléka (Skerfving et Bergdahl, 2007).

Bylo pozorováno, že hormon melatonin podávaný potkanům zvyšuje množství vyloučeného olova. Potkanům byly experimentálně podávány různé dávky octanu olovnatého společně s melatoninem. Exponovaní potkani měli nižší koncentrace olova v krvi a vyšší v moči a výkalech v porovnání s těmi, kterým melatonin podáván nebyl (Hernández-Plata et al., 2015).

2.2.4. Monitoring hladiny olova v populaci

Nejpoužívanější biomarker expozice Pb je jeho koncentrace v krvi. V epidemiologických studiích je také často používána hladina olova v kostech. Koncentrace olova v krvi slouží spíše jako indikátor nedávné expozice, zatímco koncentrace v kostech jako indikátor expozice dlouhodobé (Levin et Goldberg, 2000).

Koncentrace Pb v krvi je v současnosti přibližně až o tři řády vyšší než u lidí žijících před průmyslovou érou. V řadě zemí v dnešní době dochází k významnému poklesu tohoto prvku v krvi obyvatel. V rozvojových zemích je ale expozice stále poměrně běžná (Skerfving et Bergdahl, 2007). Fewtrell et al. (2004) ve své studii znázornili průměrné koncentrace Pb v krvi. Odlišili děti a dospělé jedince, žijící ve městských oblastech v jednotlivých částech světa. Jejich výsledky byly založené na do té doby publikovaných studiích. Obecně lze říci, že v západním světě se nevyskytují příliš vysoké koncentrace Pb v krvi lidí. Koncentrace olova v krvi lidí ve vybraných částech světa jsou znázorněny v tabulce číslo 1:

Oblast	Země	Koncentrace Pb v krvi ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	
		Děti	Dospělí
Afrika	Nigérie	11,1	11,6
	Jižní Afrika	9,8	10,4
Amerika	Kanada, USA	2,2	1,7
	Argentina, Brazílie, Chile, Jamajka, Mexiko, Venezuela	7,0	8,5
	Ekvádor, Nikaragua, Peru	9,0	10,8
Východní	Saúdská Arábie	6,8	6,8
Středomoří	Egypt, Maroko, Pákistán	15,4	15,4
Evropa	Dánsko, Francie, Německo, Řecko, Izrael, Švédsko	3,5	3,7
	Polsko, Turecko, Jugoslávie	5,8	9,2
	Maďarsko, Rusko	6,7	6,7
Jihovýchodní	Indonésie, Thajsko	7,4	7,4
Asie	Bangladéš, Indie	7,4	9,8
Západní	Austrálie, Japonsko, Nový Zéland, Singapur	2,7	2,7
Pacifik	Čína, Filipíny, Korejská republika	6,6	3,6

Tabulka 1: Koncentrace olova v krvi u dětí a dospělých v městských oblastech jednotlivých zemí světa. Upraveno podle studie Fewtrell et al. (2004).

Později byla sbírána data hodnot Pb v krvi dětí z různých částí světa v letech 2008 – 2009. Tato data jsou shrnuta v tabulce číslo 2 (Hrubá et al., 2012) a je zde jasně viditelný pokles oproti hodnotám, které publikovali Fewtrell et al. (2004). Nejen v zemích západního světa, ale také v rozvojových dochází ke snižování koncentrace Pb v krvi. AbuShady et al. (2017) naměřili v novější studii koncentrace ve městské oblasti v Egyptě 5,45 $\mu\text{g}/\text{dl}$ a 10,37 $\mu\text{g}/\text{dl}$ v průmyslové oblasti. Obě koncentrace jsou nižší, než uvádí Fewtrell et al. (2004).

Stát	Město	Koncentrace Pb v krvi (µg/dl)
Česká republika	Praha	1,5
Polsko	Wroclaw	1,6
Švédsko	Landskrona	1,4
Ekvádor	Camilo Ponce Enríquez	3,2
Maroko	Fez	7,1

Tabulka 2: Koncentrace olova v krvi u dětí a dospělých v městských oblastech jednotlivých zemí světa. Upraveno dle Hrubá et al. (2012)

2.2.5. Účinky olova na nervový systém

Nervový systém (NS) je hlavním cílovým orgánem pro toxicitu olova a je k ní citlivější než ostatní orgánové soustavy (Cory – Slechta, 1996). Rozložení olova v moku je nerovnoměrné. Nejvyšší koncentrace se nacházejí v hypokampu a amygdale, nižší v prodloužené míše a mozečku, nejnižší v kalózním tělesu a zrakovém nervu (Grandjean, 1978). Způsob procesu absorpce olova do mozku není prozatím zcela popsán. Jeho toxický účinek způsobuje mnoho mechanismů, které jsou závislé na věku, počátku a délce trvání expozice a také na struktuře mozku. Při neurologickém poškození způsobené expozicí Pb může dojít ke změně celkové struktury mozku. Například akutní otrava vysokými dávkami olova vede k otoku mozku, ke stlačení komor, k výhřezům a k poruchám v syntéze kolagenu a cévní propustnosti (Struzynska et al., 1997). Tyto patologické změny na mozku označujeme jako encefalopatie a je to pravděpodobně nejzávažnější neurologické onemocnění. Toto onemocnění, které způsobuje patologické změny v centrální nervové soustavě, se vyskytuje převážně u dětí, ale může se objevit i u dospělých. Projevuje se otupělostí, nervozitou, podrážděností, bolestí hlavy, svalovým třesem, poruchou koordinace pohybů, sníženou pozorností, halucinacemi a ztrátou paměti. Tyto symptomy mohou přejít v koma až smrt (Holtzman et al., 1984). Viditelné klinické příznaky se u dětí projevují při hladině olova v krvi vyšší než 60 g/dl (Needleman, 2004).

Expozice Pb může také měnit projevy genů, takže může dojít k problémům při formování jednotlivých oddílů mozku (Kasten-Jolly et al., 2012). Neurotoxické účinky jsou vyvolány také změnou různých redoxních molekul. Bylo prokázáno, že expozice Pb zvyšuje peroxidaci lipidů a hladiny glutationu a snižuje aktivitu antioxidantních enzymů, jako je např. glutathion peroxidáza. Tyto olovem indukované morfologické a funkční poškození mozku se následně mohou projevit jako změny v chování (Mateo a kol., 2003). Další možný mechanismus neurotoxicity indukované olovem zahrnuje změnu neurochemických cest. Je potvrzeno, že expozice Pb při vývoji vede ke

snížení cholinacetyltransferázy (Bielarczyk et al., 1994). Finkelstein et al. (1998) v jejich studii naznačili, že kognitivní a paměťové disfunkce po expozici Pb mohou být způsobeny denervací cholinergní hipokampální dráhy.

Účinky olova na nervový systém jsou považovány za vůbec nejzávažnější. Bývá totiž často zasažen i v případě velmi nízké koncentrace olova v krvi. Tyto nízké hladiny často způsobují, že se neprojeví žádné klinické symptomy (Rice, 1993; Needleman, 2004). První příznaky účinku otravy olovem na NS zahrnují podrážděnost, bolest hlavy, poruchy pozornosti, paměti a snížení kognitivních schopností (Needleman, 2004). Nejčastěji dokumentovaným symptomem při expozici olova u dospělých je periferní neuropatie s poruchami motoriky zápěstí a chodidel (Needleman, 2004).

Nejzranitelnější jsou vůči neurotoxickým účinkům Pb plody a malé děti, protože vyvíjející se nervový systém může absorbovat více frakcí olova (Ruff et al., 1996; Needleman, 2004). Studie prokázaly, že expozice Pb v raném dětství může být přímo spojená s poruchami při čtení nebo zhoršenými motorickými funkcemi (Canfield et al., 2003). Děti mohou být nepozorné, hyperaktivní a podrážděné již při vystavení nízké hladině expozice. Při vyšší hladině může docházet k opožděnému růstu a snižování inteligence (Cleveland et al., 2008). Byla sledována korelace vyššího množství Pb v krvi s nižší hladinou IQ (Canfield et al., 2003). Děti mohou mít horší krátkodobou paměť nebo přijít o sluch. Vysoké hladiny expozice mohou způsobit nevratné poškození mozku a dokonce i smrt (Cleveland et al., 2008).

2.2.6. Účinky olova na ledvinový systém

K nefropatii (nezánětlivá porucha ledvin) způsobené olovem dochází většinou při chronické expozici nízkým dávkám Pb (Pollock et Ibels, 1988). Toto onemocnění způsobuje poškození proximálních tubulů, glomerulární sklerózu a intersticiální fibrózu. Příznaky zahrnují proteinurii (přítomnost bílkovin v moči), poruchy transportu glukózy a organických aniontů a snížený poměr glomerulární filtrace (Diamond, 2005). Olovo může způsobit nefropatii již při koncentraci 5 µg/dl. Zejména u lidí s vysokým krevním tlakem, cukrovkou nebo s chronickým onemocněním ledvin. Vyšší pravděpodobnost výskytu tohoto onemocnění byla detekována u lidí s horším socioekonomickým stavem. Především v rozvojových zemích, kde roste riziko výskytu chronického onemocnění ledvin rychleji, než klesá koncentrace olova v prostředí (Ekong et al., 2006).

Při akutní otravě olovem může dojít k nedostatečné funkci ledvin. Toto onemocnění bývá doprovázeno bolestivostí abdominální části břicha (ledvinová kolika), kognitivními poruchami, periferní neuropatií, bolestí kloubů a anemií (Marsden, 2003). Při histologickém vyšetření se na tkáních ledvin při akutní intoxikaci olovem často objevují patologické morfologické změny, např.

degenerativní změny na tubulárním epitelu (Mahaffey et al., 1981). Morfologické změny u skupiny exponované olovu pozorovali ve své studii také Binkowski et al., (2013). Zde byly popsány nejen na ledvinách, ale také na játrech.

2.2.7. Účinky olova na kardiovaskulární systém

Bylo potvrzeno, že zvýšený obsah olova (20 – 29 µg/dl) významně koreluje s počtem úmrtí kvůli problémům kardiovaskulárního systému (Lustberg et Silbergeld, 2002). Dlouhodobá expozice nízkým dávkám olova může vést ke zvýšení systolického i diastolického krevního tlaku, ke vzniku cerebrovaskulární choroby u zvířat i lidí, může způsobovat ischemickou koronární chorobu srdeční a onemocnění periferních cév (Sokas et al., 1997). Zvýšený obsah olova v krvi také koreluje se zvýšeným výskytem onemocnění periferních tepen (Navas-Acien et al., 2004) a s výskytem anémie (Waldron, 1966). Olovo inhibuje tvorbu krevních kapilár (Kishimoto et al., 1995). Expozice Pb způsobuje zvýšení peroxidace tuků a snížení aktivity krevní superoxid dismutázy (Adonaylo et Oteiza, 1999). U potkanů, kterým byl podáván octan olovnatý, docházelo k prokazatelnému poškození myokardu (Mahjoub et Moghaddam, 2011).

Olovo má přímý vliv na krevní systém, protože díky inhibici enzymů zapojených do syntézy hemu omezuje syntézu hemoglobinu. Zvyšuje křehkost buněčných membrán červených krvinek, čímž zkracuje jejich životnost. Takto olovo způsobuje anémii (Guidotti et al., 2008). Olovo má při syntéze hemu vliv na tři enzymy – ALAD, ALAS (syntáza δ-aminolevulinové kyseliny) a ferrochelátázu, což je mitochondriální enzym, který katalyzuje vstup železa k formaci hemu (Piomelli, 2002). Inhibicí enzymu ALAD dochází k akumulaci aminolevulinové kyseliny, která je poté v plazmě a moči detekovatelná již při koncentraci 10 µg/dl olova v krvi. K poklesu biosyntézy hemu dochází až v okamžiku, kdy je aktivita enzymu ALAD inhibována z 80 – 90 %. K takovému poklesu dochází při koncentraci olova v krvi okolo 55 µg/dl (Ahamed et al., 2005). Inhibice ferrochelátázy vede ke zvýšenému množství koproporfyriu v moči a k akumulaci protoporfyriu v červených krvinkách. Dále vede inhibice tohoto enzymu k náhradě železa zinkem za vzniku zinkového protoporfyriu. Zvýšení zinkového protoporfyriu se může používat jako indikátor monitorování množství expozice olova (Jangid et al., 2012).

2.2.8. Další účinky olova

Při chronické expozici bývá olovo ukládáno v játrech, kde může negativně ovlivnit jaterní buňky i během prenatálního vývoje plodu (Korpela et al., 1986). Může také docházet k samovolným potratům, ke snížení počtu a pohyblivosti spermií nebo ke snížení plodnosti a libida (Levin et Goldberg, 2000).

Expozice vysokým dávkám olova vyvolává bolesti břicha, nevolnost, zvracení, zácpu, paralýzu střev, poruchy příjmu potravy a ztrátu hmotnosti (Mudipalli, 2007). Během intoxikace Pb se v játrech zvyšuje hladina metalothioneinů (Maitani et al., 1986), což představuje ochranný mechanismus proti toxickým vlivům Pb (Rosenman et al., 2003).

Olovo je jedním z potenciálních karcinogenů u lidí (Rousseau et al., 2005), protože expozice Pb zvyšuje výskyt rakoviny žaludku, plic, močového měchýře a také koreluje s celkovým počtem úmrtí na rakovinu obecně (Fu et Boffetta, 1995). Může také zvyšovat výskyt šedého zákalu u mužů (Shukla et al., 1996).

Při přítomnosti olova v organismu dochází ke změnám v hodnotách IgE v krevním séru, k poklesu protilátek a IgG v krevním séru a ke snížení aktivity lymfocytů (Bunn et al., 2001). Díky těmto změnám v imunitním systému může docházet ke zvýšenému riziku napadení parazity. Bylo prokázáno, že expozice olovem snižuje rezistenci myšice lesní (*Apodemus sylvaticus*) vůči hlístici (*Heligmosomoides polygyrus*) (Tersago et al., 2004).

2.2.9. Projevy otravy olovem

Hauptman et al. (2017) se ve své studii zabývají otravou olovem u dětí. V tabulce číslo 3 jsou uvedeny projevy otravy olovem u dětí z této studie a také jaké množství olova bylo dětem naměřeno v krvi.

Množství Pb v krvi	Projev otravy
< 5 µg/dl	Pokles IQ, zvýšený výskyt problémů s pozorností a dalšího problémového chování
5 – 10 µg/dl	Výše zmíněné, zhoršení sluchu, snížený postnatální růst, zpoždění nástupu puberty
10 – 44 µg/dl	Výše zmíněné, pomalejší nervové vedení, zvýšený hemoglobin, anémie
45 – 69 µg/dl	Výše zmíněné, bolestivost břicha, zácpa, kolika, anorexie, zvracení
> 70 µg/dl	Výše zmíněné, křeče, koma, ztráta kontroly svalů, smrt

Tabulka 3: Projevy otravy olovem u dětí a množství olova (µg/dl), které jednotlivé projevy způsobují. Podle Hauptman et al. (2017).

Akutní otrava

Akutní otrava olovem je poměrně vzácná. Vzniká inhalací par nebo po přímém požití. Po požití následuje několikahodinová latentní doba, po které se může objevit zvracení, průjem a bolest v břišní dutině. Tato křečovitá bolest, objevující se v abdominální oblasti se nazývá saturninská. Akutní i chronické otravy olovem bývají proto někdy označovány jako saturnismus. Dále se může objevit deprese, svalová slabost nebo porucha koordinace pohybů. V závažnějších případech může

následovat slepota, třes, křeče a v nejhorším případě i koma nebo smrt. Smrtelná dávka je 1 g resorbovaného olova (Bencko et al., 1995; Hauptman et al., 2017). K akutní otravě olovem došlo například v roce 2010 v Zamfaře v Nigerii. Tehdy zde zemřelo přibližně 400 – 500 dětí v oblasti, kde bylo dolováno zlato. Dolované rudy totiž před zpracováním obsahovaly až 10 % olova (Tirima et al., 2018).

Chronická otrava

Častější než otravy akutní jsou dnes otravy chronické, které souvisí se znečištěním životního prostředí, kde je organismus trvale vystaven působení olova (Patrick, 2006). Typická je také pro pracovní expozici. Onemocnění začíná únavou, bolestí kloubů a nechutenstvím. Často je přítomna zácpa nebo na počátku průjem. Objevují se saturninské koliky, šedý lem na dásních (tzv. Burtonova linie, způsobena ukládáním síranu olovnatého). Dalšími projevy jsou anémie, zvýšený krevní tlak, bolesti hlavy, slabost, svalové křeče, osteoporóza nebo pomalejší hojení fraktur. Těžké chronické intoxikace mohou být doprovázeny poruchami nervového systému, trávicího traktu nebo ledvin. Mohou se vyskytovat problémy s reprodukcí (Yusá et al., 2008).

Experimentální studie na potkanech prokázaly, že chronická expozice Pb vyvolává významný nárůst koncentrací olova v krvi a mozku exponovaných potkanů. Tito potkani poté při testu ve světlém/tmavém boxu trávili více času v osvětlené části. Potvrdila se tedy hypotéza, že chronická expozice Pb může způsobovat změny v chování, například anxieta (Sansar et al., 2012). V další studii způsobila chronická expozice navýšení počtu astrocytů a změny na gliových buňkách frontálního kortexu potkanů. Tyto změny ovlivnily chování potkanů tak, že došlo ke snížené pohybové aktivitě v otevřeném prostoru (Sansar et al., 2011). Chronické expozice způsobily u potkanů i morfologické změny na kostech (Álvarez-Lloret et al., 2017).

2.2.10. Diagnostika

Při diagnostice je nejprve třeba popsat a charakterizovat nástup a trvání jednotlivých symptomů. Je třeba se nezaměřovat jen na aktuální příznaky, ale vysledovat i ty případné dříve se projevující. K tomu je vhodné použít dotazníky, obsahující mimo jiné otázky o ingesci různých látek, o cestách do oblastí se zvýšenými obsahy olova nebo o historii expozici olova i u rodinných příslušníků. Poté by mělo následovat komplexní fyzické vyšetření se zvýšenou pozorností na soustavy, které by mohly být toxicitou olova ovlivněny (Dapul et Laraque, 2014).

Je třeba se věnovat diferenciální diagnóze, protože příznaky otravy olovem jsou shodné s příznaky řady onemocnění. Je také nutné odlišit otravu olovem od otravy jinými toxickými látkami. Například je nutné vyloučit pozření opiátů nebo otravu oxidem uhelnatým. Dále je nutné

vyločit přítomnost talasemie (dědičné onemocnění krve), nedostatek železa, Wilsonovu nemoc (dědičná porucha metabolismu mědi), porfyrii (porucha metabolismu červených krvinek), akutní bolest břicha nebo encefalitidu a další příznaky encefalopatie (Hauptman et al., 2017).

Pacient by měl být vyšetřen neurologicky. Je třeba změřit krevní tlak. Nejúčinnější diagnostickou metodou je změření obsahu olova v krvi. Vyšetření může být provedeno pomocí vzorku z kapiláry prstu, ale je třeba tento vzorek odebrat opatrně, aby nedošlo k jeho kontaminaci z prostředí. Pokud dojde k naměření koncentrace vyšší než 10 µg/dl, je nutné provést měření na vzorku krve z žíly. Méně citlivá metoda diagnostiky je měření koncentrace olova ve vlasech (Dapul et Laraque, 2014).

2.2.11. Terapie otravy olovem

Jedinou možností v případě nízkých hladin expozice je prevence (Needleman, 2004). V případě otravy olovem je v první řadě nejdůležitější najít zdroj intoxikace a ukončit expozici tomuto zdroji (Patrick, 2006; Dapul et Laraque, 2014). U dětí se k těmto opatřením přistupuje již v případě, že koncentrace Pb v krvi dosáhne 5 µg/dl. (Binns et al., 2007).

Prvním krokem terapie bývá zvýšení železa v dietě na 6 mg/kg denně, aby se uvedl do pořádku nedostatek železa způsobený olovem (Park et al., 2014). Je také možné provést výplach žaludku (Dapul et Laraque, 2014).

V případě koncentrace olova v krvi vyšší než 45 µg/ml se k terapii používají chelatační činidla (Patrick, 2006; Dapul et Laraque, 2014; Hauptman et al., 2017). Před začátkem léčby musí být tato koncentrace v krvi naměřena opakovaně. Pacient je poté hospitalizován v nemocnici, která má zkušenosti s chelátovou terapií, případně je nutná konzultace s odborníkem. Výběr chelatačního činidla závisí na koncentraci olova v krvi, na symptomech pacienta i na zatížení životního prostředí (Dapul et Laraque, 2014). Chelatační činidla jsou látky, které mají strukturu takovou, že jsou na sebe schopné navázat ionty nebo kationty kovů a vytvořit s nimi koordinačně-kovalentní vazbu. Jako součást této vazby jsou poté kovy vyloučeny z těla společně s močí (Patrick, 2006; Dapul et Laraque, 2014). Chelatační činidlo bylo poprvé použito přibližně před sto lety ke snížení toxicity sloučenin arsenu, které se v té době používaly k léčbě syfilitidy (Dennie et McBride, 1924). Chelatační činidla snižují koncentraci olova v krvi, ale nebyl prokázán jejich vliv na zlepšení kognitivních funkcí, poruch chování nebo jiných problémů, které olovo způsobuje u nervové soustavy (Dietrich et al., 2004). Před zahájením terapie pomocí těchto látek je třeba se ujistit, že v GIT není přítomné olovo. Pokud ano, je třeba provést jeho dekontaminaci, protože chelatační látky mohou zvýšit GIT absorpci olova. Během léčby chelatačními činidly je důležitá správná hydratace pacienta a sledování tvorby a vylučování moči (Patrick, 2006).

Donedávna bylo nejrozšířeněji používané chelatační činidlo CaNa_2EDTA (sodno-vápenatá sůl kyseliny etylendiamintetraoctové). Toto činidlo dříve významně snížilo mortalitu způsobenou encefalopatií, ale nikdy nebyla systematicky studována jeho účinnost při nižších hodnotách expozice. Vylučování olova močí se díky němu může zvýšit 20 – 50krát (Hauptman et al., 2017). Podává se intravenózně, dnes v kombinaci s dimercapolem při koncentraci Pb v krvi vyšší než 70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Dapul et Laraque, 2014). S podáváním tohoto činidla je spojována řada negativních vedlejších účinků, například lokální reakce v místě vpichu, horečka, poruchy ledvin a poruchy vylučování esenciálních látek (Hauptman et al., 2017). Také bylo prokázáno, že podání tohoto činidla může přímo vést k uvolnění olova uloženého v kostech a k následné otravě měkkých tkání tímto olovem (Crinnion, 2011). Kvůli vedlejším účinkům se používá pouze v přímém ohrožení pacienta encefalopatií (Hauptman et al., 2017).

Další chelatační činidlo je BAL (dimercaprol), který má schopnost cílit na olovo v měkkých tkáních (Hauptman et al., 2017). Je také schopné projít do mozku, takže se často používá u pacientů s akutní encefalopatií (Dapul et Laraque, 2014). Toto činidlo se podává rozpuštěné v arašídovém oleji hluboko do svalů. I u tohoto činidla se objevují negativní nežádoucí účinky, jako například horečka, vyrážka, bolest v místě vpichu a může způsobit hemolýzu. Nesmí se používat při nedostatečnosti jater a u osob s alergií na arašidy (Stocken, 1947). Toto činidlo se zpravidla používá v případě, že koncentrace Pb v krvi pacienta dosáhne 70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ a více (Dapul et Laraque, 2014).

Chelatační činidlo DMSA (kyselina mezo-2,3-dimerkaptojantarová, neboli sukčimer) je ve vodě rozpustný analog činidla BAL (Dapul et Laraque, 2014; Hauptman et al., 2017). Používá se v případě, že koncentrace olova v krvi nepřesáhne 70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Dapul et Laraque, 2014). Toto činidlo je možno podávat orálně, má méně negativních vedlejších účinků a způsobuje menší ztrátu esenciálních prvků močí. Podává se ve formě želatinových kapslí, které silně zapáchají po síře. Mezi vedlejší účinky při použití tohoto činidla patří bolest břicha, vyrážka (Dapul et Laraque, 2014; Hauptman et al., 2017) a zvýšené hodnoty jaterních enzymů (Hauptman et al., 2017).

Poslední činidlo používané pro terapii otravy olovem je D-penicilamin. Poprvé byl izolován v roce 1953 z moče pacientů s onemocněním jater, kteří byli léčeni penicilinem. Dobře se vstřebává po orálním podání nalačno. Nesmí být podáván pacientům alergickým na penicilin. Při dlouhodobém užívání tohoto činidla často dochází k onemocnění kůže. Dalšími vedlejšími účinky může být poškození jater, plic nebo ledvin, zvracení, anorexie nebo ztráta chuti (Dapul et Laraque, 2014; Hauptman et al., 2017).

Vzhledem k účinku olova na tvorbu volných radikálů a peroxidaci membrán jsou v posledních letech testovány terapeutické účinky různých antioxidantů. Nejčastěji studovány jsou α tokoferol, kyselina askorbová, taurin, metionin, N-acetylcystein, selen a zinek. Antioxidanty

samotné nesnižují hladinu olova v krvi, ale mohou zmírnit oxidační poškození. Některé antioxidanty se používají společně s klasickými chelatačními činidly. Výsledky takovéto léčby mohou být lepší než při použití samotných chelatačních činidel (Gurer et Ercal, 2000). Při experimentech na potkanech bylo prokázáno, že díky antioxidačním vlastnostem některých rostlin může dojít ke snížení koncentrace olova v játrech potkanů. Tyto antioxidační vlastnosti má například extrakt z rajčete (Nwokocha et al., 2012a), česneku (Nwokocha et al., 2012b) nebo garcínie (Nwokocha et al., 2011).

2.3. Akumulace olova u zvířat

Protože kontaminace olovem je považována za celosvětový problém, ve vědeckých databázích se nachází nespočet článků o akumulaci Pb ve tkáních různých druhů zvířat. Pokud je olovo akumulováno ve tkáních zvířat, které slouží jako potrava lidí, dochází ke zvýšené expozici Pb. Problém nastává samozřejmě ihned v okamžiku, když se olovo dostane do potravního řetězce, nemusí dojít ke přímé konzumaci daného živočicha člověkem. Akumulace olova byla potvrzena napříč celou živočišnou říší. Z bezobratlých například u živočišných hub (Davis et al., 2014), u měkkýšů, u kterých často nahrazuje vápník v jejich lasturách, ale akumuluje se i ve měkkých tkáních (např. Moore, 1971; Bourgoin et Risk, 1987; Bourgoin, 1990; Pitts et Wallace, 1994; Ramos et al., 2004; Krause-Nehring et al., 2012; Galimberti et al., 2016; Fan et al., 2017; Cariou et al., 2017), u olihní, sépií (Galimberti et al., 2016), medúz (Muñoz-Vera et al., 2016) nebo u různých druhů žízá, které přijímají kovy převážně povrchem jejich těla (Vijver et al., 2005)

Z klepítkačů byla akumulace olova pozorována například u pavouků, kteří jej akumulují především v hepatopankreatu (Wilczek et Babczynska, 2000). Olovo také akumuluje v tělech roztočů, sekáčů, štírků, stonožek, mnohonožek (Heikens et al., 2001) nebo u všech ostrorepa amerického (*Limulus polyphemus*). U ostrorepů platí, že čím starší vývojové stádium, tím více se v něm akumuluje olovo (Bakker et al., 2017), dospělci akumulují nejvíce olova ve svalech končetin (Burger et al., 2002).

U podkmenu korýši byla akumulace olova potvrzena například u stínky (*Porcellio scaber*) (Vijver et al., 2005), svinky (*Armadillidium granulatum*) (Mazzei et al., 2013), ve svalovině garnáta obecného (*Crangon crangon*) (Jung et Zauke, 2008), humra amerického (*Homarus americanus*) (Galimberti et al., 2016) nebo různých druhů krevet (Anandkumar et al., 2017).

Dále byla akumulace Pb pozorována u různých druhů hmyzu, u kterého zvýšené koncentrace olova způsobují abnormální vývoj, sníženou délku života, zvýšenou úmrtnost, vliv na fyziologické procesy, plodnost a pohyblivost dospělců (Warchałowska-Śliwa et al., 2005; Shu et al., 2009; Hirsch et al., 2010). Potvrzena byla například u rovnokřídlých (Warchałowska-Śliwa et al.,

2005), polokřídých (Görür, 2007), motýlů (Shu et al., 2009; Wu et Yi, 2015), mravenců, chvostoskoků, střevlíků, drabčků (Heikens et al., 2001) nebo cvrčků (Hunter, et al., 1987).

Mezi parybami byla akumulace olova pozorována u rejnoka zimního (*Leucoraja ocelota*) (Galimberti et al., 2016), u žraloka modrého (*Prionace glauca*) – v játrech (Barrera-García et al., 2013; Alves et al., 2016), ledvinách (Barrera-García et al., 2013) a detekováno bylo u některých jedinců i ve svalovině (Alves et al., 2016). Dále v játrech a ledvinách psohlava obecného (*Galeorhinus galeus*) a žraloka mako (*Isurus oxyrinchus*) nebo v játrech kladivouna obecného (*Sphyrna zygaena*) (Barrera-García et al., 2013). U kladivouna bronzového (*Sphyrna lewini*) a žraloka panamského (*Carcharhinus porosus*) bylo olovo naměřeno kromě svalů a jater také ve hřbetní ploutvi a v obratlích (Mohammed et Mohammed, 2017). Olovo bylo naměřeno i ve svalech řady dalších druhů paryb, které jsou určeny pro konzumaci lidmi – žraloka malabarského (*Carcharhinus dussumieri*), hladkouna obecného (*Mustelus mustelus*), žraloka adenského (*Carcharhinus leiodon*), máčky černoústé (*Galeus melastomus*) nebo žraloka mazaltánského (*Rhizoprionodon longurio*) (Adel et al., 2016). V nejnovější studii na toto téma byla akumulace olova potvrzena také ve svalech a játrech žralůčka perského (*Chiloscyllium arabice*) (Adel et al., 2018).

U ryb může akumulace olova způsobovat různé deformity, například zakřivení páteře nebo zčernání ocasu (Davies et al., 1976). Olovo je u této skupiny živočichů ve vysokých koncentracích akumulováno také do žaber (Davies et al., 1976; Spry et Wiener, 1991; Mariussen et al., 2017). Akumulace olova byla potvrzena například u různých druhů pstruhů (Davies et al., 1976; Mariussen et al., 2017), okouna říčního (*Perca fluviatilis*), plotice obecné (*Rutilus rutilus*), cejnka malého (*Abramis bjoerkna*), mořana žlutoploutvého (*Rhabdosargus sarba*), cejna velkého (*Abramis brama*), jelců, korusky evropské (*Osmerus eperlanus*), lína obecného (*Tinca tinca*), štiky obecné (*Esox Lucius*) (Stanskiene et al., 2006) a řady mořských ryb, běžně lovených pro konzumaci lidmi (Zaza et al., 2015; Galimberti et al., 2016).

Přestože plazi jsou nejméně prostudovanou skupinou živočichů, co se ekotoxikologie týče (Weir et al., 2010), bylo olovo nalezeno ve tkáních například mořských želv po celém světě (Cortés-Gómez et al., 2017). Sakai et al. (2000) jako jedni z mála měřili koncentrace těžkých kovů v téměř všech tělních tkáních karety obecné (*Caretta caretta*). Nejvíce olova je u nich akumulováno do kostí a krunýře, následují ledviny, játra, šupiny a svaly. Ve tkáních trávicí, pohlavní a dýchací soustavy, srdci, slezině, močovém měchýři, tuku a mozku olovo detekováno nebylo. Podle tabulky, kterou publikovali Cortés-Gómez et al. (2017) bylo olovo detekováno i v tuku a mozku želv v některých částech světa. Nejen mořské, ale i sladkovodní želvy akumulují olovo – v játrech, svalech, srdci a krunýři (Yadollahvand et al., 2014). Také u hadů byla akumulace olova potvrzena.

Nejvyšší hodnoty ve studii, kterou publikoval Burger et al. (2007), byly u užovek páskovaných (*Nerodia fasciata*) naměřeny v kůži, poté následovaly ledviny, svalovina, krev a játra (Burger et al., 2007). U mořského hada vodnáře (*Hydrophis cyanocinctus*) byly nejvyšší koncentrace olova naměřeny v ledvinách, následovala játra, krev, kůže a svalovina (Rezaie-Atagholipour et al., 2012). Olovo bylo také nalezeno ve svalovině a štítech krokodýlů (Jeffree et al., 2001; Rainwater et al., 2007) a játrech, svalech a štítech aligátorů (Nilsen et al., 2017). Koncentrace olova v játrech užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) byly významně vyšší po hibernaci než před hibernací (Gavrić et al., 2017).

Akumulace olova u ptáků byla již zmíněna v kapitole Zdroje kontaminace a expozice (2.1.2.). Ve zmíněné kapitole byly popsány jako zdroje olova náboje do střelných zbraní. Tento zdroj olova je dominantní především u vodních ptáků. V evropských mokřadech je takto exponováno minimálně 40 druhů ptáků – kachny, kachnice, labutě, bernešky, kajky, turpani, hoholové, husice, husy, čírky, poláci, plameňáci, slípky, lysky, bekasiny, motáci nebo orel mořský (*Haliaeetus albicilla*). V rámci Evropské unie jich ročně uhynie okolo 700 000 na následky akutní otravy olovem (Anderotti et al., 2018). U řady výše jmenovaných druhů byla ve studii z Argentiny pozorována akumulace Pb v kostech a játrech (Ferreira et al., 2014). Samozřejmě u ptáků není olovo z nábojů jediným zdrojem expozice. Akumulace olova byla potvrzena i u jiných než mokřadních druhů, například ptáků žijících u moře (Dietz et al., 1996) i dalších druhů ptáků (Zarrintab et Mirzaei, 2017b).

Akumulace olova u savců je již popsána v kapitole Ukládání Pb (2.2.2.). Kromě tkání vyjmenovaných v této kapitole byla akumulace olova popsána také ve slonovině (Prozesky et al., 1995). Podobně jako terestričtí savci akumulují olovo i mořští savci. Hlavními cílovými orgány jsou u nich také játra a ledviny, často bývá měřena svalovina. Řada těchto druhů žije ve vodách s koncentracemi olova nízkými tak, že v jejich tkáních je olovo pod detekčním limitem, ale bylo detekováno například u tuleně kroužkovaného (*Phoca hispida*) (Dietz et al., 1996), vorvaně obrovského (*Physeter macrocephalus*), kulohlavce Sieboldova (*Globicephala macrorhynchus*), plejtváka Brydeova (*Balaenoptera edeni*) (Wise et al., 2018), delfína brazilského (*Sotalia guianensis*) nebo delfína Grayova (*Stenella clymene*) – u těchto delfínů byla měřena ještě koncentrace v plicích, kde olovo nebylo detekováno. Nejvyšší koncentrace olova u delfínů byly naměřeny v játrech (Capelli et al., 2008; Korn et al., 2010), následují ledviny, svalovina, srdce a slezina. V plicích a mozku u většiny druhů delfínů olovo nebylo detekováno (Capelli et al., 2008). Nejvyšší koncentrace jsou i u mořských savců v kostech (Kemper et al., 1994). Také u zástupce sladkovodních savců, kapustňáka, byla zaznamenána akumulace olova (Stavros et al., 2008). Ze savců je olovo často měřeno u hospodářských zvířat, určených pro konzumaci lidmi (např. Villar et

al., 2005; Patraa et al., 2008; Cai et al., 2009; Rudy, 2009; Waegeneers et al., 2009; Pareja-Carrera et al., 2014) nebo u drobných zemních savců, kteří se často používají jako bioindikátoři znečištění v přírodě (např. Appleton et al., 2000; Metcheva et al., 2003; Sánchez-Chardi et Nadal, 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007; Wijnhoven et al., 2008; Jankovská et al., 2009; McLean et al., 2009; Fritsch et al., 2010; Zarrintab et Mirzaei, 2017a).

U zvířat lze při určování koncentrací olova v jejich tkáních použít metody, při kterých je nutné živočicha zbavit života, ale také neinvazivní metody, jako například odběr srsti, peří, výkalů, moči, mléka nebo vaječných skořápek (Patraa et al., 2008; McLean et al., 2009; Zarrintab et Mirzaei, 2017b).

Díky bioakumulaci ve tkáních živých organismů je možné sledovat rozšíření a míru toxicity těžkých kovů v konkrétním životním prostředí v místech, kde se tyto organismy pohybují (Zhou et al., 2008). Vlastnosti pro dobrý bioindikátor charakterizovali již v roce 1974 Haug et al. Bioindikátor by měl být schopný akumulovat polutant ve vysoké koncentraci, aniž by tím byl ohrožen na životě, měl by obývat co možná nejmenší plochu, měl by být na daném území velmi početný, měl by být dostatečně dlouhověký a velký, aby bylo možné sbírat vzorky ideálně i po dobu jednoho roku a déle a aby bylo dostatek materiálu na analýzy. Obsah polutantů v jeho tkáních by měl korelovat s obsahem polutantů v prostředí, ve kterém žije. V případě vodních organismů by měl tolerovat brakickou vodu (Haug et al., 1974). Bioindikační schopnosti byly z výše jmenovaných živočichů popsány u kořenoústky plicnaté (*Rhizostoma pulmo*) (Muñoz-Vera et al., 2016), žízal (Vijver et al., 2005), ústřice jedlé (*Ostrea edulis*) (Cariou et al., 2017), rozchlipky písčité (*Mya arenaria*) (Pitts et Wallace, 1994), slávky jedlé (*Mytilus edulis*) (Moore, 1971; Bourgoin, 1990), stínky obecné (*Porcellio scaber*) (Vijver et al., 2005), pstruha obecného (*Salmo trutta*) (Mariussen et al., 2017) nebo žraloka modrého (*Prionace glauca*) (Alves et al., 2016). Jako vhodný indikátor znečištění olova ve vzduchu se ukázalo stanovení obsahu olova v pavoučích sítích (Rachwał et al., 2018). Podle Burger et al. (2007) nebo Gavrić et al. (2017) jsou také hadi skupinou živočichů, která je vhodná k jejich bioindikaci těžkých kovů, tedy i olova. Další skupina vhodná k bioindikaci jsou mořské (Cortés-Gómez et al., 2017) i sladkovodní želvy (Yadollahvand et al., 2014) nebo například drobní zemní savci (např. Appleton et al., 2000; Metcheva et al., 2003; Sánchez-Chardi et Nadal, 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007; Wijnhoven et al., 2008; Jankovská et al., 2009; McLean et al., 2009; Fritsch et al., 2010; Zarrintab et Mirzaei, 2017a).

2.4. Akumulace olova v laboratorních podmínkách

Studii zkoumajících akumulaci olova v laboratorních podmínkách je publikováno mnoho. Jejich výhodou je přesné stanovení množství olova, které je zvířatům podáváno. V laboratorních

podmínkách byla akumulace olova sledována například u houby hladké (*Chondrilla nucula*), která se podle publikovaných výsledků dá použít k bioremediaci olovem znečištěných míst (Ferrante et al., 2018). Dále u ústřice velké (*Crassostrea gigas*) (Almeida et al., 1998), krevety *Litopenaeus vannamei* (Wu et al., 2017), sladkovodního kraba *Sinopotamon hanyangense* (Li et al., 2015) nebo různých druhů ryb (např. Dai et al., 2010; Kim et al., 2015). Četně testovanou skupinou jsou hospodářská zvířata (např. Bires et al., 1995; Cretacci et al., 2010; Phillips et al., 2011).

Také bylo olovo podáváno opicím, nejčastěji makakům. U těch ale nebyla sledována toxokinetika ani akumulace olova, ale spíše jeho účinky na rozmnožování (Foster, 1992), chování (Laughlin et al., 1991; Ferguson et al., 1993; Ferguson et Bowman, 1990; Laughlin et al., 1999) nebo sluch (Lasky et al., 2001).

Pro účely této práce je podstatná akumulace olova ve tkáních drobných zemních savců. Nejčastěji zkoumanými druhy jsou myši a potkani. Ve studii prováděné na potkaních bylo pozorováno, že hlavní měkké tkáně, do kterých je akumulováno olovo, jsou ledviny, játra a také mozek. U skupiny potkanů, kterým bylo podáváno 20 mg Pb/kg denně po dobu 10 dní, bylo olovo akumulováno v játrech dokonce ve vyšší koncentraci než v kostech (Hernández-Plaza et al., 2015). Stejná forma olova, octan olovnatý, byla potkanům podávána v jiném experimentu. Zde vyšlo, že koncentrace olova byla vyšší v ledvinách než v játrech. Koncentrace v játrech zde byla silně závislá na věku zvířat. Čím starší byla zvířata, tím vyšší koncentrace byly v játrech naměřeny (Guimaraes et al., 2012). U potkaních samic, kterým byl do krmiva přidáván dusičnan olovnatý, bylo olovo ve tkáních akumulováno v následujícím pořadí: kost > játra > ledviny > žaludek > krev > svalovina > mozek > vaječníky. Koncentrace Pb v kostech samic i jejich potomků vzrůstala s věkem a s případnou prenatální expozicí. U potomků bylo ve 45 dnech olovo detekováno jen v kostech a ledvinách, v 90 dnech již bylo detekováno ve všech výše zmíněných orgánech (Nascimento et al., 2016).

Vliv okolní teploty na akumulaci olova ve tkáních myši zkoumali Martinez-Garcia et al. (1995). V jejich experimentu byly myším po dobu 3 nebo 6 týdnů podávány různé dávky octanu olovnatého. Při teplotě 22 °C po uplynutí 3 týdnů byly koncentrace olova v ledvinách, játrech i krvi vyšší než při 35 °C. Po šesti týdnech byly koncentrace olova v játrech a ledvinách stejně vysoké (játra) nebo vyšší (ledviny) u myši chovaných při teplotě 35 °C. V jiné studii bylo myším do břišní dutiny podáváno olovo ve formě dusičnanu olovnatého akutně (15 dní) a chronicky (15 týdnů). U myši vystavených akutní expozici byly koncentrace olova v měkkých tkáních vyšší než u chronicky exponovaných (Taupeau et al., 2001). Opačný trend byl ve studii, kterou publikovali Marques et al., (2006). Myši v jejich studii dostávaly ve vodě octan olovnatý. Koncentrace olova v játrech měla

v této studii vzestupnou tendenci. Po 15 dnech byly naměřeny nejnižší koncentrace. Po 45 a 90 dnech expozice byly koncentrace vyšší (Marques et al., 2006).

2.5. Akumulace rizikových prvků v endoparazitech

Jak uvádí Sures (2004), mezi znečištěním životního prostředí a parazitismem existují velice blízké vztahy. Znečištění může v některých případech zvýšit i snížit napadení hostitele endoparazity. Vyšší počet parazitů při intoxikaci olovem již byl potvrzen (Tersago et al., 2004). Je také známo, že intoxikace těžkými kovy i napadení parazity negativně ovlivňují organismus hostitele, což je také možné považovat za vztah mezi těmito dvěma jevy.

Je známo, že tkáň některých gastrointestinálních parazitů akumulují vyšší koncentrace olova než tkáň jejich hostitelů (např. Sures et al., 2000a; 2000b; 2002; Baruš et al. 2003; Sures, 2003; 2004; Torres et al., 2004; 2006; Jankovská et al., 2008, 2009; Nhi et al., 2013; Al-Quraishy et al., 2014; Jankovská et al., 2016).

Akumulace rizikových prvků byla nejdříve sledována především ve vodním prostředí na endoparazitech ryb (např. Sures et al., 1997, 1999; Dural et Bickici, 2010; Khaleghzadeh-Ahangar et al., 2011; Morsy et al., 2012; Jankovská et al., 2012a). V porovnání s vodním prostředím bylo studií zaměřených na parazity savců a na suchozemské prostředí vůbec publikováno jen velmi málo (Sures et al., 1998; 2000a; 2000b; Sures, 2004; Torres et Johnson, 2001; Torres et al., 2004, 2006, 2011; Jankovská et al., 2008; 2009; 2012b).

Díky jejich akumulacím schopnostem se z parazitů stávají ideální organismy, které je možné použít k bioindikaci pro sledování kontaminace olovem v životním prostředí. Bioindikační možnosti gastrointestinálních parazitů již byly popsány ve vodním i terestrickém prostředí (Sures et al., 1999; Baruš et al., 2001; Sures, 2001; Tenora et al., 2002; Turčeková et al., 2002). Výrazně vyšší akumulace rizikových prvků do tkání střevních parazitů než do tkání hostitele byla popsána i u různých endoparazitů potkana (Sures et al., 2000b).

V práci, kterou publikovali Sures et al. v roce 1998 byl poprvé publikován názor, že příjem olova parazity může být zprostředkován žlučí hostitele. V jejich studii totiž bylo do tkáň motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), která žije přímo ve žlučovodech skotu, akumulováno velké množství olova. Olovo vylučované z jater je pro tyto parazity jediným zdrojem tohoto prvku, protože na rozdíl od GIT parazitů nepřicházejí do styku s obsahem střev (Sures et al., 1998). Tento názor byl potvrzen studií in vitro na vrtejších *Pomphorhynchus laevis* (Sures et Siddall, 1999).

2.6. Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)

Tasemnice krysí je gastrointestinální parazit, patřící do kmene Platyhelminthes (ploštěnci), třídy Cestoda (tasemnice), řádu Cyclophyllidea (kruhovky), čeledi Hymenolepididae (BioLib, 2017). Tato tasemnice byla poprvé nalezena v tenkém střevě potkana obecného (*Rattus norvegicus*). V dnešní době se vyskytuje kosmopolitně (Volf et Horák, 2007). V posledních letech byla prevalence zjišťována v Buenos Aires. U potkana obecného a krysy obecné (*Rattus rattus*) zde dosahovala 21,3 %, ale ve zkoumaných lokalitách nebyla homogenní (Hancke et Suárez, 2016).

2.6.1. Morfologie tasemnice krysí

Tělo dospělé tasemnice je 20 – 60 cm dlouhé. Skládá se ze skolexu (hlavičky) a segmentované strobily (těla). Skolex je hlavním centrem nervové soustavy (Schmidt et Roberts, 2009) a u *H. diminuta* je vybaven čtyřmi kruhovitými přísavkami a rudimentálním (vysunovatelným) rostellem hruškovitého tvaru. Rostellum této tasemnice není opatřeno háčky (Arai, 1980). Strobila *H. diminuta* je tvořena 600 – 1000 články. Každý článek obsahuje sadu reprodukčních orgánů obou pohlaví – genitalium. Části článků okolo genitalia se nazývají proglotidy (Schmidt et Roberts, 2009).

Bezprostředně po skolexu následuje krček, který je místem aktivní proliferace (růstu) článků (Arai, 1980). Proces růstu nových článků se nazývá strobilace. Přední články jsou během ní pravidelně nahrazovány novými a tím jsou posouvány směrem ke konci strobily. V průběhu tohoto procesu dochází k plnému vývinu jednotlivých článků (Schmidt et Roberts, 2009). Články poblíž krčku nemají plně vyvinutou pohlavní soustavu a jsou tedy nezralé (Arai, 1980). Články blízké konci strobily mají vyvinutější pohlavní soustavu a jsou schopné se rozmnožovat (Schmidt et Roberts, 2009).

Jednotlivé články této tasemnice většinou obsahují samčí i samičí pohlavní orgány. Až na vzácné výjimky jsou tedy *H. diminuta* hermafroditní. V každém jejich článku se nachází tři kulovitá varlata, semenný váček a cirrus. Ve varlatech se vyvíjí spermatozoa. Cirrus je vysunovatelný orgán, který se během kopulace zasunuje do genitálního atria. Samičí pohlavní systém zahrnuje genitální atrium, vaječník, vejcovod, dělohu a Mehlisovu žlázu. Slouží k produkci oocytů, k uskladnění spermatozoa před oplozením, podporuje tvorbu larválního obalu a skladuje vyvinuté larvy. Oocyty se vyvíjí ve vaječnicích a zralé vstupují do vejcovodu, kde dochází k jejich oplození. Poté dochází k přesunu do dělohy, kde se oplozené oocyty vyvíjejí v larvální stádia (onkosféry), které se nacházejí uvnitř vajíčka (Arai, 1980). K oplození může dojít mezi dvěma následujícími články na jedné strobila, nebo mezi dvěma jedinci uvnitř střeva hostitele (Nollen, 1975). Poté co článek obsahuje plně vyvinutá vajíčka, mluvíme o tom, že je zralý. U některých druhů dochází k odtrhnutí

celých zralých koncových článků a k jejich odchodu z těla společně s výkaly. U tasemnic rodu *Hymenolepis* dochází nejčastěji k apolýze, tj. k rozpadu článku a ve výkalech jsou poté uvolněná vajíčka (Schmidt et Roberts, 2009).

Svalová soustava tasemnic byla popsána právě na *H. diminuta*. Víme tedy, že svalová soustava této tasemnice se skládá ze dvou typů vláken. Ze smrštitelných myofibril a nesmrštitelných myocytů. Smrštitelná vlákna obsahují aktinová a myosinová vlákna, ale nevytváří příčně pruhovanou svalovinu. Jsou uspořádány v oddělených svazcích. V myocytonech se nachází jádro, endoplasmatické retikulum, volné ribozomy, Golgiho aparát, několik mitochondrií a mnoho glykogenu. Také se v nich ukládají tuky (Lumsden et Byram, 1967). Uvnitř vzdálenější tegumentální cytoplazmy jsou svazky podélných a kruhových vláken. Pod těmito povrchovými svaly leží silnější svalstvo. Kolem centrální parenchymální oblasti jsou uspořádány podélné svazky. Nejkomplexnější je osvalení skolexu, díky čemuž je tento orgán mimořádně pohyblivý (Schmidt et Roberts, 2009).

2.6.2. Fyziologie tasemnice krysí

Protože tasemnice nemají trávicí soustavu, veškeré živiny ze střeva hostitele musí procházet povrchem těla. Ten je tvořen tegmentem (Dalton et al., 2004), který plní funkci trávicí soustavy (Smyth et McManus, 1989). Tegument se neskládá jen ze systémů umožňujících transport molekul a iontů, ale zastává i další funkce. Například umožňuje osmoregulaci (Schmidt et Roberts, 2009), je hlavním místem katalytické aktivity a obsahuje enzymy. Dále plní funkci ochrannou vůči trávicím enzymům a vůči imunitní reakci hostitele (Arai, 1980).

Na povrchu tegmentu mají tasemnice mikrotrichy, které zvětšují jeho plochu, čímž umožňují vstřebávání většího množství živin (Arai, 1980). Mikrotrichy jsou v určitém ohledu podobné mikroklkům, které jsou ve střevech obratlovců. Pokrývají strobilu tasemnic kompletně, včetně rostella a u druhů, které mají na rostellu háčky, pokrývají i háčky (Schmidt et Roberts, 2009). Mikrotrichy jsou na venkovní membráně kryty glykokalyxem. Glykokalyx je vrstva makromolekul, která pomáhá chránit tasemnici proti vlivu trávicích enzymů hostitele (Arai, 1980). Interakcí glykokalyxu a určitých molekul dochází ke zvýšení aktivity amylázy v *H. diminuta* a potlačení trypsinu, chymotrypsinu a pankreatické lipázy hostitele. Dále dochází k poklesu absorpce kationtů a žlučových solí do těla parazita (Dewey, 2001; Schmidt et Roberts, 2009).

Příjem živin ze střeva hostitele je buď aktivním transportem, difuzí nebo zprostředkovanou difuzí, která je majoritní. Přední část těla tasemnice, obsahující skolex, krček a nezralé proglotidy, je metabolicky více aktivní (Pappas et al., 1999). Jediné tasemnicemi prokazatelně metabolizovatelné sacharidy jsou glukóza a galaktóza, které jsou oba aktivně přijímány a

akumulovány v jejich strobilách oproti koncentračnímu spádu (Schmidt et Roberts, 2009). Nejvýznamnějším zdrojem energie je u tasemnic glukóza. Galaktóza je pravděpodobně začleňována do membrán nebo jiných stavebních složek, například do glykokalyxu (Oaks et Lumsden, 1971). U *H. diminuta* byla prokázána závislost příjmu glukózy na sodíkové pumpě a byly nalezeny minimálně dvě transportní místa pro glukózu. Relativní velikost těchto míst je odlišná v průběhu vývoje (Arai, 1980). Mechanismus příjmu tuků nebyl zkoumán, ale pravděpodobně probíhá formou difuze. Tasemnice pravděpodobně nezískávají energii z bílkovin a tuků (Schmidt et Roberts, 2009). Tasemnice krysí je schopná rozložit čtyři aminokyseliny (Wack et al., 1983).

Dospělé tasemnice jsou fakultativně anaerobní (Arai, 1980). Pokud mají přístup ke kyslíku, mohou jej přijímat, ale pravděpodobně v jejich metabolismu nemá žádnou funkci, jako je tomu při klasickém buněčném dýchání (Schmidt et Roberts, 2009). Metabolismus *H. diminuta* je ovlivněn změnami vnitřních potřeb během dozrávání, ale také vlivy střevního prostředí jejího hostitele. Konečným produktem metabolismu cukrů a enzymové aktivity je u 6 dní starých tasemnic laktát z cytosolické glykolýzy. S přibývajícím věkem tasemnic klesá produkce laktátu a vzrůstá produkce sukcinátu a acetátu. V přední části strobily tasemnice probíhá glykolýza a v zadní části mitochondriální dismutace, takže v přední části je více produkován laktát a v zadní acetát a sukcinát (Bennet et al., 1993)

Bylo prokázáno, že metabolity produkované touto tasemnicí narušují činnost trávicího traktu, zvyšují sekreci slin, inhibují sekreci žaludečních tekutin a zvyšují duodenální aktivitu trypsinu (Kosik – Bogacka et al., 2010). U potkanů nakažených *H. diminuta* byly pozorovány patologické morfologické změny na sliznici tenkého střeva. Především v duodenu a v jejunu dochází ke změnám ve výšce klků a hloubce krypt (Kosik – Bogacka et Kolasa, 2012). U infikovaných potkanů také docházelo k úbytku počtu střevních klků a tím k narušení vstřebávání živin. Přítomnost tasemnice inhibovala transport iontů sodíku a chloridů v epitelu tlustého střeva potkanů a snižovala mechanickou citlivost střevního epitelu (Kosik – Bogacka et al., 2010). Dále může docházet k redukci transepiteliálního elektrického potenciálu v ileu potkanů nebo k poklesu ukládání okludinu v ileu a kolonu, což naznačuje pokles pevnosti těsných spojů. U nakažených potkanů je tedy změna v aktivním transportu a v pasivním pohybu iontů (Kosik – Bogacka et al., 2010).

2.6.3. Vývojový cyklus tasemnice krysí

Vývojový cyklus *H. diminuta* je nepřímý. Během svého obligátně dvouhostitelského vývoje využívá členovce jako mezihostitele a jako definitivního hostitele hlodavce (myši, potkany, krysy) nebo i člověka (Andreassen et al., 1999; Volf et Horák, 2007). Mezihostitelem se nejčastěji stávají

brouci, například rody *Tenebrio* (*Tenebrio molitor* – potěmnik moučný), *Tribolium* (*Tribolium castaneum* – potěmnik hnědý, *Tribolium confusum* – potěmnik skladištní), *Akis* nebo *Dermestes*, blechy rodu *Nosopsyllus*, *Xenopsylla* a *Ctenocephalides*, případně motýli nebo mnohonožky (Volf et Horák, 2007). Mezihostitelé se nakazí perorálním příjmem vajíček. Je prokázáno, že výkaly s vajíčky této tasemnice jsou pro mezihostitele atraktivnější než výkaly neinfikovaných jedinců. Tento jev byl pozorován u *T. confusum* (Evans et al., 1998) a u *T. molitor* (Pappas et al., 1995). Tato preference byla prokázána pouze u brouků, kteří ještě nebyli touto tasemnicí infikováni. Dle studie, kterou prováděl Shea (2007), nevykazují infikovaní brouci tuto preferenci. Je možné, že se v tomto případě jedná o adaptaci tasemnice, při které dochází k zamezení kompetice o zdroje hostitele. Také je možné, že jde o adaptaci hostitele, která vede k odvrácení možnosti letální infekce.

Články na konci těla tasemnice jsou naplněné vajíčky (Obrázek 1). Vajíčka mají téměř kulovitý tvar (60 - 79 x 72 - 86 μm), jsou uvolňována apolýzou – rozpadem článků a jsou odolná vůči vlivům vnějšího prostředí (Arai, 1980; Volf et Horák, 2007). Jejich obal je tvořen z 31,7 % bílkovinami v komplexní směsi a z 2,9 % karbohydráty. Obsahuje zbytky z 16-ti přirozeně se vyskytujících aminokyselin, přičemž největší podíl (více než 22) čítá histidin (Pappas et Durka, 1994).



Obrázek 1: vajíčko tasemnice (*Hymenolepis diminuta*) s onkosférou (foto: autorka práce)

Ve vajíčku se vytváří první larva – onkosféra. Ta je u této tasemnice vybavena 3 páry háčků. Kvůli obsahu těchto šesti háčků se onkosféra této tasemnice nazývá hexakant. Jeden pár je umístěn mediálně a dva laterálně. Mezi háčky jsou penetrační žlázy. Onkosféra je kryta 3 ochrannými obaly – vnitřním, vnějším a vnějším pouzdem s pláštěm. V těle vhodného mezihostitele dojde k uvolnění onkosféry z vajíčka (Ogren, 1961; Arai, 1980). K tomuto procesu je nutné, aby mandibuly hostitele porušily vnější obal vajíčka. Zbylé vrstvy obalu jsou natráveny v lumen střeva mezihostitele (Lethbridge, 1971). Uvolněná onkosféra s pomocí háčků a penetračních žláz pronikne stěvem do

hemocelu, kde dochází k jejímu růstu a k diferenciaci skolexu. Vyvíjí se metacestod, druhá, infekční larva. Protože se v případě této tasemnice objevuje u infekční larvy centrální dutina neboli cista, nazýváme tuto larvu cysticerkoid (Obrázek 2). Od centrální dutiny dochází jedním směrem k prodlužování larvy a formuje se ocásku podobná část, kterou označujeme cercomer (Arai, 1980). Již devátý den je v přední části cysticerkoidu rozeznatelný skolex s přísavkami. Délka vývoje v mezihostiteli závisí na okolní teplotě. Při 26° C dojde k vývinu cysticerkoidu za deset dní (Andreassen et al., 1999). Zralý cysticerkoid zůstane ve stavu pozastaveného vývoje do doby, kdy se dostane do těla definitivního hostitele (Arai, 1980).



Obrázek 2: infekční larva, cysticerkoid tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) (foto: autorka práce)

Tasemnice jsou u infikovaných mezihostitelů schopné ovlivnit jejich chování tak, aby se mezihostitelé stali snadnější kořistí pro definitivního hostitele. Brouci *T. molitor* byli podrobeni testu, ve kterém měli najít správnou cestu v bludišti o tvaru písmene "T". Infikovaní brouci se pohybovali výrazně pomaleji a trvalo jim déle naučit se správnou cestu, než neinfikovaným jedincům (Sheiman et al., 2006).

K nákaze *H. diminuta* dojde pozřením infikovaného mezihostitele. Nejčastěji dochází k nákazám v místech, ve kterých je skladováno obilí, protože zde mezihostitel i definitivní hostitel žijí vedle sebe (Volf et Horák, 2007). V žaludku definitivního hostitele jsou tkáně mezihostitele stráveny a pod vlivem žlučových solí dojde k aktivaci larvy, která spojovacím kanálkem opouští centrální dutinu cysticerkoidu. Trávicí enzymy hostitele poté natráví ochranné obaly a dojde k uvolnění larvy. Tento proces, při kterém dochází k uvolnění tasemnice z obalů vnější membrány cysticerkoidu, se nazývá excystace. Průměrná délka tasemnic po excystaci je 175 μ m. Velmi brzy dojde k vylíhnutí skolexu se čtyřmi přísavkami, s jejichž pomocí se parazit přichytí ke stěně tenkého střeva. První týden po infikaci rostou tasemnice exponenciálně a poté vstupují do fáze zpomaleného růstu. Kolem druhého týdne po infekci dosahují maximální délky těla – až 70 cm.

Během dvaceti dnů se parazit vyvine v dospělého jedince. Uvolňování vajíček lze obvykle pozorovat již sedmnáctý den (Arai, 1980). Při in vitro pokusu trval vývoj od cysticerkoidu po dospělé a pohlavně zralé tasemnice 24 dní (Schiller, 1965). V práci, kterou publikoval Berntzen (1961) dospěli tasemnice již v 15 dnech. V jeho pokusu byly ale kultivovány tasemnice, které byly vyjmuty z těla potkana po šesti dnech (Berntzen, 1961).

Průměrně 95,1 % cysticerkoidů, které byly podány potkanům, se vyvine v dospělé tasemnice (Stradowski, 1994). Tato úspěšnost však závisí na počtu cysticerkoidů, kterými je potkan nakažen. Při infekci potkana 1 – 20 cysticerkoidy, je průměrná výtěžnost 65 – 100 %. Pokud však byl infikován 20 – 40 cysticerkoidy, průměrná výtěžnost se snižuje a pohybuje se v rozmezí 2 – 13 % (Hesselberg et Andreassen, 1975).

Stejně jako u ostatních druhů tasemnic, projevuje se i u větších populací *H. diminuta* tzv. „crowding efekt“. Tento jev zahrnuje regulaci velikosti a plodnosti populace tasemnic v jednom hostitelském organismu (Andreassen et al., 1999). Jedná se o komplexní efekt, reagující na množství potravy a fyzický prostor. Velikost tasemnic v definitivním hostiteli je tedy nepřímo úměrná jejich počtu. Dle studie, kterou prováděl Roberts (1961), vylučuje *H. diminuta* látky, které ovlivňují růst ostatních jedinců.

Dospělec *H. diminuta* je za den schopen vyprodukovat okolo 250 000 vajíček (Arai, 1980; Andreassen et al., 1999). Množství vajíček vyprodukovaných jednou tasemnicí a množství vyprodukované všemi tasemnicemi parazitujícími v jenom potkanovi se snižuje s rostoucí hustotou populace tasemnic (Hesselberg et Andreassen, 1975).

2.6.4. Tasemnice krysí u lidí

Nákaza člověka není, vzhledem k vývojovému cyklu, příliš častá. Nejčastěji se hymenolepióza způsobená tímto druhem projevuje u dětí v rozvojových zemích (Patamia et al., 2010). Občas se vyskytne individuální případ v ostatních zemích, často také u dětí (Tena et al., 1998). Onemocnění je většinou asymptomatické (Acha et Szyfres, 1984), v některých případech se může objevit bolestivost břicha, svědění v anální oblasti, nespavost, pomočování (Tena et al., 1998) nebo eosinofilie (Acha et Szyfres, 1984). K léčbě se používá praziquantel nebo niklosamid (Auer et Aspöck, 2014).

2.6.5. In vitro kultivace tasemnice krysí

Jak již bylo řečeno, je známo, že tasemnice přijímá živiny tegumentem tak, že absorbuje jejich komplexy se žlučovými kyselinami (Smyth et McManus, 1989). Existuje tedy možnost, že olovo je přijímáno podobným způsobem. Sures et Sidall (1999) prokázali, že přítomnost žluči

zvyšuje příjem olova u vrtejšů. V případě ploštěnců tuto teorii částečně potvrzují výsledky získané u motolic (Sures et al., 1998) a tasemnic *Hymenolepis microstoma*, žijících přímo ve žlučovodech hostitelů (Torres et al., 2011). Je pravděpodobné, že u tasemnic *H. diminuta* tento proces funguje obdobně, ale je nutné toto ověřit ve studii in vitro, jako to bylo provedeno u vrtejšů.

Kultivace tasemnic je složitější než kultivace ostatních helmintů. Problémy s kultivací mohou být spojeny s velkou velikostí, které řada druhů dosahuje. Další komplikace souvisí s chybějící trávicí soustavou. Metabolický odpad tasemnic je do okolního prostředí vylučován celým tegumentem a jeho odstranění z blízkosti tasemnice obstarává hostitelova trávicí soustava, protože metabolity tasemnice odchází společně s natrávenou potravou hostitele. Tasemnice mají také specifické požadavky na výživu, které mohou kultivaci komplikovat. V neposlední řadě mají tasemnice po vyjmutí ze střeva hostitele na povrchu těla mukózní povlak, který obsahuje mikroorganismy (např. kvasinky, bakterie a houby). Ty je nutné z jejich těla odstranit, aby mohly být tasemnice umístěny do sterilního prostředí. K odstranění mikroflóry může dopomoci opakované omytí tasemnic v roztoku s antibiotiky (Smyth et McManus, 1989).

Poprvé byla *H. diminuta* úspěšně kultivována Berntzenem (1961). Ten vyjmul cysticerkoidy z těl brouků, třikrát je omyl v Tyrodově roztoku a umístil do inkubátoru. Zde při teplotě 37 °C proběhla jejich excystace (pomocí zvyšování pH). Larvy byly poté sterilizovány proplachováním Tyrodovým roztokem v průtokovém přístroji. Poté byly umístěny v důmyslném přístroji, který umožňoval kontinuální kontrolovatelný průtok média. Použité médium s metabolity tasemnic odtékalo stranou a mohlo být kdykoli odstraněno a analyzováno, aniž by došlo k přerušení kultivace. Teplotu bylo možno regulovat o $\pm 0,5$ °C okolo 37 °C. Základ média tvořila směs lidské krevní plazmy a Tyrodova roztoku (1:1). K základu byl přidán cystein hydrochlorid, tyroxin, thiamin chlorid, vitamín B₃, methyltestosteron, riboflavin, bacto-kvasinkový extrakt a extrakt vyrobený z kuřecích embryí. V tomto médiu byly tasemnice kultivovány po dobu patnácti dnů. V metodice nebylo zmíněno přesné složení plynů při kultivaci, ale pravděpodobně probíhala za přítomnosti CO₂. Kultivace probíhala od fáze cysticerkoidů po dospělé tasemnice s vyvíjejícími se onkosférami. Přesné složení kultivačního média je diskutabilní, protože žádnému z autorů se později nepovedlo médium podle publikované metodiky připravit (Smyth, 1962; Sinha a Hopkins, 1967).

Od stádia cysticerkoidů po zralé dospělé jedince se kultivace podařila Schillerovi, který metodiku výrazně zjednodušil. Tasemnice kultivoval v dvousložkovém médiu složeným z báze na inaktivovaném sterilním králičím krevním agaru, který byl zalitý 10 ml Hankova vyváženého solného roztoku. Do tekuté složky média byla přidána antibiotika (100 jednotek penicilinu a 100 µg streptomycinu na 1 ml) a pH média bylo 7,5. Tasemnice byly kultivovány v Erlenmeyerových

baňkách, které byly umístěny do Dubnoffova metabolického protřepávacího inkubátoru, kde probíhala kultivace ve 37 °C a plynne směsi 97 % N₂ a 3 % CO₂. Proudění bylo nastaveno na 100 ml/min. Po prvních šesti dnech byl vyměněn supernatant. Znovu proběhla výměna osmého dne, kdy byla také přidána sušená glukóza. Od desátého dne byly tasemnice drženy individuálně a médium bylo měněno denně. Dvacátého dne bylo množství média zvýšeno na 20 ml. V průběhu kultivace tasemnice plavaly v supernatantu a nebylo pozorováno, že by se zanořovaly do krevního agaru (Schiller, 1965).

Z této metodiky kultivace vycházeli v roce 1969 Roberts et Mong, kteří in vitro sledovali, zda se liší vývoj tasemnice krysí za přítomnosti/nepřítomnosti kyslíku. V jejich pokusu byly cysticerkoidy podány potkanům a po šesti dnech byly z jejich těl vyjmuty. Takto získané tasemnice totiž dosahují větší délky těla a dříve dospívají v porovnání s těmi, které jsou kultivovány in vitro od cysticerkoidů (Schiller, 1965). Tasemnice byly 4x omyty sterilním Hankovým roztokem a poté hodinu inkubovány při 37 °C v Hankově roztoku s 5000 jednotkami penicilinu, 500 mg streptomycinu a 5000 jednotkami mycostatinu na 10 ml. Kultivace tasemnic poté probíhala individuálně po dobu pěti dnů v 25 mililitrových Erlenmeyerových baňkách s 5 ml krevního agaru a 5 ml Hankova roztoku. Dalších 7 dnů byly umístěny v 50 mililitrových baňkách s 10 ml obou složek média. Kultivace probíhala v Dubnoffově vodní lázni s třepáním při teplotě 37 °C a médium bylo měněno jednou za 24 hodin (Roberts et Mong, 1969).

Jejich metodika byla později využívána pro další výzkumné práce. Stejní autoři ji úspěšně použili pro výzkum potřeby vitamínu B₆ pro metabolismus *H. diminuta* (Roberts et Mong, 1973). Tuto metodiku použili také Tofts et Meerovitch (1974). Fioravanti et MacInnis (1976) využili stejnou metodiku pro experimenty s farnesolmethyletherem, což je látka, která podle Thornsona et al. (1968) podporuje růst *H. diminuta*. Tofts et Meerovitch (1974) a Fioravanti et MacInnis (1976) naopak prokázali, že ve vyšších koncentracích zamezuje vývoji této tasemnice.

Turton (1972) později úspěšně nahradil dvousložkové kultivační médium agarem z krevního séra s médiem obsahující kvasnicový extrakt, extrakt z jater a koňské sérum. Jeho médium bylo, na rozdíl od předchozích, průhledné, takže umožňovalo zkoumání tasemnic přímo v kultivační nádobě. Roberts (1973) zjistil, že králičí krev lze nahradit defibrilovanou ovčí krví.

V novějších studiích bylo použito i komerčně vyráběné médium. Například Vokřál et al. (2012) použili tekuté sterilní RPMI-1640 médium. V jejich studii byly tasemnice vyjmuty ze střeva potkanů po 2 měsících. Byly třikrát omyty v solném roztoku se 60 g/ml penicilinu a 100 g/ml streptomycinu. Stejně množství antibiotik bylo přidáno i do kultivačního média. Protože

tito autoři sledovali vliv antiparazitik na tasemnice, nebylo v jejich zájmu udržet tasemnice živé déle než 24 hodin. Nevíme tedy, jak dlouho by tasemnice v takto připraveném médiu přežily.

Lopes et al. (2015) sledovali vliv přítomnosti *H. diminuta* na potkaní, lidské a myší epiteliální buňky. V jejich experimentu byly tasemnice po vyjmutí ze střeva hostitele 2 hodiny ošetřovány antibiotiky. Pro kultivaci bylo použito DMEM médium. Do média přidali HEPES, L-glutamin, penicilin, streptomycin a fetální bovinní sérum (FBS). V jejich experimentu lépe prospívaly tasemnice umístěné v médiu s přídavkem 1 % FBS a s potkaními buněčnými kulturami v porovnání s těmi, které byly umístěny jen v médiu s přídavkem 10 % FBS. Jako nejlepší médium se ukázalo to, které obsahovalo potkaní buňky a 10 % FBS.

2.6.6. Akumulace olova u tasemnice krysí

Schopnost tasemnice krysí akumulovat olovo byla v laboratorních podmínkách testována už před šestnácti lety. Potkanům parazitovaným touto tasemnicí bylo po dobu 5 týdnů podáváno olovo ve formě octanu olovnatého. Koncentrace olova v játrech, varlatech a střevech potkanů byly pod mezí detekce. Jediný potkaní orgán, kde bylo Pb detekováno byly ledviny, které ale akumulovaly přibližně 17krát méně olova než tkáň tasemnic. V této studii byl poprvé publikován názor, že tasemnice krysí by mohla být používána jako bioindikátor znečištění životního prostředí olovem (Sures et al., 2002).

Následovaly terénní studie, při kterých byl tento názor potvrzen. Tasemnice krysí byla použita jako bioindikátor olova na dvou lokalitách v egyptské Káhiře. Ve tkáních tasemnice bylo na více znečištěné lokalitě naměřeno 36krát více olova než ve tkáni střeva, 29krát více než v játrech a 6krát více než v ledvinách hostitele. Byl zde opět prezentován názor, že *H. diminuta* je bioakumulátor olova a je možné ji využít jako bioindikátor tohoto prvku v městských ekosystémech, kde se vyskytují potkani (Sures et al., 2003).

Znovu byla tato myšlenka potvrzena o 11 let později ve studii sledující koncentrace olova ve tkáních pískomila rudoocasého (*Meriones libycus*) v průmyslové lokalitě hlavního města Saúdské Arábie, Rijádu. Tkáň pískomilů obsahovaly 15,6krát (játra), 16krát (ledviny) a 21,9krát (střevo) méně olova než tkáň jejich tasemnic. I v této studii byla vyslovena myšlenka, že tasemnice *H. diminuta* může být využívána jako bioindikátor těžkých kovů v průmyslově znečištěných oblastech (Al-Quraishy et al., 2014).

Zhou et al., (2008) popisují v sepsaném review podmínky, které by měl splňovat bioindikátor znečištění životního prostředí těžkými kovy. Tasemnice *H. diminuta* splňuje většinu těchto podmínek (např. početná a rozšířená populace hostitele, snadno získatelný hostitel, vysoká prevalence parazita). Výše popsané studie, její potenciální využití pro bioindikaci potvrzují.

Hostitelsko/parazitický systém *H. diminuta*/potkan byl později znovu zkoumán v laboratorních podmínkách. Potkanům byl podáván po dobu šesti týdnů octan olovnatý, aby mohla být sledována toxokinetika olova v tomto hostitelsko/parazitickém systému. Nejvyšší koncentrace byly opět naměřeny ve tkáni tasemnice (v porovnání s ledvinami, játry, kosti, varlaty, svaly a stěnou tenkého střeva). Tato studie potvrdila možnou využitelnost tasemnice krysí jako bioindikátoru olova a také přinesla zajímavé výsledky v oblasti toxokinetiky Pb. Přítomnost tasemnice zde sice snížila koncentrace olova v některých tkáních, ale nebylo potvrzeno, že by přímo ochraňovala tkáň potkana před zvýšeným příjmem olova (Čadková et al., 2014).

Podle Surese (2004) akumuluje *H. diminuta* pouze olovo ve vyšších koncentracích. Bylo ale prokázáno, že u ní dochází také k akumulaci zinku (Jankovská et al., 2016), kadmia (Teimoori et al., 2014; Jankovská et al., 2016) a chromu (Teimoori et al., 2014).

2.6.7. Lokalizace rizikových prvků ve tkáni tasemnice krysí

Dosud nebylo objasněno, zda je absorpce Pb aktivní či pasivní proces, ani kam se Pb ve tkáni tasemnice ukládá. Studie na toto téma byla prováděna u tasemnic parazitujících v rybách – *Monobothrium wagneri* a *Bothriocephalus scorpii*. Obě tyto tasemnice ukládají olovo a kadmium především do gravidních proglotidů (Sures et al., 1997). Také u tasemnice vodních ptáků – řemenatky ptačí (*Ligula intestinalis*), *Confluaria capillaris*, *Microsomacanthus compressa*, *Diploposthe laevis*, *Microsomacanthus parvula* a *Parvitaenia ardeolae* byly naměřeny vyšší koncentrace těžkých kovů ve zralých proglotidech (Tenora et al., 2002). Koncentrace selenu ve tkáni tasemnice ryb *Bothriocephalus acheilognathi* na znečištěných lokalitách byly vyšší v gravidních člancích v porovnání s předními, nezralými. V této studii byly sledovány také koncentrace selenu na neznečištěných lokalitách. Na těch byly koncentrace ve zralých a nezralých proglotidech téměř shodné (Riggs et al., 1987).

3. Cíle práce

Na základě výše uvedené literární rešerše obsahující souhrn dosavadních poznatků v rámci studované problematiky byly stanoveny následující cíle práce:

1. Stanovit množství Pb vázaného v tkáních *Hymenolepis diminuta* exponovaným odlišným formám Pb (dusičnan olovnatý a Pb vázané v biomase babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*) s cílem vyhodnotit a porovnat akumulční potenciál tasemnice pro sledované formy Pb.
2. Stanovit množství Pb vázaného v tkáni *H. diminuta* kultivovaných v podmínkách in vitro v médiu obohaceném Pb za přítavku/absence simulovaných šťáv trávicího traktu s cílem zaznamenat případné změny v efektivitě akumulace Pb tasemnicí.
3. S využitím metody ICP-MS kombinované s laserovou ablací zmapovat rozložení Pb v histologických řezech tkání *H. diminuta* a tím identifikovat místa zvýšené akumulace tohoto prvku ve vnitřních strukturách proglotidů.

4. Hypotézy

K potvrzení stanovených cílů práce byly zvoleny následující vědecké hypotézy:

H₁: Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) vykazuje odlišný akumulční potenciál pro různé formy Pb.

H₂: Absorpce Pb do tkáně tasemnice je zprostředkována šťávami gastrointestinálního traktu, především žlučovými kyselinami.

H₃: Tasemnice přijímá Pb aktivně a ukládá ho v interních částech proglotidů.

5. Materiál a metody

5.1. Chov a infekce mezipřenositelů

K infekci potkanů tasemnicí krysí byl použit potemník moučný (*Tenebrio molitor*), pocházející z experimentálního chovu katedry zoologie a rybářství. Jeho larvální stádia, lidově označována jako mouční červi, se často používají ke krmení terarijních zvířat a jsou proto snadno dostupná. Po vylíhnutí z vajíček rostou jeho larvy dva až tři měsíce, v závislosti na vlhkosti a teplotě prostředí. Po zakuklení se během dvou týdnů líhne dospělý jedinec, který se dožívá přibližně 3 měsíců. Voge a Graiwer (1964) ve své studii infikovali larvu tohoto brouka. Infekce larválního stádia ale může být problematická, proto byli v našem experimentu infikováni dospělí jedinci.

Chov potemníků probíhal při pokojové teplotě v plastových boxech na substrátu složeném z pivních kvasnic a mletých pšeničných a ovesných vloček. Jako krmení bylo přidáváno sušené pečivo, piškoty a čerstvé ovoce a zelenina. Pro pravidelný přísun vody byla do boxů aplikována buničinná vata, která byla pravidelně vlhčena.

Před plánovanou infekcí byli dospělí brouci odděleni a v Petriho misce drženi bez přístupu k potravě a vodě. Po uplynutí 24 – 48 hodin byla broukům podána vajíčka tasemnice *H. diminuta*. Vajíčka byla separována pomocí centrifugy z výkalů infikovaných potkanů, chovaných v Demonstrační a pokusné stáji Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů (FAPPZ). Po dobu 24 hodin byli brouci ponecháni v Petriho misce pouze s vajíčky stočenými v cukernatém roztoku. Po uplynutí této doby byly do misek přidány také výkaly infikovaných potkanů. Dalších 48 hodin byli brouci ponecháni pouze s tímto zdrojem potravy. Poté bylo přidáno suché pečivo, jako další zdroj potravy. Druhý použitý způsob infekce bylo pomocí podání broukům přímo gravidních článků tasemnice *H. diminuta* po uplynutí 24 – 48 hodin hladovění (viz obrázek číslo 3). Poté byli brouci po dobu 48 hodin ponecháni v Petriho misce pouze se zralými články a až po uplynutí této doby jim bylo přidáno suché pečivo, jako další zdroj potravy. Tento způsob infekce byl použit pro pokusy s tasemnicemi in vitro.



Obrázek 3: Infekce potemníků pomocí zralých článků tasemnice (foto: autorka práce)

Vývoj infekčních larev (cysticerkoidů) tasemnic v těle potemníků probíhal v inkubátoru při teplotě 29 °C po dobu 14 dní. Po uplynutí této doby byla u cysticerkoidů z těla jednoho, namátkou vybraného brouka, zkontrolována jejich zralost. V případě, že nebyly cysticerkoidy dostatečně vyvinuté, byli brouci ponecháni v inkubátoru dalších 4 – 5 dní, poté se proces opakoval.

V případě, že cysticerkoidy byly dostatečně vyvinuté, byli brouci usmrceni dekapitací skalpelem, z těla jim byly odstraněny krovky a křídla a jejich tělo bylo podélně nastříženo. Poté byli umístěni do Petriho misky nebo na laboratorní sklíčko, kam byl kápnut fyziologický roztok, do kterého byl následně vyvržen obsah tělní dutiny brouků. Další kroky probíhaly pod mikroskopem. Zde byly krouživými pohyby odděleny cysticerkoidy od orgánů brouka a samotné cysticerkoidy byly mikropipetou přeneseny do 1,5 mililitrových eppendorfek s fyziologickým roztokem. Do každé eppendorfky bylo pipetováno 4 – 5 cysticerkoidů z několika brouků, aby byla zvýšena pravděpodobnost úspěšné infekce definitivních hostitelů. V případě experimentů s tasemnicemi in vitro bylo do jedné eppendorfky umístěno cysticerkoidů více, aby došlo k eliminaci počtu použitých potkanů. Jednotliví potkani byli při tomto experimentu nakaženi až dvaceti cysticerkoidy.

5.2. Chov a infekce potkanů

V pokusu byli použiti samci potkana obecného (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar, kteří byli získáni z komerčního chovu firmy Velaz, s.r.o (Praha). Potkani na počátku pokusu vážili přibližně 200 g a byli prosti endoparazitů. Chov potkanů probíhal v experimentálních prostorách Demonstrční a pokusné stáje FAPPZ. Potkani byli chováni ve skupinách po maximálně šesti jedincích, ve standardních, mléčně zbarvených plastových boxech typu T IV (1802 cm²) při teplotě 22 ± 2 °C. Krmení i napájení byli ad libitum. Jako podestýlka byl použit Lignocel 3-4 S, který je vhodný pro bariérové chovy a který byl dvakrát týdně měněn. Ke krmení bylo použito komerčně vyráběné komplexní krmivo pro myši a potkany v bariérových chovech (ST-1, Velaz, ČR). Potkanům, jejichž tasemnice byly použity při in vitro experimentech, bylo navíc 2x týdně podáváno čerstvé ovoce a zelenina.

Po přibližně dvoutýdenní aklimatizaci byly potkanům podle předem připraveného schématu podány zralé cysticerkoidy tasemnic. Tato nákaza by teoreticky mohla být prováděna přirozenou cestou, kdy by potkanům byli podáni ke zkrmení živí brouci. V tomto případě by ale nebyl znám počet cysticerkoidů podaných potkanům a hrozila by neúspěšná infekce z důvodu pozření málo vyvinutých cysticerkoidů. Byla tedy zvolena umělá infekce zvířat. Před plánovanou infekcí potkanů byly z mezihostitelů získány zralé cysticerkoidy (viz předchozí kapitola). Každému jedinci byly poté pomocí pipety perorálně podány předem připravené cysticerkoidy z eppendorfek. Po infekci byli potkani po určitou dobu (viz jednotlivé podkapitoly) ponecháni v chovných

podmínkách popsaných výše. Veškerá manipulace s potkany byla prováděna v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání 246/1992 Sb., pod dohledem pověřené osoby (Zuzana Čadková, držitel certifikátu Ústřední komise pro ochranu zvířat Ministerstva zemědělství, číslo CZ00354).

5.3. Stanovení akumulčního potenciálu pro jednotlivé formy olova

5.3.1. Příprava jednotlivých forem olova

Pro kultivaci rostliny *P. stratiotes* byl použit roztok, obsahující 3200 ± 40 mg Pb z $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Penta, Praha, ČR) na 1 litr vody. Rostliny byly pěstovány v šedesátilitrových, neprůhledných plastových nádobách v pokusném skleníku FAPPZ. Koncentrace olova v živném roztoku byla pravidelně kontrolována pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA). Po sklizení byla biomasa rostliny bez kořenové části jemně omyta demineralizovanou vodou, osušena na filtračním papíru, zvážena, zamrazena a lyofilizována. Následně byla provedena homogenizace materiálu a za využití metody ICP-OES byla stanovena celková koncentrace Pb, společně s několika dalšími prvky (viz tabulka číslo 4). Dusičnan olovnatý byl pořízen z komerčních zdrojů (Penta, Praha, ČR).

Prvek	Pb	Zn	Cd	Fe	Mn	Cu
Koncentrace (mg/kg)	68967	145	1,13	1836	435	39

Tabulka 4: Koncentrace jednotlivých prvků v sušině rostlinné biomasy babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*)

5.3.2. Expozice jednotlivým formám olova

Po dobu pěti týdnů byli potkani ponecháni v původních chovných podmínkách. Po uplynutí této doby byla pomocí koprologického vyšetření ověřena přítomnost tasemnice *H. diminuta* v tělech vybraných potkanů. Po pozitivním nálezu byli potkani z chovných boxů přendáni do metabolických klecí, ve kterých byli drženi jednotlivě za konstantní teploty (22 ± 2 °C) a vlhkosti (50 ± 2 %), při dvanáctihodinovém světelném cyklu v prostorách Demonstrační a pokusné stáje FAPPZ. Krmeni byli opět směsí ST-1 ad libitum. Také voda byla podávána ad libitum. Po dobu 6 týdnů poté probíhala bilanční fáze experimentu.

Při bilanční fázi byli potkani rozděleni podle předem definovaných tří skupin (viz tabulka 5). Každá skupina byla tvořena dvanácti potkany, z nichž šest bylo infikováno tasemnicí (T). Potkani v kontrolní skupině (K, n=6 a KT, n=6) byli krmeni pouze směsí ST-1 a nebyli tedy vystaveni zvýšenému množství těžkých kovů. Potkani ve skupině s dusičnanem (D, n=6 a DT, n=6) byli krmeni směsí ST-1 a jednou týdně jim bylo podáno Pb ve formě dusičnanu olovnatého

($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Dusičnan olovnatý byl smíchán s demineralizovanou vodou tak, aby v 0,5 ml roztoku bylo 6 mg olova. Tento roztok jim byl po dobu šesti týdnů podáván vždy na začátku každého týdne již od počátku bilanční fáze pokusu. Potkani ve skupině s *Pistií* (P, n=6 a PT, n=6) byli krmeni směsí ST-1 a jednou týdně jim bylo podáno Pb vázané v rostlinné biomase rostliny *P. stratiotes*. Stejně jako ve skupině s dusičnanem, i tato skupina dostávala dávku 6 mg Pb ve formě roztoku, ve kterém byl smíchán prášek z rostliny s demineralizovanou vodou.

Skupina	Počet zvířat	Přítomnost tasemnice	Expozice Pb z $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Expozice Pb z rostlinného materiálu
K	6	Ne	Ne	Ne
KT	6	Ano	Ne	Ne
D	6	Ne	Ano	Ne
DT	6	Ano	Ano	Ne
P	6	Ne	Ne	Ano
PT	6	Ano	Ne	Ano

Tabulka 5: Rozdělení potkanů do jednotlivých skupin. K a KT = skupiny kontrolní, D a DT = skupiny exponované olovu ve formě dusičnanu olovnatého, P a PT = skupiny exponované olovu vázaném v rostlinné biomase babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*), T = skupiny s tasemnicí.

Všem exponovaným potkanům byly roztoky s Pb podávány individuálně pomocí pipety, aby tak bylo zajištěno, že potkani pozřou kompletní dávku. *P. stratiotes* přirozeně obsahuje některé další rizikové prvky, které tedy byly potkanům podávány ve vyšších koncentracích v porovnání s ostatními skupinami. Průměrné množství celkem přijatých rizikových prvků u všech skupin potkanů je rozepsán v tabulce číslo 6.

Skupina	Příjem Pb	Příjem Cd	Příjem Zn	Příjem Fe	Příjem Cu
Kontrola	1.64	0.12	69.45	301.07	20.14
Dusičnan	37.6	0.12	69.45	301.07	20.14
<i>Pistia</i>	37.6	0.20	69.53	302.03	20.16

Tabulka 6: Průměrný příjem rizikových prvků (mg) u jednotlivých skupin potkanů

V průběhu bilanční fáze experimentu byli potkani vždy na začátku týdne zváženi. Denně dostávali 25 g rozemletého krmiva ST-1 a příjem krmiva byl denně u všech potkanů zaznamenáván. Jedincům, kteří dostávali zvýšené množství olova, byly 4x týdně odebírány vzorky moči a výkalů. Množství celkově vyloučené moči a výkalů bylo také zaznamenáváno. Moč a výkaly potkanů byly

odebírány vždy 24, 48, 96 a 168 hodin po expozici Pb. Tého metodický postup umožnil nejen zkoumání vlivu olova na tkáň tasemnic, ale také sledování toxokinety olova v hostitelsko/parazitickém systému potkan/tasemnice.

Po ukončení bilanční fáze experimentu byla pokusná zvířata v laboratoři katedry zoologie a rybářství euthanizována (aplikace kombinace anestetik a analgetik – Narketan 100 mg/ml a Rometar 20 mg/ml). Přímo z aorty byly všem potkanům odebrány 2 ml krve. Plná krev byla uchována ve vakuových zkumavkách Vacutainer® EDTA (Medplus, Havířov, ČR). Poté byla provedena pitva, při které byly z těl potkanů teflonovým® náčiním (pinzety, nůžky) odebrány vzorky tělních tkání potkanů – játra, ledviny, slezina, varlata, stehenní sval, stehenní kost a tenké střevo. Také byly z tenkého střeva inokulovaných jedinců vyjmuty tasemnice. Odebrané tkáň byly omyty redestilovanou vodou, osušeny na filtračním papíru, zváženy, uloženy v plastových Petriho miskách a zamrazeny až do chemických analýz.

5.3.3. Laboratorní analýzy

Vzorky orgánů a výkalů potkana a tkání *H. diminuta* byly lyofilizovány a homogenizovány. Následně byly, stejně jako vzorky potkanům odebrané plné krve, rozloženy v 6 ml 65% p.a.+ kyselině dusičné a 2 ml p.a.+ peroxidu vodíku (Analytika Ltd., Praha, Česká republika) pomocí mikrovlnně asistované digesce za zvýšeného tlaku (mikrovlnná trouba Ethos 1, Milestone, Německo) po dobu 25 minut při 230 °C. Po rozkladu byla odsáta přebývající kyselina a vzorky byly převedeny do 50 ml roztoku s demineralizovanou vodou. Společně se vzorky tkání byly stejnou metodou připraveny také slepé vzorky, které čítaly 10 % z celkového počtu vzorků a při měření byly pod mezí detekčního limitu použité analytické metody. Stejnou metodou jako vzorky tkání, výkalů a krve byl také rozložen certifikovaný referenční materiál BCR 185R Bovine Liver (tabulka číslo 7), aby mohla být ověřena správnost naměřených výsledků. Celkové obsahy Pb ve tkáních, krvi, výkalech a moči byly změřeny pomocí metody ICP-OES (Varian AA280Z, Varian, Austrálie). U kontrolní skupiny byla pro analýzu použita metoda atomové absorpční spektrometrie (AAS, AA280Z, Varian, Austrálie). Analýzy celkových obsahů Pb a dalších rizikových prvků byly provedeny v laboratořích Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ, která zajistila potřebné přístrojové vybavení.

Prvek	Certifikovaná hodnota	Naměřená hodnota
Pb	0.172	0.169 +/- 0.005

Tabulka 7: Certifikovaná a naměřená hodnota (µg/g) olova

5.4. Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro

5.4.1. Získání tasemnic

Tasemnicím, které byly určeny pro in vitro kultivace, byl umožněn růst v tělech potkanů po dobu 4 týdnů. Po uplynutí této doby byly výkaly potkanů pomocí koprologického vyšetření otestovány na přítomnost vajíček tasemnice. V případě pozitivního nálezu byla potkanům aplikována kombinace anestetik a analgetik (Narketan 100 mg/ml a Rometar 20 mg/ml) a následně byl přerušena přívod krve do srdce. Poté jim byly z tenkého střeva (pomocí sterilního teflonového náčiní) opatrně vyjmuty jednotlivé tasemnice (obrázek číslo 4). Ty byly 3x opláchnuty po dobu 3 minut ve sterilním fyziologickém roztoku předehřátém na 37 °C (obrázek číslo 5) s přidavkem sterilně filtrovaných antibiotik – stabilní roztok s 10,000 jednotkami penicilinu a 10 mg streptomycinu/ml – PenStrep (Sigma Aldrich, Praha, ČR).

V případě, že se v tenkém střevu potkana nacházelo více než deset jedinců *H. diminuta*, byli přebývající jedinci ihned devitalizováni zmražením v -80 °C. Část těchto tasemnic byla použita pro kultivaci, u části byly stanoveny celkové obsahy olova.



Obrázek 4: Separace tasemnic z tenkého střeva potkana (foto: autorka práce)



Obrázek 5: Omývání tasemnic ve fyziologickém roztoku s antibiotiky (foto: autorka práce)

5.4.2. Příprava kultivačního média

Jako základ bylo pro kultivaci použito sterilně filtrované DMEM médium (Sigma Aldrich, Praha, ČR). Jedná se o komerčně vyráběnou modifikaci Eaglova bazálního média, která obsahuje směs anorganických solí, aminokyselin a vitamínů. Vybraná varianta média obsahovala zvýšený podíl glukosy, L-glutaminu a NaHCO_3 . Základní médium o objemu 50 ml bylo obohaceno o 0,5 mg pufru HEPES (Sigma Aldrich, Praha, ČR), který je používán v některých dalších vyráběných variantách DMEM média s nižším obsahem glukosy. Abychom předešli bakteriální a mykotické kontaminaci, bylo médium dále obohaceno o 2,5 ml antibiotik – sterilně filtrovaný stabilní roztok s 10,000 jednotkami penicilinu a 10 mg streptomycinu/ml – PenStrep (Sigma Aldrich, Praha, ČR). Podle Turtona (1974) nemají tyto látky na růst *H. diminuta* negativní vliv. Dále bylo přidáno 5 mg L-cysteinu (Sigma Aldrich, Praha, ČR), protože dle Seidela (1975) je tato aminokyselina nezbytná pro přežití *H. diminuta* in vitro. Poslední složkou kontrolního kultivačního média bylo 5 ml tepelně inaktivovaného, sterilně filtrovaného fetálního bovinního séra (FBS, Sigma Aldrich, Praha, ČR). Po přidání všech dalších složek bylo upraveno pH na 7,2, aby odpovídalo přirozenému prostředí pro tasemnici *H. diminuta*. Příprava kultivačního média a manipulace s ním probíhala ve sterilních nádobách a se sterilními nástroji. Takto připravené médium bylo uchováváno v lednici vždy maximálně 2 dny při teplotě 4 °C. Dle předem připraveného schématu bylo ke kultivačnímu médiu přidáváno ještě 0,5 mg Pb ve formě vodného roztoku připraveného z $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nebo roztok 0,5 mg práškového extraktu prasečí žluči (Bile extract porcine, Sigma Aldrich, Praha, ČR) s demineralizovanou vodou, případně obě tyto složky.

5.4.3. Kultivace

Pro kultivaci byly použity nízké skleněné kádinky, které byly před umístěním tasemnic sterilizovány. Tasemnice byly v předem připraveném médiu kultivovány individuálně po dobu 10 dnů. Každý den probíhala výměna média za čerstvé. Výměna probíhala tak, že do předem označených sterilních kádinek bylo odměřeno odpovídající množství předem připraveného média (50 ml) a poté do něj byla pomocí sterilní pinzety opatrně přenesena tasemnice. Použité médium bylo vždy ihned označeno a zamrazeno. Několikrát denně bylo kontrolováno, že u tasemnic nedošlo k úhynu. In vitro kultivace probíhala ve 2,5 litrové uzavíratelné nádobě Anaerojar (Oxoid, Brno-Tuřany, ČR) při 5 % CO₂. Tato nádoba byla umístěna ve vodní třepací lázni (Julabo SW22, Sigma Aldrich, Praha, ČR) při teplotě 37 °C (obrázek 6 a 7).

Tasemnice byly při kultivacích rozděleny do 4 skupin. V každé skupině bylo použito 10 jedinců *H. diminuta*. První skupina byla kontrolní, ve které byly tasemnice kultivovány pouze v předem připraveném kultivačním médiu bez dalších přísad. Druhé skupině byl do kultivačního média přidáván roztok s 0,5 mg Pb. Ve třetí skupině byla stejná dávka olova podávána tasemnicím předem devitalizovaným zmražením. Ve čtvrté skupině byl tasemnicím do média kromě stejné dávky olova také přidán roztok se žlučí.

Skupina	Tasemnice	Počet	Počet dnů kultivace	Olovo	Žluč
Kontrolní	Živé	10	10	Ne	Ne
S olovem	Živé	10	10	Ano	Ne
Devitalizované s olovem	Devitalizované	10	4	Ano	Ne
Olovo + žluč	Živé	10	10	Ano	Ano

Tabulka 8: Rozdělení in vitro kultivovaných tasemnic do jednotlivých skupin

V případě, že bylo do média přidáváno olovo nebo žluč, tyto složky byly vždy nality jako první na dno kádinky ještě před kultivačním médiem, aby nalitím média došlo k řádnému promíchání všech přidávaných složek. U zamražením devitalizovaných tasemnic probíhala kultivace pouze po dobu 4 dní. Po ukončení kultivace byly jednotlivé tasemnice třikrát omyty demineralizovanou vodou a osušeny na filtračním papíru. Bezprostředně poté byly zamrazeny v -80 °C až do chemických analýz.



Obrázek 6 a 7: Kultivace jednotlivých tasemnic; označení kádinek v nádobě Anaerojar (vlevo); umístění nádoby Anaerojar ve vodní třepací lázni (vpravo) (foto: autorka práce)

5.4.4. Laboratorní analýzy

Tkáně tasemnic byly lyofilizovány. Poté byly naváženy do nádob z křemenného skla o objemu 35 ml. Do těchto nádob byly přidány 3 ml 65% kyseliny dusičné a 2 ml peroxidu vodíku, obojí ve kvalitě Analpure (Analytika Ltd, Praha, ČR). Následoval mikrovlnně asistovaný rozklad s cíleným mikrovlnným zahříváním (Discover SPD-Plus, CEM Inc., USA). Směs v křemenných nádobách byla zahřívána maximální silou 300 Wattů na teplotu 202 °C a tlakem 21 barů po dobu 8 minut. Po zchlazení byly vzorky převedeny do 40 ml roztoku s demineralizovanou vodou. Společně se vzorky tkání byly stejnou metodou připraveny také slepé vzorky, které byly při měření pod mezí detekčního limitu použité analytické metody. Stejnou metodou jako vzorky tkání byl rozložen certifikovaný referenční materiál BCR 185R Bovine Liver, aby mohla být ověřena správnost naměřených výsledků.

Kultivační médium bylo po rozmrazení a před měřením přefiltrováno přes filtr NYLON 0.22 μm . Obsahy olova ve tkáních tasemnic i v použitém médiu byly změřeny pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA). Celkové koncentrace Pb byly změřeny v médiu před začátkem pokusu a poté při každé výměně. Dále bylo změřeno Pb v posledním médiu, které se již za nové neměnilo. Díky tomu bylo umožněno sledování dynamiky příjmu olova tasemnicemi během kultivace. Rozklady a analýzy

celkových obsahů olova byly provedeny v laboratoři environmentální chemie Mezifakultního centra environmentálních věd ČZU, která zajistila potřebné přístrojové vybavení.

5.5. Mapování olova ve tkáních tasemnice krysí

Mapování olova ve tkáních tasemnic bylo provedeno na tasemnicích, u kterých byl sledován příjem jednotlivých forem olova. Nejprve byly tkáně tasemnic po vyjmutí ze střev potkanů omyty redestilovanou vodou a rozděleny na 2 části. Přední část obsahovala scolex, krček a nezralé nejmladší články. Zadní část tvořily dospělé, gravidní články naplněné vajíčky (tedy starší proglotidy). Obě části byly osušeny na filtračním papíru, zváženy, uloženy v plastových Petriho miskách a zamrazeny až do chemických analýz. Metody rozkladů a následné měření množství prvků v těchto tkáních probíhalo shodně jako u orgánů, výkalů a krve potkanů.

Pro přesnější lokalizaci Pb byly tkáně tasemnic z dusičnanové skupiny rozděleny na 3 části. První, přední část tvořil scolex, krček a nejmladší články. Druhá část byla tvořena nezralými články přibližně z prostředku strobily tasemnice a třetí část zralými proglotidy z konce strobily tasemnice. Všechny části byly po omytí v redestilované vodě fixovány ve směsi vroucího čtyřprocentního formaldehydu (Lach-Ner, s.r.o., ČR) po dobu několika minut. Poté byly uchovány v etanolu (Lach-Ner, s.r.o., ČR) a zamrazeny v -20 °C až do dalších analýz.

5.5.1. Příprava histologických řezů tkání tasemnic

Vzorky různých částí strobily tasemnic byly nejprve dehydrovány za použití vzrůstajícího množství etanolu (70%, 80% a nakonec čistý etanol). Dehydratované tasemnice byly umístěny do parafinového vosku (Paraplast plus, SigmaAldrich, ČR). Pomocí mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Německo) byly připraveny podélné řezy. Pro analýzy LA-ICP-MS (laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem) byly připraveny řezy o tloušťce 40 μm. Pro morfologické posouzení byly připraveny řezy o tloušťce 10 μm, které byly poté odříznuty a fixovány na adhezivní mikroskopická sklička HistoBond® (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Laboratory Glassware, Německo). Následně byly tenčí řezy obarveny pomocí Weigertova železitého hematoxylinu za použití kontrastního jednaprocentního roztoku eosinu a přikryty krycími skličky. Vzorky určené pro LA-ICP-MS byly pro další analýzy ponechány neobarvené a nepřikryté.

5.5.2. Analýza histologických řezů tkání tasemnic

Přístrojové vybavení pro analýzu řezů *H. diminuta* sestávalo z laserového ablačního systému UP 213 (New Wave Research, USA) a z hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem

Agilent 7500 CE (Agilent Technologies, USA). Mapování tkání *H. diminuta* bylo prováděno za optimalizovaných podmínek laserové ablace v režimu řádkového snímání 65 μm velkého laseru na čtverec za skenovací rychlosti 91 $\mu\text{m/s}$, plynulosti 2 J/cm^2 a opakovací frekvence 10 Hz. Použit byl 213 nm Nd:YAG laser spojený s ICP-MS Agilent 8453 UV-Visible spektroskopickým systémem (Agilent Technologies, USA) s deuteriovou výbojkou pro rozsah vlnových délek UV záření. Sekce tkání *H. diminuta* umístěných v parafínu byly upevněny na povrchu křemenné kyvety a měřeny v UV oblasti. Mapování prvků ve tkáních tasemnic proběhlo v laboratořích Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

5.6. Vyhodnocení získaných dat

Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru Statistica 12. Nejprve byl u všech dat proveden Shapiro-Wilkův W test k otestování jejich normality. Základní metodou pro vyhodnocování výsledků bylo porovnání jednotlivých skupin mezi sebou pomocí t -testů, analýz rozptylu a jejich obdůb. Rozdíly mezi sledovanými parametry byly považovány za statisticky významné, pokud hladina významnosti přesáhla 95 % ($\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). K vizualizaci některých získaných dat byly použity grafy vytvořené v tabulkovém procesoru Microsoft Office Excel.

U koncentrací Pb ve tkáních tasemnic z jednotlivých skupin byly vypočteny základní popisné charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient). Poté byl použit Shapiro-Wilkův W test k otestování normality. Ke stanovení rozdílu mezi jednotlivými skupinami byla použita jednofaktorová ANOVA a následná Post-hoc analýza pomocí Tukeyova HSD testu.

Rozdíl mezi koncentrací olova ve tkáních parazitovaných a neparazitovaných potkanů z jednotlivých skupin byl stanovován pomocí Studentova t testu. Stejný test byl použit také při porovnávání koncentrací olova ve výkalech a moči parazitovaných a neparazitovaných jedinců. Mezi tkáněmi parazitovaných a neparazitovaných potkanů jednotlivých skupin byl také vypočítán podíl. Ke stanovení rozdílu mezi koncentrací olova ve tkáních potkanů z jednotlivých skupin byla použita jednofaktorová ANOVA a následná Post-hoc analýza pomocí Tukeyova HSD testu. Podle práce Surese et al. (1999) byl pro porovnání koncentrace olova ve tkáních tasemnic se tkáněmi hostitele vypočítán biokoncentrační faktor (BF). $\text{BF} = \text{koncentrace ve tkáni tasemnice} / \text{koncentrace ve tkáni hostitele}$.

Porovnávání koncentrací olova u skupin tasemnic kultivovaných in vitro bylo také provedeno pomocí Studentova t testu. Zde byla porovnána skupina kultivovaná s přísávkem olova v médiu se skupinou, kultivovanou s přísávkem olova a žluči v médiu. Pomocí stejného testu byla také porovnána skupina živých tasemnic s přísávkem olova v médiu s devitalizovanými tasemnicemi s přísávkem olova v médiu. Koncentrace olova v médiích s přísávkem olova a olova +

žluči byly porovnány pomocí jednofaktorové ANOVY a následnou Post-hoc analýzou pomocí Tukeyova HSD testu.

Pro lokalizaci olova ve strobile *H. diminuta* byly porovnávány přední a zadní části strobil tasemnic. Protože většina získaných dat nepocházela z normálního rozdělení, byl k otestování rozdílu koncentrací olova (a dalších prvků) použit Wilcoxonův test, neparametrický analog párového testu.

6. Výsledky

Pro zjištění akumulčního potenciálu olova tasemnicemi byly použity tasemnice z osmnácti potkanů. Šest z nich nedostávalo zvýšené množství olova (kontrolní skupina) a dvanáct dostávalo 2 odlišné formy Pb.

Při ověřování první hypotézy byla také sledována toxokinetika olova v hostitelsko/parazitickém systému potkan-tasemnice krysí. Tyto výsledky jsou zobrazeny v kapitole 6.2. Celkem bylo získáno 252 potkaních tkání, 900 vzorků moči a 900 vzorků výkalů. Byl vypočítán biokoncentrační faktor a také byly testovány další hypotézy – zda je akumulace olova ve tkáních potkana odlišná u jednotlivých forem olova, zda tkáně tasemnice krysí akumulují vyšší koncentrace olova než tkáně jejího hostitele a zda se liší vylučování olova u parazitovaných a neparazitovaných jedinců. Aby byla toxokinetika kompletní, byly také měřeny hodnoty Pb v krvi potkanů. Hodnoty vylučovaného olova u jednotlivých potkanů byly vždy přepočítány dle konkrétního množství moči/výkalů, které potkani vyprodukovali. Pokud bylo olovo detekováno u méně než 3 vzorků moči nebo výkalů z jednotlivých skupin, nebyla tato skupina zahrnuta do statistického zpracování.

Předtím než byly stanovovány obsahy Pb u tasemnic kultivovaných in vitro, byly zjištěny obsahy Pb celkem ve 14 tasemnicích, které nebyly použity při kultivaci devitalizovaných tkání tasemnic. Při kultivacích in vitro bylo použito a analyzováno 34 jedinců *H. diminuta* a 200 vzorků kultivačního média.

Ke zjištění lokalizace Pb byly použity tasemnice získané z potkanů po bilanční fázi experimentu. Kromě olova jsou v příslušné kapitole zobrazeny také výsledky celkových obsahů dalších rizikových prvků v předních a zadních částech strobily tasemnic.

Při přípravě barvených histologických řezů tkání tasemnic *H. diminuta*, které měly být porovnány s řezy analyzovanými pomocí LA-ICP-MS, bohužel došlo k jejich nevratnému poškození. V příslušné kapitole jsou zobrazena pouze vizualizovaná data získaná z LA-ICP-MS.

6.1. Akumulační potenciál tasemnice krysí pro jednotlivé formy olova

Pro vyhodnocení a porovnání akumulčního potenciálu *H. diminuta* pro jednotlivé formy olova byly použity tasemnice z potkanů, kteří byli po dobu šesti týdnů exponováni dusičnanu olovnatému a Pb vázanému v biomase babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*). Ve střevech potkanů z dusičnanové etapy bylo 1, 4, 5, 4, 3 a 5 tasemnic. U skupiny *Pistia* nebyla nákaza takto úspěšná, ve střevech jednotlivých potkanů bylo 2, 1, 2, 1, 2 a 1 tasemnice. Tasemnice z obou skupin nebyly analyzovány jednotlivě, ale kvůli zajištění dostatku biomasy pro laboratorní analýzy byly tasemnice

z jednoho potkana analyzovány dohromady. Průměrné koncentrace Pb v jednotlivých skupinách jsou zobrazeny v tabulce číslo 9.

Skupina	Pb (mg/kg)	Hodnota p (Shapiro-Wilkův test)	Variační koeficient
Kontrola	0,42 ± 0,185	0,02839	44,02
Dusičnan	18,43 ± 6,88	0,45535	37,48
<i>Pistia</i>	10,82 ± 8,492	0,05948	78,48

Tabulka 9: průměrné koncentrace olova (mg/kg v sušině) ve tkáních tasemnic ± směrodatná odchylka, hodnoty p naměřené při testování normality a variační koeficient

U skupiny *Pistia* byl poměrně vysoký variační koeficient, což znamená, že naměřená data nebyla sourodá. Hodnota p Shapiro-Wilkova testu je u kontrolní skupiny menší než $\alpha = 0,05$, ale je vyšší než $\alpha = 0,01$, takže data zde jsou normálně rozdělena na hladině významnosti 0,01. Testování statisticky významného rozdílu mezi koncentrací olova u tasemnic, které přijímaly dusičnan a Pb vázané v biomase rostliny *Pistia stratiotes* a mezi kontrolní skupinou je zobrazeno v tabulce číslo deset.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná A (Pb u tasemnic) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 39,833, sv = 15,000			
	B	1	2	3
1	<i>pistia</i>	10,821	18,429	,41995
2	dusičnan	0,126120		0,030657
3	kontrola	0,030657	0,000625	

Tabulka 10: testování rozdílu mezi koncentrací Pb ve tkáních tasemnic; výstup ze softwaru Statistica

První hypotéza zněla, že tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) vykazuje odlišný akumulací potenciál pro různé formy Pb. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl nalezen statisticky významný rozdíl jen při porovnání množství Pb ve tkáních skupin *Pistia* a Dusičnan s kontrolní skupinou. Mezi koncentracemi olova ve tkáních tasemnic u skupin *Pistia* a Dusičnan nebyl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nalezen statisticky významný rozdíl. **První hypotéza tedy nebyla potvrzena**, protože tasemnice sice přijímá obě formy olova ve zvýšeném množství, ale rozdíl mezi nimi není statisticky významný.

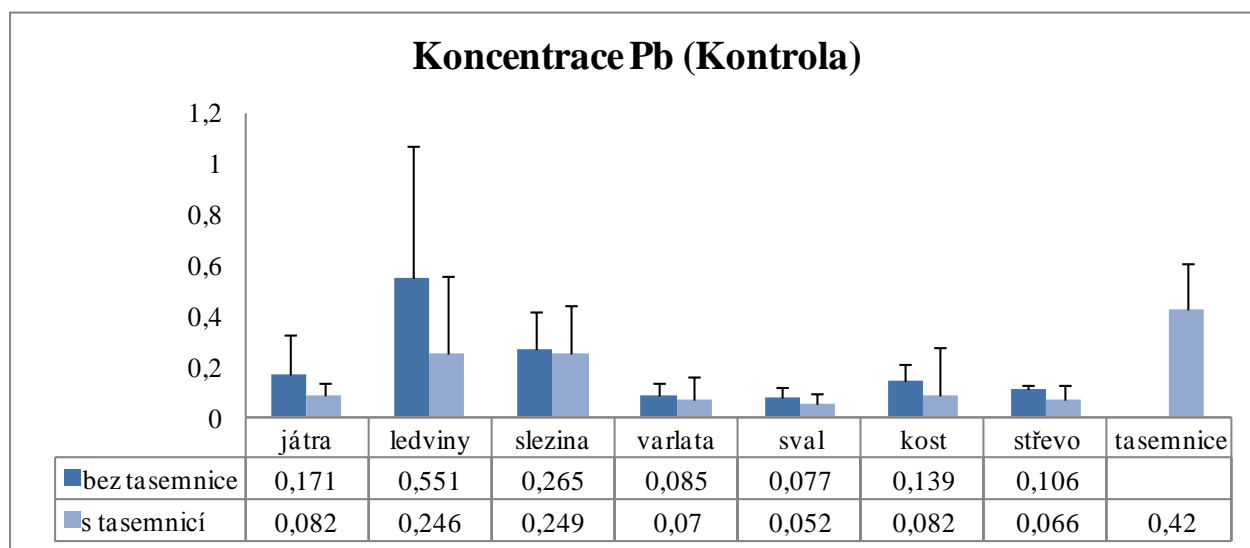
6.2. Toxokinetika odlišných forem olova v systému potkan/tasemnice kryší

Pro vyhodnocení toxokinetiky odlišných forem olova v hostitelsko/parazitickém systému potkan/*H. diminuta* byli použiti potkani, kteří byli po dobu šesti týdnů exponováni dusičnanu olovnatému a Pb vázanému v rostlinné biomase babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*) a tasemnice získané z tenkých střev těchto potkanů.

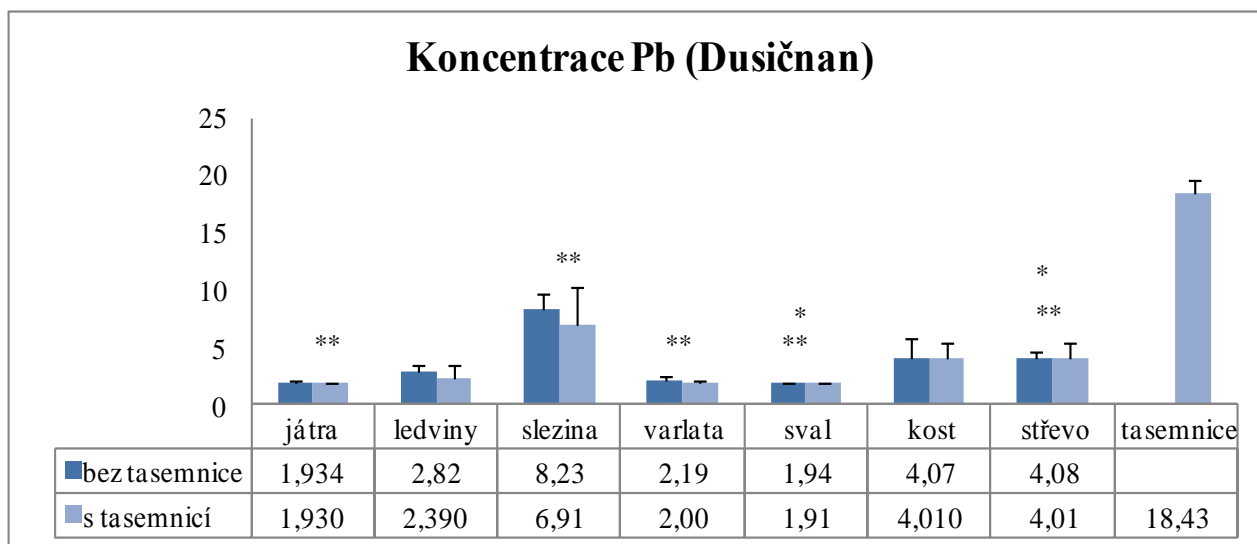
6.2.1. Koncentrace olova ve tkáních potkanů

Ve všech tkáních potkanů, získaných při pitvách (ledviny, játra, slezina, kost, varle, sval a stěna tenkého střeva) byly změřeny koncentrace nejen olova, ale také kadmia a zinku. Pro účely této práce byly ale zpracovány pouze výsledky celkových obsahů olova. Koncentrace olova u parazitovaných a neparazitovaných potkanů z jednotlivých skupin jsou znázorněny v grafech 1 – 3. Pro porovnání jsou v těchto grafech znázorněny také koncentrace ve tkáních tasemnic.

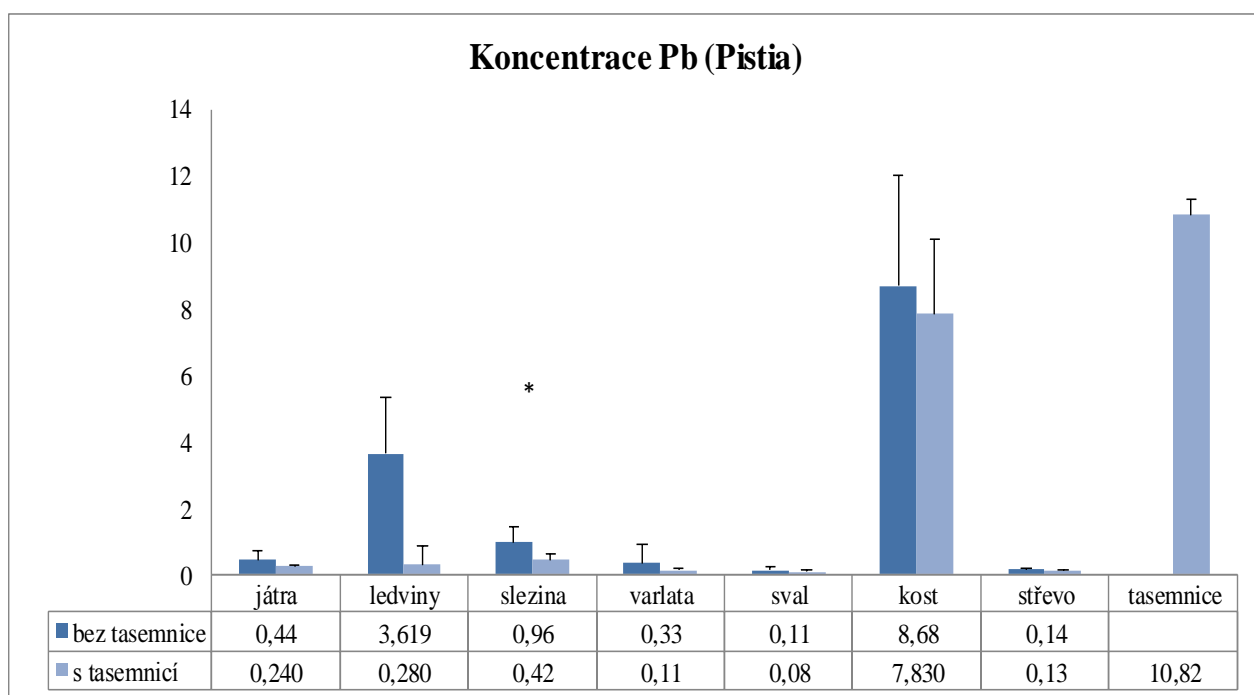
Koncentrace olova ve tkáních potkanů byly, s výjimkou kostní tkáně, ve skupině *Pistia* nižší než ve skupině Dusičnan. Obě skupiny akumulovaly významně vyšší koncentrace než kontrolní skupina. Do varlat, svaloviny, jater, tenkého střeva a sleziny potkanů z dusičnanové skupiny bylo akumulováno statisticky významně více olova než do těchto orgánů ve skupině *Pistia* (viz graf 2).



Graf 1: Koncentrace Pb (mg/kg v sušině) ve tkáních tasemnic a potkanů (parazitovaných a neparazitovaných jedinců) kontrolní skupiny; tyto potkani byli krmeni pouze standardní směsí ST-1.



Graf 2: Koncentrace Pb (mg/kg v sušině) ve tkáních tasemnic a potkanů (parazitovaných a neparazitovaných jedinců) skupiny Dusičnan; tito potkani byli krmeni standardní směsí ST-1 a jednou týdně jim byl perorálně podáván dusičnan olovnatý. * - statisticky významný rozdíl mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci, ** - statisticky významný rozdíl mezi koncentrací olova ve tkáních potkanů ze skupiny Dusičnan a *Pistia*.



Graf 3: Koncentrace Pb (mg/kg v sušině) ve tkáních tasemnic a potkanů (parazitovaných a neparazitovaných jedinců) skupiny *Pistia*; tito potkani byli krmeni standardní směsí ST-1 a jednou týdně jim bylo perorálně podáváno olovo vázané v rostlině *Pistia stratiotes*. * - statisticky významný rozdíl mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci.

Statisticky významný rozdíl mezi tkáněmi parazitovaných a neparazitovaných potkanů byl pouze u sleziny ($p = 0,0294$) ve skupině *Pistia* (Graf 3) a svaloviny ($p = 0,004$) a střeva ($p = 0,011$) ve skupině Dusičnan (Graf 2). Přestože u ostatních tkání nebyly výsledky statisticky průkazné, hodnoty akumulace olova u parazitovaných jedinců byly nižší než u neparazitovaných. Pro porovnání těchto hodnot byl vypočítán podíl pro jednotlivé tkáně mezi hodnotami akumulovaného

olova u parazitovaných a neparazitovaných jedinců (tabulka číslo 11). Ve všech případech byly vyšší koncentrace naměřeny u neparazitovaných potkanů. Podíl mezi koncentrací olova u parazitovaných a neparazitovaných jedinců se pohyboval mezi 1 – 1,7. Vyšší rozdíly byly u jater a ledvin kontrolní skupiny. Ve skupině *Pistia* bylo ve slezině parazitovaných potkanů naměřeno 2,3krát méně olova než u neparazitovaných. Ve varlatech neparazitovaných bylo olova třikrát více a v ledvinách dokonce 12,9krát více.

Skupina	Játra	Ledviny	Slezina	Varlata	Sval	Kost	Střevo
Kontrola	2.1	2.2	1.1	1.3	1.5	1.7	1.6
Dusičnan	1	1.2	1.2	1.1	1	1	1
<i>Pistia</i>	1.8	12.9	2.3	3	1.4	1.1	1.1

Tabulka 11: Podíl mezi koncentrací olova ve tkáních parazitovaných a neparazitovaných jedinců u jednotlivých skupin.

Podle práce Surese et al. (1999) byl pro porovnání koncentrace olova ve tkáních tasemnic se tkáněmi hostitele vypočítán biokoncentrační faktor (tabulka číslo 12). Tasemnice ze skupiny *Pistia* akumulovaly výrazně vyšší koncentrace olova než tkáně jejich hostitelů. Nejvyšší rozdíl byl u svaloviny. V porovnání s ní totiž tkáně tasemnice akumulovaly 135,2krát více olova. Následovala varlata, která akumulovala 98.4krát méně olova než tasemnice, střevo 83,2krát méně, játra 45,1krát méně, ledviny 38,6krát méně a slezina 25,8 krát méně. U skupiny Dusičnan nebyly rozdíly tak markantní. Koncentrace olova ve tkáních potkanů zde byly jen 9,6krát (svalovina), 9,5krát (játra), 9,2krát (varlata), 7,7krát (ledvina), 4,6krát (střevo a kost) a 2,7krát (slezina) nižší než ve tkáních tasemnic. U kontrolní skupiny byl tento trend pozorován také a to i přesto, že nebyla vystavena zvýšenému množství olova.

Skupina	Játra	Ledviny	Slezina	Varlata	Sval	Kost	Střevo
Kontrola	24,8	8,3	8,2	31,2	39	24,8	30.8
Dusičnan	9,5	7,7	2,7	9,2	9,6	4,6	4.6
<i>Pistia</i>	45,1	38,6	25,8	98,4	135,2	1,4	83.2

Tabulka 12: Biokoncentrační faktory (BF) pro olovo u jednotlivých tkání potkana (BF = koncentrace ve tkáni tasemnice/koncentrace ve tkáni hostitele)

Pro sledování toxokinetiky olova mezi tasemnicí krysí a potkanem byly stanoveny dílčí hypotézy. První dílčí hypotéza zněla: Akumulace olova ve tkáních potkanů je odlišná u jednotlivých forem olova. Tato hypotéza byla z větší části potvrzena, protože většina tkání ve skupině Dusičnan

akumulovala vyšší koncentrace než tkáně ve skupině *Pistia* (viz graf 2). Dále bylo potvrzeno, že tasemnice krysí akumuluje vyšší koncentrace olova než tkáně jejího hostitele – potkana.

Tyto výsledky byly společně s akumulací zinku a kadmia publikovány v časopise *Ecological indicators* (Horáková, B., Čadková, Z., Száková, J., Jankovská, I., Langrová, I. 2018. Lead accumulation in rats: The effect of the presence of a rat tapeworm and the different forms of metal in the host diet. *Ecological Indicators*. 85. 753-757).

6.2.2. Koncentrace olova v krvi potkanů

Hodnoty Pb v krvi, odebrané při pitvách, byly u všech potkanů ve všech skupinách pod detekčním limitem použité analytické metody (0,02 mg/l).

6.2.3. Koncentrace olova v moči a výkalech potkanů

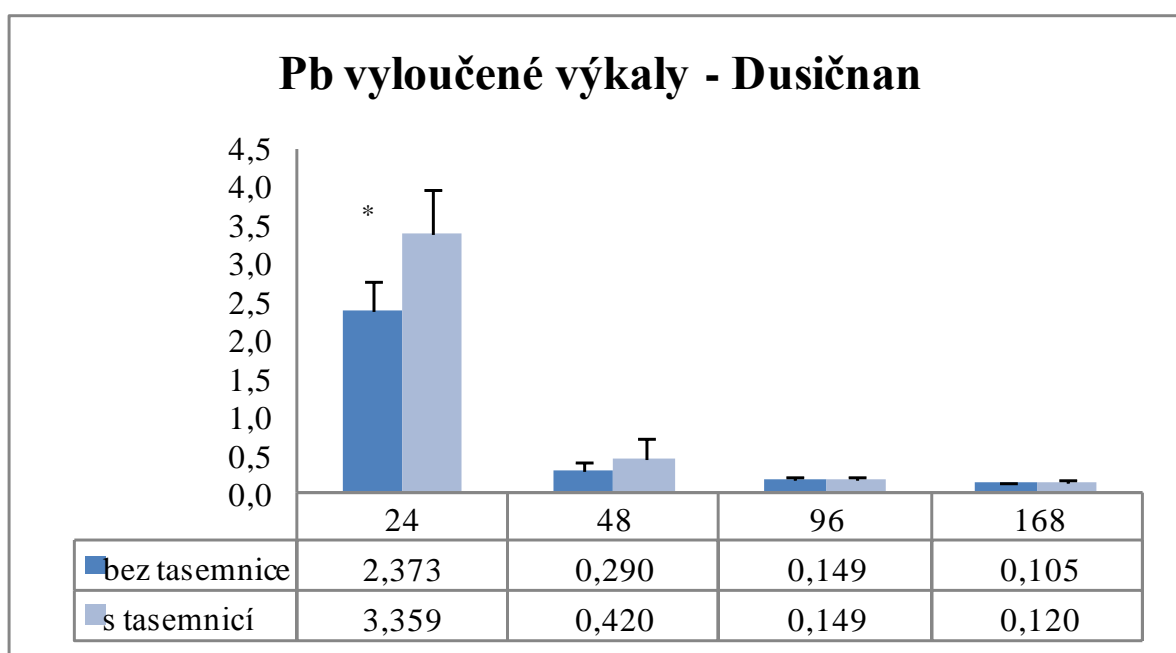
Vylučování olova močí a výkaly bylo měřeno po 24, 48, 96 a 168 hodinách od expozice. Hodnoty Pb v moči a výkalech kontrolní skupiny byly ve většině případů pod mezí detekce použité analytické metody (0,02 mg/l), proto zde nebudou grafy této skupiny prezentovány.

Ve skupině Dusičnan nebylo olovo v moči detekovatelné ve více než 80 % vzorcích, odebíraných 168 hodin po expozici a v téměř 20 % vzorcích odebíraných 96 hodin od expozice. Vzorky odebírané 96 a 168 hodin po expozici nebyly proto kvůli nízkému počtu naměřených vzorků statisticky vyhodnocovány. Parazitovaní potkani vylučovali močí méně (0,62 mg/l 24 hodin a 0,48 mg/l 48 hodin po expozici) olova než neparazitovaní (0,76 mg/l 24 hodin a 0,65 mg/l 48 hodin po expozici). Statisticky významný rozdíl byl pouze u olova vyloučeného po 48 hodinách. U parazitovaných a neparazitovaných jedinců byl patrný pokles množství vyloučené moči s přibývajícím dobou od expozice olovem. Tento pokles pokračoval i u detekovaných hodnot 96 a 168 hodin od expozice. Potkani s tasemnicí vyloučili močí průměrně 19 % přijatého Pb a potkani bez tasemnice 24 % Pb.

Hodnoty Pb v moči skupiny *Pistia* byly ve většině případů (232 z 300 vzorků) pod mezí detekce použité analytické metody. První týden experimentu nebylo olovo v moči této skupiny detekováno vůbec. Dále nebylo detekováno ve vzorcích, odebíraných 168 hodin od expozice a ve většině vzorcích, odebíraných po 96 hodinách. Druhý a šestý týden bylo naměřeno pouze u vzorků 24 hodin po expozici. Průměrně vyloučili parazitovaní jedinci močí v této skupině 0,045 mg/l 24 hodin a 0,033 mg/l Pb 48 hodin od expozice. Neparazitovaní vyloučili močí 0,05 mg/l 24 hodin a 0,03 mg/l Pb 48 hodin od expozice. Mezi množstvím olova vyloučeným močí parazitovaných a neparazitovaných jedinců nebyl u skupiny *Pistia* statisticky významný rozdíl. Průměrně vyloučili parazitovaní jedinci v moči 15,5 % a neparazitovaní 13,5 % z přijatého Pb.

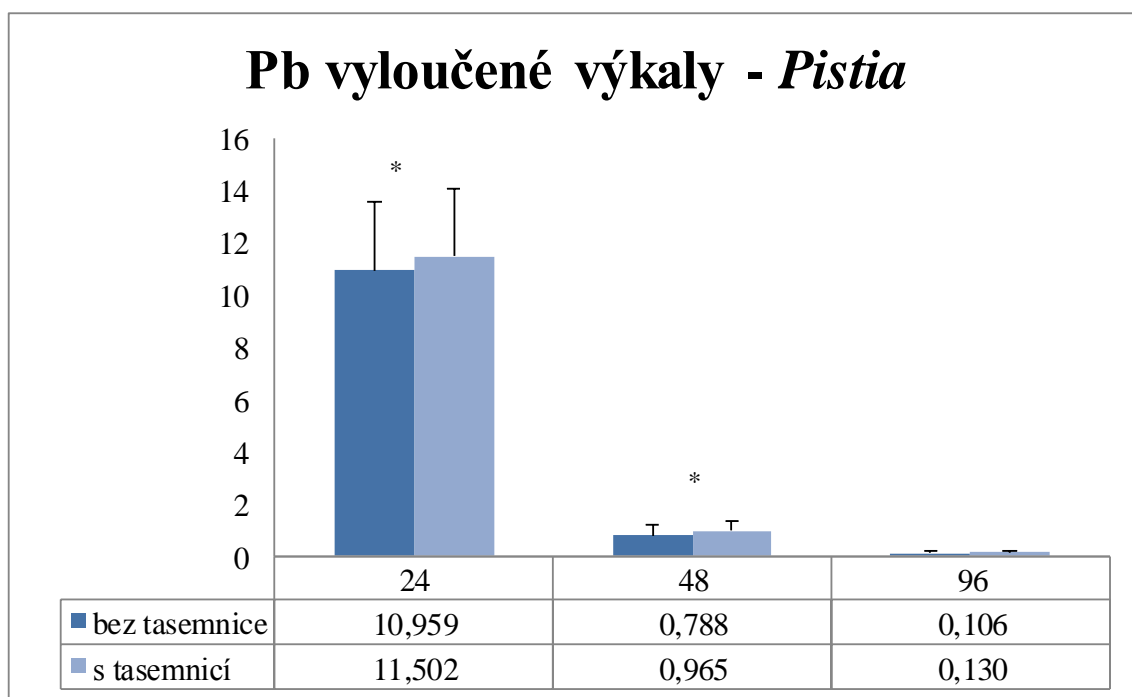
Protože detekovatelné hodnoty Pb byly u takto malého množství vzorků moči, nebyla data moči u skupiny *Pistia* ani Dusičnan graficky vizualizována.

Ve výkalech skupiny Dusičnan bylo olovo pod mezí detekce pouze u 10 % vzorků odebíraných po 168 hodinách. Ze všech odběrových dnů bylo naměřeno minimálně ve 3 vzorcích parazitovaných i neparazitovaných jedinců. Dynamika exkrece Pb výkaly skupiny Dusičnan je znázorněna v grafu číslo 4. Rozdíl v množství olova vyloučeného výkaly parazitovanými a neparazitovanými jedinci byl u této skupiny statisticky významný pouze 24 hodin od podání Pb. Výkaly vyloučili parazitovaní potkani ze skupiny Dusičnan průměrně 67,4 % přijatého Pb a neparazitovaní jedinci 47,84 % Pb.



Graf 4: Průměrně množství Pb (mg/kg v sušině) ve výkalech parazitovaných a neparazitovaných jedinců skupiny Dusičnan 24, 48, 96 a 168 hodin po expozici; *- statisticky významný rozdíl mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci.

U skupiny *Pistia* bylo olovo 168 hodin od expozice pod mezí detekčního limitu u většiny odebraných vzorků (60 ze 72). Dynamika exkrece Pb výkaly skupiny *Pistia* je znázorněna v grafu číslo 5. Mezi množstvím olova vyloučeným výkaly parazitovaných a neparazitovaných potkanů nebyl v této skupině statisticky významný rozdíl. Výkaly vyloučili parazitovaní i neparazitovaní potkani ze skupiny *Pistia* více než 100 % z přijatého množství olova. Skupina *Pistia* vylučovala 24 a 48 hodin od expozice výrazně vyšší množství olova než skupina Dusičnan.



Graf 5: Průměrně množství Pb (mg/kg v sušině) ve výkalech parazitovaných a neparazitovaných jedinců skupiny *Pistia* 24, 48 a 96 hodin po expozici; *- statisticky významný rozdíl mezi skupinou Dusičňan a *Pistia*.

6.3. Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro

Nejprve bylo zjištěno, zda je ve tkáních tasemnic bezprostředně po vyseparování z těla potkana detekovatelné nějaké olovo. Proto byly nejdříve změřeny celkové obsahy olova v tasemnicích, které byly ihned po vyseparování ze střeva potkanů devitalizovány zamražením. Tyto tasemnice měly ve tkáních průměrně 0,25 mg/kg olova.

Průměrné naměřené hodnoty olova v jednotlivých skupinách tasemnic, kultivovaných in vitro jsou zobrazeny v tabulce číslo 13.

Skupina	Pb (mg/kg)	Hodnota p (Shapiro-Wilkův test)	Variační koeficient
Kontrola	0,07 ± 0,08	0,141	15,52
S olovem	144,88 ± 53,317	0,607	36,8
Devitalizované s olovem	1400,98 ± 276,76	0,186	19,76
Olovo + žluč	229,36 ± 97,62	0,849	42,56

Tabulka 13: průměrné koncentrace olova (mg/kg v sušině) ve tkáních jednotlivých skupin tasemnic kultivovaných in vitro ± směrodatná odchylka, hodnoty p naměřené při testování normality a variační koeficient

Ve všech skupinách byla data poměrně sourodá a normálně rozdělená na hladině významnosti 0,05. Mezi průměrnou koncentrací Pb u tasemnic, která byla naměřena u kontrolní skupiny a u tasemnic, které byly měřeny ihned po vyseparování z těla potkana (bez kultivace),

nebyl statisticky významný rozdíl. Všechny skupiny tasemnic, kterým bylo přidáváno do média olovo, akumulovaly výrazně vyšší koncentrace olova než kontrolní skupina.

Pro otestování efektivity akumulace olova tasemnicí *H. diminuta* za přidavku šťáv trávicího traktu byly porovnány průměrné koncentrace olova ve tkáních tasemnic, které byly kultivovány v médiu s přidavkem olova a tasemnic, které byly kultivovány v médiu s přidavkem olova a žluči. Tyto výsledky jsou zobrazeny v tabulce číslo 14.

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (statistika a grafy) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky						
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. skup. 1	Poč.plat. skup. 2
živé vs. žluč	144,8768	229,3565	-2,30783	15	0,035680	10	10
Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (statistika a grafy) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				p	Rozptyly	Rozptyly
	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p			
živé vs. žluč	53,31663	97,62122	3,352455	0,101694			

Tabulka 14: Testování rozdílů mezi koncentrací Pb u skupiny tasemnic, kterým bylo přidáváno do média olovo a skupiny tasemnic, kterým bylo do média přidáváno olovo společně se žlučí; výstup ze softwaru Statistica

Toto testování objasnilo druhou hypotézu, která zněla: Absorpce Pb do tkáně tasemnice je zprostředkována šťávami gastrointestinálního traktu, především žlučovými kyselinami. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou tasemnic, které bylo do kultivačního média přidáváno olovo a skupinou tasemnic, které bylo přidáváno olovo a žluč. Skupina, která dostávala žluč, obsahovala ve tkáních v průměru výrazně více olova než skupina, které žluč přidávána nebyla. **Druhá hypotéza tedy byla potvrzena.**

Dále byla při in vitro experimentu testována část třetí hypotézy. A sice že tasemnice přijímá olovo aktivně. Tyto výsledky (viz tabulka číslo 15) byly získány porovnáním koncentrací olova ve tkáních živých tasemnic, které byly kultivovány v médiu s přidavkem olova a tasemnic, které byly kultivovány za stejných podmínek, ale byly devitalizované zamražením ihned po separaci ze střeva potkana.

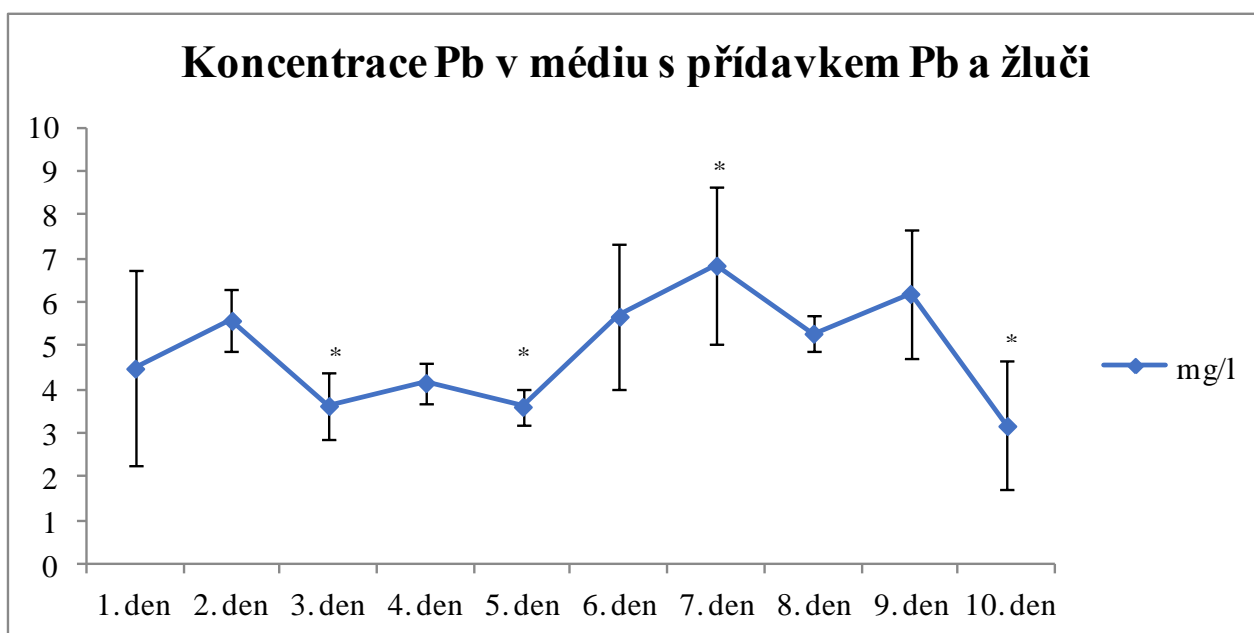
Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (statistika a grafy) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky						
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. skup. 1	Poč.plat. skup. 2
živé vs. devitalizované	144,8768	1400,984	-14,0917	18	0,000000	10	10
Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (statistika a grafy) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				p	Rozptyly	Rozptyly
	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p			
živé vs. devitalizované	53,31663	276,7902	26,95108	0,000037			

Tabulka 15: Testování rozdílů mezi koncentrací Pb u skupiny živých tasemnic, kterým bylo přidáváno do média olovo a skupiny devitalizovaných tasemnic, kterým bylo do média přidáváno olovo; výstup ze softwaru Statistica

Tento test ukázal, že devitalizované tasemnice, které jsou při kultivaci exponovány stejnému množství olova jako živé, akumulují ve svých tkáních na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ výrazně vyšší koncentrace olova než živé tasemnice. Do tkání tasemnic je tedy olovo akumulováno i pasivně, ale živé tasemnice olovo přijímají a vylučují aktivním procesem. Část třetí hypotézy, že *H. diminuta* akumulují olovo aktivně, tímto **byla potvrzena**, přestože byl dokázán i pasivní příjem devitalizovanými tkáněmi tasemnic.

U skupin živých tasemnic, kterým bylo do média přidáváno olovo, byly měřeny celkové koncentrace Pb v médiu, po jednotlivých dnech kultivace. U kontrolní etapy ani u devitalizovaných tasemnic nebylo měření obsahů olova provedeno. Každé tasemnici bylo denně přidáváno do média 0,5 mg Pb, což v 50 ml odpovídá množství 10 mg/l.

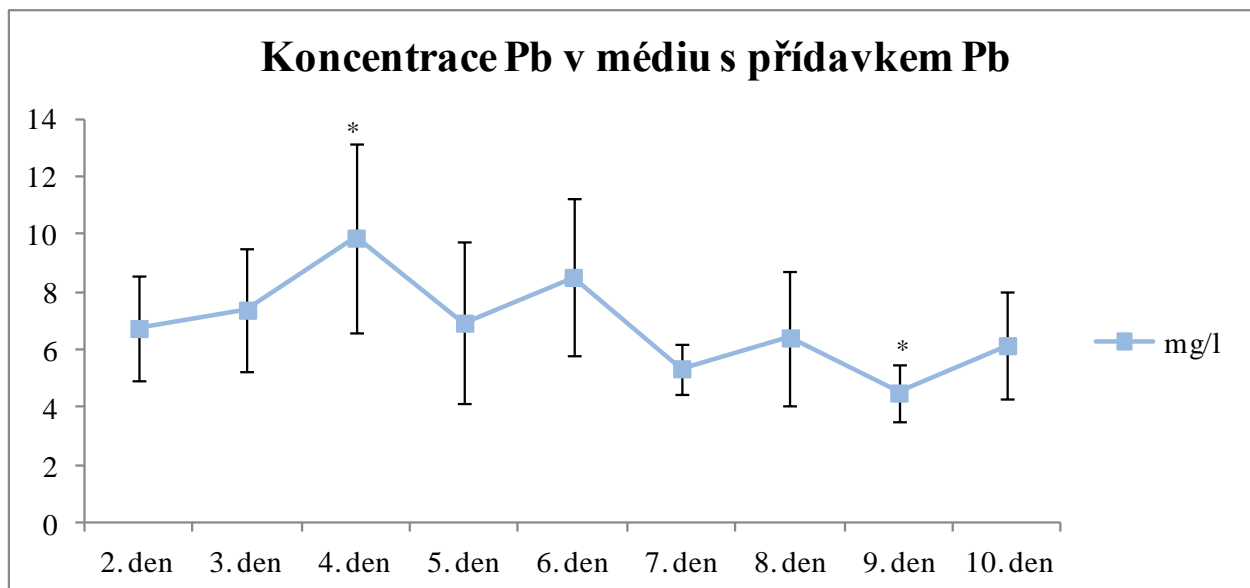
V grafu číslo 6 jsou zobrazeny průměrně koncentrace po jednotlivých dnech u skupiny, která byla kultivována s olovem a žlučí. Rozdíl mezi 10 mg/l a zobrazenými hodnotami je množství olova, které bylo akumulováno to těla tasemnic. Mezi koncentracemi naměřenými v kultivačním médiu této skupiny byl statisticky významný rozdíl pouze při porovnání média měněného sedmý den s médii ze třetího, pátého a desátého dne.



Graf 6: Průměrné koncentrace olova v médiu, do kterého bylo tasemnicím přidáváno 0,5 mg Pb ve formě dusičnanu olovnatého $Pb(NO_3)_2$ a 0,5mg žluči, naměřené po jednotlivých dnech kultivace; *-statisticky významný rozdíl mezi koncentrací Pb naměřené v médiu

V grafu číslo 7 jsou zobrazeny průměrně koncentrace po jednotlivých dnech u skupiny s olovem. Bohužel u média, měněného po 24 hodinách došlo při analýze ke znehodnocení vzorků, proto jsou zobrazeny naměřené koncentrace až od 48 hodin (2. den) kultivace. Mezi koncentracemi

naměřenými v kultivačním médiu této skupiny nebyl statisticky významný rozdíl, kromě koncentrace 4. den (9,88 mg/l) a 9. den (4,51 mg/l).



Graf 7: Průměrné koncentrace olova v médiu, do kterého bylo tasemnicím přidáváno 0,5 mg Pb ve formě dusičnanu olovnatého $Pb(NO_3)_2$, naměřené po jednotlivých dnech kultivace; *-statisticky významný rozdíl mezi koncentrací Pb naměřené v médiu

6.4. Lokalizace olova ve tkáních tasemnice krysí

Předtím než byla k lokalizaci použita laserová ablace, bylo zkoumáno, zda se olovo a další rizikové i esenciální prvky (Cd, Cu, Fe, Mn a Zn) akumulují v předních nebo v zadních člancích tasemnice (viz tabulka číslo 16).

Většina sledovaných prvků u kontrolní skupiny byla akumulována ve vyšších koncentracích v předních částech strobil tasemnic (kromě Zn). Statisticky významný rozdíl byl u této skupiny v koncentracích Cu a Fe. U skupin Dusičnan a *Pistia* byly všechny prvky ve vyšších koncentracích akumulovány do předních článků. Prokazatelně vyšší koncentrace byly v předních člancích u Cu, Fe a Zn ve skupině Dusičnan a u Pb, Fe a Zn ve skupině *Pistia*.

U skupiny *Pistia* byla většina koncentrací Cd pod detekčním limitem (0,001 mg/l), takže hodnoty tohoto prvku nejsou v tabulce zaznamenány. Ovšem i zde platilo, že pokud bylo Cd naměřeno, bylo ve vyšších koncentracích v předních člancích. Statistické vyhodnocení u tohoto prvku v této skupině ale nebylo prováděno.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise Journal od Helminthology (Horáková, B., Čadková, Z., Száková, I., Jankovská, I. 2017. The identification of risk and essential elements along the strobila of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. Journal of Helminthology. 91(5). 555-560).

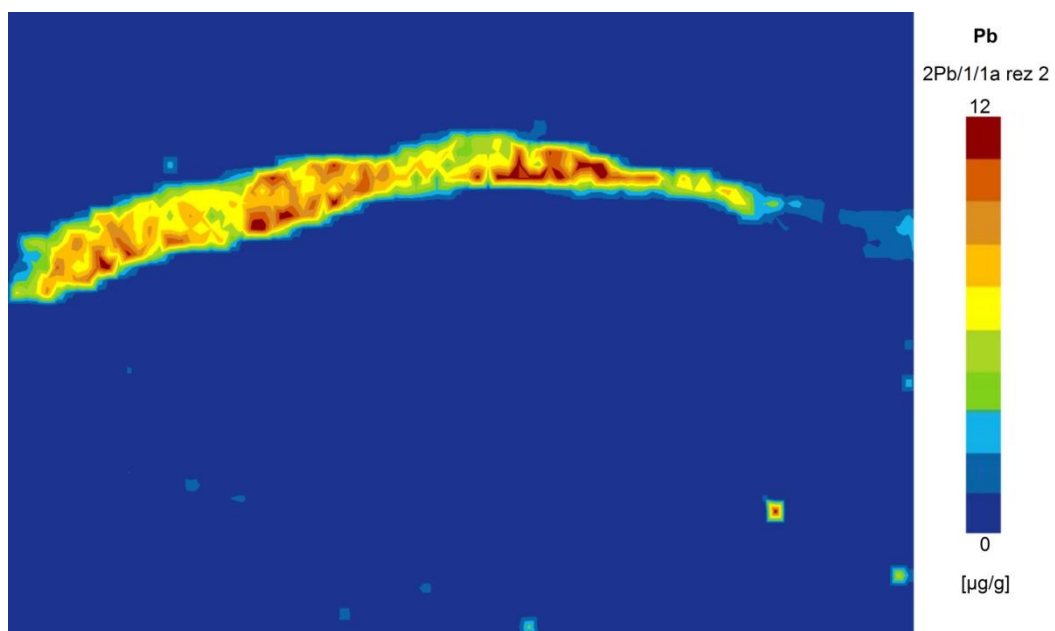
Prvek	Skupina/část těla tasemnice	
	Kontrola	
	Přední	Zadní
Cd	0,054 +/- 0,035	0,016 +/- 0,003
Cu	64,1 +/- 18,8	15,8 +/- 3,65
Fe	754 +/- 698	85,1 +/- 83,5
Mn	24,4 +/- 25,6	3,01 +/- 0,492
Pb	4,297 +/- 3,975	0,496 +/- 0,151
Zn	146 +/- 70,6	179 +/- 64,8
Dusičnan		
	Přední	Zadní
Cd	1,036 +/- 0,364	0,807 +/- 0,366
Cu	7,14 +/- 0,732	6,061 +/- 0,611
Fe	47,9 +/- 13,5	34,0 +/- 7,32
Mn	4,74 +/- 0,931	4,02 +/- 0,884
Pb	20,7 +/- 7,284	16,2 +/- 7,316
Zn	124 +/- 14,8	111 +/- 18,0
Pistia		
	Přední	Zadní
Cd	-	-
Cu	24,0 +/- 24,0	4,31 +/- 0,903
Fe	670 +/- 960	27,0 +/- 6,77
Mn	90,2 +/- 109	6,42 +/- 2,111
Pb	17,2 +/- 15,7	4,46 +/- 1,36
Zn	208 +/- 116	104 +/- 13,4

Tabulka 16: Průměrné koncentrace (mg/kg v sušině) ± směrodatná odchylka naměřené v předních a zadních částech tasemnice; '-' hodnoty, které byly pod mezí detekce; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi přední a zadní částí.

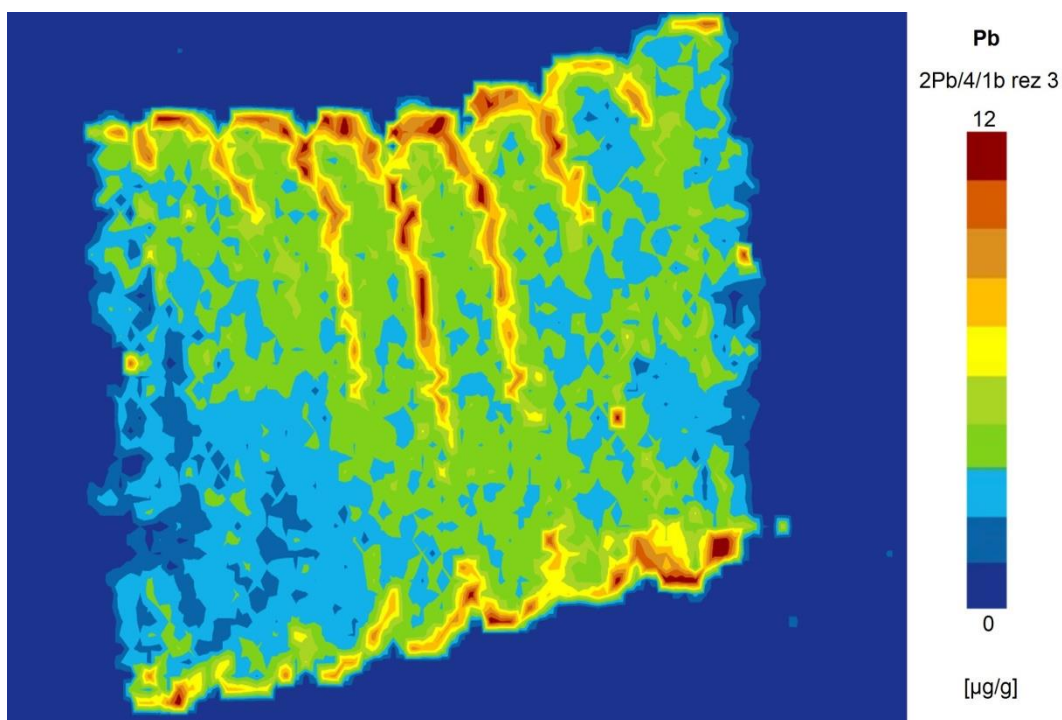
6.4.1. Lokalizace pomocí laserové ablace

Pro přesnější lokalizaci olova ve tkáních tasemnic byly histologické řezy jejich strobil analyzovány pomocí laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Vizualizované výstupy z jednotlivých částí strobily *H. diminuta* jsou zobrazeny na obrázcích 8 – 10.

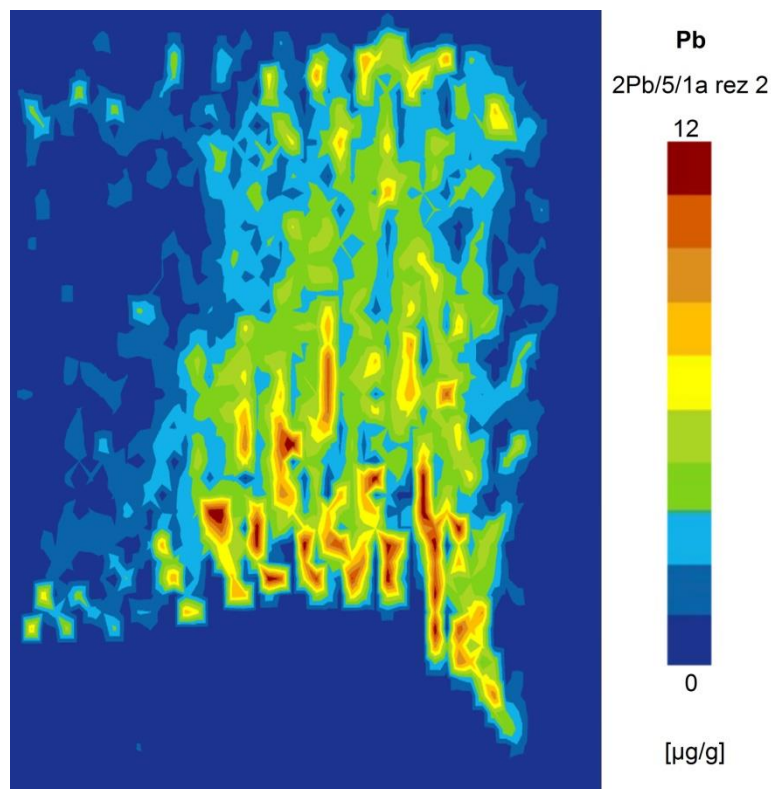
Na obrázku číslo 8 je zobrazena přední část strobily tasemnice. Konkrétně se zde nachází část krčku s nejmladšími články a ve spodní části obrázku je scolex, který byl od krčku odtržen v průběhu manipulace se vzorkem. Na obrázku číslo 9 jsou vizualizovaná data ve člancích prostřední části strobily *H. diminuta*. Na obrázku číslo 10 jsou vizualizovaná data ze zadní části strobily *H. diminuta*, konkrétně úplně poslední články.



Obrázek 8: Množství olova lokalizované pomocí LA-ICP-MS v přední části strobily tasemnice *H. diminuta*.



Obrázek 9: Množství olova lokalizované pomocí LA-ICP-MS v prostřední části strobily *H. diminuta*.



Obrázek 10: Množství olova lokalizované pomocí LA-ICP-MS v koncové části strobily tasemnice *H. diminuta*.

Tyto výsledky naznačují, že olovo se na strobilách *H. diminuta* nachází pouze v oblasti tegumentu a nevstupuje do jejích vnitřních struktur. Třetí hypotéza zněla: Tasemnice přijímá Pb aktivně a ukládá ho v interních částech proglotidů. Část **třetí hypotézy**, která se týkala lokalizace olova ve tkáni *H. diminuta*, **nebyla potvrzena**. Podle předložených výsledků se olovo do interních částí proglotidů se olovo nedostane a zůstává pouze v tegumentu.

7. Diskuze

7.1. Akumulační potenciál tasemnice krysí pro jednotlivé formy olova

Akumulační potenciál tasemnice *H. diminuta* byl vyhodnocován po šestitýdenní expozici tasemnic olovu skrze jejich definitivního hostitele (potkana). Potkani byli exponováni dusičnanu olovnatému a olovu vázanému v rostlině *P. stratiotes*. Po šestitýdenní expozici byly z jejich tenkých střev vyjmuty tasemnice, v jejichž tkáních byly analyzovány celkové obsahy olova.

Ve tkáních tasemnic z kontrolní skupiny, které nebyly exponovány zvýšené koncentraci olova, bylo akumulováno průměrně 0,42 mg/kg olova. Tento údaj je podobný, jako kontrolní skupina u experimentu, který prováděli Čadková et al (2014). V jejich studii byl infikovaným potkanům v exponované skupině podáván dusičnan olovnatý v dávce 6 mg týdně. Ve tkáních tasemnic z kontrolní skupiny bylo akumulováno 0,37 mg/kg olova. Ve tkáních olovu exponovaných tasemnic bylo akumulováno 23,16 mg/kg olova. V předkládané práci bylo do tkání tasemnic, které byly exponovány dusičnanu olovnatému, akumulováno průměrně 18,43 mg/kg olova. Ve tkáních tasemnic, které byly exponovány olovu z *P. stratiotes*, bylo akumulováno 10,82 mg/kg olova. V porovnání s prací Čadková et al. (2014) jsou tato čísla nižší. Je tedy možné, že tasemnice *H. diminuta* vstřebává olovo z dusičnanu olovnatého a z *P. stratiotes* hůře než z octanu olovnatého. Nevíme ovšem, jak dlouho po poslední expozici olova byla u Čadkové et al. (2014) provedena pitva, takže je možné, že rozdíl v jejich a v předkládaných výsledcích byl způsoben rozdílnou délkou od poslední expozice olovu.

Vzhledem k tomu, že tasemnice z jednoho potkana nebyly analyzovány individuálně, bylo z každé skupiny analyzováno šest vzorků, které představovaly celkovou biomasu *H. diminuta* v jednom potkanovi. Rozdíl mezi koncentracemi olova ve skupině Dusičnan nebyl statisticky významný v porovnání s koncentracemi tohoto prvku ve tkáních tasemnic ze skupiny *Pistia*, ale obě skupiny, exponované olovu akumulovaly statisticky významně více olova než kontrolní skupina.

Potvrzeno bylo potenciální využití této tasemnice jako bioindikátoru znečištění životního prostředí olovem. Jako bioindikátor by totiž měla akumulovat široké spektrum sloučenin, protože jednotlivé prvky se ve volné přírodě vyskytují v různých formách. Díky předkládanému experimentu bylo poprvé ověřeno, že *H. diminuta* má akumulaci schopnost pro minimálně dvě odlišné formy olova. Na bioindikační vlastnosti této tasemnice již bylo poukázáno dříve a to jak v laboratorních podmínkách (Sures et al., 2002; Čadková et al., 2014; Jankovská et al., 2016), tak při terénních studiích (Sures et al., 2003; Al-Quraishy et al., 2014).

Porovnání bioakumulace olova ve tkáních tasemnic se tkáněmi hostitele je popsáno v následující kapitole.

7.2. Toxokinetika odlišných forem olova v systému potkan/tasemnice krysí

7.2.1. Koncentrace olova ve tkáních potkanů

Podle získaných výsledků závisí distribuce olova v těle potkana na formě olova, která je potkanovi podávána. Koncentrace olova akumulované ve tkáních potkanů ze skupiny *Pistia* byly nižší, s výjimkou kostní tkáně, než u potkanů ze skupiny s dusičnanem. Je zajímavé sledovat výslednou variabilitu v koncentracích u jednotlivých tkání, která je poměrně vysoká přestože potkani v obou skupinách dostávali totožné dávky olova. Většina sledovaných tkání akumulovala významně vyšší koncentrace olova ve skupině Dusičnan v porovnání se skupinou *Pistia* (Graf 2). Tyto výsledky znamenají, že anorganické olovo z dusičnanu olovnatého vykazuje u potkanů vyšší akumulaci schopnost než olovo vázané v rostlině *P. stratiotes*. Tento fakt může být způsoben tím, že toxokinetika olova v těle potkana je odlišná v okamžiku, kdy perorálně přijímá i jen lehce zvýšené množství esenciálních prvků. Je potvrzeno, že zvýšený příjem železa může nejen snížit (Schell et al., 2004), ale dokonce úplně zablokovat absorpci olova (Bannon et al., 2003). V tabulce číslo 6 je zřetelně viditelný rozdíl v příjmu nejen železa, ale také zinku, mědi a kadmia. Tyto prvky se přirozeně vyskytují v rostlině *P. stratiotes*. Jejich obsahy v této rostlině použité v předložené práci jsou vypsány v tabulce číslo 4. Množství železa, které přijali potkani ve skupině *Pistia* navíc v porovnání s potkany ze skupiny Dusičnan nebylo o moc vyšší, ale jistý vliv tohoto prvku na akumulaci olova zde být mohl. Také mohlo dojít ke zvýšenému příjmu vápníku, u kterého bylo potvrzeno, že snižuje absorpci olova ze střeva (Bogden et al., 1995). Množství tohoto prvku ale v rostlině *P. stratiotes* nebylo analyzováno, takže můžeme jeho roli ve snížení akumulace olova jen spekulovat.

Nejvyšší koncentrace Pb byly naměřeny ve slezině, následované koncentracemi v kostech a tenkém střevě skupiny Dusičnan. Ve skupině *Pistia* byly nejvyšší koncentrace detekovány v kostech a z měkkých tkání v ledvinách. Tento výsledek se shoduje s většinou předchozích studií na toto téma, ve kterých jsou ledviny hlavní cílovou měkkou tkání akumulace olova (Sures et al., 2000b; Adham et al., 2011). Kost je místo, kde se ukládá přibližně 90% perorálně přijatého olova (Rosin, 2009; Torres et Johnson, 2001). Ve skupině *Pistia* se do kostní tkáně uložilo cca 60 % uloženého olova u neparazitovaných potkanů a u parazitovaných dokonce 86 %, což je s výše uvedenými devadesáti již velice dobře porovnatelné. U skupiny Dusičnan bylo do kostí uloženo výrazně méně akumulovaného olova – jen cca 16 %. Kostní tkáň v kontrolní skupině obsahovala méně olova než ledviny a slezina. U obou olovu exponovaných skupin byly koncentrace Pb v kostech vyšší, než ve většině měkkých tkání (s výjimkou sleziny ve skupině Dusičnan). Tento fakt podporuje názor Gerhardssona et al. (1995), že ukládání olova do kostí je mechanismus, který limituje jeho rozšíření do citlivějších tkání. V případě, že zvířata nebyla vystavena zvýšenému

množství olova, nebylo v kostech ukládáno. Ve všech skupinách byly naměřeny poměrně vysoké koncentrace Pb ve slezině. V kontrolní skupině byly obsahy Pb v této tkáni po ledvinách druhé nejvyšší. Ve skupině *Pistia* byly v porovnání se slezinou vyšší obsahy Pb pouze v kostech a ledvinách a ve skupině Dusičnan byly dokonce hodnoty ve slezině ze všech tkání potkana nejvyšší. Tento fakt byl popsán například u ryb (Shukla et al., 2007) a je způsoben vysokou metabolickou aktivitou sleziny. Slezina není orgán, který by byl obvykle v toxikologických studiích měřen. Pouze ve vodním prostředí bylo olovo v tomto orgánu stanovováno u ryb (Alves et al., 2006; Handy et al., 2011) nebo u delfinů (Capelli et al., 2008). V žádné dosud publikované toxikologické studii na drobných zemních savcích, tedy ani na potkanech, nebyly dosud monitorovány hodnoty ve slezině. Stejně tak pokud je prováděn terénní výzkum, hodnoty ve slezině obvykle nebývají zjišťovány. Ani v nejnovější studii na toto téma nebyla slezina vyhodnocována (Nascimento et al., 2016). Nejčastěji jsou stanovovány obsahy olova v játrech a ledvinách. Dle výsledků zjištěných v předkládané práci by bylo vhodné kromě těchto dvou tkání používat pro bioindikaci zatížení olovem také slezinu a především kosti. Hodnoty Pb ve slezině byly často vyšší než v játrech a ledvinách. Při stanovování obsahů bioakumulovaného olova pouze u jater a ledvin může navíc docházet k významnému podceňování ekotoxikologického rizika v případě, že nejsou analyzovány kosti. V kontrolní skupině a ve skupině Dusičnan byly poměrně vysoké hodnoty olova detekovány ve tkáni střeva. To mohlo být způsobeno vylučováním ostatních orgánů do střeva (Mager et al., 2010). Velice nízké koncentrace olova byly naměřeny ve varlatech a ve svalovině u všech skupin. Tyto výsledky jsou v souladu například s prací, kterou publikovali Cai et al. (2009). V jejich práci byly také popsány nízké koncentrace olova ve svalovině dobytka, pasoucího se na olovem kontaminovaných lokalitách.

Výsledky koncentrací olova u parazitovaných a neparazitovaných jedinců nejsou v této studii tak jednoznačné, jako to bylo například u Jankovské et al. (2012b). V jejich studii akumulovali neparazitovaní jedinci výrazně více olova než parazitovaní. Stejný výsledek zaznamenali i Azmat et al. (2008). V předkládané práci byl statisticky významný rozdíl mezi tkáněmi parazitovaných a neparazitovaných jedinců pouze u sleziny ve skupině *Pistia* a svaloviny a střeva ve skupině Dusičnan (viz grafy číslo 2 a 3). V předkládané práci tedy nemůžeme mluvit o ochranné funkci tasemnice *H. diminuta*, jako tomu je ve studiích Azmata et al. (2008) a Jankovské et al. (2012b). V jejich studiích bylo popsáno, že endoparazité mohou chránit své hostitele tím, že akumulují těžké kovy do svého těla a tím snižují jejich akumulaci ve tkáních hostitele. Shodný výsledek s předkládanou prací publikovali Čadková et al. (2014). V jejich studii bylo olovo také akumulováno především do tkání tasemnice *H. diminuta*. Koncentrace olova ve tkáních potkanů parazitovaných touto tasemnicí byly také ve většině případů nižší než u neparazitovaných, ale

statisticky významný rozdíl nebyl potvrzen ani v jejich studii. V předkládané práci akumulovalo do tkání parazitovaných jedinců nejčastěji 1,7mi násobné množství olova v porovnání s neparazitovanými. Nejvyšší podíl byl u ledvin ve skupině *Pistia*. Do tohoto orgánu bylo akumulováno téměř 13krát více olova u neparazitovaných potkanů než u parazitovaných. Je zde tedy patrné, že přítomnost *H. diminuta* mírně snižuje celkové množství akumulovaného olova, ale jak je zmíněno výše, nedá se mluvit o efektivní ochraně tkání hostitele.

V případě, že potkani přijímali zvýšené množství olova, akumulovaly tkáň tasemnic vyšší koncentrace tohoto prvku než tkáň hostitele. Nejmarkantnější rozdíl byl při porovnání se svalovinou ve skupině *Pistia*. V porovnání s touto tkání bylo do těla tasemnice akumulováno 135krát více olova. V této skupině byly i ostatní biokoncentrační faktory poměrně vysoké. Do tkáň varlat bylo akumulováno 98krát méně olova, do střeva 83krát, do jater 45krát, ledvin 39krát a sleziny 26krát méně olova než do tkáň tasemnic. Ve skupině Dusičnan byly biokoncentrační faktory o něco nižší. V této skupině bylo do svaloviny akumulováno 10krát méně, do jater 9,5krát méně, do varlat devětkrát méně, do ledvin osmkrát méně, do střeva a kosti pětkrát méně a do sleziny třikrát méně olova než do tkáň tasemnic. V porovnání s předchozími studiemi byly koncentrace z předkládané práce výrazně vyšší nebo naopak výrazně nižší. Ve studii, kterou publikovali Sures et al. (2002) bylo v laboratorních podmínkách olovo podáváno potkanům po dobu pěti týdnů. Jediný orgán potkana, kde bylo poté detekováno, byly ledviny. Ty zde obsahovaly sedmnáctkrát méně olova než tkáň *H. diminuta*. V předkládané práci bylo u ledvin ve skupině *Pistia* olova 39krát méně než u *H. diminuta*. Oproti práci Surese et al. (2002) je toto číslo více než dvojnásobné. Ve skupině Dusičnan bylo naopak dvakrát méně než ve studii Surese et al. (2002), konkrétně osmkrát méně než ve tkáni tasemnice. Výsledek ze skupiny Dusičnan je porovnatelný se studií Surese et al. (2003), kde bylo na lokalitě v Káhiře v játrech potkanů naměřeno šestkrát více olova než u *H. diminuta*. V této studii již bylo olovo detekováno ve více tkáních, ale ani střevo, které obsahovalo 36krát méně olova než tkáň tasemnice, nedosáhlo podobného biokoncentračního faktoru pro tuto tkáň. Stejně tak výsledek, který naměřili u jater, nebyl podobný ani jednomu v předkládané práci předkládanému výsledku. Ve studii prováděné na pískomilech z průmyslové lokality v Rijádu, kterou publikovali Al-Quraishy et al. (2014), bylo v játrech pískomilů 16krát méně než ve tkáních *H. diminuta*. Tento údaj je ze všech dostupných biokoncentračních faktorů z jater nejbližší mému naměřenému výsledku ve skupině s dusičnanem olovnatým (10krát nižší než tasemnice). Biokoncentrační faktor pro ledviny byl v jejich studii 16, což bylo v porovnání s předkládaným experimentem dvojnásobné v porovnání se skupinou Dusičnan. U *Pistia* byl naopak více než dvojnásobný než ve studii, kterou publikovali Al-Quraishy et al. (2014). Rozdíly v biokoncentračních faktorech ale byly pravděpodobně způsobeny odlišným množstvím podaného

olova. Toto množství je nemožné odhadnout u volně žijících zvířat. Faktem zůstává, že tato tasemnice je vhodným bioindikátorem pro znečištění olova v životním prostředí. Ve studiích Surese et al. (2000b) a Al-Quraishy et al. (2014) bylo pozorováno snižování akumulace olova v ledvinách a zvyšování akumulovaného olova v játrech u potkanů, kteří byli infikováni tasemnicí *H. diminuta*. V předkládané studii byl tento trend zaznamenán pouze u kontrolní skupiny. U skupin *Pistia* a *Dusičnan* byly koncentrace olova v ledvinách vyšší než v játrech.

7.2.2. Koncentrace olova v krvi potkanů

Ve všech skupinách bylo olovo v krvi pod detekčním limitem použité analytické metody (0,02 mg/l). Podle dostupné literatury je do stěn erytrocytů vázáno až 99 % přijatého olova (Papanikolaou et al., 2005). Proces navázání do erytrocytů je velice rychlý, řádově se jedná o desítky minut (Hunder et al., 2000) a přibližně po pěti dnech od expozice se olovo z krve přesouvá do kostí a měkkých tkání (Timchalk et al., 2006). Podle výsledků, které publikovali Morgan et al. (1977) je u potkanů nejvyšší koncentrace olova v krvi hodinu od intravenózního podání. Poté koncentrace rapidně klesá a po dvou dnech je možné naměřit v krvi jen asi 5 % z podaného olova. Přestože toxokinetika olova se u perorálního a intravenózního podání liší, jsou jejich výsledky v souladu s předkládanou prací. V předkládané práci byla krev odebírána při pitvách, které probíhaly sedm dní od poslední expozice, takže je zřejmé, že i při perorálním podání olova je olovo po uplynutí této doby z krve přesunuto do různých tkání.

7.2.3. Koncentrace olova v moči a výkalech potkanů

Aby byla toxokinetika Pb v tomto hostitelsko/parazitickém systému kompletní, byly při bilanční fázi experimentu odebírány vzorky moči a výkalů potkanů. Vzorky byly odebírány 24, 48, 96 a 168 hodin od expozice.

Týden (168 hodin) od expozice již nebylo olovo ve většině vzorků moči a výkalů detekovatelné použitou analytickou metodou. Tento výsledek je v plném souladu s předešlými publikovanými pracemi na toto téma, podle kterých je perorálně přijaté olovo vyloučeno v největší míře v prvních pěti dnech od expozice (např. Rabinowitz et al., 1980). Dynamika vylučování nebyla doposud takto zkoumána, proto není možné porovnat výsledky předkládané v této práci s dříve publikovanými pracemi.

Zkoumání moči je považováno za jeden z nejlepších neinvazivních způsobů pro biomonitoring celé řady xenobiotik, včetně olova (Yantasee et al., 2008). Vylučování olova močí je často sledováno po intravenózním podání (Castellino et Aloj, 1964; Klaassen et Shoeman, 1974; Morgan et al., 1977; Gregus et Klaassen, 1986). Také byla zkoumána exkrece u intraperitoneálního

podání (Varaksin et al., 2014). U perorálního podání doposud vylučování zkoumáno nebylo. Porovnání různých způsobů expozice může být problematické, protože podle studie, kterou publikovali Steinbaugh et al. (2007) je toxokinetika olova při různých způsobech expozice odlišná. Nejvíce olova bylo močí u obou skupin vyloučeno během prvních 24 hodin od expozice a poté klesalo s přibývajícím dobou od expozice. Na tuto skutečnost nemělo vliv, zda byli potkani parazitováni nebo ne. Potkani ve skupině *Pistia* vylučovali močí nižší koncentrace olova než potkani ve skupině Dusičnan. Množství vyloučené moči bylo ale u skupiny *Pistia* výrazně vyšší a proto v přepočítání močí vylučovaného olova na procenta z přijaté dávky se tyto skupiny příliš nelišily. U skupiny Dusičnan bylo z přijaté dávky močí vyloučeno 19 % u parazitovaných a 24 % u neparazitovaných potkanů. U skupiny *Pistia* vyloučili parazitováni potkani 15,5 % a neparazitováni 13,5 % přijatého olova. Tyto výsledky nejsou výrazně odlišné od množství olova vyloučeného močí po intravenózním podání octanu olovnatého ve studii, kterou prováděli na potkanech Castellino et Aloj (1964). V jejich práci vyloučili potkani 15,9 % přijatého olova. Statisticky významný rozdíl mezi množstvím vyloučeného olova u parazitovaných a neparazitovaných potkanů byl pozorován pouze v moči vyloučené 24 – 48 hodin od expozice ve skupině Dusičnan.

Většina přijatého olova byla v předkládané práci i ve výkalech vyloučena během prvních 24 hodin od expozice nezávisle na formě přijatého olova. Stejný výsledek publikovali Hernández-Plata et al. (2015), v jejichž práci ale chyběly hodnoty z odběrů v dalších časech. V předkládané práci exkrece výkaly během dalších dnů klesala 3x (skupina Dusičnan) až 10x (skupina *Pistia*). Z těchto výsledků je patrné, že olovo vázané v rostlině *P. stratiotes* je z těla potkana vylučováno snadněji než anorganické olovo.

Vylučování olova výkaly bylo v předkládané studii majoritní. Stejně tak tomu bylo například ve studii, kterou publikovali Gregus et Klaassen (1986). V jejich studii bylo olovo výkaly vyloučeno 50 % z přijaté dávky. V práci, kterou publikovali Castellino et Aloj (1964) bylo výkaly vyloučeno 35,7 % z přijaté dávky olova. Výsledky skupiny Dusičnan publikované v předkládané práci se pohybují v podobných hodnotách. U parazitovaných potkanů v této skupině bylo vyloučeno 67,4 % a u neparazitovaných 47,84 % z přijaté dávky olova. Podle Castellino et Aloj (1964) je vylučování olova společně s výkaly u živočichů hlavním způsobem detoxifikace. Výkaly odchází z těla až 90 % přijatého olova (Rabinowitz et al., 1976). Stejný výsledek byl prezentován i u jiného experimentu prováděného na potkanech (Hunder et al., 2000). V předkládané práci nebylo množství olova vyloučeného výkaly ve skupině Dusičnan tak vysoké.

Je třeba brát ohled na skutečnost, že ve skupině parazitovaných jedinců může být výsledek ovlivněn množstvím propagačních útvarů tasemnic. Podle výsledků prezentovaných v této práci je v koncových článcích tasemnice nejméně olova. Přesto může tato koncentrace významně ovlivnit

hodny detekované ve výkalech, protože při odběrech nebyly propagační útvary tasemnic z výkalů separovány. Ve skupině *Pistia* bylo kvůli tomu množství olova vyloučeného výkaly parazitované skupiny dokonce v některých týdnech vyšší než dávka olova, která byla potkanům v této skupině na začátku týdne podávána. U skupiny neparazitovaných jedinců bylo v některých týdnech výkaly také vyloučeno více olova, než bylo potkanům podáváno. Tato skutečnost byla pravděpodobně ovlivněna množstvím dalších esenciálních prvků přijatými v *Pistii*, protože díky příjmu zvýšeného množství dalších prvků došlo k uvolnění Pb, které bylo uloženo ve tkáních potkanů.

Skupina *Pistia* vylučovala během 24 i 48 hodin od expozice výrazně více olova než skupina Dusičnan, což koresponduje s výsledky množství olova akumulovaného ve tkáních potkana u těchto skupin. U skupiny Dusičnan bylo totiž akumulováno výrazně více olova než u skupiny *Pistia*.

7.3. Stanovení olova ve tkáních tasemnice krysí in vitro

Aby bylo možné zjistit, zda je příjem olova tasemnicí *H. diminuta* aktivní či pasivní proces a zda je ovlivněn šťávami trávicího traktu, bylo nutno provést experiment přímo na tasemnici, bez vlivu jejího hostitele. Pro tento účel byl realizován in vitro experiment. Nejprve byla kultivována kontrolní skupina tasemnic, která byla kultivována pouze v médiu. Průměrné množství olova ve tkáních těchto tasemnic nebylo na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ odlišné od tkání tasemnic, které byly analyzovány ihned po vyseparování ze střev potkanů. Koncentrace olova, která byla detekována v jejich tkáních, nebyla vysoká a mohla pocházet již z doby, kdy tasemnice parazitovaly v potkanech. Do médií ve všech dalších skupinách bylo jednotlivým tasemnicím přidáváno 0,5 mg Pb ve formě dusičnanu olovnatého. Do tkání všech takto kultivovaných tasemnic bylo akumulováno prokazatelně více olova, než bylo naměřeno v kontrolní skupině nebo v tasemnicích přímo ze střeva potkana. Tím byla znovu potvrzena schopnost tasemnice *H. diminuta* akumulovat olovo (Sures et al., 2002, 2003; Sures, 2004; Al-Quraishy et al., 2014; Čadková et al., 2014), tentokrát nově v podmínkách in vitro a ne skrze jejího definitivního hostitele.

Je známo, že některé živiny jsou tasemnicí *H. diminuta* snadněji absorbovány za přítomnosti žluči. Tento fakt byl prokázán například u mastných kyselin, monoglyceridů a sterolů (Bailey et Fairbairn, 1968). Abychom mohli potvrdit, že také olovo je absorbováno společně se žlučí, do kultivačního média byl kromě olova přidán také extrakt ze žluče. Ve tkáních tasemnic, které byly kultivovány v médiu s přídavkem olova a žluči, bylo akumulováno téměř dvojnásobné množství olova než ve tkáních tasemnic, kterým žluč do média přidávána nebyla. Tasemnicím, kultivovaným pouze s přídavkem olova, bylo po ukončení kultivace ve tkáních naměřeno průměrně 144,88 mg/kg Pb. Tasemnice, které byly kultivovány v médiu s přídavkem olova a žluči, akumulovaly 229,36 mg/kg Pb. Shodný výsledek byl zjištěn i u jediné doposud publikované práce na toto téma. Vrtejší

Pomphorhynchus laevis byli kultivováni in vitro po dobu 3 týdnů v médiu, do kterého bylo přidáváno olovo a žluč. Ve tkáních vrtejšů z kontrolní skupiny bylo olova naměřeno 11 mg/g čerstvé hmotnosti a ve tkáních vrtejšů, kterým byla do média přidávána žluč 18 mg/g, tedy shodně s předkládanou prací také téměř dvojnásobek (Sures et Siddall, 1999).

Při porovnání koncentrací olova, které je z média akumulováno živými a devitalizovanými *H. diminuta* bylo zjištěno, že do tkání devitalizovaných tasemnic je akumulováno výrazně více olova než do tkání živých. Živým tasemnicím, kultivovaným s přidavkem olova, bylo po ukončení kultivace ve tkáních naměřeno průměrně 144,88 mg/kg Pb. Do tkání devitalizovaných tasemnic, které byly kultivovány v médiu s přidavkem olova, bylo akumulováno 1400,95 mg/kg Pb. Z těchto výsledků je jasně patrné, že tasemnice olovo nejen přijímají, ale také ho mohou aktivně vylučovat. Tento fakt je způsoben tím, že tegument na povrchu těla tasemnic je živoucí tkáň s vysokou metabolickou aktivitou (např. Schardein and Waitz, 1965; Lumsden, 1966; Öhman-James, 1973; Schmidt et Roberts, 2009). U devitalizovaných tasemnic došlo k narušení životaschopnosti této tkáně. Během kultivace tedy nedocházelo k vylučování olova. To bylo skrz neaktivní tegument z kultivačního roztoku nasáknuto, a proto byly koncentrace olova ve tkáních devitalizovaných tasemnic výrazně vyšší. Tasemnice tedy může přijímat olovo i pasivně. U živých tasemnic je příjem i vylučování olova aktivní proces, do kterého je zapojen jejich tegument.

Mezi koncentracemi olova v médiu u skupiny tasemnic, které byly kultivovány za přidavku olova a žluči, většinou nebyl v jednotlivých dnech kultivace statisticky významný rozdíl. Pouze koncentrace naměřená sedmý den, která byla ze všech dní nejvyšší, byla výrazně vyšší v porovnání s koncentracemi naměřenými třetí, pátý a desátý den, které byly naopak nejnižší. Množství olova v médiu u této skupiny mělo v průběhu pokusu kolísavý charakter, při kterém se jeden den objevil pokles a následující den nárůst, následovaný opět poklesem. Pouze mezi šestým a sedmým dnem následoval nárůst namísto poklesu. Přestože mezi koncentracemi většinou nebyl statisticky významný rozdíl, na grafu číslo 7 je toto kolísání zřetelně viditelné. Kolísání souvisí pravděpodobně s faktem, že tasemnice část Pb z média přijaly do svých tkání a část ze tkání naopak vyloučily, přičemž příjem i exkrece neprobíhaly souběžně ve stejném poměru, ale docházelo ke střídání. Jeden den byl vyšší příjem, jeden den exkrece. Desátý den došlo k výraznému snížení množství olova v médiu oproti předchozím dnům.

Mezi koncentracemi Pb v médiu u skupiny živých tasemnic, která dostávala pouze olovo, většinou nebyl statisticky významný rozdíl. Jedinou výjimkou byla koncentrace olova, která byla v médiu naměřena 4. den kultivace a 9. den kultivace. Hodnota naměřená čtvrtý den byla vůbec nejvyšší a devátý den naopak nejnižší. Kdyby tasemnice z média olovo přijímaly a nevylučovaly jej zpět, koncentrace naměřená v médiu čtvrtý den by odpovídala tomu, že tasemnice přijala 0,12 mg

Pb. Tato hodnota ale nemůže být přesně určena, protože tasemnice olovo do média i vylučují a není možné odlišit, kolik olova bylo do média vyloučeno a kolik bylo naopak přijato. Stejně jako u skupiny, které bylo přidáváno olovo a žluč se i u těchto tasemnic střídaly dny, ve kterých přijaly více olova se dny, kdy více olova vyloučily. Množství olova v médiu u této skupiny mělo tedy také v průběhu pokusu kolísavý charakter a v porovnání s médii od tasemnic se žlučí bylo toto kolísání pravidelnější.

Koncentrace olova v médiu, ve kterém byly kultivovány devitalizované tasemnice, nebyly měřeny, takže není možné zjistit, kolik olova se po přítomnosti devitalizované tasemnice nacházelo v médiu. Protože ale ve tkáních devitalizovaných tasemnic bylo olova naměřeno výrazně více než u živých, koncentrace v médiu u devitalizovaných tasemnic musely být řádově nižší než u živých tasemnic.

7.4. Lokalizace olova ve tkáních tasemnice krysí

V předkládané práci bylo zkoumáno, do kterých částí strobily tasemnice *H. diminuta* je převážně ukládáno olovo a také další prvky. Nejprve byla tasemnice rozdělena na dvě části. První, přední část byla složena ze skolexu, krčku a nezralých článků. Nezralé články rostou z krčku směrem od skolexu ke konci strobily postupně narůstá jejich zralost, takže na konci strobily jsou již články plně zralé. Zralé články tvořily druhou, zadní část.

Většina prvků (olovo, měď, železo a mangan) byla u všech skupin intenzivněji akumulována v přední části strobily tasemnice. V případě, že bylo kadmium ve tkáních tasemnice detekováno, také tento prvek vykazoval stejný trend. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií Surese et al. (1997), ve které bylo publikováno, že olovo a kadmium jsou akumulovány především ve zralých člancích. V jejich studii byly tedy tyto prvky akumulovány především do zadní části strobily. Také v práci, kterou publikovali Tenora et al. (2002), byl zdůrazněn význam zralých článků, jakožto akumulátorů olova a kadmia u tasemnic parazitujících ve střevech vodních ptáků.

Podle Pappas et al. (1999) jsou morfologické rozdíly mezi zralými a nezralými články doprovázeny fyziologickými a biochemickými rozdíly. Tyto rozdíly potvrdili také Bennet et al. (1993). Pappas et al. (1999) zkoumali příjem glukózy a glykogenu a zjistili, že přední část strobily *H. diminuta* je metabolicky více aktivní než zadní část. Tento fakt mohl způsobit, že v předních částech tasemnic v předkládané práci byly akumulovány vyšší koncentrace sledovaných prvků. Ke stejnému výsledku došli Sures et al (2000b), kteří zkoumali akumulaci olova ve tkáních samců a samic vrtejšů *Moniliformis moniliformis*. V jejich studii byly nejvyšší koncentrace naměřeny v samičích vajíčkách, následovaly cementové žlázy samců, ale nejvyšší koncentrace byly naměřeny v předních částech těla vrtejšů.

Woelfl et al. (2008) zjistili, že kratší tasemnice akumulují významně vyšší hodnoty kovů než dlouhé tasemnice. Tyto výsledky mohou být porovnatelné s výsledky v předkládané práci, protože menší tasemnice nemají na strobile tolik zralých článků jako delší jedinci. Woelfl et al. (2008) také zmínili, že tento trend nebyl nalezen u zinku. V předkládané práci byl zinek jediným prvkem, pro který byly vyšší koncentrace naměřeny v zadních částech strobil tasemnic u kontrolní skupiny, i když tento rozdíl nebyl statisticky významný. Koncentrace zinku u skupin *Dusičnan* a *Pistia* byly prokazatelně vyšší v ředních částech strobil tasemnic. Tyto výsledky naznačují, že zinek je akumulován především do zralých článků *H. diminuta* v případě, že tasemnice nepřijímají žádný rizikový nebo esenciální prvek ve zvýšeném množství.

Riggs et al. (1987) zkoumali u tasemnic *Bothriocephalus acheilognathi* akumulaci selenu. Pokud byly tasemnice v jejich pokusu exponovány nízkým hladinám selenu, přední a zadní část strobil akumulovaly stejné množství selenu. V případě, že byly tasemnice vystaveny většímu množství selenu, tak byl tento prvek akumulován do zralých článků. Tuto skutečnost zdůvodnili tím, že zadní články mohou obsahovat vyšší koncentrace selenu proto, že jsou exponovány déle. Stejně odůvodnění použili i Sures et al. (1997). Ovšem nejstarší a tedy nejdéle exponovanou částí těla tasemnic jsou jejich scolex a krček. Oba tyto útvary se nacházejí v přední části a mohou tedy významně ovlivňovat množství prvků v této části detekované.

7.4.1. Lokalizace olova pomocí laserové ablace

Pro přesnější lokalizaci olova ve tkáních tasemnic byly histologické řezy strobil *H. diminuta* analyzovány pomocí laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Předkládaná práce je první, která se zabývá mapováním olova ve strobile parazita tímto způsobem. Přitom zájem o mapování rozložení prvků v biologických tkáních vzrůstá již od roku 2003, kdy bylo poprvé použito LA-ICP-MS k tomuto účelu. První práci, ve které byla použita tato metoda, publikovali Kindness et al. (2003).

Nejčastěji jsou v různých tkáních mapovány esenciální prvky (Becker et al., 2014). Rizikové prvky byly mapovány pouze ve tkáních hostitelů *H. diminuta*, potkanů a myší. Nejčastěji mapovanou tkání jsou mozky (Becker, 2010; Shariatgorji et al., 2016; Zhang et al., 2016; Müller et al., 2018) a rozložení esenciálních prvků v nich. Bylo mapováno železo, zinek a měď v mozku myší (Zhang et al., 2016) nebo potkanů (Müller et al., 2018). Společně s výše uvedenými prvky byly mapovány ještě uhlík, sodík, hořčík, fosfor, síra a mangan v mozku potkana (Becker, 2010). Stejně prvky, kromě uhlíku a síry, navíc s vápníkem byly mapovány v mozku a ledvinách potkana (Shariatgorji et al., 2016).

Olovo bylo pomocí této metody mapováno v lidských zubech (Arora et al., 2011; Hare et al., 2011) a mozku (Zoriy et al., 2006; Dobrowolska et al., 2008; Matusch et al., 2011), v mozcích potkanů (Oros-Peusquens et al., 2011; Urgast et al., 2012), včel (Wang et al., 2013) a mořského měkkýše vršatky síťované (*Tritia reticulata*) (Santos et al., 2009).

V předložené práci výsledky získané laserovou ablací potvrdily první získané výsledky o lokalizaci olova, které jsou popsány výše. Na výstupech získaných při laserové ablaci je totiž jasně patrný trend poklesu olova v zadních částech strobily *H. diminuta* v porovnání s předními.

Přední část strobily obsahovala nejvyšší koncentrace olova. Na této části strobily tasemnice je na nejvíce místech koncentrace olova okolo 6 mg/kg. Celkově je více než na 80 % plochy této části strobily obsah olova vyšší než 6 mg/kg. Čím více směrem k přední části těla (na obrázku směrem doprava), tím je olovo ve vyšší koncentraci. Na scolexu byla uprostřed koncentrace olova okolo 11 mg/kg, okolní části obsahovaly olova méně. Krček tasemnice je velice tenký a tedy i křehký. Proto došlo při přípravě řezů k jeho poškození a k odtržení jeho části a tedy i k odtržení scolexu. Je pravděpodobné, že koncentrace, která je na krčku detekovaná neodpovídá realitě a že pokud by k jeho poškození nedošlo, byla by koncentrace olova v oblastech krčku vyšší. Přesto je na přední části na největší ploše ze všech 3 obrázků koncentrace olova nejvyšší naměřená (11 – 12 mg/kg). Plocha s touto koncentrací zde zabírá přibližně 30 % z celkové plochy. Na prostřední části byla tato koncentrace na méně než 10 % plochy a na obrázku zadní části strobily zabírala plochu ještě menší. Koncentrace olova 11 – 12 mg/kg jsou na všech obrázcích rozloženy v jednotlivých člancích nerovnoměrně a v řadě míst kopírují okraje článků. Na obrázku přední části strobily tento jev patrný není, protože nové články obsahují olova tolik, že je v nich vysoká koncentrace po celé jejich ploše. Nejzřetelnější je tento jev na obrázku prostřední části strobily. V zadní části strobily je koncentrace olova okolo 11 – 12 mg/kg pouze na jedné straně strobily tasemnice, přičemž na druhé straně stejného článku je koncentrace do 6 mg/kg. I v těchto člancích lze pozorovat, jak jednotlivé koncentrace kopírují tvar článků. Tento fakt naznačuje, že olovo není do vnitřních struktur strobily tasemnic vůbec vstřebáno. Je shromažďováno v tegumentu, který se nachází na povrchu těla tasemnic (např. Arai, 1980; Smyth et McManus, 1989). Tyto výsledky potvrdily skutečnost, že olovo se v přední části strobily vyskytuje ve vyšší koncentraci díky vyšší metabolické aktivitě této části.

Prostřední část strobily *H. diminuta* obsahovala koncentrace olova nižší než přední, ale vyšší než zadní. Největší plochu (více než 80 %) u ní zabírají místa, ve kterých je olovo v množství menším než 6 mg/kg. Na jedné straně většiny článků je olova více než na straně druhé.

Zadní část strobily *H. diminuta* obsahovala nejnižší koncentrace olova. Z velké části byla tvořena místy, kde nebylo olovo vůbec naměřeno. Tato místa, společně s místy, kde byly

koncentrace Pb velice nízké (nižší než 3 mg/kg), tvoří na obrázku zadní části více než 50 % plochy. Na obrázku prostřední a přední části strobily místa s nulovou koncentrací nalezena nebyla. Koncentrace okolo 3 mg/kg zabírá na zadní části strobily přibližně 20 %. Na prostřední části jsou tyto koncentrace na cca 40 % plochy a na obrázku přední části jsou na méně než 5 % plochy. Koncentrace okolo 4 – 5 mg/kg je na zadní části strobily na více než 40 % plochy, na prostřední části na přibližně 50 % plochy a na přední části méně než na 10 % plochy. Na obrázku zadní části strobily jsou vyšší koncentrace jen ve velmi malém množství. Koncentrace okolo 6 mg/kg jsou zde přibližně pouze na 5 % plochy a vyšší koncentrace potom ještě méně.

Tyto výsledky všechny potvrzují a graficky přehledně dokreslují první zde popsané výsledky o lokalizaci olova ve tkáni tasemnice *H. diminuta*. V doposud publikovaných studiích o akumulaci různých prvků ve tkáních tasemnic byly použity nesourodé techniky, ze kterých se žádná nezabývala definováním míst, do kterých jsou rizikové prvky akumulovány. V některých studiích byly strobily tasemnic rozděleny na jednotlivé části, v některých byly analyzovány celé tasemnice, případně byly porovnávány různě staré celé tasemnice. Porovnání mezi takto odlišnými studiemi je komplikované. Nejčastěji se stanovují totální obsahy rizikových prvků ve strobilách celých jedinců tasemnic. Jen málo studií se zabývalo detailní lokalizací rizikových prvků ve tkáních parazitů. Ve většině doposud publikovaných prací na toto téma byly studovány organismy žijící ve vodním prostředí, ve kterém se příjem, metabolismus i vylučování rizikových prvků hostiteli i jejich parazity liší od suchozemského. Předkládané výsledky proto představují unikátní pohled na lokalizaci olova ve strobile *H. diminuta*.

8. Závěr

Předkládaná práce je zaměřená na toxikologii olova ve tkáních tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Také se zabývá toxokinikou tohoto prvku v hostitelsko/parazitickém systému potkan/tasemnice krysí.

Díky unikátnímu in vitro experimentu bylo zjištěno, že tasemnice *H. diminuta* je schopna akumulovat olovo z kultivačního média stejně jako ze střeva definitivního hostitele. Dále bylo díky tomuto experimentu dokázáno, že proces akumulace olova do tkáně *H. diminuta* je efektivnější, když je v kultivačním médiu přítomna žluč. Olovo může být do tkání tasemnic akumulováno i pasivně, když tasemnice nežije. U živých tasemnic je ale proces akumulace olova řízen aktivně a tasemnice *H. diminuta* je schopna tento prvek také aktivně ze svých tkání detoxifikovat.

Další unikátní experiment byl proveden za účelem lokalizace Pb ve tkáních tasemnice krysí. Bylo zjištěno, že k akumulaci olova dochází především v předních částech strobil tasemnic. Tyto části strobil tasemnic obsahují výrazně vyšší koncentrace olova než části zadní. Kromě olova byl tento jev pozorován také u Cd, Cu, Fe a Mn. Tyto výsledky byly získány při měření koncentrací pomocí ICP-OES. Detailnější mapování bylo provedeno pomocí LA-ICP-MS na histologických řezech tkání tasemnic *H. diminuta*. I u těchto výsledků bylo nejvíce olova lokalizováno v přední části strobily a byl pozorován zřetelný pokles směrem k zadní části strobily. Tyto výsledky také ukázaly, že olovo je akumulováno pouze v tegumentu tasemnic a že nevstupuje do interních struktur strobil tasemnic.

V předkládané práci jsou také uveřejněny komplexní výsledky toxikologie dvou odlišných forem olova v systému hostitel/parazit. Díky použitému metodickému postupu byl vyhodnocen akumulační potenciál *H. diminuta* pro anorganické olovo ve formě dusičnanu olovnatého a pro olovo vázané v biomase hyperakumulátoru olova, rostlině babelce řezanovité (*Pistia stratiotes*). Tyto dvě formy olova byly tasemnicí přijímány stejně snadno. Do tkání tasemnic bylo akumulováno více olova než do tkání hostitele u obou sledovaných forem olova. Tím byl potvrzen názor, že tato tasemnice je vhodný bioindikátor olova v životním prostředí. Olovo bylo většinou ve větší míře akumulováno do tkání potkanů, kteří dostávali dusičnan olovnatý než do tkání potkanů, kteří dostávali Pb vázané v biomase *P. stratiotes*. Do tkání neparazitovaných potkanů bylo akumulováno více olova než do tkání parazitovaných, přestože „ochranná“ funkce parazita vůči tkáním jeho hostitele nebyla v tomto směru prokázána. V krvi potkanů nebylo olovo týden od expozice detekováno. Olovo bylo u obou skupin vylučováno více výkaly než močí. Vylučování bylo nejvyšší 24 hodin od expozice, poté klesalo a týden od expozice již ve velké části vzorků nebylo detekovatelné. Potkani, kteří dostávali olovo ve formě dusičnanu olovnatého, vylučovali močí více Pb než potkani, kteří dostávali olovo vázané v biomase *P. stratiotes*. Ve výkalech naopak

vylučovali více olova potkani, kteří dostávali olovo vázané v rostlině *P. stratiotes*. Parazitace většinou neměla na množství vyloučeného olova přímý vliv.

Výsledky předkládané v této práci přinesly zajímavé a unikátní poznatky týkající se toxikologie olova ve tkáních tohoto parazita i toxokinetiky tohoto prvku v hostitelsko/parazitickém systému potkan/tasemnice krysí. Použitá metodika in vitro experimentu je aplikovatelná také pro další parazity i další rizikové prvky. Díky ní je možné redukovat počet laboratorních zvířat pro toxikologické studie na gastrointestinálních parazitech. Laserová ablace na mapování rizikových prvků ve tkáních parazitů byla použita poprvé a naznačuje zajímavé výsledky, které by bylo dobré rozšířit dalšími analýzami. Například by měla být provedena analýza příčných řezů tkání parazita, aby mohly být zde publikované výsledky jasně potvrzeny.

9. Seznam použitých zkratk

AAS – atomová absorpční spektrometrie

ALAD – enzym dehydrogenáza kyseliny δ -aminolevulinové

BAL – dimercaprol, chelatační činidlo

BF – bioakumulační faktor

DMEM – Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

FAPPZ – fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

FBS – fetální bovinní sérum

GI – gastrointestinální

GIT – gastrointestinální trakt

HEPES – hydroxyethyl piperazin ethansulfonová kyselina

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

LA-ICP-MS – laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem

NS – nervový systém

PenStrep – penicilin + streptomycin

PVC – polyvinylchlorid

RPMI – kultivační médium Roswell Park Memorial Institute

10. Seznam literatury

- AbuShady, M. M., Fathy, H. A., Fathy, G. A., Fatah, S. A. E., Ali, A., Abbas, M. A. 2017. Blood lead levels in a group of children: the potential risk factors and health problems. *Jornal de Pediatria*. 93 (6). 619-624.
- Adel, M., Conti, G. O., Dadar, M., Mahjoub, M., Copat, Ch., Ferrante, M. 2016. Heavy metal concentrations in edible muscle of whitecheek shark, *Carcharhinus dussumieri* (elasmobranchii, chondrichthyes) from the Persian Gulf: A food safety isme. *Food and Chemical Toxicology*. 97. 135-140.
- Adel, M., Copat, Ch., Saeidi, M. R., Conti, G. O., Babazadeh, M., Ferrante, M. 2018. Bioaccumulation of trace metals in banded Persian bamboo shark (*Chiloscyllium arabicum*) from the Persian Gulf: A food safety isme. *Food and Chemical Toxicology*. 113. 198–203.
- Adham, K. G., Al-Eisa, N. A., Farhood, M. H. 2011. Risk assessment of heavy metal contamination in soil and wild Libyan jird *Meriones libycus* in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Environmental Biology*. 32(6), 813–819.
- Adonaylo, V. N., Oteiza, P. I. 1999. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*. 135 (2-3). 77-85.
- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., Siddiqui, M. K. 2005. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environment*. 346. 48–55.
- Acha, P. N., B. Szyfres. 1984. Hymenolepiasis, p. 754–758. *In* P. N. Acha and B. Szyfres. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2. vydání. Servicio Editorial de la Organizacio´n Panamericana de la Salud, Washington, D.C.
- Akinci, I. E., Akinci, S., Yilmaz, K. 2010. Response of tomoato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research*. 5. 416–423.
- Almeida, M. J., Moura, G., Pinheiro, T., Machado, J., Coimbra, J. 1998. Modifications in *Crassostrea gigas* shell composition exposed to high concentrations of lead. *Aquatic Toxicology*. 40 (4). 323-334.
- Al-Qattan, S. I., Elfawal, M. A. 2010. Significance of teeth lead accumulation in age estimation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 17. 325-328.
- Al-Quraishy, S., Gewik, M. M., Abdel-Baki, A.-A. S. 2014. The intestinal cestode *Hymenolepis diminuta* as a lead sink for its rat host in the industrial areas of Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21. 387-390.

- Álvarez-Lloret, P., Lee, Ch. M., Conti, M. I., Terrizzi, A. R., González-López, S., Martínez, M. P. 2017. Effects of chronic lead exposure on bone mineral properties in femurs of growing rats. *Toxicology*. 377. 64-72.
- Alves, L. C., Glover, C. N., Wood, C. M. 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 51. 615–625.
- Alves, L. M., Nunes, M., Marchand, P., Le Bizec, B., Mendes, S., Correia, J. P. S., Lemos, M. F. L., Novais, S. C. 2016. Blue sharks (*Prionace glauca*) as bioindicators of pollution and health in the Atlantic Ocean: Contamination levels and biochemical stress responses. *Science of The Total Environment*. 563–564. 282-292.
- Anandkumar, A., Nagarajan, R., Prabakaran, K., Rajaram, R. 2017. Trace metal dynamics and risk assessment in the commercially important marine shrimp species collected from the Miri coast, Sarawak, East Malaysia. *Regional Studies in Marine Science*. 16. 79-88.
- Andreassen J., Bennet-Jenkins E. M., Bryant C. 1999. Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*. 42. 223-275.
- Anderotti, A., Guberti, V., Nardelli, R., Pirrello, S., Serra, L., Volponi, S., Green, R. E. 2018. Economic assessment of wild bird mortality induced by the use of lead gunshot in European wetlands. *Science of The Total Environment*. 610–611. 1505-1513.
- Appleton, J., Lee, K. M., Sawicka Kapusta, K., Damek, M., Cooke, M. 2000. The heavy metal content of the teeth of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) as an exposure marker of environmental pollution in Poland. *Environmental Pollution*. 110. 441-449.
- Arai, H. 1980. *Biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta*. Academic Press. New York. USA. 746 s. ISBN: 0-12-058980-X.
- Arora, M., Hare, D., Austin, C., Smith, D. R., Doble, P. 2011. Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth. *Science of the Total Environment*. 409. 1315–1319.
- Ashraf, M. Y., Azhar, N., Ashraf, M., Hussain, M., Arshad, M. 2011. Influence of lead on growth and nutrient accumulation in canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Environmental Biology*. 32 (5). 659–66.
- Aslam, M., Davis, S. S., Healy, M. A. 1979. Heavy metals in some Asian medicines and cosmetics. *Public Health*. 93. 274-284.
- Auer, H., Aspöck, H. 2014. Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 164 (19-20). 405-413.

- Azmat, R., Fayyaz, S., Kazi, N., Mahmood, S. J., Uddin, F. 2008. Natural bioremediation of heavy metals through nematode parasite of fish. *Biotechnology*. 7. 139–143.
- Bailey, H. H., Fairbairn, D. 1968. Lipid metabolism in helminth parasites. V. Absorption of fatty acids and monoglycerides from micellar solution by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 26. 819–836.
- Baker, A. J. M. 1987. Metal Tolerance. *New Phytologist*. 160 (1). 93-111.
- Baker, A. J. M., Brooks, R. R. 1989. *Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements – A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry*. Biorecovery Academic Publishers. 1. 81-126.
- Bakker, A. K., MDutton, J., Sclafani, M., Santangelo, N. 2017. Accumulation of nonessential trace elements (Ag, As, Cd, Cr, Hg and Pb) in Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) early life stages. *Science of The Total Environment*. 596–597. 69-78.
- Bannon, D. I., Abounader, R., Lees, P. S., Bressler, J. P., 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. 284, C44-C50.
- Bartrop, D., Khoo, H. E. 1975. The influence of nutritional factors on lead absorption. *Postgraduate Medical Journal*. 51. 795-800.
- Barrera-García, A., O'Hara, T., Galván-Magaña, F., Méndez-Rodríguez, L. C., Castellini, J. M., Zenteno-Savín, T. 2013. Trace elements and oxidative stress indicators in the liver and kidney of the blue shark (*Prionace glauca*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 165. 483–490.
- Baruš, V., Tenora, F., Kračmar, S., Prokeš, M. 2001. Cadmium and lead concentrations in *Contracaecum rudolphii* (Nematoda) and its host, the cormorant *Phalacrocorax carbo* (Aves). *Folia Parasitologica*, 48. 77-78.
- Baruš, V., Tenora, F., Šumbera, R. 2003. Relative concentrations of four heavy metals in the parasites *Protospirura muricola* (Nematoda) and *Inermicapsifer arvicanthidis* (Cestoda) in their definitive host silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*: Rodentia). *Helminthologia*, 40 (4). 227-232.
- Becker, J. S. 2010. Bioimaging of metals in brain tissue from micrometre to nanometre scale by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: State of the art and perspectives. *International Journal of Mass Spectrometry*. 289 (2-3). 65-75.
- Becker, J. S., Matusch, A., Wu, B. 2014. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Analytica Chimica Acta*. 835. 1–18.

- Bencko, V., Cikrt, M., Lenert, J. 1995. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. 2. přepracované a doplněné vyd. Grada. Praha. 282 s. ISBN: 80-7169-150-X .
- Beneš, S. 1994. Obsahy a bilance prvků ve sférách životního prostředí. Část 2, 1. vydání. Vstupy prvků do půd zvětráváním hornin, atmosférickými spady, aplikací hnojiv a ostatních surovin ve srovnání s výstupy erozní činností, podzemními vodami a sklizní zemědělských plodin. Agrospoj. Praha. 168 s. ISBN 80-7084- 090-0.
- Bennet, E. M., Heath, P. A., Bryant, C. 1993. The effects of changes in the definitive host environment on the metabolism of *Hymenolepis diminuta* during growth and maturation. International Journal for Parasitology. 23. 57-68.
- Bercovitz, K., Laufer, D. 1991a. Tooth type as indicator of exposure to lead of adults and children. Archives of Oral Biology. 35. 895-897.
- Bercovitz, K., Laufer, D. 1991b. Age and gender influence on lead accumulation in root dentine of human permanent teeth. Archives of Oral Biology. 36. 671-673.
- Berntzen, K., 1961. The In vitro Cultivation of Tapeworms. I. Growth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). The Journal of Parasitology. 47 (3). 351-355.
- Bielarczyk, H., Tomsig, J. L., Suszkiw, J. B. 1994. Perinatal low-level lead exposure and the septo-hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and cholineacetyltransferase in the rat septum. Brain Research. 643. 211– 217.
- BioLib – Mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z (<http://www.biolib.cz>).
- Binkowski, Ł. J., Sawicka-Kapusta, K., Szarek, J., Strzyzewska, E., Felsmann, M. 2013. Histopathology of liver and kidneys of wild living Mallards *Anas platyrhynchos* and Coots *Fulica atra* with considerable concentrations of lead and kadmium. Science of The Total Environment. 450–451. 326-333.
- Binns, H. J., Campbell, C., Brown, M. J. 2007. Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Interpreting and managing blood lead levels of less than 10 microg/dL in children and reducing childhood exposure to lead: recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Pediatrics. 120 (5). e1285-98.
- Bires, J., Maracek, I., Bartko, P., Biresova, M., Weissova, T. 1995. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. Veterinary and Human Toxicology. 37. 349-356.
- Bogden, J. D., Kemp, F. W., Han, S., Murphy, M., Fraiman, M., Czerniach, D., Flynn, C. J., Banua, M. L., Scimone, A., Castrovilly, L., Gertner, S. B., 1995. Dietary calcium and lead interact

- to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation. *Journal of Nutrition*. 125(4), 990-1002.
- Bourgoin, B. P. 1990. *Mytilus edulis* shell as a bioindicator of lead pollution: considerations on bioavailability and variability. *Marine Ecology Progress Series*. 61. 253-262
- Bourgoin, B. P., Risk, M. J. 1987. Historical changes in lead in the eastern Canadian Arctic, determined from fossil and modern *Mya truncata* shells. *Science of the Total Environment*. 67. 287-291.
- Bunn, T. L., Parsons, P. J., Kao, E., Dietert, R. R. 2001. Gender-based profiles of developmental immunotoxicity to lead in the rat: Assessment in juveniles and adults. *Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A*. 64 (3). 223-240.
- Burger, J., Campbell, K. R., Murray, S., Campbell, T. S., Gaines, K. F., Jeitner, Ch., Shukla, T., Burke, S., Gochfeld, M. 2007. Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. *Science of The Total Environment*. 373 (2–3). 556-563.
- Burger, J., Dixon, C., Shukla, T., Tsipoura, N., Gochfeld, M. 2002. Metal levels in horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from Maine to Florida. *Environmental Research*. 90 (3). 227-236.
- Cai, Q., Long, M.-L., Zhu, M., Zhou, Q.-Z., Zhang, L., Liu, J. 2009. Food chain transfer of cadmium and lead to cattle in a lead–zinc smelter in Guizhou, China. *Environmental Pollution*. 157. 3078–3082.
- Callahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D., Wedd, A. G. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 11 (1). 2-12.
- Canfield, R. L., Henderson, C. R. Jr., Cory-Slechta, D. A., Cox, Ch., Jusko, T. A., Lanphear, B. P. 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *The New England Journal of Medicine*. 348. 1517-1526.
- Capelli, R., Das, K., Pellegrini, R. D., Lepoint, G. D. G., Miglio, C., Minganti, V., Poggi, R. 2008. Distribution of trace elements in organs of six species of cetaceans from the Ligurian Sea (Mediterranean), and the relationship with stable carbon and nitrogen ratios. *Science of the Total Environment*. 390. 569-578.
- Cariou, E., Guivel, Ch., La, C., Lenta, L., Elliot, M. 2017. Lead accumulation in oyster shells, a potential tool for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 125 (1-2). 19-29.
- Carrell, R. W., Winterbourn, C. C., Rachmilewitz, E. A. 1975. Activated oxygen and haemolysis. *British Journal of Haematology*. 30. 259–264.
- Castellino, N., Aloj, S. 1964. Kinetics of the distribution and excretion of lead in the rat. *British Journal of Industrial Medicine*. 21. 308-314.

- Cibulka, J., a kolektiv. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. 1. vydání. Academia Praha. 432 s. ISBN: 80-200-0401-7.
- Cleveland, L. M., Minter, M. L., Cobb, K. A., Scott, A. A., German, V.F. 2008. Lead hazards for pregnant women and children: Part 1: immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. *The American Journal of Nursing*. 108. 40–49.
- Conrad, M. E., Barton, J. C. 1978. Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat. *Gastroenterology*. 74. 731-740.
- Cortés-Gómez, A. A., Romero, D., Girondot, M. 2017. The current situation of inorganic elements in marine turtles: A general review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. 229. 567-585.
- Cory-Slechta, D. A. 1996. Legacy of lead exposure: consequences for the central nervous system. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 114. 224–226.
- Cretacci, Y., Parsons, P. J. 2010. Localized accumulation of lead within and among bones from lead-dosed goats. *Environmental Research*. 110 (1). 26-32.
- Crinnion, E. J. 2011. EDTA redistribution of lead and cadmium into the soft tissues in a human with a high lead burden – Should DMSA always be used to follow EDTA in such cases?, *Alternative Medicine Review*. 16. 109–112.
- Čadková, Z., Miholová, D., Száková, J., Válek, P., Jankovská, I., Langrová, I. 2014. Is the tapeworm able to affect tissue Pb-concentrations in white rat? *Parasitology*. 141. 826-836.
- Dai, W., Du, H., Fu, L., Liu, H., Xu, Z. 2010. Effect of montmorillonite on dietary lead (Pb) accumulation in tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied Clay Science*. 47 (3–4). 193-195.
- Dalton, J. P., Skelly, P., Halton, D. W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic. *Canadian Journal of Zoology – Revue Canadienne de Zoologie*. 82 (2). 211-232.
- Dapul, H., Laraque, D. 2014. Lead Poisoning in Children. *Advances in Pediatrics*. 61. 313–333.
- Davies, P. H., Goettl, J. G., Sinley, J. R., Smith, N. F. 1976. Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. *Water Resources*. 10. 199-206.
- Davis, R. A., de Mestre, C., Maher, W., Krikowa, F., Broad, A. 2014. Sponges as sentinels: metal accumulation using transplanted sponges across a metal gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33. 2818-2825.
- Dennie, C., McBride, W. 1924. Treatment of arsphenamin dermatitis, mercurial poisoning and lead intoxication: Further observations. *Journal of the American Medical Association*. 83. 2082–2085.

- Dewey S. 2001. *Hymenolepis diminuta*. Animal Diversity Web. [online]. [cit. 2017-04-18].
Dostupné z: http://animaldiversity.ummz.edu/site/accounts/information/Hymenolepis_diminuta.html.
- Diamond, G. L. 2005. Risk assessment of nephrotoxic metals. In: Tarloff J, Lash L, eds. The Toxicology of the Kidney. London, England: CRC Press. 1099-1132.
- Dietrich, K. N., Ware, J. H., Salganik, M., Radcliffe, J., Rogan, W. J., Rhoads, G. G., Fay, M. E., Davoli, C. T., Denckla, M. B., Bornschein, R. L., Schwarz, D., Dockery, D. W., Adubato, S., Jones, R. L. 2004. Effect of chelation therapy on the neuropsychological and behavioral development of lead-exposed children after school entry. *Pediatrics*. 2004. 114 (1). 19-26.
- Dietz, R., Riget, F., Johansen, P. 1996. Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals. *Science of the Total Environment*. 186. 67-93.
- Dobrowolska, J., Dehnhardt, M., Matusch, A., Zoriy, M., Koscielniak, P., Zilles, K., Becker, J. S. 2008. Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 74. 717–723.
- Dural, M., Bickici, E., 2010. Distribution of trace elements in the *Upeneus pori* and *Upeneus molucensis* from the eastern coast of Mediterranean, Iskenderun Bay. Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9. 1380–1383.
- Đurža, O., M. Khun. 2002. Environmentálna geochémia niektorých ťažkých kovov. 1. vydání. Univerzita Komenského. Bratislava. 115 s. ISBN 80-223-1657-1.
- Ekong, E. B., Jaar, B. G., Weaver, V. M. 2006. Lead-related nephrotoxicity: A review of the epidemiologic evidence. *Kidney International*. 70. 2074–2084.
- Ettler, V., Vaněk, A., Mihaljevič, M., Bezdička, P. 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. *Chemosphere*. 58 (10). 1449-1459.
- Evans, W. S., Wong, A., Hardy, M., et al. 1998. Evidence that the factor used by the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, to direct the foraging of its intermediate host, *Tribolium confusum*, is a volatile attractant. *Journal of Parasitology*. 84 (6). 1098-1101
- Fan, X., Wang, P., Wang, Ch., Hu, B., Wang, X. 2017. Lead accumulation (adsorption and absorption) by the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* in sediments contaminated by TiO₂ nanoparticles. *Environmental Pollution*. 231 (1). 712-721.
- Ferguson, S. A., Bowman, R. E. 1990. Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. *Neurotoxicology and Teratology*. 12 (2). 91-97.
- Ferguson, S. A., Medina, R. O., Bowman, R. E. 1993. Home cage behavior and lead treatment in rhesus monkeys: A comparison with open-field behavior. *Neurotoxicology and Teratology*. 15 (2). 145-149.

- Ferrante, M., Vassallo, M., Mazzola, A., Brundo, M. V., Pecoraro, R., Grasso, A., Copat, Ch. 2018. In vivo exposure of the marine sponge *Chondrilla nucula* (Schmidt, 1862) to cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb) and its potential use for bioremediation purposes. *Chemosphere*. 193. 1049-1057.
- Ferreira, H., Romano, M., Beldomenico, P., Caselli, A., Correa, A., Uhart, M. 2014. Lead gunshot pellet ingestion and tissue lead levels in wild ducks from Argentine hunting hotspots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 103. 74-81.
- Fewtrell, L. J., Prüss-Ustün, A., Landrigan, P., Ayuso-Mateos, J. L. 2004. Estimating the global burden of disease of mild mental retardation and cardiovascular diseases from environmental lead exposure. *Environmental Research*. 94 (2). 120-133.
- Finkelstein, Y., Markowitz, M. E., Rosen, J. F., 1998. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Research Brain Research Reviews*. 27. 168–176.
- Fioravanti, C. F., MacInnis, A. J. 1976. The in vitro effects of farnesol and derivatives on *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*. 62. 749-755.
- Foster, W. G. 1992. Reproductive toxicity of chronic Pb exposure in the female *Cynomolgus* monkey. *Reproductive Toxicology*. 6. 123-131.
- Freeman, N. C., Ettinger, A., Berry, M., Rhoads, G. 1997. Hygiene- and food-related behaviors associated with blood lead levels of young children from lead-contaminated homes. *Journal of Exposure Analysis Environmental Epidemiology*. 7. 103–118.
- Fritsch, C., Cosson, R. P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., de Vaufleury, A., Scheifler, R. 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environmental Pollution*. 158. 827–840.
- Fu, H., Boffetta, P. C. 1995. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occupational and Environmental Medicine*. 52. 73-81.
- Galimberti, C., Corti, I., Cressoni, M., Moretti, V. M., Menotta, S., Galli, U., Cambiaghi, D. 2016. Evaluation of mercury, cadmium and lead levels in fish and fishery products imported by air in North Italy from extra-European Union Countries. *Food Control*. 60. 329-337.
- Galušková, I., Mihaljevič, M., Borůvka, L., Drábek, O., Frühauf, M., Němeček, K. 2014. Lead isotope composition and risk elements distribution in urban soils of historically different cities Ostrava and Prague, the Czech Republic. *Journal of Geochemical Exploration*. 147. 215–221.
- Gavrić, J., Anđelković, M., Tomović, L., Prokić, M., Despotović, S., Gavrilović, B., Radovanović, T., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z. 2017. Oxidative stress biomarkers,

- cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*Natrix tessellata* Laurenti) during pre-hibernation and post-hibernation: A possible correlation with heavy metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 138. 154-162.
- Gerhardsson, L., Englyst, V., Lundstrom, N., Nordberg, G., Sandberg, S., Steinvall, F. 1995. Lead in tissues of deceased lead smelter workers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 9. 136-43.
- Gilbert, S. G., Weiss, B. 2006. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 g/dL. *Neurotoxicology*. 27. 693-701.
- Gilfillan, S. C. 1965. Lead poisoning and the fall of Rome. *Journal of Occupational Medicine*. 7. 53-60.
- Görür, G. 2007. Effects of host plant contaminated with heavy metals on the life history traits of aphids (*Brevivoryne Brassicae* L.). *Polish Journal of Ecology*. 55. 113-120.
- Grandjean, P. 1978. Regional distribution of lead in human brains. *Toxicology Letters*. 65-69.
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A. 1993. *Chemie prvku. Svazek 1. Informatorium. Praha 793 s.* ISBN: 80-85427-38-9.
- Gregus, Z., Klaassen, C. D. 1986. Disposition of metals in rats: a komparative study of fial, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of 18 metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 85. 24-38.
- Guidotti, T. L., McNamara, J., Moses, M. S. 2008. The interpretation of trace element analysis in body fluids. *Indian Journal of Medical Research*. 128. 524-532.
- Guillemain, M., Devineau, O., Lebreton, J.-D., Mondain-Monval, J.-Y., Johnson, A. R., Simon, G. 2007. Lead shot and teal (*Anas crecca*) in the Camargue, Southern France: effects of embedded and ingested pellets on survival. *Biological Conservation*. 137. 567.
- Guimarães, D., Carvalho, M. L., Geraldés, V., Roch, I., Alves, L. C., Santos, J. P. 2012. Lead in liver and kidney of exposed rats: Aging accumulation study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 26. 285- 290.
- Gulson, B., Wilson, D. 1994. History of lead exposure in children revealed from isotopic analyses of teeth. *Archives of Environmental Health*. 49. 279-283.
- Gurer, H., Ercal, N. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Biology & Med*. 29. 927-945.
- Gwiazda, R., Campbell, C., Smith, D., 2005. A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implication for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ. Health Perspect*. 113. 104-110.

- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53. 1-11.
- Hancke, D., Suárez, O. V. 2016. Infection levels of the cestode *Hymenolepis diminuta* in rat populations from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Helminthology*. 90 (2). 199-205.
- Handy, R. D., Al-Bairuty, G., Al-Jubory, A., Ramsden, C. S., Boyle, D., Shaw, B. J., Henry, T. B. 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*. 79. 821–853.
- Hare, D., Austin, C., Doble, P., Arora, M. 2011. Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Dentistry*. 39. 397–403.
- Haug, A., Melsom, S., Omang, S. 1974. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Environmental Pollution*. 7. 179-192.
- Hauptman, M., Bruccoleri, R., Woolf, A. D. 2017. An Update on Childhood Lead Poisoning. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*. 18 (3). 181-192.
- Heikens, A., Peijnenburg, W. J. G. M., Hendriks, A. J. 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*. 113 (3). 385-393.
- Helander, B., Axelsson, J., Borg, H., Holm, K., Bignert, A. 2009. Ingestion of lead from ammunition and lead concentrations in White-tailed Sea Eagles (*Haliaeetus albicilla*) in Sweden. *Science of the Total Environment*. 407 (21). 5555-63.
- Hermes-Lima, M., Pereira, B., Bechara, E. J. 1991. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica*. 21. 1085–1090.
- Hernández-Plata, E., Quiroz-Compeán, F., Ramírez-García, G., Barrientos, E. Y., Rodríguez-Morales, N. M., Flores, A., Wrobel, K., Wrobel, K., Méndez, I., Díaz-Muñoz, M., Robles, J., Martínez-Alfaro, M. 2015. Melatonin reduces lead levels in blood, brain and bone and increases lead excretion in rats subjected to subacute lead treatment. *Toxicology Letters*. 233 (2). 78-83.
- Hesselberg C. A., Andreassen J. 1975. Some influences of population density on *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitology*. 71. 517-523.
- Hirsch, H. V., Possidente, D., Possidente, B. 2010. Pb²⁺: an endocrine disruptor in *Drosophila*? *Physiology & Behavior*. 99. 254-259.
- Hoffman, D. J., Pattee, O. H., Wiemeyer, S. N., Mulhern, B. 1981. Effects of lead shot ingestion on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity, hemoglobin concentration, and serum chemistry in bald eagles. *Journal of Wildlife Disease*. 17. 423-431.

- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., Herberger, J. P. 1977. The World's Worst Weeds. Distribution and Biology. University Press of Hawaii. Honolulu, Hawaii, USA. 621 s. ISBN: 0824802950
- Holtzman, D., DeVries, C., Nguyen, H., Olson, J., Bensch, K. 1984. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. *Neurotoxicology*. 5. 97-124.
- Hrubá, F., Strömberg, U., Černá, M., Chen, Ch, Harari, F., Harari, R., Horvat, M., Koppová, K., Kos, A., Krsková, A., Krsnik, M., Laamech, J., Li, Y.-F., Löfmark, L., Lundh, T., Lundström, N.-G., Lyoussi, B., Mazej, D., Osredkar, J., Pawlas, K., Pawlas, N., Prokopowicz, A., Rentschler, G., Spěváčková, V., Spiric, Z., Tratnik, J., Skerfving, S., Bergdahl, I. A. 2002. Blood cadmium, mercury, and lead in children: An international comparison of cities in six European countries, and China, Ecuador, and Morocco. *Environment International*. 41. 29–34.
- Hunder, G., Javdani, J., Elsenhans, B., Schumann, K. 2000. Use of gamma-spectrometry for simultaneous determination of Pb-210, As-73, Cd-109, Hg-203 and Fe-59 distribution and excretion in rats. *Toxicology*. 150 (1-3). 69-82.
- Hunter, B. A., Hunter, L. M., Johnson, M. S., Thompson, D. J. 1987. Dynamics of metal accumulation in the grasshopper *Chorthippus brunneus* in contaminated grasslands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1987. 16. 711-716.
- Christie, N. T., Costa, M. 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interaction with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. *Biological Trace Element Research*. 6. 139–158.
- Ikedá, M., Zhang, Z. W., Shimbo, S., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Moon, C. S., Matsuda-Inoguchi, N., Higashikawa, K. 2000. Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia. *Science of the Total Environment*. 249. 373-384.
- Jangid, A. P., John, P. J., Yadav, D., Mishra, S., Sharma, P. 2012. Impact of chronic lead exposure on selected biological markers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 27. 83–89.
- Jankovská, I., Langrová, I., Bejček, V., Miholová, D., Vadlejch, J., Petrtyl, M. 2008. Heavy Metal Accumulation in Small Terrestrial Rodents Infected by Cestodes or Nematodes. *Parasite - Journal de la Societe Francaise de Parasitologie*. 15. 581-588.
- Jankovská, I., Miholová, D., Langrová, I., Bejček, V., Vadlejch, J., Kolihová, D., Šulc, M. 2009. Influence of parasitism on the use of small terrestrial rodents in environmental pollution monitoring. *Environmental Pollution*. 157. 2584 – 2586.
- Jankovská, I., Miholová, D., Lukešová, D., Kalous, L., Válek, P., Romočuský, Š., Vadlejch, J., Petrtyl, M., Langrová, I., Čadková, Z. 2012a. Concentrations of Zn, Mn, Cu and Cd

- indifferent tissues of perch (*Perca fluviatilis*) and in perch intestinal parasite (*Acanthocephalus lucii*) from the stream near Prague (Czech Republic). *Environmental Research*. 112. 83-85.
- Jankovská, I., Száková, J., Lukešová, D., Langrová, I., Válek, P., Vadlejš, J., Čadková, Z., Petrtýl, M. 2012b. Effect of lead in water on the absorption of copper, iron, manganese and zinc by sheep (*Ovis aries*) infected with sheep tapeworm (*Moniezia expansa*). *Experimental Parasitology*. 131. 52-56.
- Jankovská, I., Sloup, V., Száková, J., Langrová, I., Sloup, S. 2016. How the tapeworm *Hymenolepis diminuta* affect zinc and cadmium accumulation in a host fed a hyperaccumulating plant (*Arabidopsis halleri*). *Environmental Science and Pollution Research*. 23 (19). 1926-33.
- Jeffree, R. A., Markich, S. J., Twining, J. R. 2001. Metal concentrations in the flesh and osteoderms of estuarine crocodiles (*Crocodylus porosus*) from the Alligator Rivers Region, northern Australia: biotic and geographic predictors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40. 236-245.
- Jung, K., Zauke, G.-P. 2008. Bioaccumulation of trace metals in the brown shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) from the German Wadden Sea. *Aquatic Toxicology*. 88 (4). 243-249.
- Kafka, Z., Punčochářová, J. 2002. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chemické listy*. 96 (7). 611-617.
- Kasten-Jolly, J., Pabello, N., Bolivar, V. J., Lawrence, D. A. 2012. Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female BALB/ cAnNTac mice. *Neurotoxicology*. 33. 1005–1020.
- Kaushal, D., Garg, M. L., Bansal, M. R., Bansal, M. P. 1996. Biokinetics of lead in various organs of rats using radiotracer technique. *Biological Trace Element Research*. 53. 249–260.
- Kemper, C., Gibbs, P., Obendorf, D., Marvanek, S., Lenghaus, C. 1994. A review of heavy metal and organochlorine levels in marine mammals in Australia. *Science of The Total Environment*. 154 (2–3). 129-139.
- Khaleghzadeh-Ahangar, H., Malek, M., McKenzie, K., 2011. The parasitic nematodes *Hysterothylacium* sp. type MB larvae as bioindicators of lead and cadmium: a comparative study of parasite and host tissues. *Parasitology*. 138. 1400–1405.
- Kim, J.-H., Kang, J.-Ch. 2015. The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 115. 33–39.

- Kindness, A., Sekaran, C. N., Feldmann, J. 2003. Two-dimensional mapping of copper and zinc in liver sections by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clinical Chemistry*. 49. 1916-1923.
- Kishimoto, T., Oguri, T., Ueda, D., Tada, M. 1995. Effect of lead on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Archives of Toxicology*. 69 (10). 718-21.
- Klaassen, C. D., Shoeman, D. W. 1974. Biliary excretion of lead in rats rabbits, and dogs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 29 (3). 434-446.
- Koch, I., Moriarty, M., House, K., Sui, J., Cullen, W. R., Saper, R. B., Reimer, K. J. 2011. Bioaccessibility of lead and arsenic in traditional Indian medicines. *Science of the Total Environment*. 409. 4545–4552.
- Korn, M. G. A., Santos, G. L., Rosa, S. M., Teixeira, L. S. G., de Oliveira, P. V. 2010. Determination of cadmium and lead in cetacean *Dolphinidae* tissue from the coast of Bahia state in Brazil by GFAAS. *Microchemical Journal*. 96 (1). 12-16.
- Korpela, H., Loueniva, R., Yrjanheikki, E., Kauppila, A. 1986. Lead and kadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta and amniotic membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 155. 1086-1089.
- Kosik – Bogacka, D. I., Baranowska-Bosiacka, I., Salmatin, R. 2010. *Hymenolepis diminuta*: Effect of infection on ion transport in colon and blood picture of rats. *Experimental Parasitology*. 124: 285-294.
- Kosik – Bogacka, D. I., Kolasa, A. 2012. Histopathological changes in small and large intestines during hymenolepidosis in rats. *Folia Biologica (Kraków)* 60. 195-198.
- Kosnett, M. J., Becker, C. E., Osterloh, J. D., Kelly, T. J., Pasta, D. J. 1994. Factors influencing bone lead concentration in a suburban community assessed by noninvasive K X-ray fluorescence. *JAMA*. 271. 197-203.
- Krause-Nehring, J., Brey, T., Thorrold, S. R. 2012. Centennial records of lead contamination in northern Atlantic bivalves (*Arctica islandica*). *Marine Pollutio Bulletin*. 64. 233-240.
- Laraque, D., Trasande, L. 2005. Lead poisoning: successes and 21st century challenges. *Pediatrics Review*. 26 (12). 432-443.
- Lasky, R. E., Luck, M. L., Torre, P., Laughlin, N. 2001. The effects of early lead exposure on auditory function in rhesus monkeys. *Neurotoxicology and Teratology*. 23 (6). 639-649.
- Laughlin, N. K., Bushnell, P. J., Bowman, R. E. 1991. Lead exposure and diet: Differential effects on social development in the rhesus monkey. *Neurotoxicology and Teratology*. 13 (4). 429-440

- Laughlin, N. K., Lasky, R. E., Giles, N. L., Luck, M. L. 1999. Lead Effects on Neurobehavioral Development in the Neonatal Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). *Neurotoxicology and Teratology*. 21 (6). 627-638.
- Lawton, L. J., Donaldson, W. E. 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*. 28. 83–97.
- Lethbridge R. C. 1971. The hatching of *Hymenolepis diminuta* eggs and penetration of the hexacanth in *Tenebrio molitor* beetles. *Parasitology* 62. 445-456.
- Levin, S. M., Goldberg, M. 2000. Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 37. 23-43.
- Li, N., Hou, Y., Ma, D., Jing, W., Dahms, H.-U., Wang, L. 2015. Lead accumulation, oxidative damage and histopathological alteration in testes and accessory glands of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*, induced by acute lead exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 117. 20-27.
- Lindén A., Olsson I. M., Bensryd I., Lundh T., Skerfving S., Oskarsson A. 2003. Monitoring of cadmium in the chain from soil via crops and feed to pig blood and kidney. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 55. 213-222.
- Lopes, F., Reyes, J. L, Wang, A., Leung, G., McKay, D. M. 2015. Enteric epithelial cells support growth of *Hymenolepis diminuta* in vitro and trigger TH2-promoting events in a species-specific manner. *International Journal for Parasitology*. 45. 691-696.
- Lumsden, R. D., Byram, J. 1967. The ultrastructure of cestode muscle. *Journal of Parasitology*. 53. 326–342.
- Lumsden, R.D. 1966. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes II the synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument of *Hymenolepis diminuta*. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*. 28. 1–13.
- Lustberg, M., Silbergeld, E. 2002. Blood lead levels and mortality. *Archives of Internal Medicine*. 162. 2443-2449.
- Mager, E. M., Brix, K. V., Grosell, M. 2010. Influence of bicarbonate and humic acid on effects of chronic waterborne lead exposure to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*. 96. 135–144.
- Mahaffey, K. R., Capar, S. G., Gladen B. C., Fowler, B. A. 1981. Concurrent exposure to lead, cadmium and arsenic. Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 98. 463-481.

- Mahaffey, K. R., Gartside, P. S., Glueck, C. J. 1986. Blood lead levels and dietary calcium intake in 1- to 11-year old children: the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980. *Pediatrics*. 78 (2). 257–262.
- Mahjoub, S., Moghaddam, A. H. 2011. The role of exercising and curcumin on the treatment of lead-induced cardiotoxicity in rats. *Iranian Journal of Health and Physical Activity*. 2 (1). 1–5.
- Maitani, T., Watahiki, A., Suzuki, K. T. 1986. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 83 (2). 211-217.
- Mariussen, E., Heier, L. S., Teien, H. Ch., Pettersen, M. N., Holth, T. F., Salbu, B., Rosseland, B. O. 2017. Accumulation of lead (Pb) in brown trout (*Salmo trutta*) from a lake downstream a former shooting range. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 135. 327–336.
- Markowitz. M. 2000. Lead poisoning. *Pediatrics in Review*. 21. 327-335.
- Marques, C. C., Nunes, A. C., Pinheiro, T., Lopes, P. A., Santos, M. C., Viegas-Crespo, A. M., Ramalhinho, M. G., Mathias, M. L. 2006. An assessment of time-dependent effects of lead exposure in Algerian mice (*Mus spretus*) using different methodological approaches. *Biological trace Element Research*. 109 (1). 75-89.
- Marsden, P. A. 2003. Increased body lead burden – cause or consequence of chronic renal insufficiency? *The New England Journal of Medicine*. 348. 345-347.
- Maršálek, P. 2014. Těžké kovy (Hg, Cd, Pb, As), s. 467–502. In: Velišek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Stěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, E., Stancová, V. *Vodní toxikologie pro rybáře*. FROV JU, Vodňany. 600 s. ISBN: 978-80-87437-89-6.
- Martinez-Garcia, F., Martínez-Ruiz, F., Vicente, I., Peñafiel, R., Cremades, A. 1995. Effect of environmental temperature on tissue lead accumulation in mice repeatedly treated with lead acetate. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*. 293 (3). 271-275.
- Mateo, R., Beyer, W. N., Spann, J. W., Hoffman, D. J., Ramis, A. 2003. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 66. 1371–1389.
- Mateo, R., Belliure, J., Dolz, J. C., Aguilar Serrano, J. M., Guitart, R. 1998. High prevalences of lead poisoning in wintering waterfowl in Spain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35. 342-347.

- Matusch, A., Bauer, A., Becker, J. S. 2011. Element imaging in formalin fixed slices of human mesencephalon. *International Journal of Mass Spectrometry*. 307. 240–244.
- Mazzei, V., Longo, G., Brundo, M. V., Copat, C., Ferrante, M. 2013. Effects of heavy metal accumulation on some reproductive characters in *Armadillidium granulatum* Brandt (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98. 66-73.
- McLean, Ch. M., Koller, C. E., Rodger, J. C., MacFarlane, G. R. 2009. Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Science of the Total Environment*. 407. 3588–3596.
- Metcheva, R., Teodorova, S., Topashka-Ancheva, M. 2003. A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria I: monitoring points and bioaccumulation features. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54. 176–187.
- Mishra, V. K., Tripathi, B. D. 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*. 99. 709-712.
- Mohammed, A., Mohammed, T. 2017. Mercury, arsenic, cadmium and lead in two commercial shark species (*Sphyrna lewini* and *Caraaharinus porosus*) in Trinidad and Tobago. *Marine Pollution Bulletin*. 119 (2). 214-218.
- Monteiro, H. P., Bechara, E. J., Abdalla, D. S. 1991. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 24. 73–83.
- Moore, H. J. 1971. The structure of the latero-frontal cirri on the gill of certain lamellibranch molluscs and their role in suspension feeding. *Marine Biology*. 11. 23-27.
- Morgan, A., Holmes, A., Evans, J. C. 1977. Retention, distribution, and excretion of lead by the rat after intravenous injection. *British Journal of Industrial Medicine*. 34. 37-42
- Morsy, K., Bashtar, A.R., Abdel-Ghaffar, F., Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S.A., El-Mahdi, M., Al-Ghamdi, A., Mostafa, N., 2012. First record of anisakid juveniles (Nematoda) in the European seabass *Dicentrarchus labrax* (family: Moronidae), and their role as bio-indicators of heavy metal pollution. *Parasitol. Res.* 110. 1131–1138.
- Mudipalli, A. 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. *Indian Journal of Medical Research*. 126. 518-27.
- Müller, J.-Ch., Lichtmanegger, J., Zischka, H., Sperling, M., Karst, U. 2018. High spatial resolution LA-ICP-MS demonstrates massive liver copper depletion in Wilson disease rats upon Methanobactin treatment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 49. 119-127.

- Muñoz-Vera, A., Matías, J., Castejón, P., García, G. 2016. Patterns of trace element bioaccumulation in jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria, Scyphozoa) in a Mediterranean coastal lagoon from SE Spain. *Marine Pollution Bulletin*. 110 (1). 143-154.
- Mushak, P. 1991. Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: Overview of biological and biophysico-chemical aspects. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 3. 87-104.
- Nascimento, C. R. B., Risso, W. E., dos Reis Martinez, C. B. 2016. Lead accumulation and metallothionein content in female rats of different ages and generations after daily intake of Pb-contaminated food. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 48. 272–277.
- Navas-Acien, A., Selvin, E., Sharrett, A. R., Calderon-Aranda, E., Silbergel, E., Guallar, E. 2004. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation*. 109. 3196-3201.
- Needleman, H. 2004. Lead poisoning. *Annual Review of Medicine*. 55. 209-222.
- Ngueta, G., Prévost, M., Deshommes, E., Abdous, B., Gauvin, D., Levallois, P. 2014. Exposure of young children to household water lead in the Montreal area (Canada): The potential influence of winter-to-summer changes in water lead levels on children's blood lead concentration. *Environment International*. 73. 57–65.
- Nhi, T. T. Y., Shazili, N. A. M., Shaharom-Harrison, F. 2013. Use of cestodes as indicator of heavy-metal pollution. *Experimental Parasitology*. 133. 75-79.
- Nilsen, F. M., Kassim, B. L., Delaney, J. P., Lange, T. R., Brunell, A. M., Guillette Jr., L. J., Long, S. E., Schock, T. B. 2017. Trace element biodistribution in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Chemosphere*. 181. 343-351.
- Nollen, P. M. 1975. Studies on the reproductive system of *Hymenolepis diminuta* using autoradiography and transplantation. *Journal of Parasitology*. 61. 100-4.
- Norman, E. H., Hertz-Picciotto, I., Salmen, D. A., Ward, T. H. 1997. Childhood lead poisoning and vinyl miniblind exposure. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 151. 1033-1037.
- Nwokocha, Ch. R., Nwokocha, M. I., Aneto, I., Obi, J., Udekweleze, D. C., Olatunde, B., Moses, D. U. O., Iwuala, O. 2012a. Comparative analysis on the effect of *Lycopersicon esculentum* (tomato) in reducing cadmium, mercury and lead accumulation in liver. *Food and Chemical Toxicology*. 50 (6). 2070-2073.
- Nwokocha, Ch. R., Owu, D. U., Nwokocha, M. I., Ufearo, Ch. S., Iwuala, M. O. E. 2012b. Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50 (2). 222-226.

- Nwokocha, Ch. R., Owu, D. U., Ufearo, C. S., Iwuala, M. O. E. 2011. Comparative study on the efficacy of *Garcinia kola* in reducing some heavy metal accumulation in liver of Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 135 (2). 488-491.
- Oaks, J. A., Lumsden, R. D. 1971. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. V. Incorporation of carbohydratecontaining macromolecules into tegument membranes. *Journal of Parasitology*. 57. 1256–1268.
- Odjegba, V. J., Fasidi, I. O. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: Implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*. 13 (7). 637–646.
- Ogren, R. 1961. The Mature Oncosphere of *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*. 47 (2). 197-204.
- Öhman-James, C., 1973. Cytology and cytochemistry of the scolex gland cells in *Diphyllobothrium ditremum* (Creplin, 1825). *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*. 42. 77–86.
- Oros-Peusquens, A. M., Matusch, A., Becker, J. S., Shah, N. J. 2011. Automatic segmentation of tissue sections using the multielement information provided by LA-ICP-MS imaging and k-means cluster analysis. *International Journal of Mass Spectrometry*. 307. 245–252.
- Pain, D. J., Amiard-Triquet, C. 1993. Lead poisoning of raptors in France and elsewhere. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 25. 183-192.
- Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N., Tsatsakis, A. M. 2005. Lead toxicity update. A brief review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 11 (10). RA329-336.
- Pappas P. W., Marschall E. A., Morrison S. E., Durka G. M., Daniel C. S. 1995. Increased coprophagic activity of the beetle, *Tenebrio molitor*, on reces containing eggs of the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *International Journal for Parasitology*. 25. 1179-1184.
- Pappas, P. W., Barley, A. J., Wardrop, S. M. 1999. *Hymenolepis diminuta*: Glucose and glykogen gradients in the adult tapeworm. *Experimental Parasitology*. 91. 351-326.
- Pappas, P. W., Durka, G. M. 1994. Partial characterization of the protein and carbohydrate constituents of the egg shell of *Hymenolepis diminulu* (Cestoda). *Intrrnutionul Journal Jor Parasitology*. 24. 705-712.
- Pareja-Carrera, J., Mateo, R., Rodríguez-Estival, J. 2014. Lead (Pb) in sheep exposed to mining pollution: Implications for animal and human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 108. 210–216.
- Park, S., Sim, Ch, S., Lee, H., Kim, Y. 2014. Effects of iron therapy on blood lead concentrations in infants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28 (1). 56-59.

- Patamia, I., Cappello, E., Castellano-Chiodo, D., Greco, F., Nigro, L., Cacopardo, B. A. 2010. Human Case of *Hymenolepis diminuta* in a Child from Eastern Sicily. *Korean Journal of Parasitology*. 48 (2). 167-169.
- Patraa, R. C., Swarupa, D., Kumara, P., Nandia, D., Naresha, R., Ali, S. L. 2008. Milk trace elements in lactating cows environmentally exposed to higher level of lead and cadmium around different industrial units. *Science of the Total Environment*. 404. 36-43.
- Patrick, L. 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*. 11 (1). 2-22.
- Phillips, C. J. C., Mohamed, M. O., Chiy, P. C. 2011. Effects of duration of exposure to dietary lead on rumen metabolism and the accumulation of heavy metals in sheep. *Small Ruminant Research*. 100 (2–3). 113-121.
- Piomelli, S. 2002. Childhood lead poisoning. *Pediatric Clinics of North America*. 49. 1285– 1304.
- Pitts, L. C., Wallace, G. T. 1994. Lead deposition in the shell of the bivalve, *Mya arenaria*: an indicator of dissolved lead in seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 39. 93-104.
- Pollock, C. A., Ibels, L. S. 1988. Lead nephropathy – a preventable cause of renal failure. *The International Journal of Artificial Organs*. 11. 75-78.
- Prozesky, V. M., Raubenheimer, E. J., Heerden, W. F. P. V., Grotepass, W. P., Przybylowicz, W. J., Pineda, C. A., Swart, R. 1995. Trace element concentration and distribution in ivory. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. 104. 638-644.
- Rabinowitz, M. B., Kopple, J. D., Wetherill, G. W. 1980. Effect of food intake on fasting gastrointestinal lead absorption in human. *American Journal of Clinical Nutrition*. 33. 1784-1788.
- Rabinowitz, M. B., Wetherill, G. W., Kopple, J. D. 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 58. 260-270.
- Rachwał, M., Rybak, J., Rogula-Kozłowska, W. 2018. Magnetic susceptibility of spider webs as a proxy of airborne metal pollution. *Environmental Pollution*. 234. 543-551.
- Rainwater, T. R., Wu, T. H., Finger, A. G., Cañas, J. E., Yu, L., Reynolds, K. D., Coimbatore, G., Barr, B., Platt, S. G., Cobb, G. P., Anderson, T. A., McMurry, S. T. 2007. Metals and organochlorine pesticides in caudal scutes of crocodiles from Belize and Costa Rica. *Science of The Total Environment*. 373 (1). 146-156.
- Ramos, A. A., Inoue, Y., Ohde, S. 2004. Metal contents in *Porites* corals: anthropogenic input of river run-off into a coral reef from an urbanized area, Okinawa. *Marine Pollution Bulletin*. 48. 281-294.

- Rezaie-Atagholipour, M., Riyahi-Bakhtiari, A., Sajjadi, M., Yap, Ch. K. Y., Ghaffari, S., Ebrahimi-Sirizi, Z., Ghezellou, P. 2012. Metal concentrations in selected tissues and main prey species of the annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) in the Hara Protected Area, northeastern coast of the Persian Gulf, Iran. *Marine Pollution Bulletin*. 64 (2). 416-421.
- Rice, D. C. 1993. Lead-induced changes in learning: evidence for behavioral mechanisms from experimental animal studies. *Neurotoxicology*. 14. 167-178.
- Riggs, M. R., Lemly, A. D., Esch, G. W. 1987. The growth, biomass and fecundity of *Bothriocephalus acheilognathi* in a North Carolina cooling reservoir. *Journal of Parasitology*. 73. 893-900.
- Roberts, L. S. 1961. The influence of population density on patterns and physiology of growth in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea) in the definitive host. *Experimental Parasitology*. 11 (4). 332-371.
- Roberts, L. S. 1973. Modifications in media and surface sterilization methods for in vitro cultivation of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*. 59. 474-479.
- Roberts, L. S., Mong, F. N. 1969. In vitro Development of *Hymenolepis diminuta* in Presence and Absence of Oxygen. *Experimental Parasitology*. 26. 166-174.
- Roberts, L. S., Mong, F. N. 1973. Developmental physiology of cestodes. XIII. Vitamin B₆ requirement of *Hymenolepis diminuta* during in vitro cultivation. *Journal of Parasitology*. 59. 101-104.
- Rojas-Lopez, M., Santos-Burgoa, C., Rios, C., Hernández-Avila, M., Romieu, I. 1994. Use of lead-glazed ceramics is the main factor associated to high lead in blood levels in two Mexican rural communities. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 42. 45-52.
- Rosado, J. L., Lopez, P., Kordas, K., Garcia-Vargas, G., Ronquillo, D., Alatorre, J., Stoltzfus, R. J. 2006. Iron and/or zinc supplementation did not reduce blood lead concentrations in children in a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Nutrition*. 136 (9). 2378-2383.
- Rosenman, K. D., Sims, A., Luo, Z., et al. 2003. Occurrence of lead-related symptoms below the current Occupational Safety and Health Act allowable blood lead levels. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 45 (5). 546-555.
- Rosin, A. 2009. The Long-term Consequences of Exposure to Lead. *Israel Medical Association Journal*. 11 (11). 689-694.
- Rousseau, M. C., Straif, K., Siemiatycki, J. 2005. IARC carcinogen update. *Environmental Health Perspectives*. 113. A580-A581.
- Rudy, M. 2009. Correlation of lead, cadmium and mercury levels in tissue and liver samples with age in cattle, *Food Additives & Contaminants: Part A*. 26 (6). 847-853.

- Ruff, H. A., Markowitz, M. E., Bijur, P. E., Rosen, J. F. 1996. Relationships among blood lead levels, iron deficiency, and cognitive development in two-year-old children. *Environ. Health Perspect.* 104 (2). 180-185.
- Russell, J. R. 1989. The continuing hazard of lead in drinking water. *Lancet.* 2. 669-670.
- Sainty, G. R., Jacobs, S. W. L. 1981. *Water Plants of New South Wales.* Sydney, Australia: Water Resources Commission for New South Wales.
- Sakai, H., Saeki, K., Ichihashi, H., Suganuma, H., Tanabe, S., Tatsukawa, R. 2000. Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) and green turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin.* 40. 701-709.
- Sánchez-Chardi, A., Nadal, J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere.* 68. 703–711.
- Sánchez-Chardi, A., Penarroja-Matutano, C., Ribeiro, C. A. O., Nadal, J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere.* 70. 101–109.
- Sansar, W., Ahboucha, S., Gamrani, H. 2011. Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. *Acta Histochemica.* 113 (6). 601-607.
- Sansar, W., Bouyatas, M. M., Ahboucha, S., Gamrani, H. 2012. Effects of chronic lead intoxication on rat serotonergic system and anxiety behavior. *Acta Histochemica.* 114 (1). 41-45.
- Santos, M. C., Wagner, M., Wu, B., Scheider, J., Oehlmann, J., Cadore, S., Becker, J. S. 2009. Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta.* 80. 428–433.
- Seidel, J. S. 1975. The Life Cycle In Vitro of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda). *The Journal of Parasitology.* 61 (4). 677-681.
- Shariatgorji, M., Nilsson, A., Bonta, M., Gan, J., Marklund, N. M., Clausen, F., Kallback, P., Loden, H., Limbeck, A., Andrén, P. E. 2016. Direct imaging of elemental distributions in tissue sections by laser ablation mass spectrometry. *Methods.* 104. 86-92.
- Shea J. F. 2007. Lack of preference for infective faeces in *Hymenolepis diminuta*-infected beetles (*Tenebrio molitor*). *Journal of Helminthology.* 81. 293-299.
- Sheiman, I. M., Shkutin, M. F., Terenina, N. B., Gustfsson, M. K. 2006. A behavioral study of the beetle *Tenebrio molitor* infected with cysticercoids of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Naturwissenschaften.* 93 (6). 305-308.

- Shu, Y., Zhou, J., Tang, W., Lu, K., Zhou, Q., Zhang, G. 2009. Molecular characterization and expression pattern of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vitellogenin, and its response to lead stress. *Journal of Insect Physiology*. 55. 608-616.
- Shukla, N., Moitra, J. K., Trivedi, R. C. 1996. Determination of lead, zinc, potassium, calcium, copper and sodium in human cataract lenses. *Science of the Total Environment*. 181. 161-165.
- Shukla, V., Dhankhar, M., Prakash, J., Sastry, K. V. 2007. Bioaccumulation in Zn, Cu and Cd in *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*. 28. 395-397.
- Schardein, J. L., Waitz, J. A. 1965. Histochemical studies of esterases in the cuticle and nerve cords of four cyclophyllidean cestodes. *Journal of Parasitology*. 51. 356-363.
- Schell, L. M., Denham, M., Stark, A. D., Ravenscroft, J., Parsons, P., Schulte, E. 2004. Relationship between blood lead concentration and dietary intakes of infants from 3 to 12 months of age. *Environmental Research*. 96. 264-273.
- Scheuhammer, A. M. 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: a review. *Environmental Pollution*. 46. 263-295.
- Schiller, E. L. 1965. A Simplified Method for the In vitro Cultivation of the Rat Tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*. 51 (4). 516-518.
- Schmidt, G. D., Roberts, L. S. 2009. *Foundations of Parasitology*. 8. vydání. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, USA. 701s. ISBN 978-0-07-302827-9.
- Simon, S. L., 1998. Soil ingestion by humans: a review of history, data, and etiology with application to risk assessment of radioactively contaminated soil. *Health Physics*. 74. 647-672.
- Sinha, D. P., Hopkins, C. A. 1967. In vitro cultivation of the tapeworm *Hymenolepis nana* from larva to adult. *Nature*. 215. 1275-1276.
- Sinicropi, M. S., Amantea, D., Caruso A., Satunino, C. 2010. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Archives of Toxicology*. 84 (7). 501-520.
- Skerfving, S., Bergdahl, I. A. 2007. Lead. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3. vydání. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L. (Eds). Elsevier Academic Press, Amsterdam, s. 599-643. ISBN: 978-0-12-369413-3.
- Smith, E., Gancarz, D., Rofe, A., Kempson, I. M., Weber, J., Juhasz, A. L. 2012. Antagonistic effects of cadmium on lead accumulation in pregnant and non-pregnant mice. *Journal of Hazardous Materials*. 199-200. 453-456.

- Smyth, J. D. 1962. Studies on tapeworm physiology. X. Axenic cultivation of the hyatid organism *Echinococcus granulosus*; establishment of a basic technice. *Parasitology*. 52. 441-457.
- Smyth, J. D., McManus, D. P. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Cambridge. Velká Británie. 412 s. ISBN: 9780511525841.
- Sokas, R. K., Simmens, S., Sophar, K., Welch, L. S., Liziewski, T. 1997. Lead levels in Maryland construction workers. *American Journal of Industrial Medicine* .31. 188-194.
- Spry, D. J., Wiener, J. G. 1991. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. *Environmetal Pollution*. 71. 243-304.
- Sridhar, M. K. C. 1986. Trace element composition of *Pistia stratiotes* L. in polluted lake in Nigeria. *Hydrobiologia*. 131. 273–276.
- Stanskiene B., Matusevicius, P., Budreckiene, R., Skiniewska, K. A. 2006. Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15. 585-591.
- Stavros, H.-Ch. W., Bonde, R. K., Fair, P. A. 2008. Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Marine Pollution Bulletin*. (56) 6. 1221-1225.
- Steinbaugh, G. E., Taylor, R. W., Pfeiffer, D. R. 2007. Oral administrativ versus intra-peritoneal injection of Pb affects its concentration in selected tissues. *Inorganic Chemistry Communication*. 10 (11). 1371-1374.
- Stets, E. G., Lee, C. J., Lytle, D. A., Schock, M. R. 2018. Increasing chloride in rivers of the conterminous U.S. and linkages to potential corrosivity and lead action level exceedances in drinking water. *Science of the Total Environment*. 613–614. 1498–1509.
- Stocken, L. A. 1947. 3-Dimercaptopropanol (“British Anti-Lewisite”) and related compounds. *Journal of the Chemical Society*. 592–595.
- Stradowski M. 1994. Effects of inbreeding in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Acta Parasitologica*. 39. 146-149.
- Struzynska, L., Walski, M., Gadamski, R., Dabrowska-Bouta, B., Rafalowska, U. 1997. Lead-induced abnormalities in blood-brain barrier permeability in experimental chronic toxicity. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 31. 207–224.
- Sures, B. 2001. The use of fish parasites as bioindicators of heavy metals in aquatic ecosystems: a review. *Aquatic Ecology*. 35. 245-255.
- Sures, B. 2003. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: an overview and perspective. *Parasitology*. 126. 53-60.

- Sures, B. 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. 20 (4). 170-177.
- Sures, B., Siddall, R. 1999. *Pomphorhynchus laevis*: The intestinal acanthocephalan as a lead sink for its fish host chub (*Leuciscus cephalus*). *Experimental Parasitology*. 93. 66-72.
- Sures, B., Taraschewski, H., Rokicki, J. 1997. Lead and cadmium content of two cestodes, *Monobothrium wagneri* and *Bothriocephalus scorpii*, and their fish hosts. *Parasitology Research*. 83 (6). 618-623.
- Sures, B., Jürges, G., Taraschewski, H. 1998. Relative concentrations of heavy metals in the parasites *Ascaris sum* (Nematoda) and *Fasciola helatica* (Digenea) and their respective porcine and bovine definitive hosts. *International Journal for Parasitology*. 28 (8). 1173-1178.
- Sures, B., Siddall, R., Taraschewski, H. 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitology Today*. 15 (1). 16-21.
- Sures, B., Franken, M. R., Tarschewski, H. 2000a. Element concentrations in the archiacanthocephalan *Macracanthorhynchus hirudinaceus* compared with those in the porcine host from a slaughterhouse in La Paz, Bolivia. *International Journal for Parasitology*. 30. 1071-1076.
- Sures, B., Jürges, G., Taraschewski, H. 2000b. Accumulation and distribution of lead in the archiacanthocephalan *Moniliformis moniliformis* from experimentally infected rats. *Parasitology*. 121 (4). 427-33.
- Sures, B., Grube, K., Taraschewski, H. 2002. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Hymenolepis diminuta* and its final host, *Rattus norvegicus*. *Ecotoxicology* 11, 365-368.
- Sures, B., Scheible, T., Bashtar, A. R., Taraschewski, H. 2003. Lead concentrations in *Hymenolepis diminuta* adults and *Taenia taeniaeformis* larvae compared to their rat hosts (*Rattus norvegicus*) sampled from the city of Cairo, Egypt. *Parasitology*. 127. 483-487.
- Taupeau, C., Poupon, J., Nomé, F., Lefèvre, B. 2001. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reproductive Toxicology*. 15 (4). 385-391.
- Teimoori S., Sabour Yaraghi A., Makki M. S., Shahbazi F., Nazmara S., Rokni M. B., Mesdaghinia, A., Salhi Moghaddam, A., Hosseini, M., Rakhshanpour, A., Mowlavi, G. 2014. Heavy metal bioabsorption capacity of intestinal helminths in urban rats. *Iranian Journal of Public Health*. 43 (3). 310–315.

- Tena, D., Pérez Simón, M., Gimeno, C., Pérez Pomata, M. T., Illescas, S., Amondarain, I., González, A., Dominguez, J., Bisquert, J. 1998. Human infection with *Hymenolepis diminuta*: Case Report from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (8). 2375-2376.
- Tenora, F., Baruš, V., Prokeš, M. 2002. Next remarks to the knowledge of heavy metal concentrations in gravid tapeworm species parasitizing aquatic birds. *Helminthologia*. 39. 143-148.
- Tersago, K., De Coen, W., Scheirs, J., Vermeulen, K., Blust, R., Van Bockstaele, D., Verhagen, R. 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution*. 13 (3). 385-394.
- Thornson, R. E., Digenis, G. A., Berntzen, A., Konyalian, A. 1968. Biological activities of various lipid fractions from *Echinococcus granulosus* scolices on in vitro cultures of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*. 54. 970-973.
- Timchalk, C., Lin, Y., Weitz, K. K., Wu, H., Gies, R. A., Moore, D. A., Yantasee, W. 2006. Disposition of lead (Pb) in saliva and blood of Sprague-Dawley rats following a single or repeated oral exposure to Pb-acetate. *Toxicology*. 222 (1-2). 86-94.
- Tirima, S. Bartrem, C., von Lindern, I., von Braun, M., Lind, D., Anka, S. M., Abdullahi, A. 2018. Food contamination as a pathway for lead exposure in children during the 2010–2013 lead poisoning epidemic in Zamfara, Nigeria. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 67. 260-272.
- Tofts, J., Meerovitch, E. 1974. The effect of farnesyl methyl ether, a mimic of insect juvenile hormone, on *Hymenolepis diminuta* in vitro. *International Journal for Parasitology*. 4. 211-218.
- Torres, K. C., Johnson, M. L. 2001. Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (11). 2617–2626.
- Torres, J., de Lapuente, J., Eira, C., Nadal, J. 2004. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoides arfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain. *Parasitology Research*. 94. 468-470.
- Torres, J., Peig, J., Eira, C., Borrás, M. 2006. Cadmium and lead concentrations in *Skryabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain), *Environmental Pollution*. 143. 4-8.
- Torres, J., Eira, C., Miquel, J., Foronda, P., Feliu, C. 2011. Cadmium and lead concentrations in *Moniliformis monilitormis* (Acanthocephala) and *Rodentolepis microstoma* (Cestoda), and their definitive hosts, *Rattus rattus* and *Mus domesticus* in El Hierro (Canary Archipelago, Spain). *Acta Parasitologica*. 56 (3), 320-324.

- Trebichavský, J., Havrdová, D., Blohberger, M. 1998. Toxické kovy. NSO. Kutná Hora. 483 s.
- Trinogga, A., Fritsch, G., Hofer, H., Krone, O. 2013. Are lead-free hunting rifle bullets as effective at killing wildlife as conventional lead bullets? A comparison based on wound size and morphology. *Science of The Total Environment*. 443. 15. 226-232
- Turčeková, L., Hanzelová, V., Špakulová, M. 2002. Concentrations of heavy metals in the cestode *Proteocephalus percae*, parasite of perch. *Helminthologia*. 39 (1). 23-28.
- Turton, J. A. 1972. The in vitro cultivation of *Hymenolepis diminuta*: effect of antibiotik on the growth of free-day-old worms removed from the rat. *Experimental Parasitology*. 36. 62-69.
- Turton, J. A. 1974. In vitro cultivation of *Hymenolepis diminuta*: effect of antibiotics on the growth of three-day-old worms removed from the rat. *Experimental parasitology*. 36 (1). 62-69.
- Urgast, D. S., Ellingsen, D. G., Berlinger, B., Eilertsen, E., Friisk, G., Skaug, V., Thomassen, Y., Beattie, J. H., Kwun, I. S., Feldmann, J. 2012. Multi-elemental bioimaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404. 89–99.
- Varaksin, A. N., Katsnelson, B. A., Panov, V. G., Privalova, L. I., Kireyeva, E. P., Valamina, I. E., YuBeresneva, O. 2014. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: A case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. *Food and Chemical Toxicology*. 64. 144-156.
- Veselý, T., Trkal, L., Neuberg, M., Száková, J., Drábek, O., Tejnecký, V., Baliková, M., Tlustoš, P. 2012. Removal of Al, Fe and Mn by *Pistia stratiotes* L. and its stress response. *Central European Journal of Biology*. 7 (6). 1037–1045.
- Vijver, M. G., Wolterbeek, H. T., Vink, J. P. M., van Gestel, C. A. M. 2005. Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body. *Science of the Total Environment*. 340. 271-280.
- Villar, T. d. C., Elaine, J., Kaligayahan, P., Flavier, M. E. 2005. Lead and cadmium levels in edible internal organs and blood of poultry chicken. *Journal of Applied Sciences*. 5. 1250–1253.
- Visioli, G., Marmioli, N. 2013. The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants. *Journal of Proteomics*. 79. 133-45.
- Voge, M., Graiwer, M. 1964. Development of Oncospheres of *Hymenolepis diminuta*, Hatched In vivo and In vitro, in the Larvae of *Tenebrio molitor*. *The Journal of Parasitology*. 50 (2). 267-270.
- Vokřál, I., Jirásko, R., Jedličková, V., Bártíková, H., Skálová, L., Lamka, J., Holčápek, M., Szotáková, B. 2012. The inability of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* and fluke

- Dicrocoelium dendriticum* to metabolize praziquantel. *Veterinary Parasitology*. 185. 168-174.
- Volf P., Horák P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. 1. Vydání. Triton. Praha. 318 s. ISBN 9788073870089
- Wack, M., Komuniecki, R., Roberts, L. S. 1983. Amino acid metabolism in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 74B. 399–402.
- Waegeneers, N., Pizzolon, J.-C., Hoenig, M., De Temmerman, L. 2009. Accumulation of trace elements in cattle from rural and industrial areas in Belgium, *Food Additives & Contaminants: Part A*. 26 (3). 326-332.
- Waldron, H. A., 1966. The anaemia of lead poisoning: a review. *American Journal of Industrial Medicine*. 23. 83–100.
- Wang, T. H., Jian, C. H., Hsieh, Y. K., Wang, F. N., Wang, C. F. 2013. Spatial distributions of inorganic elements in honeybees (*Apis mellifera* L.) and possible relationships to dietary habits and surrounding environmental pollutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61. 5009–5015.
- Warchałowska-Śliwa, E., Niklińska, M., Görlich, A., Michailova, P., Pyza, E. 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental Pollution*. 133. 373-381.
- Weir, S. M., Suski, J. G., Salice, Ch. J. 2010. Ecological risk of anthropogenic pollutants to reptiles: Evaluating assumptions of sensitivity and exposure. *Environmental Pollution*. 158 (12) 3596-3606.
- Woelfl, S., Mages, M., Torres, P. 2008. Trace metal concentrations in single specimens of the intestinal broad flatworm (*Diphyllbothrium latum*), compared to their fish host (*Oncorhynchus mykiss*) measured by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy*. 63. 1450-1454.
- Wijnhovena, S., Leuven, R. S. E. W., van der Velde, G., Eijsackers, H. J. P. 2008. Toxicological risks for small mammals in a diffusely and moderately polluted floodplain. *Science of the Total Environment*. 406. 401-406.
- Wilczek, G., Babczynska, A. 2000. Heavy metals in the gonads and hepatopancreas of spiders (Araneae) from variously polluted areas. *Ekologia (Bratislava)*. 3. 283-292.
- Wilkinson, J. M., Hill, J., Phillips, C. J. C. 2003. The accumulation of potentially-toxic metals by grazing ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62 (2). 267-277.

- Wise Jr, J. P., Wise, J. T. F., Wise, C. F., Wise, S. S., Gianios Jr, Ch., Xie, H., Walter, R., Boswell, M., Zhu, C., Zheng, T., Perkins, Ch., Wise Sr, J. P. 2018. A three year study of metal levels in skin biopsies of whales in the Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil crisis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 205. 15-25.
- Wu, Y.-S., Huang, S.-L., Chung, H.-Ch., Nan, F.-H. 2017. Bioaccumulation of lead and non-specific immune responses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to Pb exposure. *Fish & Shellfish Immunology*. 62. 116-123.
- Wu, G., Yi, Y. 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology*. 167. 131-139.
- Yadollahvand, R., Kami, H. G., Mashroofeh, A., Bakhtiari, A. R. 2014. Assessment trace elements concentrations in tissues in Caspian Pond Turtle (*Mauremys caspica*) from Golestan province, Iran. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 101. 191-195.
- Yantasee, W., Hongsirikarn, K., Warner, C. L., Choi, D., Sangvanich, T., Toloczko, M. B., Warner, M. G., Fryxell, G. E., Addleman, R. S., Timchalk, C. 2008. Direct detection of Pb in urine and Cd, Pb, Cu, and Ag in natural waters using electrochemical sensors immobilized with DMSA functionalized magnetic nanoparticles. *The Analyst*. 133 (3). 348-55.
- Yasar, A., Khan, M., Tabinda, A. B., Hayya, M, Zaheer, A. 2013. Percentage uptake of heavy metals of different macrophytes in stagnant and flowing textile effluent. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 23 (6). 1709–1713.
- Yusá, V., Suelves, T., Ruiz-Atienza, L., Cervera, M. L., Benedito, V., Pastor, A. 2008. Monitoring programme on cadmium, lead and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*. 1(1). 22–31.
- Zarrintab, M., Mirzaei, R. 2017a. Evaluation of some factors influencing on variability in bioaccumulation of heavy metals in rodents species: *Rhombomys opimus* and *Rattus norvegicus* from central Iran. *Chemosphere*. 169. 194-203.
- Zarrintab, M., Mirzaei, R. 2017b. Stress induced by heavy metals on breeding of magpie (*Pica pica*) from central Iran. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 143. 28–37.
- Zaza, S., de Balogh, K., Palmery, M., Pastorelli, A. A., Paolo Stacchini, P. 2015. Human exposure in Italy to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption from Eastern Central Atlantic Fishing Area. *Journal of Food Composition and Analysis*. 40. 148-153.

- Zhang, X.-Y., Zheng, L.-N. , Wang, H.-L., Shi, J.-W., Feng, W.-Y., Li, L., Wang M. 2016. Elemental Bio- imaging of Biological Samples by Laser Ablation- Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 44 (11). 1646-1651.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. 606 (2). 135-150.
- Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., Mahaffey, K. R., Fomon, S. J. 1978. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatric Research*. 12. 29-34.
- Zoriy, M. V., Dehnhardt, M., Reifenberger, G., Zilles, K., Becker, J. S. 2006. Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 257. 27–33.