Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Vliv příjmu půdy kontaminované rizikovými prvky na vybrané biochemické parametry potkanů

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiřina Száková, Csc.

Konzultant: doc. Ing. Alena Fučíková, Csc.

Autor práce: Bc. Barbora Koubková

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv příjmu půdy kontaminované rizikovými prvky na vybrané biochemické parametry potkanů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Praze dne ……. ……

Poděkování

Za cenné rady a vedení při zpracování diplomové práce bych touto cestou ráda poděkovala své vedoucí práce prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc při laboratorním zpracování vzorků své konzultantce práce doc. Ing. Aleně Fučíkové, CSc. A v neposlední řadě děkuji svým nejbližším za poskytování psychické podpory.

Souhrn

Stále se zvyšující kontaminace životního prostředí je prokazatelným důvodem řady onemocnění lidské populace. Proto je prováděno mnoho experimentů řešících tuto problematiku a které pomáhají zjišťovat vlivy rizikových prvků na organismy.

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení příjmu rizikových prvků laboratorními potkany (konkrétně se jedná o kadmium, arsen a olovo) na základě koncentrací těchto prvků v krevní plasmě. Pomocí analýzy biochemických parametrů byl hodnocen vliv polosyntetické diety s přídavkem kontaminovaných půd. Jedná se o půdy z okolí řeky Litavky, okres Příbram a z oblasti Kutné Hory. Pro kontrolu byla použita skupina potkanů, kterým byla do diety přimíchaná nekontaminovaná půda z oblasti Suchdola v Praze. Pro experiment byli vybráni samci i samice laboratorních potkanů kmene Wistar.

Po ukončení experimentu byly z krevní plasmy stanoveny hodnoty alkalické fosfatázy, dále obsahy vybraných esenciálních prvků, tedy vápníku, hořčíku, zinku a fosforu a sledovaných rizikových prvků, tedy As, Cd a Pb. Výsledné hodnoty obsahů jednotlivých prvků a vybraného biochemického parametru byly statisticky vyhodnoceny.

Bylo zjištěno, že u zvířat exponovaných vysokým dávkám As a Cd došlo k významnému zvýšení koncentrací těchto prvků v krevní plasmě, zatímco v případě biologicky málo dostupného olova významné zvýšení jeho koncentrace v plasmě pozorováno nebylo. Naproti tomu bylo zaznamenáno snížení koncentrací zinku v plasmě, což naznačuje možný antagonismus mezi zinkem a kadmiem.

Je třeba konstatovat, že zjištěný zvýšený příjem rizikových prvků do organismu, zejména As a Cd, může při dlouhodobé expozici nebo při vyšších hladinách těchto prvků v půdě znamenat určité riziko, kterému je třeba v takto kontaminovaných oblastech věnovat pozornost.

Klíčová slova: potkan, rizikové prvky, jaterní enzymy, kontaminovaná půda, orální příjem

Summary

Increasing environmental contamination is demonstrable reason for a range of diseases of the human population. Therefore, many experiments are conducted on this issue to investigate the impact of risk elements on human organism.

The aim of this thesis was to evaluate the uptake of risk elements (namely cadmium, arsenic and lead) according to their concentrations in a blood plasma of laboratory rats. Analysis of biochemical parameters was used to evaluate the effect of semi-synthetic diet with addition of contaminated soils. The soils originated from land along river Litavka located in district of Příbram and area of Kutná Hora. For control was used a group of rats fed with diet containing unpolluted soil from Suchdol area, Prague. For the experiment were selected both male and female laboratory Wistar rats.

Values of alkaline phosphatase, as well as the contents of selected essential elements, namely calcium, magnesium, zinc and phosphorus and monitored risk elements, i.e. As, Cd and Pb, were determined in the blood plasma after the experiment's end. The resulting values of individual elements and selected biochemical parameter were statistically evaluated.

It has been found that animals exposed to high doses of As and Cd had significantly increased concentrations of these elements in the blood plasma, whereas in case of rarely bio-available lead, there was not any significant increase in the plasma concentration observed. In contrast to these results, the decrease of zinc concentration in the plasma was found, suggesting a possible antagonism between zinc and cadmium.

It should be noted that the increased uptake of risk elements by organisms, mainly of As and Cd, observed in this experiment, may cause some risk due prolonged exposure or high levels of these elements in the soil. The risk in the mentioned contaminated areas needs following attention.

Keywords: rat, risk elements, liver enzymes, contaminated soil, oral intake

Obsah

1 Úvod 7
2 Cíl práce 8
3 Literární přehled 9
3.1 Rizikové prvky 9
3.1.1 Kadmium 9
3.1.2 Arsen 12
3.1.3 Olovo 14
3.2 Jaterní enzymy 17
3.2.1 Aspartátaminotransferáza 17
3.2.2 Alaninaminotransferáza 18
3.2.3 Alkalická fosfatáza 20
3.3 Metalothioneiny (MT) 21
3.4 Oxidativní stres 22
4 Materiál a metody 25
4.1 Schéma pokusu 25
4.2 Materiál 26
4.2.1 Zvířata použitá v experimentu 26
4.2.2 Složení krmných směsí 26
4.2.3 Ukončení experimentu 27
4.3 Analytické metody 27
4.3.1 Stanovení hořčíku 28
4.3.2 Stanovení vápníku 28
4.3.3 Stanovení fosforu 29
4.3.4 Stanovení alkalické fosfatázy 29
4.4 Výpočty 29
4.5 Statistické zpracování výsledků 30
5 Výsledky 31
6 Diskuse 35
7 Závěr 39
8 Použitá literatura 40

1 Úvod

Rizikové prvky (v této práci se jedná konkrétně o kadmium, arsen a olovo) se v životním prostředí vyskytují přirozeně. Avšak na určitém území se koncentrace těchto prvků výrazně zvýšila například rozvojem průmyslu či lidskou činností. Zvyšující se riziko pro lidskou populaci, vyvstávající z kontaminace životního prostředí rizikovými prvky, je předmětem zájmu více a více experimentů. Tato práce se zabývá kontaminovanou půdou v okolí Kutné hory a v určité části toku řeky Litavky, okres Příbram.

Rizikové prvky se do organismu dostávají například požitím či vdechnutím. V organismech dochází ke kumulaci rizikových prvků v jednotlivých orgánech a následně k rozvíjení různých onemocnění.

Experiment, kterým se zabývá tato práce, byl založen na podávání polysyntetické diety potkanům, dieta byla kontaminovaná půdou z uvedených oblastí. Pro posouzení vlivu rizikových prvků na živočišné organismy bylo provedeno stanovení hodnot vybraných biochemických parametrů a k celkovému zhodnocení bylo použito statistické zpracování získaných dat.

2 Cíl práce

V České republice se nachází několik oblastí vyznačujících se zvýšeným obsahem rizikových prvků v půdě až na hodnoty, kdy hrozí reálné riziko kontaminace zemědělské produkce, a tedy i ohrožení zdraví lidí. Jak uvádí Státní zdravotní ústav (SZÚ) ve své odborné zprávě „Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací“, dospělý člověk přijme denně přibližně 60 mg půdy, u dětí je pak příjem vyšší a to zhruba 200-800 mg denně. V téže zprávě se například uvádí, že v kontaminované oblasti Příbramska má problém s těžkými kovy (zvláště Cd, As, Pb) v půdě 100 % mateřských školek. Limitní hodnoty jsou zde překročeny několikanásobně (v případě kadmia 9 krát, u olova 6 krát, u arsenu 4,5 krát). Ljung et al (2006) ve své práci uvádějí, že příjem zeminy u dětí je téměř normální záležitostí. Proto je příjem u dětí z půdy nezanedbatelným faktorem a měl by být brán v potaz hlavně v kontaminovaných oblastech a v okolí velkých měst. Podle našich předchozích výsledků (Tremlová et al., 2010) jsou obsahy extrahovatelné pomocí *in vitro* simulované žaludeční šťávy vyšší než u běžných metod extrakce, které se používají pro určení odhadu možné přijatelnosti těchto prvků rostlinami.

Cílem této práce a modelového experimentu bylo posouzení vlivu příjmu rizikových prvků laboratorními potkany z kontaminované půdy. Dále byl posouzen vliv zvýšeného příjmu rizikových prvků na vybrané biochemické parametry zvířat, tedy aktivitu základních jaterních enzymů. Byla tedy posuzována i míra poškození jaterních funkcí vlivem zvýšeného příjmu rizikových prvků.

Vědecká hypotéza je založena na předpokladu, že člověk i zvířata mohou konzumovat nezanedbatelné množství půdy, která může být kontaminovaná rizikovými prvky. Tyto rizikové prvky se mohou ukládat do jednotlivých orgánů a následně pak ovlivňovat jejich správnou funkci. Vhodným indikátorem zvýšeného obsahu rizikových prvků v organismu zvířat je pak obsah těchto prvků v krvi a změna aktivity enzymů, které indikují oxidativní stres.

3 Literární přehled

3.1 Rizikové prvky

Tato práce se zaměřuje na problematiku negativního působení vybraných těžkých kovů na živý organismus, a to prostřednictvím diety laboratorních potkanů pokusně kontaminované půdou se zvýšeným obsahem těchto prvků.

Jako těžké kovy se označují chemické prvky, jejichž specifická hmotnost je vyšší než 5 g/cm³. Jedná se o kovové prvky, které i při nízké koncentraci mohou být toxické. Toxicitou těžkých kovů se rozumí vlastnost, kdy při určitých koncentracích působí škodlivě jak na člověka, tak i na ostatní biotické složky ekosystému. Do této skupiny jsou zahrnuty především olovo, chrom, nikl, rtuť, kadmium, zinek a měď. Navíc k nim bývají přiřazovány také polokovy selen a arsen. Právě vzhledem k tomu, že podobný efekt jako těžké kovy mohou mít i polokovy či nekovové prvky (Kafka et Punčochářová, 2002).

Těžké kovy se zařazují do skupiny cizorodých látek, které se mohou významným způsobem podílet na kontaminaci zemědělských půd. V přirozených podmínkách se nacházejí v nevelkých množstvích, ale díky antropogenním vlivům se jejich obsah v půdě zvyšuje, a to zejména v povrchové vrstvě humózního horizontu. S tím souvisí i toxicita těžkých kovů, která je závislá na jejich setrvání v půdě. V důsledku antropogenní činnosti dochází k pronikání těžkých kovů do půdního prostředí a zvyšování jejich hladiny. Jedná se zejména o produkty průmyslové činnosti, dopravy a energetiky (Richter, 2004).

3.1.1 Kadmium

Základní charakteristika

Latinský název kadmia je cadmium. Je to poměrně vzácný kov a je používáno k různým účelům (například pokování proti korozi). Jeho barva v čisté formě je bílá až namodralá. Tento kov je velmi měkký, snadno ohýbatelný a může být snadno zpracováván ocelovým nožem. Podle Remyho (1971b) je tento kov lesklý, avšak na vzduchu se jeho povrch stává matným díky tvoření oxidu. Kadmium je kujný a tažný kov. Nemá žádný pach ani chuť a je velmi jedovaté, navíc má dobrou tepelnou a elektrickou vodivost. V přírodě se kadmium v čisté formě nevyskytuje (Cobb, 2008).

Vzhledem k podobnému atomovému poloměru kadmia se zinkem může kadmium zinek nahrazovat v biochemických strukturách organismu, a tím může změnit i jejich funkci, například může způsobit inaktivaci některých důležitých enzymů (Kafka et Punčochářová, 2002).

Remy (1971b) uvedl, že pevnost čistého kadmia je malá, ale značně stoupá sléváním se zinkem, i proto kadmium často doprovází zinek v jeho rudách. Téměř veškeré kadmium se získává jako vedlejší produkt při zpracovávání zinku, mědi a olova (Husted, 2011).

V periodické soustavě prvků patří do II.B skupiny, má dva valenční elektrony, atomové číslo kadmia je 48 a jeho atomová hmotnost je 112,4 (Makovníková, 2000). Jeho specifická hmotnost je 8,65 g/cm³, tudíž je kadmium řazeno mezi těžké kovy. Jeho biologický poločas je určen na 20 až 30 let (Kafka et Punčochářová, 2002). Teplota tání kadmia je 320 °C a jeho teplota varu je 767 °C (Remy, 1971b).

Výskyt v půdě

V půdě se kadmium přirozeně vyskytuje jako stopový prvek a kontaminací může být jeho koncentrace až 1000x zvětšena. Jeho obsah v půdě je třikrát vyšší než v zemské kůře (Kafka et Punčochářová, 2002).

Richter (2004) píše, že se kadmium v přírodě vyskytuje jako součást minerálů, dále v organických sloučeninách, vázané na půdní koloidy a ve vodorozpustném stavu jako součást půdního roztoku.

Průměrný obsah kadmia v půdě v přirozených podmínkách se nejčastěji pohybuje v rozmezí 0,01-1,1 mg/kg. V půdách ČR je (mimo zdroje kontaminace) běžný obsah 0,2-1,5 mg kadmia na 1 kg půdy. Kadmium se v půdě kumuluje nejvíce ve vrstvě 0-5 cm a s přibývající hloubkou jeho koncentrace klesá (Richter, 2004).

Kadmium proniká do prostředí z komunálních odpadů, z čistírenských kalů, při zpracovávání rud či kovů, ve formě superfosfátů (používaných k hnojení), při použití pesticidů (herbicidů, fungicidů, insekticidů) nezbytných pro zamezení poklesu zemědělské produkce (Kafka et Punčochářová, 2002) a při spalování olejů a plynů. Zdrojem tohoto prvku může být i spalování plastů, uhlí a nafty. Kadmium lze prokázat i v kouřových a výfukových plynech. Kouření je též zdrojem emisí kadmia, jedna cigareta obsahuje přibližně 0,5 μg kadmia, tudíž i pasivní vdechování cigaretového kouře je nebezpečné (Sova, 1997).

Je tomu tak díky vlastnostem tabáku, je totiž jednou z rostlin se zvýšenou schopností akumulace kadmia v listech. Tyto rostliny mohou ve svých pletivech kadmium oproti půdě několikanásobně zkoncentrovat; další takové rostliny jsou například sója, pšenice a některé druhy listové zeleniny, například špenát (Kafka et Punčochářová, 2002).

Toxické účinky

Kadmium je v současné době považováno za velmi významný jed. Nejnebezpečnější je samotné kovové kadmium a oxid kademnatý, ohrožující je zejména inhalace nebo kontaminovaná potrava. Jedná se o mimořádně kumulativní jed (Štefan et al., 2012).

Piscator (1985) také uvedl, že standardní populací je kadmium do organismu přijímáno především potravou, menší část je pak přijata vdechováním. Inhalace je ale intenzivnější a rychlejší forma kontaminace.

Podle Kafky et Punčochářové (2002) jsou cílové orgány pro poškození kadmiem játra, ledviny a také varlata. Nejvyšší koncentrace v lidském těle je v játrech a také v ledvinách, vyšší hladina pak je v kůře a nižší v dřeni ledvin. U lidí je množství kadmia v těle ovlivněno převážně věkem, bydlištěm a kouřením (Friberg et al., 1985).

Kadmium je jednou z příčin vysokého krevního tlaku, způsobuje poškození reprodukčních orgánů, destrukci červených krvinek a může vyvolat rakovinu plic. Kademnaté ionty jsou mimo jiné příčinou křehnutí kostí, které vede při dostatečném nahromadění kadmia v těle až ke zhroucení skeletu (Kafka et Punčochářová, 2002).

Při jednorázové vysoké dávce dochází k bolestem břicha, průjmům a zvracení, otravy se mohou projevit také na varlatech. Vdechování kadmia působí především na plíce. Při inhalaci kadmia může dojít k toxickému edému plic, při kterém jsou tvořeny v dýchacích cestách, plicích a poplicnici krevní výrony (Cibulka et al., 1991), těžkému zánětu plic i smrti. Podle Tesaře (2006) již inhalace 10-15 mg kadmia může vyvolat gastrointestinální příznaky či fatální pneumonii. U chronických otrav dochází kromě poškození ledvin a jater také k výše zmíněné osteoporóze (kadmium vytěsňuje a nahrazuje vápník) a anemii. Kadmium může způsobovat i kancerogenní změny (Štefan et al., 2012).

Hlavním příznakem poškození ledvin kadmiem je tubulární proteinurie, v těžších případech je prokazována nefrolitiáza (Bencko et al., 1995). Dalším příznakem poškození

funkce ledvin je glykosurie, někdy je popisovaná i zvýšená glukoneogeneze (Cibulka et al., 1991).

Charakteristické pro kadmium je, že má v živočišných organismech dlouhodobou retenci. Délka retence je závislá na konkrétním živočišném druhu a na stupni vystavení prvku. Rozsah retence se odlišuje u jednotlivých živočišných druhů: například u potkanů jde o 0,3 % a u člověka až 25 % kadmia přijatého potravou (Beneš, 1994).

3.1.2 Arsen

Základní charakteristika

Latinský název arsenu je arsenicum. Arsen je toxický polokov široce rozšířený v prostředí a organismech (Soudek et al., 2006). Arsen se vyskytuje v přírodě někdy i ryzí, převážně ale v sloučeninách. Může se objevovat ve více modifikacích (Remy 1971a, Kuglerová et al. 2006):

-šedý - stálá modifikace, vede elektrický proud, při žíhání na vzduchu hoří šedomodrým plamenem na oxid arsenitý

-žlutý - vzniká ochlazením arsenových par, je nestálý, měkký, rychle se přeměňuje zpět na šedý

-černý - vzniká tepelným rozkladem arsanu, amorfní, nestálý, přeměňuje se na šedý arsen

-hnědý - vzniká redukcí arsenitých solí silnými redukčními činidly

Arsen je v V.A skupině periodické tabulky prvků, jeho atomové číslo je 33, relativní atomovou hmotnost má 74,922. Jeho biologický poločas je uveden v rozmezí hodin až dnů (Kafka et Punčochářová, 2002). Teplota tání arsenu je 816 °C a teplota varu je 615 °C. Je to křehký polokov, který tvoří ocelově šedé krystaly kovového vzhledu (Kuglerová et al., 2006).

Roza (2009) uvádí, že arsen je užitečný a důležitý pro výrobu léčiv, pesticidů a skla. Používá se do slitin s olovem a mědí, kde zvyšuje jejich tvrdost. Dále se využívá k výrobě diod emitujících světlo - LED (Kuglerová et al., 2006).

Výskyt v půdě

Rozšířeným kritériem hodnocení kontaminace půd je celkový obsah prvků v půdě. Průměrné obsahy se u nekontaminovaných půd pohybují v rozmezí 1,3-27 mg As/kg (McLaughlin et al., 1999; Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Arsen se může do vody a půdy dostávat jak přirozenou cestou, tak antropogenní činností. Přirozené cesty zahrnují zvětrávání, biologickou aktivitu a vulkanickou aktivitu. Primární antropogenní vstup se odvíjí od spalování pevného odpadu, fosilních paliv, uvolnění z těžby a při zpracování kovů a přímým použitím fungicidů, insekticidů a herbicidů obsahující arsen (Soudek et al., 2006). V Evropské unii ale sloučeniny arsenu jako pesticidy povoleny nejsou.

Dále se může arsen do životního prostředí dostat prostřednictvím zpracování rud, přidáváním aditiv do skel, kouřením, léčivy pro veterinární medicínu či ochrannými prostředky na dřevo. Arsen se vyskytuje jako doprovodný prvek v rudách mědi, zlata, stříbra nebo olova a při získávání těchto kovů z rud se uvolňuje do životního prostředí (Kafka et Punčochářová, 2002).

Toxické účinky

Sloučeniny arsenu jsou vysoce toxické s významnou kumulativní schopností v organismech. Podle Kuglerové et al. (2006) je smrtelná dávka arsenu pro člověka 0,06-0,2 g. Cílovými orgány, které jsou ovlivněny arsenem, jsou hlavně centrální nervový systém, kůže a vlasy. Dále jsou ohroženy játra, ledviny a nehty. Arsen má mutagenní, teratogenní i karcinogenní účinky. Teratogenní účinky se mohou objevit díky přestupu arsenu přes jednu z nejpřísnějších ochranných bariér v těle - bariéru placenty (Rejnek et al., 1998; Kafka et Punčochářová, 2002).

Akutní otravy se vyskytují v dnešní době jen řídce, avšak projevují se bolestmi hlavy, závratěmi a někdy velmi bouřlivými zažívacími obtížemi, které mohou vyústit v selhání krevního oběhu až smrt organismu (Kafka et Punčochářová, 2002). Chronické otravy, způsobené požitím, vdechnutím prachu či kontaktem s pokožkou, se projevují ložisky šedě zbarvené pokožky, bílými proužky na nehtech, vysokým krevním tlakem, srdeční ischemií nebo dysfunkcí jater. Jsou popisovány i neurologické změny, břišní kolika a výrazné hubnutí (Rejnek et al., 1998).

Další příznaky, které mohou prokazovat chronickou otravu arsenem, jsou záněty kůže trvalé potíže se zažíváním, aplastická anémie, poškození nervového systému projevující se mimo jiné i mravenčením v končetinách. Za nejvážnější chronické efekty se považuje rakovina kůže či plic (Kafka et Punčochářová, 2002).

Otravu arsenem lze identifikovat i pomocí senzorických pozorování. Tato otrava je totiž spojená s nadměrným rohovatěním kůže a již výše zmíněnou specifickou pigmentací (šedozelené zabarvení kůže). Z dechu je možné cítit česnekový zápach (Kafka et Punčochářová, 2002).

Obecně lze říct, že rozpustné anorganické sloučeniny arsenu jsou výrazně toxičtější než organické sloučeniny. A dále že trojmocná forma arsenu je nebezpečnější než pětimocná, přesto že jsou obě formy velmi toxické (Kafka et Punčochářová, 2002).

3.1.3 Olovo

Základní charakteristika

Latinský název olova je plumbum. Olovo je měkký kujný kov, nejměkčí z běžných těžkých kovů, podstatně měkčí než cín, dá se snadno krájet nožem (Remy, 1971a). Je velmi jedovaté. Na čerstvém řezu je olovo lesklé bílé až namodralé. Ale když je vystaveno vzduchu jeho barva se rychle mění v matně šedou - olovo oxiduje (Lew, 2009).

Olovo patří do IV.A skupiny v periodické tabulce prvků, jeho atomové číslo je 82, relativní atomová hmotnost je 207,2 a je považován za nejrozšířenější těžký kov. Jeho biologický poločas je shodný s arsenem, také jde až o 20-30 let (Kafka et Punčochářová, 2002). Teplota tání olova je 327 °C a jeho teplota varu je 1751 °C. Tepelná a elektrická vodivost je poměrně malá (Kuglerová et al., 2006).

Olovo se obvykle získává z galenitu (PbS). Ačkoli lze najít v přírodě jeho čistá forma, je to velmi vzácné (Casas, 2006). Snadno se slévá s jinými kovy, se rtutí například tvoří amalgám, který je při menším obsahu olova kapalný. Olovo se využívá na potrubí, obaly kabelů či kyselinotvorné povlaky nádrží a nádob. Dále lze olovo použít ve formě olověných plechů jako ochrana proti rentgenovým paprskům a gama záření, k výrobě akumulátorů, antikorozních nátěrů a také k výrobě munice - jádra střel, broků, kde se slévá s malým

množstvím arsenu (asi 0,3 %). Z olova se vyrábějí kelímky, misky a odpařovací pánve (Remy, 1971a).

Remy (1971a) dále uvedl, že z technicky nejdůležitějších sloučenin olova jsou olovnaté barvy, které patří k nejstarším minerálním barvám. Olovo lze využít i jako závaží nebo zátěže (Kuglerová et al., 2006).

Výskyt v půdě

Za běžný obsah olova v půdách je považováno 10-20 mg/kg. Tvoří celou řadu minerálů, které jsou poměrně špatně rozpustné ve vodě. Nejvíce je zastoupené v kyselých vyvřelých horninách. V půdě je olovo velmi málo pohyblivé. Je to dáno tím, že soli olova jsou většinou málo rozpustné. Olovo se hromadí převážně v humusovém horizontu, nejbohatší je vrchní padesátimilimetrová vrstva půdy a s přibývající hloubkou obsah olova klesá (Richter, 2004).

Podle Kafky et Punčochářové (2002) nejběžnějšími zdroji kontaminace olovem v životním prostředí jsou úpravny rud, hutě, rafinerie, chemický průmysl, akumulátory, pigmenty do barev, olovnaté sklo, přídavky do glazur, zemědělství (hnojiva, insekticidy), spalování fosilních paliv, dříve automobilový provoz (používání olovnatého benzinu).

Toxické účinky

I pouhé stopové množství olova může vést k těžkým onemocněním až k smrti, protože olovo se v těle kumuluje. Slitiny, které mají velké množství olova, se proto nesmí používat k výrobě užitkových předmětů (Remy, 1971a).

V živočišném organismu se olovo chová jako antagonista vápníku. Až 90 % olova přijatého tělem se kumuluje v kostech, kde negativně ovlivňuje krvetvorbu (narušuje syntézu hemoglobinu), a je také proto příčinou možné anémie (z důvodu inhibice syntézy hemu). Olovnaté ionty, podobně jako ionty ostatních těžkých kovů, jsou karcinogenní. Tyto ionty mají mutagenní a embryotoxické účinky. Embryotoxickými účinky je myšleno poškození nervového systému plodu ale i způsobení potratu, díky prostupnosti jinak přísně ochranné bariéry placenty (Kafka et Punčochářová, 2002).

Podle Kafky et Punčochářové (2002) jsou olovem nejvíce ohrožené orgány: mozek, ledviny, játra, placenta, dlouhé kosti. Lüllmann et al. (2004) zjistili, že již denní dávka 1 mg per os může vyvolávat příznaky otravy. Olovo se dobře vstřebává inhalační cestou ve formě

prachu nebo par, ze žaludku se tolik zpětně nevstřebává, vylučuje se však pomalu a v těle se hromadí. Podle Kafky et Punčochářové (2002) je naopak nejrizikovější vstup olova do organismu požitím, protože vede k nejvyššímu zadržení tohoto prvku (až 60 % přijímáno požitím oproti 30 % inhalací). Ukládá se především v kostech a způsobuje chudokrevnost. Otravu olovem potvrdí vysoká koncentrace tohoto prvku v moči a krvi (Navrátil et al., 2008).

Příznakem otravy olovem je tmavošedý lem na dásních („olovnatý lem“), bledost obličeje a rtů, obstipace a nechuť k jídlu. V těžších případech se objevují prudké bolesti v břiše („olověná kolika“), ochrnutí, bolesti končetin, křeče, bezvědomí nebo jiné příznaky onemocnění mozku (Remy, 1971a).

Akutní otrava anorganickými sloučeninami olova je velmi vzácná, vyvíjí se po příjmu masivní dávky olovnatých solí. Příznaky chronické otravy jsou ne zcela charakteristické: únava, dušnost, bolesti hlavy, ztráta chuti k jídlu, obstipace, bledost a možné jsou i poruchy psychického stavu - například mentální retardace u dětí (Lüllmann et al., 2004).

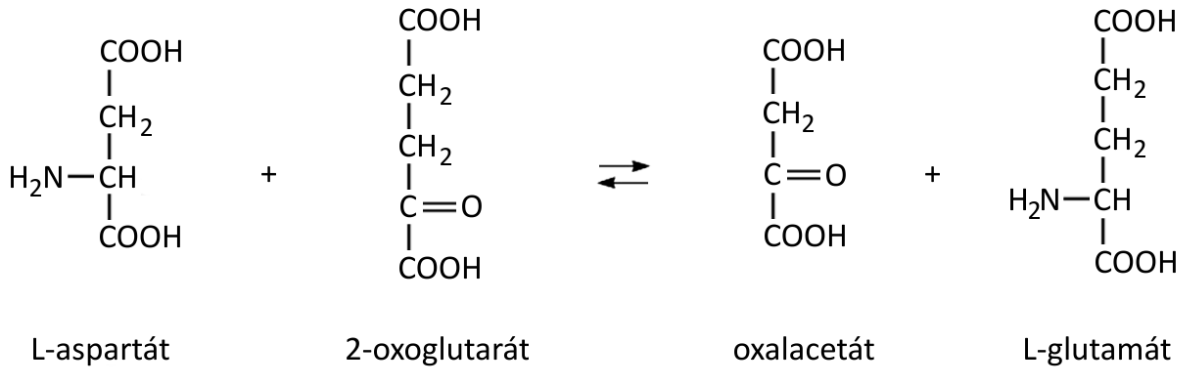
3.2 Jaterní enzymy

3.2.1 Aspartátaminotransferáza

(zkratka AST, jiným názvem L-aspartát:2-oxoglutarát aminotransferáza, glutamát-oxalacetát transamináza)

Aspartátaminotransferáza je sérový jaterní enzym, patřící do skupiny aminotransferáz. Je to enzym přenášející aminoskupinu z aspartátu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a oxalcetátu, viz. obrázek č. 1 (Ehrmann et al., 2006).

Obrázek č. 1 - katalyzační reakce aspartátaminotransferázy (Klusáčková, 2012)



Fyziologické hodnoty AST jsou u dospělého člověka v rozmezí 0,05-0,72 µkat/l (Kotačková, 2014).

Aspartátaminotransferáza je přítomna v srdečním a kosterním svalu, dále v ledvinách, játrech, slinivce břišní, slezině, plicích a v erytrocytech, seřazeno podle klesající koncentrace (Ehrmann et al., 2006).

Díky přítomnosti aspartátaminotransferázy v různorodých tkáních či orgánech její stanovení není příliš specifické pro určité onemocnění. Nejvíce bývá aktivita AST v krvi zvýšena při těžkém poškození hepatocytů (Imalab s.r.o., 2009).

Z pohledu lokalizace v buňkách jde o binokulární enzym, jelikož jedna molekulová forma enzymu se nachází v mitochondriích a druhá forma v cytoplazmě. Obě tyto formy

enzymu prostupují za určitých fyziologických okolností v malé míře do krevního řečiště (poměr mitochondriální a cytoplazmatické AST je v krvi v poměru 1 : 8) a cirkulují v krvi s poločasem rozpadu zhruba 18 hodin (Ehrmann et al., 2006).

K vyplavení cytoplazmatické aspartátaminotransferázy do krevního řečiště dochází již při mírném poškození hepatocytů, jako je například zvýšení permeability buněčné membrány. K přechodu mitochondriální AST dochází naopak až při nekróze hepatocytu (Racek et al., 2006).

Zvýšení aktivity aspartátaminotransferázy v krvi je obvykle potvrzeno po zjištění poškození jater, při srdečních nebo svalových onemocněních, během hemolytických stavů a po extrémní fyzické námaze (Doubek et al., 2010).

Zvýšené hodnoty aspartátaminotransferázy se prokážou při hepatitidě - akutní virové či chronické, při jiné cirhóze jater, jaterních tumorech, steatóze jater (ztučnění jater), toxickém poškození jater (díky léčivům), při lézi myokardu nebo při onemocnění kosterního svalstva (Imalab s.r.o., 2009). Dále se provádějí laboratorní testy na hodnotu aspartátaminotransferázy k diagnostice infarktu myokardu (Murray et al., 2001), při podezření na ikterus, různé formy hepatitidy (akutní virová, alkoholová-toxická, chronická inaktivní, chronická aktivní) i na toxickou hepatózu (Hehlmann, 2010).

Podle Klusáčkové (2012) se zvýšená aktivita AST prokáže kromě výše uvedených onemocnění ještě u infekční mononukleózy, sepsi, cholangitidy, biliární koliky, svalové dystrofii, zhmoždění svalů, při Reyovu syndromu, po podání morfinu a dalších.

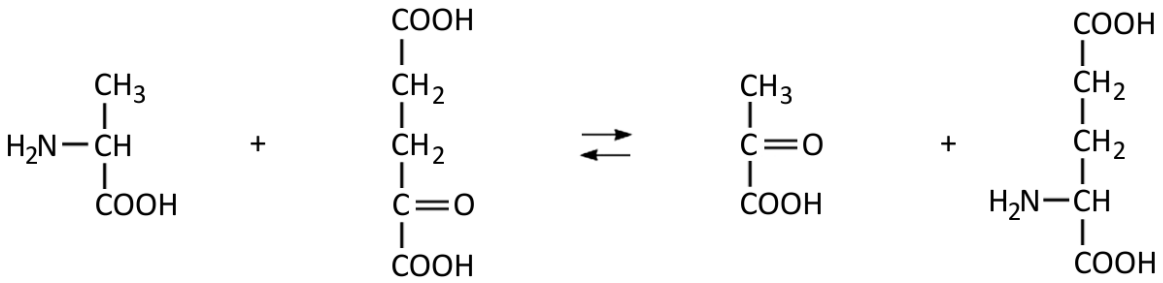
Naopak snížení aktivity aspartátaminotransferázy se prokáže při deficitu vitaminu B_6 (Klusáčková, 2012).

3.2.2 Alaninaminotransferáza

(zkratka ALT, jiným názvem L-alanin:2-oxoglutarát aminotransferáza, glutamát-pyruvát transamináza)

Alaninaminotransferáza je cytoplazmatický enzym přenášející aminoskupiny z alaninu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a pyruvátu, viz. obrázek č. 2. Tato reakce se uplatňuje při syntéze, odbourávání a přeměně aminokyselin. ALT se tak podílí na metabolismu dusíku v organismu (Imalab s.r.o., 2009).

Obrázek č. 2 - katalyzační reakce alaninaminotransferázy (Klusáčková, 2012)



Alaninaminotransferáza je přítomna ve stejných tkáních jako AST, vyšší obsah je ale v játrech i ledvinách. Nejvyšší hladinu tohoto enzymu obsahují hepatocyty, avšak při poškození buňky se vyplavuje ve zvýšené míře do krevního řečiště (Imalab s.r.o., 2009). Je to unilokulární enzym, jelikož se vyskytuje pouze v cytoplazmě buňky. Z buněk, ve kterých je enzym obsažen, se uvolňuje do krve a cirkuluje tam s poločasem rozpadu asi 48 hodin (Ehrmann et al., 2006).

Fyziologické hodnoty alaninaminotransferázy pro dospělého člověka jsou v rozmezí 0,1-0,78 μkat/l (Kotačková, 2014).

Zvýšené hodnoty alaninaminotransferázy poukazují na akutní virovou i chronickou hepatitidu, což je podle Murray et al. (2001) hlavní diagnostické použití pro ALT, dále jinou cirhózu jater, jaterní tumory, steatózu jater, toxické poškození jater (následkem braní léků), srdeční infarkt, plicní embolie (Imalab s.r.o., 2009).

Podle Hehlmanna (2010) je krom těchto uvedených onemocnění možné pomocí hladin alaninaminotransferázy poukázat na ikterus, toxickou hepatózu, akutní cholecystitidu, akutní nebo chronickou nehnisavou cholangitidu.

Zvýšení aktivity alaninaminotransferázy lze dokázat dále při infekční mononukleóze, alkohol-toxické hepatitidě, sepsi, metastázách do jater, biliární kolice, onemocnění myokardu

(srdeční selhání s městnáním krve v játrech), při Reyovu syndromu a dalších (Klusáčková, 2012).

Naopak snížení aktivity alaninaminotransferázy se projeví díky nedostatku vitaminu B_6 (Klusáčková, 2012).

3.2.3 Alkalická fosfatáza

(zkratka ALP)

Alkalická fosfatáza je enzym patřící mezi hydrolázy (Murray et al., 2001). Je to membránově vázaný enzym, který katalyzuje hydrolytické štěpení monoesterů kyseliny fosforečné při alkalickém pH, ve kterém je nejúčinnější (Imalab s.r.o., 2009). ALP má reakční optimum při pH 9-10. Alkalická fosfatáza byla prokázána téměř ve všech tkáních organismu v různých stupních aktivity - střevní sliznice, osteoblasty, leukocyty, placenta, epitel žlučových cest, játra, buňky tubulů ledvin (Kraft et Dürr, 2001).

Existuje několik izoenzymů a izoforem alkalické fosfatázy. ALP má tři izoenzymy - kostní, placentární a střevní. V séru se za fyziologických podmínek nachází převážně jaterní a kostní izoforma, dále existuje ještě ledvinná izoforma (Doubek et al., 2010). Aktivita alkalické fosfatázy v séru vzrůstá hlavně při hepatobiliárních onemocněních (především při cholestáze nebo při metastázách v játrech) a při onemocnění kostí (Imalab s.r.o., 2009). Podle Doubka et al. (2010) je aktivita ALP zvýšená i u rostoucích zvířat.

Fyziologické hodnoty alkalické fosfatázy pro dospělého člověka jsou v rozmezí 0,6-2,2 μkat/l (Kotačková, 2014).

Množství alkalické fosfatázy se mění při různých onemocněních a pomáhá rozlišovat leukemoidní reakci (zvýšená hladina alkalické fosfatázy) a chronickou myeloidní leukemii (snížená aktivita alkalické fosfatázy). Zvýšená hodnota alkalické fosfatázy bývá v těhotenství, při infekcích s neutrofilií, u polycytemie, aplastické anémie, u myelodisplastických syndromů, mnohočetného myelomu a u pacientů, kteří užívají kortikosteroidy. Naopak sníženou hodnotu alkalické fosfatázy lze pozorovat u chronické myeloidní leukemie, paroxysmální noční hemoglobinurie, sférocytární anémie a sideroblastické anémie (Penka, Tesařová et al., 2011).

Zvýšené hodnoty u alkalické fosfatázy se dále projevují při onemocnění jater a nemocí žlučových cest, jako jsou cholangitida, cholangiohepatitida, hepatitida, metastázy na játrech,

infekční mononukleóza a jiné. A také se objevují při onemocnění kostí - Pagetova choroba, rachitida, osteomalacie, hyperparatyroidismus, osteosarkom, kostní metastázy (Imalab s.r.o., 2009).

Podle Hehlmanna (2010) se laboratorní testy na hodnoty alkalické fosfatázy dělají i u dalších onemocnění, jako jsou například ikterus, onemocnění žlučových cest (akutní cholecystitida, cholangitida, uzávěrový ikterus), bolesti kostí, bradykardie a hirzutismus.

3.3 Metalothioneiny (MT)

Metalothioneiny jsou intracelulární nízkomolekulární proteiny, které jsou bohaté na cystein (Kizek et al., 2004a). Metalothioneiny mají specifické složení aminokyselin. Například u savců je 56 % ze všech cysteinových zbytků zachováno, to zahrnuje všech 20 cysteinových zbytků (zásadní pro vazbu kovů) a to hlavně z lysinu, serinu a argininu. Lysiny mohou být zapojeny do detoxikační funkce metalothioneinů. Savčí metalothioneiny jsou jednoduché polypeptidové řetězce složené z 61-68 aminokyselinových zbytků s terminálním acetylmethioninem a často alaninem na karboxylovém konci (Miles et al., 2000).

MT mají molekulovou hmotnost v rozmezí 6-10 kDa. Petrlová et al. (2006) uvedli, že se molekuly metalothioneinů skládají ze dvou vazebných domén α a β, které jsou složeny z cysteinových klastrů, přičemž thiolové skupiny cysteinu tvoří kovalentní vazby s atomy kovů. Vazebná doména α je schopná vyvázat čtyři ionty kovů, β-doména má tři vazebná místa (Kizek et al., 2004b). Metalothioneiny patří do skupiny proteinů, které mají vysokou afinitu k těžkým kovům (zinek, kadmium, arsen a další), regulují tudíž fyziologické koncentrace esenciálních a těžkých kovů a jsou přítomny při řízení homeostázy kovů v organismech (Kizek et al., 2004b). Metalothioneiny mohou být též antioxidanty v buňkách (Chubatsu et Meneghini, 1993). Nárůst koncentrace kovu v organismech vede ke zvyšování exprese metalothioneinu. Metodami, které se používají ke stanovení metalothioneinů, jsou chromatografie, elektroforéza, elektrochemie, hmotnostní spektrometrie a další (Kizek et al., 2004a).

Metalothioneiny byly dříve rozděleny do tří tříd podle jejich strukturálních charakteristik. Třída MT - I je definovaná jako polypeptidy s vysokým stupněm konzervace cysteinu. Třída MT - II jsou polypeptidy s méně zachovanými zbytky cysteinu a třída MT - III je definovaná jako atypické polypeptidy. Tato klasifikace byla později nahrazena

komplexnějším a přesnějším zařazením do rodin, podčeledí, podskupin a izoforem (Miles et al., 2000).

Kizek et al. (2004b) rozdělili metalothioneiny do dvou tříd. Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódované skupinou genů, které vytvářejí 10 izoforem. Exprese metalothioneinů výrazně stoupá při indukci mnoha exogenními i endogenními faktory, jako jsou UV záření, těžké kovy, stresové hormony, volné kyslíkové radikály, cytokiny, které se uvolňují z poškozené tkáně, nebo xenobiotika (Masařík et al., 2010).

Molekulární mechanismus exprese zatím není zcela znám, ale pravděpodobně jde o účast samotného kovu a jeho vazba na specifický transkripční faktor, protein označovaný jako metal transcription factor 1 (MTF - 1). Na syntéze metalothioneinů se mohou podílet i jiné regulační proteiny prostřednictvím responsivních elementů (Masařík, 2010).

Metalothioneiny byly objeveny již v roce 1957, kdy Margoshes a Vallee izolovali z koňských ledvin nízkomolekulární protein, který vykazoval vysokou afinitu k iontům kadmia (Kizek et al., 2004b).

Různé výzkumy poukazují na významný vztah koncentrace metalothioneinů ke karcinogenezi, mutagenezi a teratogenům. MT jsou známy jako prognostické markery u řady druhů rakoviny a mají negativní vztah k léčivům proti rakovině (Kizek et al., 2004a).

3.4 Oxidativní stres

Vysoké hladiny metalothioneinů v buňkách mohou být zdrojem obrany proti oxidativnímu stresu (Chubatsu et Meneghini, 1993).

Oxidativní stres je situace organismu, kdy si tělo nemůže vlastními silami poradit s odstraněním volných radikálů a dalších škodlivin z nich vzniklých. Oxidativní, nebo též oxidační, stres je převaha volných radikálů nad antioxidanty v těle (Holeček, 2005).

Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty, které jsou schopné samostatné existence. Mají ve svém elektronovém obalu jeden nepárový elektron, případně více nepárových elektronů. Snaží se proto získat jiný elektron, kvůli doplnění elektronového páru do stabilní konfigurace. Reagují s jinými volnými radikály i s inaktivními molekulami a tím vytvářejí další volný radikál, tento děj má tendenci přecházet v řetězovou reakci (Racek et Holeček, 1999).

Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku, jejich přeměnami mohou vznikat jiné reaktivní látky, které ale už nemají nepárový elektron (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Organismus na jedné straně využívá volné radikály ve svůj prospěch například k ničení fagocytovaných organismů, při ovulaci a oplodnění vajíčka, volné radikály mají též signalizační význam v buňkách. Na druhé straně mohou volné radikály organismus závažně poškozovat a je známo, že hrají hlavní úlohu v etiopatogenezi či rozvoji onemocnění (Racek et Holeček, 1999).

Diego-Otero et al. (2009) konstatují, že se oxidativní stres může podílet na patogenezi systémových a neurogenerativních onemocnění a může být pozorován u Downova syndromu či autismu.

Volné radikály mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy a bílkoviny včetně enzymů, což často vede k těžkému poškození tkání a celých orgánů (Racek et Holeček, 1999). Oxidativní stres se tudíž podílí na celé řadě nežádoucích stavů a onemocnění, například předčasné stárnutí, stařecká porucha zraku, bolesti a záněty kloubů, špatné hojení ran, porucha imunity, narození postižených jedinců, infarkt myokardu, mozková mrtvice či rakovina (Ondruš, 2007). Racek et Holeček (1999) napsali, že proto si organismus vyvinul účinné mechanismy obrany proti volným radikálům, obecně nazvané jako antioxidační ochrana (antioxidanty).

Antioxidanty jsou všechny látky, které mají schopnost zamezit vzniku radikálu, vstoupit do reakce s volným radikálem a tím ho zneškodnit nebo jsou schopni opravit změnu, kterou volný radikál již způsobil. Základní antioxidanty se mohou rozdělit na preventivní, tj. omezující iniciační fázi řetězové reakce (například enzymy kataláza a další peroxidázy jako glutationperoxidáza, superoxiddismutáza), přerušující řetězovou reakci, tj. zamezující jejímu šíření (například fenoly, aromatické aminy, EDTA, DTPA). V reakcích, do kterých antioxidanty vstupují, se uplatňují i vitamin E, vitamin C, koenzym Q, karoteny a selen (Kuchynka et al., 2007).

Je známo, že ne každý antioxidant je schopen odstranit každý volný radikál. Antioxidanty jsou hydrofilní, které jsou hlavně v extracelulární tekutině a lipofilní, rozpustné v tucích, které pronikají skrz buněčnou membránu a mohou tudíž účinkovat intracelulárně (Holeček, 2005).

Přirozené antioxidanty obsahuje čerstvá zelenina a ovoce a další rostlinné produkty - čaj, káva, byliny a jiné (Ondruš, 2007).

Účinky oxidativního stresu na organismus jsou závislé na genetické výbavě, fyzické zátěži, výživě, celkové životosprávě a také na antioxidačních doplňcích stravy. V dnešní době je oxidativní stres negativně ovlivňován výfukovými plyny, cigaretovým kouřem, jiným znečištěním životního prostředí, nadměrnou psychickou i fyzickou zátěží, konzumací alkoholu, ultrafialovým a radiačním zářením či některými léčivy. Fyzická zátěž je doprovázena velkou spotřebou kyslíku a následně tvorbou značného množství volných radikálů. Jako paradox je uvedeno, že pohybová aktivita je prevencí většiny civilizačních onemocnění - nemoci srdce, diabetes, některé druhy rakoviny (Ondruš, 2007).

4 Materiál a metody

4.1 Schéma pokusu

Pro experiment byly vybrány dva vzorky kontaminované půdy rozdílných fyzikálně-chemických vlastností:

1) Okolí města Kutná Hora, což je oblast proslavená středověkou těžbou stříbrných rud. Hlavním zdrojem kontaminace půd rizikovými prvky, převážně se jedná o As, Cd, Pb a Zn, je zvětrávání zbytku rudnin či hutních strusek starých hald. Hlavním zdrojem arsenu je zde arsenopyrit a různé sekundární minerály. V našem případě jsme se zaměřili na neobdělávanou plochu na okraji obce Malín v blízkosti tzv. Štoly 14 pomocníků.

2) Oblast Příbramska, kde důlní a hutní činnosti v této oblasti mají současně vliv na zastoupení rizikových prvků v půdě, především Pb, Cd a Zn. Vysoký obsah rizikových prvků v půdě je umocněn i jejich zvýšeným obsahem v geologickém podloží. Kromě bezprostředního okolí zdroje znečištění (Kovohutě Příbram, a. s.) se vyskytuje vyšší koncentrace některých nežádoucích prvků i v naplaveninách v povodí Litavky, kde byly v dřívějších dobách soustředěny proplachovny rud.

Půdy byly přidávány do polosyntetické diety potkanů tak, aby podíl půdy představoval 10 % diety. Pokus byl jednogenerační, kdy byli samci i samice krmeni pokusnou dietou po dobu 60 dnů. Byly odebrány vzorky jater a ledvin samců i samic, vzorky byly lyofilizovány a byly v nich stanoveny spektrometrickými metodami obsahy rizikových prvků (As, Cd, Pb).

V krevní plasmě pak byly stanoveny hladiny základních jaterních enzymů, to je alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST) a alkalické fosfatázy (ALP). Dále byly stanoveny obsahy rizikových i esenciálních prvků. Matematicko-statistickými metodami pak byl vyhodnocen případný vliv zvýšeného příjmu rizikových prvků na aktivitu těchto enzymů. Obsahy prvků v játrech a ledvinách, hematologické ukazatele a hladiny ALT a AST byly již diskutovány jinde (Vlčková 2013, Malinová 2013).

4.2 Materiál

4.2.1 Zvířata použitá v experimentu

Pro studii bylo použito 24 samců a stejný počet samic laboratorních potkanů kmene Wistar. Průměrná tělesná hmotnost samců byla 251 ± 2 g a průměrná tělesná hmotnost samic se pohybovala na hodnotě 185 ± 2 g. Tělesné hmotnosti a přírůstky hmotnosti v průběhu experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 3. Zvířata byla získána od chovatele ve 30 dnech věku a byla umístěna do klecí (1 zvíře na klec) v místnosti s kontrolovanou teplotou (pohybující se mezi 23 a 25 °C) a za přirozených světelných podmínek. Experiment s těmito zvířaty byl proveden ve Fyziologickém ústavu Akademie věd v Krči.

Zvířata byla rozdělena do 4 skupin po šesti jedincích a byla krmena polosyntetickou dietou podle experimentálního schématu po dobu 60 dní.

4.2.2 Složení krmných směsí

Krmivo a voda byly zvířatům dodávány ad libitum. Spotřeba krmiva a přírůstky tělesné hmotnosti zvířat byly sledovány týdně.

Kontrolní skupina byla krmena polosyntetickou dietou skládající se z 47 % pšeničné hrubé mouky, 12,6 % rybí moučky, 14 % sojového extrahovaného šrotu, 0,28 % $CaHPO_4$, 1,12 % vápence, 3,8 % sena z vojtěšky, 0,6 % minerálních přísad (AMINOVITAN STER PLUS, Biofaktory s.r.o., Česká republika), 7,4 % droždí, 4,4 % pšeničných klíčků a 9 % ovesné mouky.

V případě ošetřených skupin se přidají definované části jednotlivých půd pro získání konečného procenta 10 % půdy z konečné hmotnosti diety.

Půdy použité pro kontaminovanou dietu byly:

1. Fluvizem z naplavených usazenin od řeky Litavka, Česká republika, silně znečištěné odpady z těžebných věží (půda L)
2. půda z Kutné Hory (Luvizem) kontaminovaná kadmiem, arsenem a zinkem, hlavně kvůli těžbě stříbra ve středověku (půda K)
3. nekontaminovaná černozem (půda S)

Celkové obsahy prvků v jednotlivých půdách, v dietě a ve směsi diety s kontaminovanou půdou jsou shrnuty v tabulce č. 1 a hlavní fyzikálně-chemické parametry půd v tabulce č. 2.

4.2.3 Ukončení experimentu

Po ukončení jednotlivých částí experimentu byla zvířata po anestezii usmrcena a vykrvena. Anestezie byla provedena pomocí Xylapan (xylasin) a Narketan (ketamin) a z plné krve byly odebrány vzorky. Vzorky krve byly ošetřeny K2EDTA a okamžitě použity na stanovení hematologických parametrů, zatímco zbylá krev byla sedimentována pro získání vzorků plasmy. Samotná plasma byla naředěna a bez dalších úprav vzorku bylo provedeno stanovení rizikových prvků a vybraných biochemických parametrů.

4.3 Analytické metody

Celkové obsahy prvků ve vzorcích půd a diet byly stanoveny optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) s axiálním uspořádáním plasmy, spektrometr Varian - VistaPro, vybavený autosamplerem SPS-5 - automatický podavač vzorků (Austrálie). Podmínky měření byly: výkon 1,2 kW, průtok plasmového plynu 15,0 l/min, průtok přídavného plynu 0,75 l/min, průtok plynu zmlžovačem 0,9 l/min.

Pro stanovení nízkých koncentrací arsenu, kadmia, chromu, niklu a olova v krevní plasmě byla využita metoda atomové absorpční spektrometrie (ETAAS) za použití přístroje VARIAN AA280Z (Varian, Austrálie), který byl vybaven elektrotermickým grafitovým atomizérem GTA120.

Další použitou analytickou metodou byla metoda indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní detekcí (ICP-MS, spektrometr Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA) vybavený autosamplerem ASX-500, tříkanálovým peristaltickým čerpadlem a zmlžovačem MicroMist.

Obsahy vápníku, hořčíku a draslíku v dietě a půdách byly stanoveny pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie na přístroji Varian 280FS (Varian, Austrálie).

Biochemický ukazatel (ALP - alkalická fosfatáza) a obsahy vápníku, hořčíku a fosforu v plasmě byly stanovovány za použití počítačem řízeného analyzátoru COBAS 6000 (Roche, Švýcarsko). Bylo tak provedeno po nashromáždění všech vzorků, které byly odebrány z krevní plasmy pokusných zvířat. Plasma byla před rozbory uchovávána zamrazená ve zkumavkách. Vzorky se měřily v křemenných kyvetách o optické délce 10 mm. Některé metody vyžadovaly použití standardní vodní lázně o teplotě 37 °C. Detaily stanovení jednotlivých ukazatelů jsou následující:

Všechny biochemické ukazatele byly stanovovány fotometricky s využitím biochemických souprav BIO-LA-TEST od firmy Erba Lachema. Principy metod jsou popsány vždy u jednotlivých parametrů.

4.3.1 Stanovení hořčíku

Princip metody spočívá v měření barevného komplexu, který je vytvořen kalmagitem s hořčíkem v alkalickém prostředí. EGTA (kyselina etylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová) pak eliminuje nežádoucí interference vápníku.

Připravené vzorky byly inkubovány 5 minut při teplotě 37 °C a proměřeny při vlnové délce 520 nm přesně jak je uvedeno v návodu.

4.3.2 Stanovení vápníku

Princip metody spočívá v měření zabarvení vzorku po smíchání s příslušným činidlem, které obsahuje arsenazo III, tedy (3Z,6Z)-3,6-bis[(2-arsonofenyl)hydrazinyliden]-4,5-dioxonafthalen-2,7-disulfonovou kyselinu, která tvoří s vápenatými ionty barevný komplex při neutrálním pH. Intenzita zabarvení vzorku těmito komplexy je přímo úměrná koncentraci vápníku ve vzorku.

Připravené vzorky byly inkubovány 1 minutu ve vodní lázni o teplotě 37 °C a proměřeny při vlnové délce 650 nm přesně podle návodu.

4.3.3 Stanovení fosforu

Princip metody spočívá ve fotometrickém měření fosfomolybdenového komplexu, který vzniká při reakci fosforu s molybdenanem amonným za přítomnosti kyseliny sírové.

Připravené vzorky byly inkubovány 5 minut při teplotě 37 °C a měřeno bylo při vlnové délce 340 nm přesně podle návodu.

4.3.4 Stanovení alkalické fosfatázy

Princip metody spočívá v reakci, při které alkalická fosfatáza (ALP) štěpí v alkalickém prostředí 4-nitrofenylfosfát na 4-nitrofenol a fosfát. Měří se touto reakcí vzniklý 4-nitrofenol.

Připravené vzorky byly inkubovány 1 minutu při teplotě 37 °C a měřeny při vlnové délce 405 nm přesně jak je uvedeno v návodu.

4.4 Výpočty

U všech biochemických stanovení bylo vždy provedeno rovněž vyhodnocení vždy 3 standardních roztoků, které byly obsaženy v sadách pro stanovení jednotlivých parametrů. Z výsledků měření byl u jednotlivých metod vypočten aritmetický průměr. Následně byl vypočítán kalibrační faktor f:

$f = c\,(st.) / A\,(st.)$

kde: c (st.) je koncentrace standardu, která je uvedená v návodech pro jednotlivé parametry nebo také na obalech standardních roztoků

A (st.) hodnota absorbance, naměřená pro standardní vzorky, průměr

Faktorem se pak vynásobily absorbance naměřené u jednotlivých vzorků:

$c\,(vz.) = f * A\,(vz.)$

4.5 Statistické zpracování výsledků

U všech sledovaných biochemických ukazatelů byly vypočítány základní statistické údaje. Na statistické zpracování byla použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA). Průkaznosti rozdílů mezi jednotlivými skupinami byly otestovány Scheffého testem. Ke statistickému vyhodnocení byl použit program STATISTICA verze 10. Statisticky významné rozdíly jsou v tabulkách označeny různými písmeny.

Statisticky zpracovaná data jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Vše bylo hodnocena při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

Lze shrnout, že relativně vysoký obsah arsenu, kadmia a olova v půdách K a L má za následek významně ($P < 0,05$) zvýšený obsah těchto prvků v speciálně připravené dietě (tabulka č. 1). Vliv fyzikálně chemických parametrů jednotlivých půd (tabulka č. 2) není statisticky významný.

Tabulka č. 1 - Celkový obsah prvků v půdě, v dietě a ve směsi diety s 10 % půdy (mg/kg sušiny); půdy L - fluvizem, půdy K - luvizem, půdy S – nekontaminovaná černozem

prvek	dieta+S	dieta+K	dieta+L	dieta	půda S	půda K	půda L
As	4.5±2.1	130±14	32.0±1.0	1.51±0.3	15.1±0.8	1602±363	321±2.2
Ca	19244±478	17995±864	18421±412	21623±216	10031±2112	8772±212	3013±244
Cd	0.80±0.05	3.05±0.34	5.01±0.29	0.34±0.06	1.02±0.03	16.7±0.59	37.5±1.29
Cu	39.5±2.3	45.3±9.9	40.5±5.9	29.7±2.2	156±2	173±1	134±4
Fe	4005±123	6220±539	5054±147	445±66	27247±406	43249±342	34139±129
K	18012±361	17537±175	17113±460	15010±377	24600±270	23545±18	15233±115
Mg	1402±64	1676±26	1353±80	2190±25	230±18	222±14	150±25
Mn	218±13	199±17	674±32	128±5	912±8	969±11	4941±625
Mo	1.92±0.07	2.34±0.19	3.02±0.23	2.32±0.23	1.31±0.37	0.88±0.09	6.22±0.07
Ni	5.88±0.69	5.55±0.61	4.73±0.37	1.75±0.24	37.8±2.26	45.1±0.24	28.8±0.37
P	6463±286	5664±522	6267±288	6697±184	888±50	1700±81	592±13
Pb	5.14±0.63	13.1±1.51	522±5.28	3.82±1.42	105±2	195±2	5074±103
Zn	130±27	276±25	735±26	117±17	137±32	1970±4	5899±158

Tabulka č. 2 - Hlavní fyzikálně-chemické parametry experimentálních půd a dostupných obsahů hlavních živin; TOC - celkový obsah organického uhlíku, CEC - kationtové výměnné kapacity, půda L - fluvizem, půda K - luvizem, půda S - nekontaminovaná černozem

půda	TOC %	pH	CEC mmol/kg	Ca mg/kg	Mg mg/kg	K mg/kg	P mg/kg
půda L	2.31	5.8	54.5	2561	148	155	147
půda K	6.05	7.2	346	2296	76.7	62.2	69.5
půda S	2.21	7.2	138	7195	282	585	166

Byla sledována tělesná hmotnost laboratorních zvířat, jako i celkový přírůstek tělesné hmotnosti (tabulka č. 3) a spotřeby krmiva.

Tabulka č. 3 - Tělesné hmotnosti a celkové přírůstky zvířat sledovaných v průběhu experimentu (g); průměry označené stejným písmenem se významně nelišily (P < 0,05) v jednotlivých sloupcích, n = 6, údaje jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

samci			
	30 dní	90 dní	přírůstky hmotnosti
dieta	250 ± 24[a]	514 ± 24[a]	265 ± 46[a]
dieta+S	253 ± 12[a]	502 ± 18[a]	249 ± 20[a]
dieta+K	253 ± 15[a]	511 ± 27[a]	258 ± 27[a]
dieta+L	248 ± 7[a]	499 ± 47[a]	252 ± 44[a]
samice			
	30 dní	90 dní	přírůstky hmotnosti
dieta	184 ± 8[a]	336 ± 22[a]	152 ± 19[a]
dieta+S	188 ± 12[a]	338 ± 18[a]	150 ± 12[a]
dieta+K	186 ± 14[a]	353 ± 23[a]	167 ± 34[a]
dieta+L	183 ± 13[a]	326 ± 22[a]	143 ± 28[a]

Koncentrace jednotlivých prvků v krevní plasmě jsou shrnuty v tabulce č. 4. Z výsledků předchozích experimentů (Száková et al., 2012; Vlčková, 2013) je zřejmé, že obsahy rizikových prvků ve tkáních laboratorních potkanů odrážejí změny obsahu prvků v půdách, přičemž také velký vliv měla i biologická dostupnost těchto prvků.

Tabulka č. 4 - Koncentrace prvků v krevní plasmě laboratorních zvířat; průměry označené stejným písmenem se významně neliší (P < 0,05) v jednotlivých sloupcích, n = 6, údaje jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

	As	Cd	Pb	Zn	Ca	Mg	P
	($\mu g.L^{-1}$)	($\mu g.L^{-1}$)	($\mu g.L^{-1}$)	($\mu g.L^{-1}$)	($mmol.L^{-1}$)	($mmol.L^{-1}$)	($mmol.L^{-1}$)
samci							
dieta	3.08 ± 3.19^{a}	0.050 ± 0.036^{b}	0.607 ± 0.362^{ab}	725 ± 79^{b}	2.28 ± 0.12^{a}	1.65 ± 0.16^{b}	1.88 ± 0.25^{a}
dieta+S	1.32 ± 1.41^{a}	0.003 ± 0.003^{a}	0.195 ± 0.127^{a}	788 ± 146^{b}	2.22 ± 0.28^{a}	0.97 ± 0.31^{a}	2.05 ± 0.32^{a}
dieta+K	184 ± 25^{b}	0.002 ± 0.002^{a}	0.465 ± 0.247^{ab}	513 ± 144^{a}	2.32 ± 0.26^{a}	0.88 ± 0.36^{a}	1.87 ± 0.31^{a}
dieta+L	30.3 ± 16.3^{b}	0.029 ± 0.01^{ab}	0.641 ± 0.218^{b}	600 ± 114^{ab}	2.19 ± 0.16^{a}	0.92 ± 0.24^{a}	2.13 ± 0.33^{a}
samice							
dieta	6.58 ± 5.29^{a}	0.019 ± 0.011^{ab}	0.568 ± 0.21^{b}	882 ± 281^{b}	2.40 ± 0.34^{a}	0.95 ± 0.35^{a}	1.79 ± 0.43^{a}
dieta+S	5.42 ± 2.39^{a}	0.009 ± 0.005^{a}	0.288 ± 0.108^{a}	1063 ± 287^{bc}	2.47 ± 0.12^{a}	0.73 ± 0.06^{a}	1.71 ± 0.12^{a}
dieta+K	383 ± 58^{b}	0.015 ± 0.004^{ab}	0.505 ± 0.077^{b}	503 ± 70^{a}	2.40 ± 0.17^{a}	0.75 ± 0.22^{a}	1.87 ± 0.33^{a}
dieta+L	68.3 ± 19.8^{b}	0.025 ± 0.003^{b}	0.520 ± 0.114^{b}	629 ± 104^{ab}	2.38 ± 0.16^{a}	0.79 ± 0.18^{a}	1.83 ± 0.37^{a}

V půdě L je vysoký obsah olova a přesto nebylo pozorováno zvýšení koncentrace tohoto prvku v krevní plasmě. Podobná situace byla pozorována v případě půdy K se zvýšeným obsahem kadmia a extrémně vysokým obsahem arsenu. U této půdy ale bylo zaznamenáno statisticky významné snížení hladiny zinku v plasmě. Jak vyzkoumali Cui et Okayasu (2008) a Saito et al. (2008), nebyl zaznamenán vliv arsenu na obsah zinku ve zvířecím a lidském organismu. Z tohoto důvodu u laboratorních potkanů krmených dietou s příměsí půdy K může být potlačení hladiny zinku v plasmě připisováno kadmiu.

Obsah vybraných biochemických parametrů stanovených v krevní plasmě laboratorních potkanů je shrnutý v tabulce č. 5. Další biochemické a hematologické ukazatele pak hodnotila Malinová (2013). U enzymů indikujících potenciální nežádoucí účinky rizikových prvků v krmivech byla hodnocena aktivita AST a ALT enzymu na funkci jater, mezi experimentálními skupinami nebyly pozorovány statisticky významné ($P < 0,05$) změny. Nicméně výsledky ukázaly významné ($P < 0,05$) zvýšení koncentrace močoviny v krevní plasmě samců laboratorních potkanů, což svědčí o kadmiem navozeném poškození ledvin. Borgese et al. (2008) a El-Demerdash et al. (2004) navrhli zvyšující se hladinu močoviny v krevní plasmě jako primární indikátor reverzibilního poškození ledvin vyvolaného kadmiem. Krom toho vedlo přidání samotné půdy ke snížení glukózy v krevní plasmě samic, zatímco výsledky u samců zůstaly beze změny (Malinová, 2013). Rozdíly mezi hladinou glukózy u samců a samic laboratorních potkanů, kteří byli vystaveni arsenu a olovu prostřednictvím pitné vody, vedly k významnému zvýšení střevní absorpce glukózy u samců potkanů, pozorovali Palacios et al. (2012). V našem experimentu výsledky naznačují potlačenou biologickou dostupnost glukózy, získané z experimentální diety, z důvodu přítomnosti kontaminované půdy (Malinová, 2013).

Tabulka č. 5 - Průměrný obsah vybraných biochemických parametrů stanovených v krevní plasmě laboratorních zvířat; přičemž průměry označené stejným písmenem se významně nelišily při $P < 0,05$ v jednotlivých sloupcích, n = 6, data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka.

	AST	ALP
	($\mu kat.L^{-1}$)	($\mu kat.L^{-1}$)
samci		
dieta	1.59 ± 0.15^{a}	3.36 ± 0.61^{a}
dieta+S	1.70 ± 0.41^{a}	2.78 ± 1.01^{a}
dieta+K	1.55 ± 0.12^{a}	2.47 ± 0.61^{a}
dieta+L	1.20 ± 0.04^{a}	3.24 ± 0.76^{a}
samice		
dieta	1.89 ± 1.05^{a}	2.24 ± 0.57^{a}
dieta+S	1.38 ± 0.07^{a}	1.83 ± 0.26^{a}
dieta+K	1.64 ± 1.02^{a}	1.73 ± 0.55^{a}
dieta+L	1.25 ± 0.40^{a}	2.14 ± 0.38^{a}

6 Diskuse

Vliv příjmu rizikových prvků na hodnotu tělesné hmotnosti a přírůstek hmotnosti laboratorních potkanů byl zkoumán mnoha autory. V případě arsenu například Paul et al. (2002), v případě kadmia Asagba (2010) a v případě olova Shan et al. (2009) a Smith et al. (2008). Při vystavení zvířat vlivu arsenu a olova byl pozorován nárůst tělesné hmotnosti laboratorních zvířat bez ohledu na míru obsahu prvků v dietě a na dobu trvání experimentu, zatímco po expozici zvířat kadmiem bylo pozorováno potlačení růstu potkanů. V našem experimentu nebyly pozorovány významné rozdíly mezi zkoumanými skupinami, i v případě vystavení zvířat o jeden řád vyššímu celkovému obsahu kadmia v dietě, než bylo popsáno v uvedených studiích.

Obsah arsenu v krevní plasmě (tabulka č. 4) byl ovlivněn jeho zastoupením v experimentální dietě. Koncentrace arsenu v živočišných tkáních zvířat krmených půdou L a K byly téměř srovnatelné (Vlčková, 2013; Száková et al., 2012), ale jeho koncentrace v půdě L byly významně ($P < 0,05$) nižší než v půdě K. Jak již bylo uvedeno, rozdíly v biologické dostupnosti arsenu v obou půdách také neodpovídají koncentraci arsenu v jednotlivých tkáních (Száková et al., 2012). Proto je možná interakce arsenu s kadmiem. Z toho důvodu interakce arsenu s kadmiem zdá se hraje podstatnou roli. Interakce mezi arsenem a kadmiem v případě společné intoxikace zvířat těmito prvky byla již dříve publikována. Například přídavek kadmia do experimentální diety může významně zvýšit obsah arsenu v játrech a v ledvinách potkanů krmených dietou s obsahem kadmiem obohacených krmných kvasnic (Száková et al., 2009). Podobně jako potkani, kteří byli vystaveni kadmiu s arsenem, nakonec měli více arsenu v srdeční tkáni než potkani, kteří byli vystaveni pouze arsenu (Yáñez et al., 1991). Hochadel et Waalkes (1997) uvedli, že preventivní aplikace arsenu může snížit úmrtnost u potkanů, vystavených vysokým dávkám kadmia, ve srovnání s potkany vystavených samotnému kadmiu. Opačný efekt u obou prvků nebyl pozorován. Kromě toho preventivní aplikace arsenu přinesla zvýšenou produkci (až osmi násobnou) metalothioneinu v játrech. Metalothionein je obecný název skupiny nízkomolekulárních proteinů (6-7 kDa), které jsou schopny navazovat prvky jako Cd, Zn, Cu prostřednictvím cysteinylových skupin. Indukce metalothioneinů chrání organismus proti akutní intoxikaci kadmiem (Klaassen et al., 2009). Tudíž zvýšení obsahu obou prvků v játrech a ledvinách lze očekávat a zvýšený obsah metalothioneinu v těchto tkáních bylo možné ověřit v dalším výzkumu. V případě olova jeho nízká biologická dostupnost (Ellickson et al., 2001; Száková et al., 2012) vede k jeho

relativně nízkým obsahům v analyzovaných tkáních (Vlčková, 2013) a plasmě, kde byly pozorovány významně zvýšené ($P < 0,05$) hladiny pouze v případě extrémně kontaminované půdy L. Jak vysvětlil Smith et al. (2008), absorpce a transformace olova v organismu zvířat se výrazně neliší v závislosti na sloučeninách olova v aplikovaném olovem obohaceném materiálu, případně olovem kontaminované půdě.

Z pravděpodobných interakcí rizikových prvků s esenciálními prvky byl pozorován významný vliv v případě mědi v tkáních zvířat krmených arsenem kontaminovanou půdou K, jak bylo uvedeno v předchozím experimentu (Száková et al., 2012; Vlčková, 2013) a zároveň potvrzeno jinými autory (Birri et al., 2010; Schmolke et al., 1992; Uthus, 2001; Yu et Beynen, 2001). Obsah mědi a její biologická dostupnost v půdě K se neliší od ostatních našich experimentálních půd, tudíž můžeme předpokládat interakci arsenu s mědí, která je popisována i jinými autory (Birri et al, 2010). Interakce mědi s arsenem byla pozorována pouze v případě, kdy arsen byl přítomen pouze v anorganických sloučeninách. V našem případě je mobilní podíl arsenu v půdách zastoupen převážně anorganickým arzeničnanem (Marin et al., 1993), což naznačuje možné zintenzivnění interakce arsenu s mědí. Ostatní dříve popsané interakce, jako je arsen s železem (Paul et al., 2002), kadmium s železem (Turgut et al., 2007) nebo kadmium s mědí (Chmielnicka et Sowa, 1996), nebyly v našem experimentu potvrzeny. Jak již bylo uvedeno, jednotlivé experimenty se lišily v množství použitých prvků, jejich aplikace, zdroj prvků a době trvání experimentu.

Hladiny ostatních makro- a mikroživin se významně ($P < 0,05$) nezměnily v důsledku zvýšeného vstřebávání rizikových prvků. Ačkoli je obsah zinku v půdě L velmi vysoký v porovnání s ostatními experimentálními půdami, jeho obsah v játrech a ledvinách má klesající tendenci. Vzhledem k vysokému obsahu kadmia v půdě L je zřejmý potenciální nežádoucí účinek kadmia na zinek, je vstřebáván a tuto akumulaci je třeba vzít v úvahu (Chmielnicka et Sowa, 1996; Matovic et al., 2011; Vlčková, 2013).

Významný vliv intoxikace potkanů rizikovými prvky byl pozorován na jaterních enzymech, jako je aspartátalanintransferáza, alaninaminotransferáza a alkalická fosfatáza. Bylo tak pozorováno po jednorázových dávkách (Tzirogiannis et al., 2003; Dudley et al., 1982) i po dlouhodobé expozici dietě (Renugadevi et Prabu, 2010), dokumentuje to jasně hepatotoxický vliv rizikových prvků, zejména pak kadmia. V našem případě nebyly pozorovány žádné změny v aktivitě jaterních enzymů (tabulka č. 5), ale v ostatních biochemických ukazatelech, například koncentrace močoviny v krevní plasmě poukazuje

na nežádoucí účinek, který vzniká při dlouhodobé expozici rizikovými prvky z kontaminované půdy (Malinová, 2013). Poškození ledvin je častý důsledek dlouhodobého působení kadmia (Hiratsuka et al., 1996; Borgese et al., 2008; El-Demerdash et al., 2004). Hypoglykémie vyplývající z aplikace jednorázové dávky kadmia byla uváděna z důvodu narušení funkce glukoneogeneze způsobené zdravotním poškozením jater (Adachi et al., 2007). Nicméně dlouhodobé vystavení kadmiu vedlo k obnovení původní koncentrace glukózy a to díky antioxidačním mechanismům u potkanů. Naše výsledky nám však neumožňují dospět k názoru, že potlačení glukózy u samic potkanů byla způsobena příjmem rizikových prvků.

Bylo popsáno snížení obsahu hemoglobinu, který je spojen s klesající hladinou železa v krvi a anémií (Adachi et al., 2007; El-Demerdash et al., 2004). Nicméně opačný efekt byl pozorován v pokusu Fučíková et al. (1995), kde byly potkani krmeni polosyntetickou dietou doplněnou o kvasnice *Candida utilis* s nízkým (3 mg/kg) nebo vysokým (90 mg/kg) obsahem organicky vázaného kadmia a / nebo kadmia ve formě CdCl2 (9 mg/kg potravy). Potkani, kteří byli krmeni dietou s vysokým obsahem kvasnic Cd nebo s přidaným CdCl2, měli vyšší hladiny ($P < 0,05$) kadmia v játrech a ledvinách než kontrolní skupiny. Zvířata ze skupiny, která měla přidaný vysoký obsah Cd, měla významně zvýšené hodnoty hemoglobinu ve srovnání se skupinou, která měla přidaný nízký obsah Cd v dietě. Vliv průběhu pokusu a doba trvání experimentu popisuje (Fučíková et al., 1995). Zjistili, že neproběhly žádné změny v hodnotách hemoglobinu u potkanů krmených kadmiem obohacenou dietou. Také předchozí experiment (Száková et al., 2012) prokázal, že neproběhly žádné změny v hodnotách hemoglobinu, ale ukazuje na snížení koncentrace železa v tkáních. V tomto experimentu nebylo prokázáno potlačení železa, ale hodnoty hemoglobinu a celkový počet erytrocytů byly zvýšené u samic potkanů vystavených půdě L, toto dokumentuje jednoznačnou odpověď živočišných organismů na posílení dietní úrovně kadmia (Malinová, 2013). Stejně tak i zvýšená hodnota bílých krvinek pozorovaná po obou jednotlivých dávkách (Kataranovki et al., 1998) a po dlouhodobé expozici kadmiu (Fučíková et al., 1995; Száková et al., 2012), nebyla v tomto experimentu potvrzena.

Výsledky potvrzují předchozí poznatky (Száková et al., 2012), které ukazují zvýšený obsah rizikových prvků (zejména As a Cd) jako důsledek dlouhodobého příjmu půdy kontaminované těmito prvky. Přestože změny biochemických a hematologických parametrů zvířat nevedly k jednoznačným závěrům, jejich existence jako taková potvrzuje, že expozice

zvířat půdě kontaminované rizikovými prvky vede k nepříznivému ovlivnění organismu zvířat. V případě olova byly nízké obsahy tohoto prvku ve tkáních ovlivněny jeho nízkou biologickou dostupností. Nicméně Oktem et al. (2004) pozorovali nepříznivé účinky dlouhodobého příjmu nízkých koncentrací olova u lidí žijících v kontaminované oblasti. Mimoto je nutno předpokládat interakce mezi prvky v případě víceprvkové kontaminace oblasti (Whittaker et al., 2011; Wang et al., 2009), která může ovlivnit potenciální účinky jednotlivých prvků.

7 Závěr

Pro tuto práci byl proveden modelový experiment, při kterém byli použiti samci i samice laboratorních potkanů kmene Wistar, kterým byla podávána polysyntetická dieta s přídavkem 10 % kontaminované půdy z oblastí zatížených bývalou těžbou a zpracováním rud drahých kovů (část toku řeky Litavky, okres Příbram a Kutná Hora). Po ukončení experimentu byly stanoveny obsahy vybraných rizikových prvků (kadmia, arsenu a olova) a některých esenciálních prvků v plasmě laboratorních zvířat.

Práce byla zaměřena na posouzení vlivu rizikových prvků (Cd, As a Pb) laboratorními potkany na vybrané biochemické parametry a tudíž na aktivitu jaterních enzymů. Byl také posouzen vliv příjmu rizikových prvků na živočišný organismus, jaká onemocnění způsobuje kontaminace jednotlivými prvky. Dále byly posuzovány metalothioneiny a oxidativní stres, jejich charakteristika a funkce v živočišném organismu.

Lze shrnout, že u zvířat exponovaných vysokým dávkám As a Cd došlo k významnému zvýšení koncentrací těchto prvků v krevní plasmě, zatímco v případě málo biologicky dostupného olova významné zvýšení jeho koncentrace v plasmě pozorováno nebylo. Naproti tomu bylo zaznamenáno snížení koncentrací zinku v plasmě, což naznačuje možný antagonismus mezi zinkem a kadmiem.

Obsahy alkalické fosfatázy ani dříve stanovených dalších biochemických ukazatelů, jako AST a ALT nebyly přídavkem kontaminované půdy významně ovlivněny, což naznačuje nízkou bezprostřední míru ohrožení pokusných zvířat. Je ale třeba konstatovat, že zaznamenaný zvýšený příjem zejména As a Cd může při dlouhodobé expozici nebo při vyšších hladinách těchto prvků v půdě znamenat určité riziko, kterému je třeba v takto kontaminovaných oblastech věnovat pozornost.

8 Použitá literatura

Adachi, K., Dote, T., Dote, E., Mitsui, G., Kono, K. 2007. Strong acute toxicity, severe hepatic damage, renal injury and abnormal serum electrolytes after intravenous administration of cadmium fluoride in rats. Journal of Occupational Health. 49. 235-241.

Asagba, S. O. 2010. Comperative effect of water and food-chain mediated cadmium exposure in rats. Biometals. 23. 961-971.

Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J. 1995. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Grada Publishing. Praha. 288 s. ISBN: 807169150X.

Beneš, S. 1994. Obsahy a bilance prvků ve sférách životního prostředí 2.část. Ministerstvo zemědělství ČR. Praha. 159 s. ISBN: 8070840900.

Birri, P. N. R., Perez, R. D., Cremonezzi, D., Perez, C. A., Rubio, M., Bongiovanni, G. A. 2010. Association between As and Cu renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake. Environmental Research. 11. 417-423.

Borgese, L. P., Brandão, R., Godoi, B., Nogueira, C. W., Zeni, G. 2008. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. Chemico-biological Interactions. 171. 15–25.

Casas, J. S., Sordo, J. 2006. Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects. Amsterdam. p. 354. ISBN: 9780444529459.

Cibulka, J., Domažlická, E., Kozák, J., Kubizňáková, J., Mader, P., Machálek, E., Maňkovská, B., Musil, J., Pařízek, J., Píša, J., Pohunková, H., Reisnerová, H., Svobodová, Z. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. Academia. Praha. 427 s. ISBN: 8020004017.

Cobb, A. 2008. The elements: Cadmium. Marshall Cavendish Corporation. New York. p. 33. ISBN: 9780761426868.

Cui, X., Okayasu, R. 2008. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. Food and Chemical Toxicology. 46. 3646-3650.

Diego-Otero, Y. et al. 2009. α-Tocopherol Protects Against Oxidative Stress in the Fragile X Knockout Mouse: an Experimental Therapeutic Approach for the Fmr1 Deficiency. Neuropsychopharmacology. 34. 1011-1026.

Doubek, J., Šlosárková, S., Řeháková, K., Bouda, J., Scheer, P., Piperisová, I., Tomenendálová, J., Matalová, E. 2010. Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. Noviko s.r.o. Brno. 102 s. ISBN: 9788086542225.

Dudley, R. E., Svoboda, D. J., Klaassen, C. D. 1982. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. Toxicology and Applied Pharmacology. 65 (2). 302-313.

Ehrmann, J. jr., Schneiderka, P., Ehrmann, J. 2006. Alkohol a játra. Grada Publishing a.s. Praha. 168 s. ISBN: 802471048X.

El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S., Baghdadi, H. H. 2004. Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β-carotene. Food and Chemical Toxicology. 42. 1563-1571.

Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellström, T., Nordberg, G. 1985. Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal. Exposure, dose, and metabolism. CRC Press. Florida. p. 209. ISBN: 0849366909.

Fučíková, A., Slámová, A., Száková, J., Cibulka, J., Heger, J. 1995. The influence of dietary cadmium on hematological parameters and phagocytic activity of leukocytes in rats. Živočisná Výroba. 40. 15-18.

Hehlmann, A. 2010. Hlavní symptomy v medicíně: Praktická příručka pro lékaře a studenty. Grada Publishing a.s. Praha. 464 s. ISBN: 9788024726120.

Hirutsuka, H., Katsuta, O., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T., Marumo, F. 1996. Chronic Cadmium Exposure-Induced Renal Anemia in Ovariectomized Rats. Toxicology and Applied Pharmacology. 137. 228-236.

Hochadel, J. F., Waalkes, M. P. 1997. Sequence of exposure to cadmium and arsenic determines the extent of toxic effects in male Fisher rats. Toxicology. 116. 89-98.

Holeček, V. Volné radikály a antioxidanty [online]. 2005 [cit. 2014-3-12]. Dostupné z <http://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>.

Husted, R. et al. Cadmium. In: LANS. *Los Alamos National Lab* [online]. 2011 [cit. 2014-2-4]. Dostupné z <http://periodic.lanl.gov/48.shtml>.

Chmielnicka, J., Sowa, B. 1996. Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein, and ceruloplasmin in pregnant rats and fetuses. Ecotoxicology and Environmental Safety. 35. 277-281.

Chubatsu, L. S., Meneghini, R. 1993. Metallothionein proteus DNA from oxidative damage. Biochem. J. 291. 193-198.

Imalab s.r.o.: biochemie, hematologie, cytogenetika, imunochemie, flowcytometrie, molekulární biologie [online]. 2009 [cit. 2014-2-27]. Dostupné z <http://www.imalab.cz/clanek/>.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press. USA. p. 413. ISBN: 0849315751.

Kafka, Z., Punčochářová, J. 2002. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. Chemické listy. 96. 611-617.

Kataranovski, M., Kataranovski, D., Savic, D., Jovcic, G., Bogdanovic, Z., Jovanovic, T. 1998. Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. Physiological Research. 47. 453-461.

Kizek, R., Vacek, J., Adam, V., Vojtěšek, B. 2004a. Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. Klinická Biochemie a Metabolismus. 12. 72-78.

Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B., Havel, L. 2004b. Využití katalytických reakcí na rtuťové elektrodě pro elektrochemické stanovení metalothioneinů. Chemické listy. 98. 166-173.

Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology. 238. 215–220.

Klusáčková, Z. Aminotransferázy [online]. 2012 [cit. 2014-3-7]. Dostupné z <mefanet-motol.cuni.cz/>.

Kotačková, L. Top lékař: Laboratorní hodnoty [online]. 2014 [cit. 2014-3-6]. Dostupné z <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/>.

Kraft, W., Dürr, U. M. 2001. Klinická laboratórna diagnostika vo veterinárnej medicíne. Hajko & Hajková. Bratislava. 365 s. ISBN: 8088700515.

Kuglerová, J., Studecký, T., Lubojacký, R., Milička, M., Sekerka, L., Nešpor, O., Humpál, M., Beran, T., Knobloch, P. Chemie: chemický vzdělávací portál [online]. 2006 [cit. 2014-2-20]. Dostupné z <http://chemie.gfxs.cz/index.php>.

Kuchynka, P. et al. 2007. Oční lékařství. Grada Publishing a.s. Praha. 812 s. ISBN: 9788024711638.

Lew, K. 2009. Understanding the Elements of the Periodic Table: Lead. The Rosen Publishing Group. New York. p. 47. ISBN: 9781404217799.

Ljung, K., Selinus, O., Otabbong, E., Berglund, M. 2006. Metal and arsenic distribution in soil particle sizes relevant to soil ingestion by children. Applied Geochemistry. 21. 1613-1624.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. 2004. Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing a.s. Praha. 728 s. ISBN: 8024708361.

Makovníková, J. 2000. Distribúcia kadmia, olova, medi a zinku v pôde a jej hodnotenie so zreteľom na potenciály a bariéry transportu kovov do rastlín. Výzkumný ústav pôdoznalectva a ochrany pôdy. Bratislava. 126 s. ISBN: 8085361671.

Malinová, M. 2013. Vliv rozdílných diet na zdravotní stav laboratorního potkana. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 63 s.

Marin, A. R., Masscheleyn, P. H., Patrick, W. H. jr. 1993. Soil redox-pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice. Plant and Soil. 152. 245-253.

Masařík, M., Gumulec, J., Kuchtičková, S., Rovný, A., Hrabec, R., Eskschlager, T., Kizek, R. 2010. Změny hladiny metalothioneinu u buněčných linií odvozených z karcinomu prostaty. Brněnské onkologické dny. 24. 104-106.

Matovic, V., Buha, A., Bulat, Z., Dukic-Cosic, D. 2011. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju. 62. 65-76.

McLaughlin, M. J., Parker, D. R., Clarke, J. M. 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. Field Crop Research. 60. 143-163.

Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H., Rodilla, V. 2000. Induction, Regulation, Degradation and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 35(1). 35-70.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. 2001. Harperova Biochemie. Nakladatelství H+H. Jinočany. 872 s. ISBN: 8073190036.

Navrátil, L. et al. 2008. Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory. Grada Publishing a.s. 424 s. ISBN: 9788024723198.

Oktem, F., Arslan, M. K., Dundar, B., Delibas, N., Gultepe, M., Ilhan, I. E. 2004. Renal effects and erytrocyte oxidative stress in long-term low-level lead-exposed adolescent workers in auto repair workshops. Archives of Toxicology. 78. 681-687.

Ondruš, J. Oxidační stres a antioxidanty [online]. 2007 [cit. 2014-3-11]. Dostupné z <http://www.atletickytrenink.cz/Regenerace/antioxidanty.php>.

Palacios, J., Roman, D., Cifuentes, F. 2012. Exposure to low level of arsenic and lead in drinking water from antofagasta city induces gender differences in glucose homeostasis in rats. Biological Trace Element Research. 148. 224-231.

Paul, P. C., Misbahuddin, M., Nasimuddin Ahmed, A. N., Dewan, Z. F., Mannan, N. A. 2002. Accumulation of arsenic in tissues of iron-deficient rats. Toxicology Letters. 135. 193-197.

Penka, M., Tesařová, E. et al. 2011. Hematologie a transfuzní lékařství I: hematologie. Grada Publishing a.s. Praha. 488 s. ISBN: 9788024734590.

Petrlová, J., Svoboda, M., Blaštík, O., Horáková, Z., Binková, Z., Křížková, S., Adam, V., Trnková, L., Kizek, R. 2006. Přehled analytických metod pro stanovení metalothioneinu v tkáních. Brněnské onkologické dny. 30.

Piscator, M. 1985. Dietary exposure to cadmium and health effects: Impact of environmental ganges. Environmental Health Perspectives. 63. 127-132.

Racek, J., Eiselt, J., Friedecký, B., Holeček, V., Nekulová, M., Pittrová, H., Rušavý, Z., Senft, V., Šavlová, M., Těšínský, P., Verner, M. 2006. Klinická biochemie. Galén. Praha. 329 s. ISBN: 8072623249.

Racek, J., Holeček, V. 1999. Enzymy a volné radikály. Chemické listy. 93. 774-780.

Rejnek, J., Novobilský, V., Mullnerová, J. 1998. Zatížení některých skupin lidské populace severočeského regionu arsenem. Mikroelementy. 98. 107-109.

Remy, H. 1971a. Anorganická chemie I.díl. Nakladatelství technické literatury. Praha. 936 s.

Remy, H. 1971b. Anorganická chemie II.díl. Nakladatelství technické literatury. Praha. 831 s.

Renugadevi, J., Prabu, S. M. 2010. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. Experimental and Toxicologic Pathology. 62. 171-181.

Richter, R. Multimediální učební stránky z výživy rostlin [online]. MZLU v Brně. 2004 [cit. 2014-2-10]. Dostupné z <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_tk.htm>.

Roza, G. 2009. Understanding the Elements of the Periodic Table: Arsenic. The Rosen Publishing Group. New York. p. 47. ISBN: 9781404217829.

Saito, S., Yamauchi, H., Yoshida, K. 2008. Interactions of arsenic with zinc, copper and iron in human hepatic cells. Trace elements and electrolytes. 25. 206-210.

Shan, G., Tang, T., Zhang, X. 2009. The Protective Effects of Ascorbic Acid and Thiamine Supplementation against Damage Caused by Lead in the Testes of Mice. Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences. 29. 68-72.

Schmolke, G., Elsenhans, B., Ehtechami, C., Forth, W. 1992. Arsenic copper interaction in the kidney of the rat. Human & Experimental Toxicology. 11. 315-321.

Smith, D. M. jr., Mielke, H. W., Heneghan, J. B. 2008. Subchronic Lead Feeding Study in Male Rats. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 55. 518-528.

Soudek, P., Víchová, L., Valenová, Š., Podlipná, R., Malá, J., Vaněk, T. 2006. Arsen a jeho příjem rostlinami. Chemické listy. 100. 323-329.

Sova, Z. 1997. Nálezy kadmia, rtuti a olova v hospodářských a volně žijících zvířatech, v krmivech a potravinách v České republice v roce 1995. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 1-4.

Száková, J., Novosadová, Z., Zídek, V., Fučíková, A., Zídková, J., Miholová, D., Tlustoš, P. 2012. The effect of diet amended by risk elements contaminated soil on risk element tissue contents and hematological parameters of rats. Czech Journal of Animal Science. 57. 430-441.

Száková, J., Zídek, V., Miholová, D. 2009. Influence of elevated content of cadmium and arsenic in diet containing feeding yeast on organisms of rats. Czech Journal of Animal Science. 54. 1-9.

Štefan, J., Hladík, J. et al. 2012. Soudní lékařství a jeho moderní trendy. Grada Publishing a.s. Praha. 448 s. ISBN: 9788024735948.

Tesař, V., Schück, O. et al. 2006. Klinická nefrologie. Grada Publishing a.s. Praha. 652 s. ISBN: 8024705036.

Tremlová, J., Száková, J., Tlustoš, P. 2010. An assessment of possible effect of risk elements contained in soil on human organism. Chemické listy. 104. 349-352.

Turgut, S., Polat, A., Inan, M., Turgut, G., Emmungil, G., Bican, M., Karakus, T. Y., Genc, O. 2007. Interaction Between Anemia and Blood Levels of Iron, Zinc, Copper, Cadmium and Lead in Children. Indian Journal of Pediatrics. 74. 827-830.

Tzirogiannis, K. N., Panoutsopoulos, G. I., Demonakou, M. D., Hereti, R. I., Alexandropoulou, K. N., Basayannis, A. C., Mykoniatis, M. G. 2003. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. Archives of Toxicology. 77. 694-701.

Uthus, E. O. 2001. High dietary arsenic exacerbates copper deprivation in rats. Journal of trace elements in experimental medicine. 14. 43-55.

Vlčková, V. 2013. Příjem rizikových prvků u potkanů krmených směsí s přídavkem kontaminované půdy. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 56 s.

Wang, L., Chen, D., Wang, H., Liu, Z. 2009. Effects of Lead and/or Cadmium on the Expression of Metallothionein in the Kidney of Rats. Biological Trace Element Research. 129. 190-199.

Whittaker, M. H., Wang, G., Chen, X. - Q., Lipsky, M., Smith, D., Gwiazda, R., Fowler, B. A. 2011. Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats. Toxicology and Applied Pharmacology. 254. 154-166.

Yáñez, L., Carrizales, L., Zannata, M. T., de Jesús Majía, J., Batres, L., Díaz-Barriga, F. 1991. Arsenic-cadmium interaction in rats: toxic effects in the heart in tissue metal shifts. Toxicology. 67. 227-234.

Yu, S., Beynen, A. C. 2001. High Arsenic intake raises kidney copper and lowers plasma copper concentrations in rats. Biological Trace Elements Research. 81. 63-70.