

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Interakce mezi infekcí tasemnicí a zatížením hostitele
těžkými kovy**

Diplomová práce

Autor práce: Jan Magdálek

Vedoucí práce: doc. Ing. Ivana Jankovská, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Interakce mezi infekcí tasemnicí a zatížením hostitele těžkými kovy" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4. 2016

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své vedoucí diplomové práce, paní doc. Ing. Ivaně Jankovské Ph.D. a konzultantovi, Ing. Vladislavu Sloupovi, za jejich metodické vedení, cenné připomínky a čas, který mi v průběhu psaní této práce věnovali.

Interakce mezi infekcí tasemnicí a zatížením hostitele těžkými kovy

Souhrn

Těžké kovy se v živých organismech vyskytují ve stopovém množství. Zatímco zinek je esenciální prvek, který je nezbytný pro řadu fyziologických procesů, kadmium v těle působí jako buněčný jed, který může způsobovat oxidační stres a přispívat ke vzniku nádorových onemocnění. Výsledky dřívějších studií naznačují, že někteří zástupci třídy tasemnic (Cestoda) a vrtějšů (Acantocephala) jsou schopni ve svých tělech absorbovat vyšší dávky těžkých kovů ve srovnání s jejich hostiteli. V souvislosti se zvýšenou akumulací těžkých kovů ve tkáni tasemnic bylo také pozorováno snížené množství těchto kovů v orgánech hostitele. Cílem této práce bylo zjistit, zda infekce tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) způsobí snížení koncentrace Cd a Zn v orgánech laboratorních potkanů. Celkem 24 jedinců laboratorního potkana (*Rattus norvegicus* var. *alba*) kmene wistar bylo rozděleno do 4 skupin (PT, P0, 0T a 00). Skupinám PT a P0 byly po dobu 6. týdnů podávány zvýšené dávky kadmia (3,0 mg/týden) a zinku (235,7 mg/týden). Těchto zvýšených dávek bylo dosaženo příměsí huseníčku Hallerova, rostliny schopné hyperakumulace kadmia zinku z půdy. Potkani ze skupiny PT byli navíc infikováni cysticerkoidy tasemnice krysí. Potkani ze skupiny 0T byli krmeni standardní směsí ST-1 a též infikováni tasemnicí krysí, zatímco potkani ze skupiny 00 sloužili, jako kontrola bez zvýšených dávek Zn a Cd bez infekce tasemnicí. Po uplynutí šesti týdnů byli potkani usmrceni a v jejich orgánech (kost, svalovina, varlata, slezina, střevo, játra ledviny) bylo analyzováno množství Zn a Cd. Následné statistické testy potvrdily nižší množství Zn a Cd ve většině orgánech potkanů infikovaných tasemnicí krysí v porovnání s potkany bez infekce tasemnicí. Například v ledvinách, játrech a ve tkáni tenkého střeva infikovaných potkanů byla zjištěna 2,9; 2,5 a 1,8 krát nižší průměrná koncentrace kadmia ve srovnání s neinfikovanými jedinci. Tasemnice krysí ve své tkáni absorbovala 1695 krát vyšší koncentraci kadmia ve srovnání se svalovinou. Obsah zinku byl u infikovaných potkanů oproti neinfikovaným nižší ve všech orgánech s výjimkou varlat a sleziny. Infikovaní potkani měli v ledvinách, játrech a ve tkáni tenkého střeva 1,2; 1,25 a 1,4 krát nižší průměrnou koncentraci zinku oproti neinfikovaným. Tasemnice krysí absorbovala vyšší koncentraci zinku v porovnání se všemi orgány hostitele.

Klíčová slova: potkan, těžké kovy, akumulace, tasemnice

Interaction between tapeworm infection and heavy metals accumulation in the host

Summary

Heavy metals in living organisms occur in trace amounts. While zinc is an essential element which is indispensable for many physiological processes, cadmium in body acts as a tissue toxin, that can cause oxidative stress and contribute to cancer development. Recent studies suggest that some species of tapeworms (Cestoda) and Acantocephala are able to absorb in their tissue higher quantity of heavy metals in comparison with their hosts. Moreover it was observed that in connection with the increased accumulation of heavy metals in the tissue of tapeworm was decreased amounts of these metals in the organs of the host. The aim of this thesis was to investigate whether the rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) causes a decrease in the concentration of Cd and Zn in the organs of rats. A total of 24 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 4 groups (n=6). Groups PT and OP take increased doses of cadmium (3,0 mg/week) and zinc (235,7 mg/week) for six weeks. This increased intake was achieved by adding *Arabidopsis halleri* to feed. After six weeks rats were killed and concentrations in their tissues (bone, muscle, testes, spleen, intestine, liver kidney) were analyzed. Subsequent statistical tests confirmed lower levels of Cd and Zn in some organs of rats infected with tapeworm compared to rats without infection. For example in kidney, liver and intestine of infected rats was detected 2,9; 2,5 and 1,8 times lower concentrations of cadmium and zinc in comparison with uninfected rats. Tapeworm absorbed 1695 times higher amount of cadmium compared to the host muscle. The zinc content was lower in all organs (except spleen and testes) of infected rats in comparison to uninfected. In kidney, liver and intestine of infected rats was 1,2; 1,25 and 1,4 times lower average concentration of zinc in comparison with uninfected rats. The tapeworm absorbed higher concentration of zinc compared to all organs of the host.

Keywords: rat, heavy metals, accumulation, tapeworm

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	7
3 Literární rešerše	8
3.1 Stopové prvky v živém organismu	8
3.2. Kadmium.....	9
3.3 Zinek.....	10
3.3.1. Toxicita zinku.....	12
3.4. Transport kovů v těle (metallothioneiny).....	13
3.5. Akumulace kovů v ledvinách.....	14
3.6. Tasemnice čeledi Hymenolepididae	15
3.6.1. Tasemnice krysí (Hymenolepis diminuta).....	16
3.6.2. Imunitní reakce na tasemnici krysí.....	17
3.7. Akumulace kovů parazitickými helminty.....	17
3.7.1. Využití helmintů v bioindikaci zatížení prostředí.....	18
3.7.2. Model Hymenolepis dimituta/Rattus norvegicus.....	19
3. 4. 2. Vliv tasemnice na zatížení hostitele těžkými kovy.....	19
3. 5. Rostlinné hyperakumulátory.....	21
1.5.1. Huseníček Hallerův (Arabidopsis Halleri).....	22
4 Materiál a metody	24
4. 1. Potkani.....	24
4. 2 Infekce tasemnicí.....	24
4. 3. Bilanční fáze.....	25
4. 4. Analýza kovů v orgánech a tasemnici.....	25
4. 5. Statistika.....	19
5 Výsledky	27
5.1. Kadmium.....	27
5. 2. Zinek	33
6 Diskuse	38
7 Závěr	44
8. Seznam použité literatury	45

1 Úvod

Od druhé poloviny 90. let minulého století se objevují záznamy o schopnosti parazitických helmintů s metabolicky aktivním tegumentem, jako jsou tasemnice (Cestoda) a vrtějši (Acantocephala) akumulovat vyšší množství těžkých kovů ve srovnání s tkání jejich hostitelů. V minulosti byl tento fenomén pozorován nejčastěji u parazitů vodních organismů (Sures et al., 1999; Sures, 2001). Někteří parazité ryb, zejména vrtějši jsou v souvislosti s tímto jevem obecně přijímáni, jako bioindikátory znečištění prostředí těžkými kovy (Tores et al., 2004). V terestrickém prostředí se v tomto ohledu staly předmětem studií tasemnice parazitující u hlodavců. Například potkan obecný (*Rattus norvegicus*) spolu s tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) mohou být využiti jako bioindikátory zatížení olovem, zejména v urbanistickém prostředí (Sures et al., 2002; 2003). Současně byly v některých případech zjištěny nižší koncentrace kovů v orgánech zvířat infikovaných tasemnicí, oproti jedincům bez infekce (Sures et al., 2002; Jankovská et al., 2010b).

Kadmium je vysoce toxický kovový prvek, který způsobuje poškození tkání různých orgánů a u člověka bývá také spojován se vznikem nádorových onemocnění. Záznamy o interakci mezi zatížením tímto kovem a infekcí tasemnicemi pocházejí pouze od jedinců žijících ve volné přírodě (Tores et al., 2006; Teimoori et al., 2014). Zinek je naopak esenciální kov nezbytný pro normální funkci lidského těla (García et al., 2015), avšak při nadbytečném množství v potravě může působit toxicky (Blindauer et al., 2001). Z několika málo existujících záznamů o vlivu tasemnic na zátěž tímto kovem vyplývalo, že přítomnost tasemnice způsobuje zvýšení koncentrace zinku v játrech (García et al., 2015; Brožová et al., 2015). Pro posouzení vlivu tasemnice krysí na zátěž laboratorního potkana zinkem a kadmiem byl v rámci této diplomové práce proveden experiment v laboratorních podmínkách.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo vyhodnotit zatížení laboratorních potkanů vybranými těžkými kovy (Zn, Cd) a posoudit vliv tasemnice krysí na tuto zátěž.

Hypotéza: Tasemnice snižují koncentrace zinku a kadmia ve tkáni hostitele.

3 Literární rešerše

3.1 Stopové prvky v živém organismu

Koncentrace stopových prvků nutná pro správnou funkci organismu je velmi nízká. Obvykle nižší, než 100 mg/kg v sušině (McDowell, 1992). Také v krevním séru zvířat jsou stopové prvky přítomny v nepatrném množství. Jak uvádí Suttle (2010), toto množství zpravidla nepřesahuje 2 ppm (parts per milion). Mezi sedm esenciálních stopových prvků patří: měď, železo, zinek, kobalt, jod, mangan a selen. Z těchto prvků je v krevním séru nejvíce zastoupeno železo (1 – 2 ppm), následováno zinkem (0,8 – 1,2 ppm) a mědí (0,57 – 1,0). Naopak kobalt, jod, mangan a selen se vyskytují v menším množství. Esenciální prvky jsou většinou přijímány v potravě a přestože se v organismu vyskytují v nízkých koncentracích, mají velký význam pro zdraví, růst a reprodukci. Spolu s řetězcí aminokyselin tvoří složené enzymy, důležité pro řadu fyziologických procesů (Yattoo et al., 2013).

Přítomnost stopových prvků je nezbytná pro funkci imunitního systému. Při jejich nedostatku dochází ke snížení rezistence vůči onemocněním. Ovlivňují celou řadu buněk imunitního systému, například schopnost fagocytózy neutrofilů může být zvýšena suplementací selenu (Sordillo et al., 2013).

Prostřednictvím metalloenzymů a metalloproteinů jsou zapojeny do oxidačně redukčních procesů v těle. Nedostatek esenciálních stopových prvků vede k oxidativnímu stresu, při kterém dochází k poškození buněk a tkání volnými radikály (Gressley et al., 2009). Koncentrace stopových prvků se může měnit pod vlivem různých infekcí a zánětů a v důsledku změn v buněčném metabolismu (Yattoo et al., 2013).

Zatímco výše zmiňované esenciální kovy jsou pro organismus nezbytně nutné, naopak kovy jako rtuť, olovo nebo kadmium jsou pro organismus toxické již v malých dávkách. Tyto kovy se vážou na SH (sulfanylové), COOH (karboxylové) a NH₂ (amino) skupiny biomolekul, čímž mění jejich strukturu a následně i funkci a působí tak, jako enzymatické jedy (Raudenská a kol., 2012). Díky vysoké afinitě k vazebným místům různých bílkovin mohou o tato vazebná místa soupeřit s esenciálními prvky. Například kadmium tak narušuje metabolismus vápníku, což může vést k osteomalacii (Kido et al., 1993).

Chronická ingesce toxických kovů má za následek jejich absorpci ve střevech a následnou akumulaci v cílových orgánech. Ve střevě zároveň zůstává velké množství nevstřebaného kovu, což může mít přímý dopad na střevní ekosystém (Brožová et al., 2015). Příjem kadmia v dávce 50ppm po dobu třiceti dní způsobil u potkanů snížení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*, poškození střevních tkání a zánět doprovázený zvýšenou hladinou metallothioneinů a zvýšenou aktivitou prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1, nebo IL-17 a naopak sníženou, nebo nezměněnou hladinu protizánětlivého interleukinu IL-10 (Ninkov et al., 2015).

3.2. Kadmium

Toxicita kadmia byla zjištěna v padesátých letech 20. století v Japonsku, kde byla popsána, jako nemoc Itai-itai. Při akutní kontaminaci tímto kovem jsou poškozeny plíce, játra a varlata (Friberg, 1986). Mezi následky chronické kontaminace kadmiem patří poškození dýchacích cest, glomerulárních i tubulárních částí ledvin, imunodeficience, apatie, narušení regulace krevního tlaku, osteoporóza a celková deformace kostry (Bertin et al., 2006).

Přítomnost kadmia v buňkách narušuje aktivitu enzymů, což může způsobit poškození biologických membrán. Například Janik (1992) pozoroval snížené množství fosfolipidů v srdeční tkáni potkanů, kterým byl podáván chlorid kadmia oproti kontrolní skupině. Negativní účinek kadmia je navíc zesílen nízkou rychlostí vylučování a následnou akumulací v těle (Jin et al., 2004).

Hlavním místem vstřebávání kadmia je tenké střevo, v jehož tkáni se krátce po orálním podání ukládá v poměrně vysoké koncentraci. Po určité době ale tato koncentrace klesá (Elsenhans et al., 1997). Vstřebávání kadmia skrze střevní sliznici je popisováno, jako kombinace dvou odlišných procesů. Nejprve jsou ionty kadmia rychle vstřebány střevními mikrokly, což vede k rychlé saturaci střevní stěny. V další fázi jsou intracelulární ionty kadmia vázány na jaterní metalothioneiny, spolu se kterými opouštějí buňky střevní sliznice a dostávají se do krve (Bertin et al., 2006). Následně se kadmium krevním oběhem dostává do různých orgánů. Největší koncentrace kadmia, zvláště při chronické zátěži, ukládána v ledvinách (Swiergosz and Kowalewska, 2001).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) kadmium řadí mezi karcinogeny skupiny 1, tedy látky prokazatelně karcinogenní. Přestože ionty kadmia nejsou samy o sobě mutagenické a poškození DNA není způsobeno přímo jejich navázáním, prokazatelně mohou zvyšovat expresi protoonkogenů, jako je např. C-FOS. To má za následek zvýšenou proliferaci, vedoucí až ke vzniku tumoru (Bertin et al., 2006).

K poškození DNA vlivem kadmia dochází nepřímo. Kadmium vyvolává oxidační stres prostřednictvím procesů, které mají za následek pokles hladiny buněčných antioxidantů a exhalaci reaktivních forem kyslíku (ROS) mitochondriemi (Waisberg et al., 2003).

Kadmium navíc už při nízkých koncentracích inhibuje aktivitu opravných mechanismů. Bílkoviny zodpovědné za stabilitu DNA často obsahují zinek vázaný na cysteinový a histidinový zbytek, tzv. zinkový prst. Kadmium má stejně jako některé další těžké kovy afinitu k thiolovým skupinám přítomným na cysteinovém zbytku, díky čemuž může soupeřit se zinkem o vazebné místo a narušit tak funkci těchto bílkovin (Bertin et al., 2006).

Dávka kadmia v rozmezí 1 – 10 mg/kg na den může u březí samice potkana inhibovat přenos zinku, železa a pravděpodobně i mědi a vápníku z placent do plodu (Kuriwaki et al., 2005).

Kontaminace prostředí kadmiiem je obvykle spojována s těžbou těžkých kovů, metalurgií, ale také s používáním zinko-kadmiových baterií, pigmentů a antikorozivních prostředků (Bertin et al., 2006).

3.3 Zinek

Zinek je nezbytný pro růst rostlin i živočichů. Podílí se na řadě reakcí zapojených v metabolismu uhlovodíků a dusíku. Uplatňuje se při přenosech energie v buňce, při syntéze bílkovin a reguluje expresi genů. Je důležitý pro metabolismus DNA a RNA stejně jako pro replikaci, diferenciaci a růst buněk (Stefanidou et al., 2006). Vazebná místa pro zinek jsou nezbytná pro strukturu a funkci byla nalezena u 10% ze všech bílkovin (Maret, 2013). Transport zinku v těle je regulován sítí tvořenou Zip proteiny a metallothioneiny. Jsou – li tyto mechanismy porušeny, dostupnost zinku je snížena a tím ustává i proliferace a diferenciaci v různých orgánech (Bonaventura et al., 2015). V krevním séru zvířat se zinek vyskytuje v rozmezí 0,8 – 1,2 ppm (Yatoo et al., 2013).

Zinek má vliv na celou řadu aspektů imunitního systému od bariér na povrchu kůže, až po genovou regulaci lymfocytů, aktivita získané i vrozené imunity je modulována zinkem (García et al., 2015). Nedostatek zinku tak může vést k snížení rezistence a zvýšení náchylnosti k onemocněním. Obzvláště rovnováha mezi různými podskupinami pomocných Th - lymfocytů je citlivá na hladinu zinku. Zatímco akutní nedostatek zinku způsobuje snížení imunity, chronický nedostatek vede k produkci zánětlivých interleukinů, které negativně ovlivňují průběh řady onemocnění (Bonaventura et al., 2015). Spolu s mědí je zinek esenciálním prvkem pro dismutázu a ceruloplasmin, což jsou enzymy nezbytné pro imunitní systém (Hussein and Staufenbiel, 2012). Zvýšené riziko nedostatku zinku nastává v průběhu bakteriálních, virových, nebo parazitárních onemocnění. Například u krav klesá koncentrace zinku v krevní plazmě v akutní fázi imunitní reakce (Kuschner et al., 1982).

Jako součást metalloenzymů je zinek zapojen do oxidačně redukčních procesů v těle. Zinek je součástí superoxid dismutáz (SOD), které neutralizují superoxidové radikály (Markesberry et al. (2001). Prasad et al. (2008) zaznamenali snížení koncentrace markerů oxidativního stresu a tvorby zánětlivých cytokinů po suplementaci zinkem.

V případě nedostatku zinku je například u zvířat zvýšené riziko vzniku průjmů, mastitid, zánětu dělohy, a mohou se objevovat problémy s lokomocí (Enjalbert et al., 2006). Zkrmování organického zinku může u zemědělských zvířat zlepšit odolnost vůči patogenům způsobujícím mastitidu, protože pomáhá udržovat kožní integritu a obložení stěn mléčného kanálu keratinem. Pomáhá také udržovat strukturu kopyt (Tomlinson et al., 2008).

Známý je též hepatoprotektivní účinek zinku. Ten je způsoben několika faktory: zinek stabilizuje membrány a inhibuje oxidaci lipidů, indukuje tvorbu metalothioneinů a usnadňuje proteosyntézu v játrech (Tian et al., 2014). Játra jsou dále chráněna proti oxidativnímu stresu (Oteiza, 2012). V minulosti byla některá onemocnění jater spojována s nedostatkem zinku. Například vznik cirhozy jater je často doprovázen malnutricí a deficiencí zinku (Tian et al., 2014). Zinek je významný i pro reprodukci zvířat, hraje významnou roli v regulaci progesteronu prostřednictvím superoxidových dismutáz. Zinek je zapojen do reorganizace ovariálních folikulů, které jsou následně zdrojem progesteronu. Tento proces je umožněn enzymem metalloproteinázou-2 (MMP2) ze skupiny zinkových endopeptidáz.

Pozitivní korelace byla zjištěna mezi koncentracemi progesteronu a zinku v krevním séru krav. Nedostatek zinku bývá spojován se sníženou fertilitou, abnormalitami v estrálním cyklu a potraty (O'Donoghue, 2002). Podílí se i na sekreci a funkci testosteronu prostřednictvím kontroly kaskády arachidonové kyseliny (Chanmugam et al., 1984), čímž ovlivňuje spermiogenezi. V neposlední řadě je esenciálním prvkem pro sekreci thyroidních hormonů. Pro funkci hormonu štítné žlázy T3 (trijodthronin) je nezbytná vazba se zinkem, aby bylo dosaženo biologicky funkční konformace. Nedostatek zinku se tak může projevat sníženou funkčností hormonu T3 (O'Donoghue et al., 2002). Zinek hraje roli v syntéze ukládání a sekreci inzulinu. Pravděpodobně má také příznivý vliv při cukrovce. Potomstvo samic potkana, kterým byl podáván zinek vykazovalo po vyvolání diabetes aloxanem (derivát pyrimidinu, schopný selektivní likvidace buněk tvořících inzulin) nižší hladinu glukózy a vyšší hladinu inzulinu při stejné hmotnosti (Yaghmaei et al., 2013).

3.3.1. Toxicita zinku

Je známo, že zinek plní řadu důležitých biologických funkcí. Na druhou stranu zvýšený příjem zinku například v léčivech a doplňcích stravy může mít za následek chronickou otravu zinkem. Vysoký podíl zinku v dietě může způsobit nedostatek mědi a zasahuje také do metabolismu železa a vápníku. Například autoři Porter et al. (1977) zaznamenali případy deficiencie mědi, jako důsledek použití zinkových suplementů při léčbě některých onemocnění.

Nedostatek mědi (při denní dávce zinku 150 mg) byl charakterizován klasickými příznaky jako jsou anémie, leukopenie (pokles leukocytů v krvi) a neutropenie (pokles neutrofilních leukocytů). Tyto příznaky odezněly po ukončení suplementace. Naopak Hoffman et al. (1988) pozorovali přetrvávající příznaky i po vyřazení zinku z diety. Tyto příznaky odezněly až po intravenózní aplikaci chloridu měďnatého. Eliminace přebytečného množství zinku je pravděpodobně zdlouhavá a po dobu přítomnosti v gastrointestinálním traktu blokuje absorpci mědi. Zinek navíc silně indukuje syntézu metalothioneinů (nízkomolekulární protein s vysokou afinitou k iontům těžkých kovů). Vazebná afinita metalothioneinů k mědi je mnohem vyšší, než k zinku a měď tak může být zachycena již ve sliznici tenkého střeva metalothioneiny, čímž je znemožněno její další využití (Fosmire et al., 1990).

Například u potkanů, kterým byl podáván zinek v nadměrných dávkách byla zaznamenána také prokazatelně snížená produkce slin a změny v poměru iontů sodíku, vápníku a draslíku v krevním séru (Mizary et al., 2012). Vysoká hladina zinku je dále spojována také se změnami v imunitní odpovědi a zvýšením hladiny cholesterolu v krevním séru. V důsledku podávání 300mg zinku denně po dobu šesti týdnů došlo u jedenácti dobrovolníků ke zhoršení schopnosti stimulace lymfocytů, chemotaxe a fagocytozy. Také došlo ke zvýšení hladiny nízkodenzitního lipoproteinu (LDL), který je zodpovědný za transport cholesterolu k buňkám, zatímco hladina vysokodenzitního lipoproteinu (HDL), zajišťujícího transport přebytečného cholesterolu do jater v krvi naopak poklesla (Chandra et al., 1988).

Případy akutní otravy zinkem jsou méně časté. Většina záznamů akutní toxicity zinku byla získána jako důsledek otravy jídlem. Symptomy akutní otravy jsou: nevolnost, zvracení, bolesti břicha, křeče a průjem. Projev akutní otravy zinkem je ovlivněn také formou, v jaké je zinek přijímán (Fosmire et al., 1990).

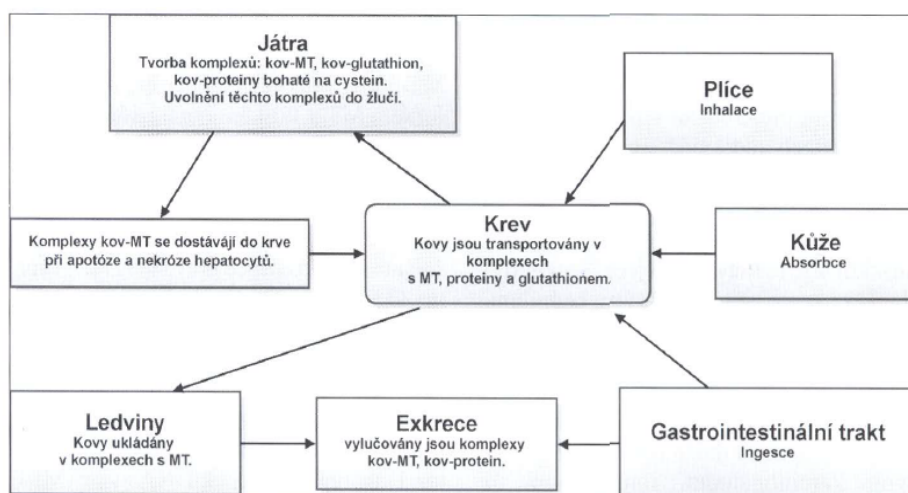
3.4. Transport kovů v těle (metallothioneiny)

Homeostáza zinku a ostatních kovů je udržována prostřednictvím bílkovin zapojených do vychytávání, exkrece a transportu. Mezi tyto proteiny patří metallothioneiny (MT) a transmembránové transportéry. Například přenos zinku skrze plazmatickou membránu a mezi buněčnými kompartmenty je realizován pomocí bílkovin ze skupiny ZIP a ZnT. ZIP transportéry přenášejí ionty kovu do cytosolu buňky, zatímco ZnT zajišťují jejich export z buňky (Maret, 2013).

Metallothioneiny náleží do skupiny nízkomolekulárních bílkovin, bohatých na cystein. Právě vysoký obsah cysteinu (okolo 30%) způsobuje jejich vysokou afinitu ke kovům. Zejména ke zinku, rtuti, kadmiu a mědi (Raudenská a kol., 2012). Podle primární struktury se dělí do dvou tříd, přičemž u savců se vyskytují MT-1 (metallothioneiny první třídy). Ty jsou dále řazeny do čtyř podskupin 1 – 4. Jejich funkcí je chelatace, detoxikace škodlivých kovů a udržování homeostázy kovů esenciálních. Bylo prokázáno, že například kadmium a olovo vázané na MT jsou pro tělo méně toxické, než ve volném stavu (Chan et al., 1993). Kromě přítomnosti kovů může být syntéza metallothioneinů indukována také hormony, cytokiny a některými interferony (Kita et al., 2006).

Tyto látky slouží, jako enchancery (zesilovače) transkripce MT. Za normálních okolností je transkripční faktor MTF-1 inhibován navázaným MTI (metallothionein transcription inhibitors). Po vstupu iontu kovu do buňky se tento iont váže na MTI a uvolňuje tak transkripční faktor MTF-1, který může zahájit transkripci. Kromě tvorby metallothioneinů indukuje MTF-1 také transkripci genů zapojených do regenerace glutathionu, antioxidantu schopného vázat kadmium. U eukariotních organismů je MTF-1 také jediným známým senzorem pro ionty zinku, přičemž řídí expresi zinek dependentních genů (Maret, 2012). Zvýšená tvorba metallothioneinů byla pozorována mimo jiné při hladovění a psychickém stresu (Tian et al., 2014).

Obrázek č.1: základní metabolismus těžkých kovů



Převzato z: (Raudenská a kol., 2012)

3.5. Akumulace kovů v ledvinách

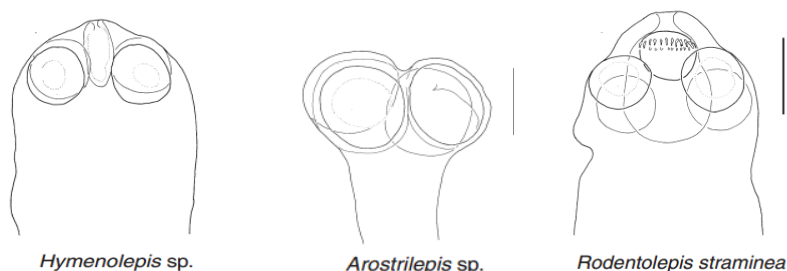
Ledviny hrají důležitou roli v regulaci homeostázy organismu. Eliminují toxické látky a odpadní produkty metabolismu, regulují poměr elektrolytů, zabezpečují acidobazickou rovnováhu, krevní tlak a produkují důležité hormony, jako je například erythropoetin a enzymy, jako je například renin. U terestrických savců jsou ledviny známy, jako jeden z hlavních orgánů, ve kterých se akumulují kovy (Sures et al., 2002). Ledviny obsahují v porovnání s ostatními orgány vyšší koncentrace stopových prvků esenciálních, jako jsou kobalt, zinek, nebo selen, ale také toxických, jako jsou například olovo, nebo kadmium (Gélinas et al., 1992).

Při vysoké dávce v potravě ionty kovů indukují tvorbu metalothioneinů a jsou tak snadno poutány a transportovány do ledvin. Například kadmium může být vázáno v ledvinách i při velmi nízkých dávkách. Dieta potkanů, kterou použili autoři Shimamura et al. (2013) obsahovala 0,10 g kadmia na gram, přičemž v ledvinách bylo nalezeno 0,03 g/g, což byla největší koncentrace ze všech osmnácti zkoumaných orgánů. I při podání takto nízkých dávek se tělo potkana bránilo zachytáváním a akumulací v ledvinách. Při chronické zátěži kadmíem je kadmium ukládáno do buněk epitelu proximálního tubulu, což vede k dysfunkcím charakterizovaným polyurií a proteinurií (Prozialeck et al., 2015). Někteří autoři, například Weaver et al., (2011) uvádějí také alterace ve funkci glomerulů způsobené poškozením tkáně kadmíem. Pro sledování účinku kadmia na ledviny považují Prozialeck et al. (2015) za optimální subkutánní aplikaci nízkých dávek kadmia v rozmezí 0,3 – 1,2 mg/kg po dobu 3 – 12 týdnů. Při tomto způsobu aplikace je u potkanů pozorováno srovnatelné schéma distribuce kadmia, jako při chronickém perorálním příjmu.

3.6. Tasemnice čeledi Hymenolepididae

Tasemnice čeledi Hymenolepididae jsou kosmopolitně rozšířené střevní parazité, jejichž přítomnost byla popsána u různých druhů savců a ptáků. V posledních letech došlo k četným změnám v taxonomii těchto tasemnic a ke vzniku nových rodů na základě morfologických znaků (obr.2) Například pro tasemnici *Hymenolepis horrida* a ostatní druhy od tasemnic rodu *Hymenolepis* lišící se úplnou absencí rostella byl založen rod *Arostrilepis*. Monofyletismus tohoto rodu následně potvrdili autoři (Haukisalmiet al., 2010a) pomocí analýzy rDNA.

Obrázek č.2: Tasemnice čeledi Hymenolepididae.



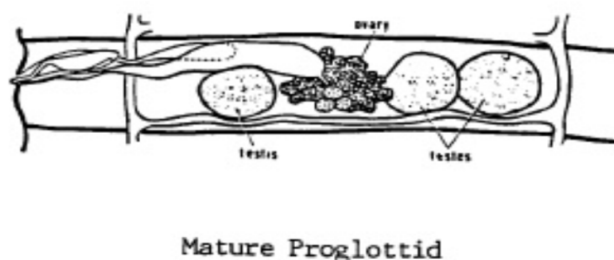
Převzato z: (Haukisalmiet al., 2010a)

Tasemnice čeledi Hymenolepididae, jejichž skolex je opatřen háčky byly přeřazeny do rodu *Rodentolepis*. Monofyletismus rodu *Rodentolepis* ale nebyl prokázán, neboť sem byly zařazeny také druhy rodu *Stafylocystis* a *Vampirolepis* (Haukisalmi et al., 2010a).

3.6.1. Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)

Přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) byla v minulosti popsána u více než osmdesáti druhů hlodavců na celém světě, avšak jak ukazují molekulární analýzy RNA z poslední doby, jedná se pravděpodobně o větší množství morfologicky velmi podobných druhů. Typickým znakem pro tasemnici krysí je přítomnost rudimentálního rostella a naopak absence háčků (Czaplinsky and Vaucher, 1994).

Obrázek č.2: zralý článek (proglitida) tasemnice krysí.



Osmoregulační kanály jsou v jednotlivých proglotidách propojeny příčnými anastomózami. Varlata tvoří jednu řadu a děloha je váčkovitá (obr.3). Vajíčka jsou opatřena silným vnějším pláštěm (Mas-Coma and Tenora, 1997) Vývoj je podobně jako u většiny tasemnic nepřímý, vajíčka musí být pozřena členovcem, v němž probíhá vývin do stadia infekceschopného cysticerkoidu. Ve finálním hostiteli se dospělí jedinci nachází v tenkém střevě. Jednotlivé proglitidy jsou v průběhu života tasemnice od posteriorní části strobily konstantně odlučovány (Sures, 2004). Schopnost tasemnice krysí infikovat člověka je nízká. Přesto však byly zjištěny případy nákazy touto tasemnicí u dětí v zejména v rozvojových zemích (Watve and Dardy, 2008) a vzácně také u dospělých osob se sníženou imunitou (el – Shazly et al., 2006). Podle autorů Hernandez et al., (2012) mohlo v některých dřívějších záznamech dojít k záměně za příbuzný druh, tasemnici dětskou (*Hymenolepis nana*).

3.6.2. Imunitní reakce na tasemnici krysí

Imunitní reakce hostitele na tasemnici krysí je vyvolána při setkání antigenů parazita s dendritickými buňkami střevního epitelu hostitele (Lopes et al., 2015). Při napadení tasemnicí krysí u myší převládá imunitní reakce typu TH2, pro kterou je typická dominantní produkce interleukinů IL-4, IL-5 a IL-14 stimulujících růst a diferenciaci B-lymfocytů (Hernandez et al., 2012). Současně dochází k hyperplazii pohárkových buněk a zvýšené produkci mucinozního hlenu. Zatímco u myší dojde v průběhu 9 – 14 dní k vyloučení parazita, u potkanů způsobuje tasemnice krysí chronické onemocnění. Spektrum zúčastněných komponentů imunitního systému je u obou hostitelských druhů podobné s tím, že u potkanů se projevuje v menší míře (McKay et al. 2010).

3.7. Akumulace kovů parazitickými helminty

Nedávné výzkumy potvrdily, že gastrointestinální helminti absorbují těžké kovy ze střev svých hostitelů. Zejména vrtějši (*Acantocephala*) a tasemnice (*Cestoda*) parazitující u ryb. U zástupců těchto skupin byly zjištěny koncentrace kovů, přesahující koncentrace u běžných volně žijících sentinelových organismů, jako je například slávička jedlá (*Dreissena polymorpha*). Zároveň byly tyto koncentrace několikanásobně vyšší, než ve tkáních hostitelů. Fenomén akumulace kovů parazity byl v minulosti častěji popsán u vodních organismů, například autoři Tenora et al. (2000) zjistili koncentraci olova, chromu a kadmia ve tkáni plerocerkoidu řemenatky ptačí (*Ligula intestinalis*) 15,6x a 2,6x vyšší, než ve svalovině hostitelské ryby. V terestrickém prostředí byl tento jev pozorován například autory Jankovská et al. (2010) u tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*), která ve svém těle též akumulovala několikanásobně vyšší množství olova, než její hostitel ovce domácí (*Ovis aries*). Prvky, jako je kadmium, selen, nebo olovo nejsou v tasemnici distribuovány rovnoměrně. Největší množství kovu bývá u tasemnic uloženo v gravidních článcích strobily (Sures et al., 2003).

3.7.1. Využití helmintů v bioindikaci zatížení prostředí

Přítomnost parazita může na jednu stranu překážet při použití bioindikačních metod, neboť ovlivňuje fyziologii a chování hostitele, což může vést k chybné indikaci znečištění prostředí. Na druhou stranu naopak sami parazité mohou být použiti, jako indikátory znečištění a míry akumulace toxických látek (Sures, 2004). U suchozemských organismů bylo třeba najít vhodné sentinelové organismy, zejména v oblastech lidského osídlení. Cílem pozorování se v tomto ohledu staly hlístice (Nematoda) a vrtějši (Acantocephala) parazitující u suchozemských živočichů. Zatímco škrkavky se ukázaly, jako nevyhovující (například ve škrkavce *Ascaris suum* parazitující u prasat zjistil Greichus, (1980) pouze poloviční množství olova, než v játrech hostitele), u vrtějšů byl zaznamenán úspěch. Ve tkáni druhů parazitujících u potkanů a prasat (*Moniliformis moniliformis*) byla změřena až stokrát vyšší koncentrace některých těžkých kovů, než v ostatních tkáních hostitele (Scheef et al., 2000). Vrtějši však nejsou u savců zdaleka tak častými parazity, jako u ryb (Sures et al., 2002) Jako model vhodný pro bioindikaci znečištění těžkými kovy v terestrickém prostředí, konkrétně v urbanistických oblastech navrhli autoři Tores, et al., (2006) myšiči křovinnou (*Apodemus sylvaticus*) a jejího parazita, tasemnici *Skrjabinoteania lobatta* z čeledi Catenotaenidae, v jejíž tkáni nalezl 8,5 krát vyšší koncentraci olova, než v ledvinách hostitele. Schopnost bioakumulace vyššího množství kovu oproti hostiteli ale není jediným kritériem pro posouzení, zda je parazit vhodný pro indikaci zatížení prostředí. Jak popisuje Sures (2004), ideální sentinelový organismus musí splňovat určité požadavky. Schopnost splnit tyto požadavky se u tasemnic může lišit v závislosti na druhu tasemnice a jejího hostitele. Například v práci autorů Jankovská et al., (2010b) tasemnice rodu *Mesocestoides* parazitující u lišek obecných (*Vulpes vulpes*) některá tato kritéria splňovala (vysoký bioakumulační potenciál, známý homorange, hojné rozšíření), zatímco jiná nikoliv (neznámá korelace mezi koncentrací polutantu v tasemnici a v prostředí, nedostatečná velikost pro analýzu, málo poznatků o fyziologii parazita). Dalšími požadavky jsou snadný sběr a identifikace, což tasemnice ve většině případech splňují a snadné určení věku. Přestože jsou tasemnice obecně známy, jako dlouhověké, exaktní určení přesného věku je poměrně obtížné. Pro správné měření koncentrací kovu je třeba provádět standardizovaný odběr vzorků. tzn. používat tasemnice přibližně stejné délky a stáří, jak navrhli autoři Sures et al. (2003).

3.7.2. Model *Hymenolepis diminuta/Rattus norvegicus*

Skupinou parazitů často se vyskytujících u hlodavců a to i v městské zástavbě jsou tasemnice rodu *Hymenolepis*. Cílem studie provedené autory (Sures et al. 2002) bylo určit akumulární kapacitu olova u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Po experimentální infekci potkanů cysticerkoidem tasemnice krysí jim bylo orálně podáváno olovo, načež byla ve tkáních potkanů a v tasemnici analyzována koncentrace olova pomocí elektrotermální atomové absorpční spektrometrie. Koncentrace olova v tasemnici byla u infikovaných potkanů prokazatelně vyšší, než v ledvinách a to přibližně sedmáctkrát. Možnost využití modelu *H. diminuta/ Rattus norvegicus* mimo laboratorní podmínky byla následně potvrzena během studie prováděné poblíž Káhiry, kde koncentrace olova v tasemnici byla jedenáctkrát vyšší, než v ledvinách hostitele (Sures, 2003). Jelikož je potkan spolu se svým parazitem, tasemnicí krysí rozšířen téměř ve všech typech terestrického prostředí, zejména v městských aglomeracích, považují jej autoři Sures et al., 2002 za významný pro bioindikaci znečištění prostředí těžkými kovy.

3. 4. 2. Vliv tasemnice na zatížení hostitele těžkými kovy

Povrch těla tasemnice je tvořen metabolicky aktivním tegumentem. Ten svojí funkcí odpovídá kartáčovitému povrchu střevní sliznice obratlovců, se kterou soupeří o živiny, přičemž absorbuje i ionty těžkých kovů (Dalton et al., 2004). Řada studií vlivu parazita na zátěž kovy vycházela z předpokladu, že pokud je hostitelský organismus vystaven kontaminaci těžkým kovem, přičemž je podstatná část přijatého kovu absorbována parazitem, může hostitel vstřebat jen omezené množství kovu a koncentrace v jeho tkáních pak bude nižší. Například Sures and Sidall, (1999) uvádějí nižší koncentraci olova ve střevech jelců infikovaných vrtějšem *Pomphorhynchus laevi*, než u kontrolní skupiny bez parazita. Podobné výsledky byly pozorovány také v případě infekce některými tasemnicemi. Přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) ve střevech potkanů vystavených zátěži olovem měla za následek nižší koncentraci olova v ledvinách (Sures et al., 2002).

Taktéž při porovnání koncentrací olova ve tkáních ovcí zatížených olovem a zároveň infikovaných tasemnicí ovčí (*Moniezia expansa*) se skupinou ovcí bez tasemnice bylo patrné, že přítomnost parazita redukuje množství olova v játrech, krvi a ledvinách (Jankovská et al., 2010a). Některé další studie však přinesly opačné výsledky. Například infekce vrtějšem krysím (*Moniliformis moniliformis*) nemá prokazatelný vliv na koncentraci olova ve tkáni hostitele, ani přes vysokou bioakumulační kapacitu tohoto parazita (Scheef et al., 2000). Rovněž v případě rtuti nebyla prokázána akumulace vrtějšem ve střevě hostitele, okouna říčního (*Perca fluviatilis*), naopak olovo tento parazit akumuloval ve větší míře, než jeho hostitel (Jankovská et al., 2011; 2014). Jindy byly získány rozporuplné výsledky. Například lišky z oblastí kontaminovaných těžkými kovy, infikované tasemnicí rodu *Mesocostoides* sice vykazovaly oproti neinfikovaným jedincům sníženou koncentraci olova v ledvinách, ale zároveň vyšší koncentraci v játrech (Jankovská, 2010b).

V některých případech byl popsán i čistě negativní vliv tasemnic na regulaci vstřebávání těžkých kovů. Okoth et al. (2012) pozorovali vyšší koncentraci kadmia v orgánech ryb z čeledi kaprovitých (Cyprinidae) *Rastrineobola argenta* infikovaných tasemnicí řemenatkou ptačí (*Ligula intestinalis*). K tomuto zvýšení podle autora došlo v důsledku poškození fyziologických mechanismů regulujících příjem kovů. Těžké kovy jsou v těle izolovány pomocí metalothioneinů, jak bylo popsáno výše. Tasemnice přijímají množství proteinů, tuků a mnoha dalších látek ze zažívacího traktu, které jsou důležité pro tvorbu metalothioneinů, což může způsobit jejich sníženou exkreci a následně sníženou účinnost detoxikace (Frank et al., 2011).

Čadková et al. (2013) použili upravený experiment provedený dříve autory Sures et al. (2002), aby zjistili, zda má infekce tasemnicí krysí skutečně vliv na koncentraci olova ve tkáních potkana. Ve shodě s předešlými studiemi byla ve tkáni tasemnice zaznamenána až trojnásobně vyšší koncentrace olova, než v ledvinách, což potvrdilo tasemnice rodu *Hymenolepis*, jako vhodné bioindikátory zatížení prostředí olovem. Výsledky studie nepodporovaly předpoklad, že by přítomnost gastrointestinálních parazitů byla schopna zabránit absorpci pozřených těžkých kovů, neboť v některých orgánech infikovaných jedinců byla větší koncentrace olova, než u jedinců bez tasemnice. Ledviny a kost byly jedinými orgány, ve kterých byla konečná koncentrace olova nižší u infikovaných zvířat, než u těch bez tasemnice během podání malých i zvýšených dávek.

Jelikož zvýšená koncentrace olova ve tkáni parazita nebyla prokazatelně spojena se snížením koncentrace v hostitelských tkáních, předpokládají autoři studie, že tasemnice přijímají spíše olovo vázané na žluč, které bylo nejprve vstřebáno hostitelem a až následně vyloučeno jaterním cyklem do duodena. Olovnaté ionty jsou schopny projít z hostitelova gastrointestinálního traktu přes epitelovou membránu paracelulárním transportem do krve, kde se váží na membránu erytrocytů a jsou tak roznášeny k různým orgánům. Portálním oběhem se dostávají do jater, kde jich je většina odstraněna z krve a se žlučí se dostává do střev. Žluč obsahuje steroidy, se které společně s ionty olova tvoří komplexy. V této podobě mohou být olovnaté ionty přijímány tasemnicí (Sures and Sidall, 1999).

3. 5. Rostlinné hyperakumulátory

Reakce rostlin na kontaminaci půdy kovy se je různá. U některých druhů rostlin může dojít k zastavení růstu. Naopak jiné rostliny kontaminaci přežívají, přičemž dochází k akumulaci. Akumulace kovu v horních částech rostliny byla popsána jako jedna ze strategií proti vysokým dávkám kovů v prostředí (Baker, 1981) a je definována, jako schopnost rostliny koncentrovat ve svém těle vyšší koncentraci kovu, než je v půdě, na které roste. (Baker et al., 1989). Hyperakumulátory jsou ve svých nadzemních částech schopny akumulovat výjimečně vysoké koncentrace kovů oproti neakumulujícím rostlinám ze stejného prostředí. U terestrických rostlin není hyperakumulace častým jevem.

Jako hyperakumulátory zinku jsou definovány rostlinné druhy, které obsahují více než 10000 $\mu\text{g Zn/g}$ sušiny, zatímco jako hyperakumulátory kadmia jsou označovány rostliny schopné koncentrovat množství vyšší, než 100 $\mu\text{g Cd/g}$ v sušině. Oproti rostlinám ze stejného prostředí obsahují přibližně desetkrát vyšší koncentrace těchto kovů (Bert et al., 2002). Přibližně 500 rostlinných taxonů je schopno akumulovat vysoké koncentrace potenciálně toxických kovů a 20 z nich jsou hyperakumulátory zinku (Schanmugam et al., 2013). Většinou se jedná o endemické druhy pro půdy bohaté na kovy, ale mohou se vyskytovat také na půdách, kontaminovaných lidskou činností. V minulosti se hyperakumulační rostliny staly předmětem zájmu díky jejich potenciálnímu využití pro fytoremediaci (Bert et al., 2002).

1.5.1. Huseníček Hallerův (*Arabidopsis Halleri*)

Řada hyperakumulujících rostlin byla popsána v čeledi brukvovitých (Brassicaceae). Do této čeledi patří i huseníček Hallerův (*Arabidopsis halleri*). Tento druh je dobře znám pro svou toleranci vůči kovům a často jej lze nalézt na lokalitách kontaminovaných zinkem a kadmíem (Bert et al., 2000). Při hydroponickém experimentu huseníček Hallerův vykazoval koncentraci zinku od 300 µg/g (v sušině) až do 32000 µg/g, aniž by trpěl fyto toxicitou (Zhao et al., 2000). Huseníček Hallerův je schopen hyperakumulace kadmia, a to jak na kontaminovaných půdách, tak při hydroponických experimentech (Küper et al., 2000). Jedná se o druh blízký příbuzný huseníčku rolnímu (*Arabidopsis thaliana*) u kterého sice nebyla popsána schopnost hyperakumulace, ale jehož genom byl v minulosti důkladně osekvenován. Jelikož mezi oběma druhy existuje 94% shoda nukleotidů, mohli tak přispět k poznání mechanismů hyperakumulace. Řada komparativních studií transkriptomů huseníčku Hallerova pomohla identifikovat geny zapojené při procesu hyperakumulace zinku (Talke et al., 2006).

Hyperakumulátory využívají různé mechanismy, jako je například efektivní absorpce, ukládání v xylému (dřevní cévní svazek) a zvýšená detoxikace v nadzemních částech rostliny (Kramer, 2010). To je umožněno efektivními transportními mechanismy pro transport z kořenů do vyšších částí rostliny (Kramer, 2010). Na tomto transportu se podílejí zejména ATPázové HMA transportéry. Tyto transportéry jsou v huseníčku Hallerově přítomny ve vysoké koncentraci. Jakmile je zinek účinně transportován do tkáně nadzemní části rostliny, je pomocí tonoplastových transportérů přenesen do vakuol.

Transportní látky v huseníčku rolním oproti tomu jednak nejsou schopny účinně přenášet zinek do nadzemních částí a navíc nadměrné množství zinku způsobí snížený příjem železa vlivem kompetice obou kovů o vazebná místa. Snížená koncentrace železa vyvolává syntézu transportérů IRT1 a IRT2, které zároveň přenášejí další zinek, čímž dojde k přetížení detoxikačního systému a úhynu rostliny (Schanmugam et al., 2013).

U huseníčku Hallerova je zinek do kořenů přenášen především ZIP transportéry regulovanými pouze koncentrací zinku, díky čemuž nedochází k narušení exprese Fe - ZIP transportérů (Schanmugam et al., 2011). Naopak byla u Huseníčku Hallerova pozorována zvýšená exprese ZIP transportérů, jako je například IRT3, které hrají důležitou roli v příjmu a transportu železa (Schanmugam et al., 2013).

Výskyt huseníčku Hallerova není omezen pouze na kontaminované půdy. Schopnosti hyperakumulace u populací z nekontaminovaných oblastí byly v minulosti předmětem výzkumu. Jak uvádějí autoři Bert et al. (2002) , populace z nekontaminovaných oblastí mají stejnou schopnost hyperakumulace zinku a kadmia, jako populace z kontaminovaných půd. Naopak žádná populace této rostliny z nekontaminovaných půd nebyla schopna hyperakumulovat olovo. Co se týče míry hyperakumulace zinku, ta je u zinku pro všechny populace stejná, zatímco u kadmia byla pozorována variabilita. U pěti z dvaceti populací huseníčku Hallerova z nekontaminovaných oblastí byla zjištěna hraniční koncentrace kadmia (více než 100 $\mu\text{g/g}$). Z dvaceti populací huseníčku z kontaminovaných oblastí tohoto limitu dosáhly pouze dvě.

4 Materiál a metody

4. 1. Potkani

V pokusu bylo použito celkem 24 jedinců laboratorního potkana (*Rattus norvegicus* var *alba*) kmene Wistar. Počáteční hmotnost potkanů byla $150 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$. Tito potkani byli získáni komerčního chovu Fyziologického ústavu AV ČR v Praze. Chov potkanů probíhal po dobu experimentu v prostorách Pokusné stáje FAPPZ (Praha-Suchdol). U všech potkanů byla pomocí koprologického vyšetření ověřena nepřítomnost intestinálních helmintů. Chov probíhal při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a při vlhkosti $75 \% \pm 5 \%$. Světelný režim byl nastaven na dvanáct hodin světla a dvanáct hodin tmy. Potkani byli krmeni standardní směsí pro hlodavce ST-1 dodávanou společností Velaz s.r.o., a s přístupem k vodě *ad libitum*. Potkani byli rozděleni do čtyř skupiny (tab1) a následně umístěni ve standardních boxech typu E4 (1730 cm^2). Takto byly všechny čtyři skupiny chovány po dobu tří týdnů, pro aklimatizaci potkanů a pro vývin tasemnic v infikovaných jedincích.

Tabulka č 1.: desing experimentu.

Skupina	n potkanů	Zn/týden (mg)	Cd/týden (mg)	<i>H.diminuta</i>
PT	6	235,7	3,0	+
P0	6	235,7	3,0	-
OT	6	10,5	-	+
00	6	10,5	-	-

PT=skupina potkanů krmená hyperakumulující rostlinou a zároveň infikovaná tasemnicí krysí. **P0**=skupina krmená hyperakumulátorem bez tasemnice. **OT**= kontrolní skupina bez zatížení kovy s tasemnicí. **00**=kontrolní skupina bez zatížení kovy a bez tasemnice.

4. 2 Infekce tasemnicí

Dvě skupiny laboratorních potkanů PT a OT byly infikovány tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*). Infekce potkanů proběhla pomocí cysticerkoidů získaných z laboratorně chovaných potemníků skladištních (*Tribolium confusum*) z experimentálního chovu katedry Zoologie a Rybářství, kteří byli nakaženi pozřením vajíček tasemnice krysí získaných z exkrementů již dříve infikovaných potkanů.

Vývoj cysticerkoidů probíhal 20 dní. Poté byly cysticerkoidy vypreparovány a spolu s roztokem glukózy orální cestou pomocí mikropipety vpraveni do potkanů. Každý potkan byl infikován třemi cysticerkoidy. Úspěšnost infekce byla ověřena pomocí koprologického vyšetření provedeného pět týdnů po infekci. Přítomnost parazitů byla potvrzena nálezem vajíček ve výkalech.

4. 3. Bilanční fáze

Po ověření infekce následovala bilanční fáze experimentu. Po dobu šesti týdnů byli potkani ze skupin PT a OT krmeni mletou směsí krmiva ST-1 a huseníčku Hallerova (*Arabidopsis halleri*). Výsledný týdenní příjem byl 3 mg kadmia a 235, 7 mg zinku. Potkani ze skupin OT a 00 dostávali pouze mletou krmnou směs ST-1 přičemž přijali 10,5 mg zinku týdně. Celkové množství krmiva bylo rovnoměrně rozloženo do celého týdne. Na konci každého týdne byli potkani váženi.

Tabulka č 2.: Obsah prvků v rostlině (*Arabidopsis halleri*)

prvek	Cd	Mn	Fe	Cu	Pb	Zn
mg/kg	50,4	56,3	183,7	2,4	37,2	3912,1

4. 4. Analýza kovů v orgánech a tasemnici

Po uplynutí šesti týdnů byli potkani usmrceni kombinací injekční aplikace sedativ a analgetik. Během následné pitvy byly odebrány orgány: játra, ledviny, slezina, varlata, tkáň tenkého střeva, svalovina a stehenní kost. Z tenkého střeva infikovaných jedinců byla odebrána také tasemnice. Vzorky byly ihned po odebrání zmrazeny na -20°C a následně vysušeny pomocí lyofilizace při teplotě -80°C. Lyofilizované vzorky byly dále rozemlety, naváženy a mineralizovány směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Před samotnou analýzou byly vzorky rozloženy v přístroji Ethos 1 (MLS GmbH, Leutkirch, Germany) pomocí mikrovlnně asistované digesce. Obsahy jednotlivých prvků byly analyzovány pomocí optické emisní spektrometrie (ICP OES, Agilent 720, USA). Pro stanovení nízkých koncentrací kovů byla použita také atomová absorpční spektrometrie (AAS, Varian 280FS).

4. 5. Statistika

Koncentrace Cd a Zn v orgánech jednotlivých skupin byly mezi sebou porovnávány pomocí statistických testů. Pro určení, zda hodnoty koncentrace získané z jednotlivých orgánů pocházejí z normálního rozdělení byl použit Shapiro – Wilkův test. U většiny výběrů nebyla normalita rozdělení potvrzena. Na základě toho byl pro posouzení, zda mezi jednotlivými skupinami existuje statisticky významný rozdíl použit neparametrický Mann – Whitneyův U test. na hladině významnosti ($\alpha = 0,05$). Hladina významnosti odpovídá pravděpodobnosti zamítnutí nulové hypotézy H_0 , přestože platí (chyba prvního typu). Pokud hodnota p získaná z testu byla vyšší, než 0,05, nebylo možné zamítnout H_0 a tedy platilo, že mezi koncentracemi kovu v orgánech obou testovaných skupin není statisticky významný rozdíl. Naopak pokud byla p hodnota nižší, než α , H_0 byla zamítnuta a platila H_1 , která tvrdí, že mezi skupinami existuje významný rozdíl. Dále byl stanoven korelační koeficient r mezi koncentracemi v orgánech potkanů a v tasemnici. Testy byly prováděny ve statistickém programu R i386 ,verze 3.2.0.

5 Výsledky

5.1. Kadmium

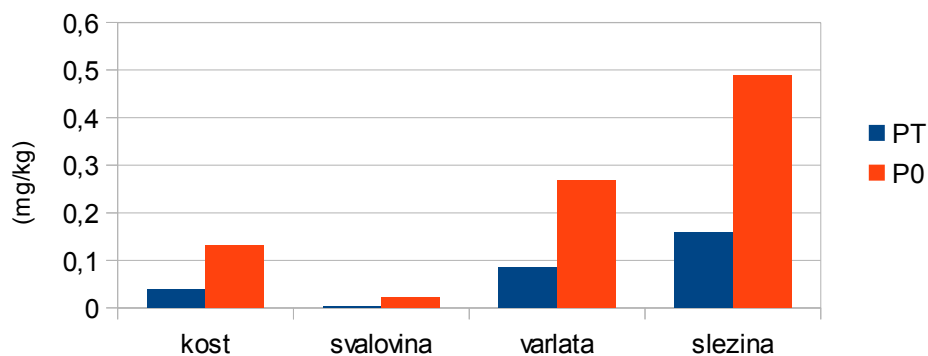
Nejvyšší průměrná koncentrace kadmia byla u potkanů ze skupiny krmené rostlinou bez tasemnice (P0) zjištěna v ledvinách. Po ledvinách následovala játra a střeva. Naopak nejnižší průměrná koncentrace byla změřena ve svalovině (tab3). Rozložení kadmia v orgánech zatížených potkanů skupiny (PT) prakticky kopírovalo schéma předchozí skupiny (graf1 a,b). U potkanů z kontrolní skupiny (00) byla největší část kadmia koncentrována v kosti a naopak nejnižší hodnota byla u této skupiny zjištěna ve varlatech. Oproti tomu potkani ze skupiny infikované tasemnicí (0T) měli nejvíce kadmia uloženo v ledvinách, následovaných slezinou a stehenní kostí. Nejnižší koncentrace kadmia byla ve skupině 0T změřena stejně jako v případě kontrolní skupiny 00 ve varlatech a svalovině (graf2).

Tabulka č. 3: Průměrná koncentrace kadmia v jednotlivých orgánech (mg/kg v sušině).

skupiny	kost	svalovina	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny	<i>H.diminuta</i>
PT	0,039	0,003	0,085	0,158	1,857	2,359	7,945	5,085
P0	0,132	0,023	0,269	0,488	3,455	5,930	23,01	N
0T	0,023	0,002	0,002	0,046	0,013	0,01	0,051	0,005
00	0,099	0,008	0,007	0,040	0,042	0,036	0,060	N

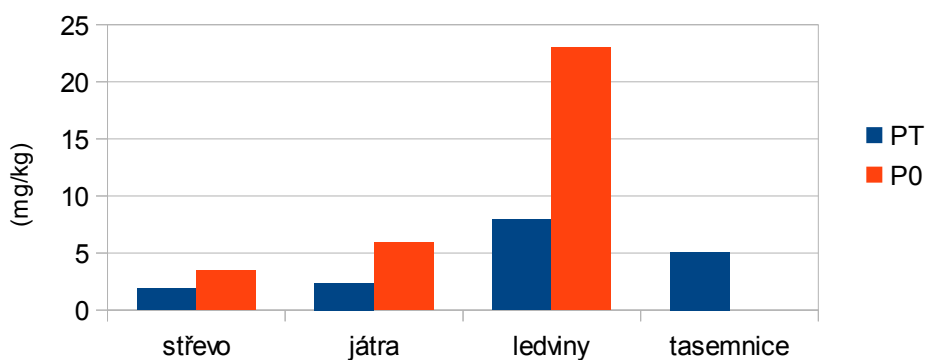
Koncentrace kadmia v orgánech potkanů krmených hyperakumulující rostlinou a zároveň infikovaných tasemnicí krysí (PT) byla oproti skupině s tasemnicí, krmené standardním krmivem (0T) prokazatelně nižší ($p < 0,05$) ve všech orgánech, kromě svaloviny ($p = 0,06$) a kosti ($p = 0,06$). Mezi potkany ze skupin P0 a 00 byl zjištěn prokazatelný rozdíl koncentrace kadmia ve všech orgánech s výjimkou kosti ($p = 0,32$). Také tasemnice obou infikovaných skupin se mezi sebou prokazatelně lišily v koncentraci akumulovaného kadmia, průměrná koncentrace ve tkáni tasemnice ze skupiny potkanů krmených zvýšenými dávkami kadmia (PT) byla více než 800x vyšší oproti skupině 0T, krmené standardním krmivem (tab3).

Skupiny zatížené kadmíem



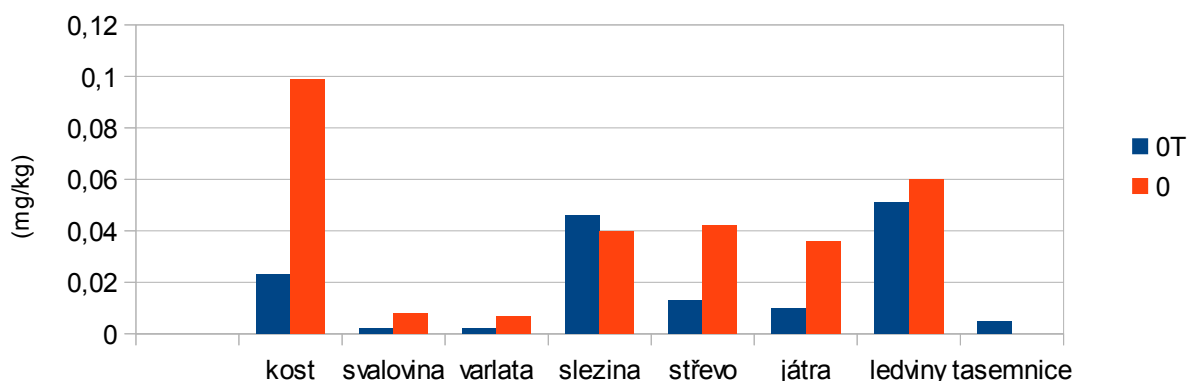
Graf č. 1a): Průměrná koncentrace kadmia v orgánech potkanů ze skupin krmených hyperakumulující rostlinou (PT, P0), ve kterých koncentrace kovu nepřesáhla 0,5mg/kg (kost – slezina).

Skupiny zatížené kadmíem



Graf č. 1b): Průměrná koncentrace kadmia v orgánech potkanů krmených hyperakumulující rostlinou (PT,P0), ve kterých byla koncentrace kadmia vyšší, než 0,5mg/kg (střevo – ledviny) a průměrná koncentrace ve tkáni tasemnice krysí (*H. Diminuta*).

Skupiny bez zatížení kadmíem



Graf č. 2): Průměrná koncentrace kadmia v orgánech potkanů krmených pouze standardní směsí ST-1 s tasemnicí a bez tasemnice (OT a O0).

S výjimkou střeva ($p=0,08$) byla koncentrace kadmia ve všech orgánech potkanů infikovaných tasemnicí krysí z pokusné skupiny (PT) prokazatelně nižší oproti neinfikovaným potkanům z pokusné skupiny (P0). Například průměrná koncentrace v ledvinách potkanů ze skupiny P0 byla téměř 2,9x vyšší, než u jedinců ze skupiny PT (graf1). Prokazatelný rozdíl mezi oběma skupinami byl potvrzen pomocí statistického testu ($p<0,001$). Naopak rozdíl mezi koncentracemi kadmia v ledvinách potkanů krmených standardním krmivem s tasemnicí a bez tasemnice (OT a O0) nebyl statisticky významný (tab4).

Tabulka č. 4. : hodnoty p, získané z Mann – Whitneyova U testu.

	kost	sval	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny	tasemnice
PT/OT	0,06	0,7	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$7,4 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
P0/O0	0,3	0,0002	$7,4 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-6}$	
PT/P0	0,0002	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-7}$	$6,8 \cdot 10^{-6}$	0,08	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$7,4 \cdot 10^{-7}$	
OT/O0	0,01	0,005	0,004	0,5	$3 \cdot 10^{-6}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$	0,5	

PT/OT a **P0/O0** značí rozdíl mezi skupinami zatíženými kadmíem a skupinami bez zátěže. **PT/P0** a **OT/O0** značí rozdíl mezi skupinami s tasemnicí a bez tasemnice. Porovnání skupin bylo provedeno pomocí Mann-Whitneyova U testu v programu r. **Zvýrazněné p - hodnoty** značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p<0,05$).

U potkanů z pokusných skupin PT a P0 byla druhým nejvíce postiženým orgánem játra. Také zde byla u potkanů s tasemnicí zjištěna prokazatelně nižší koncentrace ($p=0,01$), než u jedinců ze skupiny bez infekce tasemnicí (P0). Totéž v případě jater platilo i pro skupiny bez zatížení kadmiem OT a 00, ($p<0,01$). Mezi skupinami OT a 00 byl statisticky významný rozdíl v koncentraci kadmia zjištěn u všech zbylých orgánů ($p<0,05$) s výjimkou sleziny. Slezina byla jediným orgánem, ve kterém byla zjištěna mírně vyšší koncentrace kadmia u potkanů s tasemnicí (OT), než u potkanů bez infekce (00), avšak rozdíl mezi oběma skupinami nebyl průkazný (tab4). Ve stehenní kosti potkanů ze skupiny OT byla koncentrace kadmia 4 krát nižší, oproti kontrolní skupině, což bylo relativně nejvýraznější snížení koncentrace kovu u infikované skupiny oproti skupině bez infekce. Podrobnější srovnání koncentrací kadmia v orgánech nejvíce zatížených kadmiem (ledviny, játra střevo) zobrazují grafy 3 – 5.

Tabulka č. 5: Porovnání koncentrace kadmia v tasemnici krysí s koncentracemi v jednotlivých orgánech.

	kost	svalovina	varlata	slezina	střevo	Játra	ledviny
$BF_{(PT)}$	130	1695	60	32	2,7	2	0,6
$BF_{(OT)}$	0,2	2,5	2,5	0,1	0,4	0,5	0,09
$r_{(PT)}$	-0,3	0,1	0,3	0,08	0,3	0,3	0,3
$r_{(OT)}$	-0,2	0,3	0,4	0,01	0,03	0,1	0,3

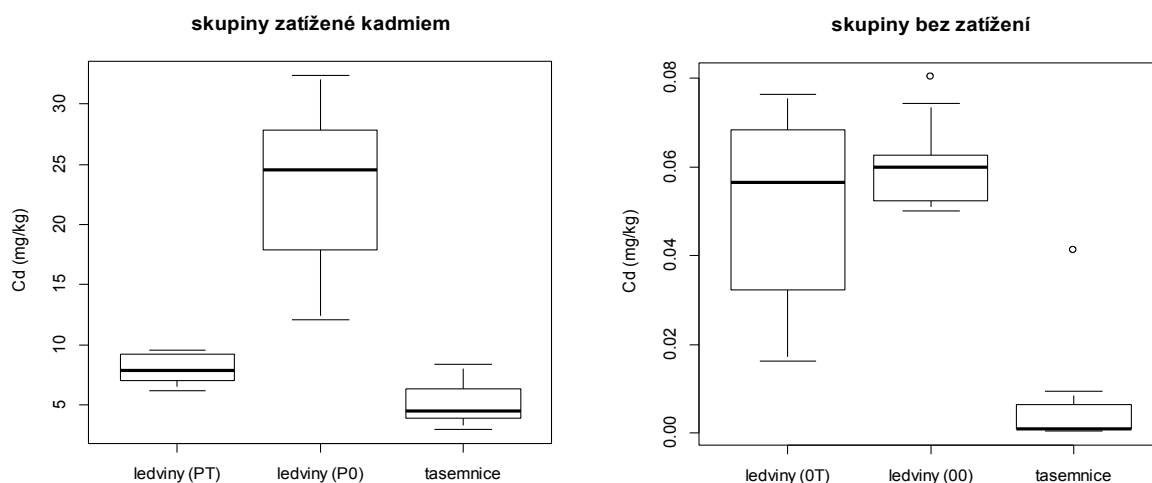
$BF_{(PT)}$, $BF_{(OT)}$ = bioakumulační faktor tasemnice v porovnání s orgány potkanů ze skupiny zatížené kadmiem (PT) a ze skupiny bez zatížení (OT). $r_{(PT)}$, $r_{(OT)}$ = korelační koeficient mezi koncentrací kadmia ve tkáni tasemnice a v jednotlivých orgánech potkanů ze zatížené skupiny (PT) a skupiny bez zatížení (OT).

Koncentrace kadmia ve tkáni tasemnice byla u potkanů skupiny PT vyšší oproti všem orgánům, kromě ledvin. Biokoncentrační faktor (BF), podle autorů Sures and Sidall et al. (1999), vyjádřený jako $(C_{\text{tasemnice}} / C_{\text{ledviny}})$ vyšel přibližně 0,64. Naopak například v porovnání se svalovou tkání potkanů (PT) byla koncentrace ve tkáni parazita 1695x vyšší (tab5). Co se týče infikované skupiny bez zatížení kadmiem (OT), zde byla vyšší koncentrace ve tkáni tasemnice oproti tkáni hostitele zjištěna pouze ve dvou orgánech hostitele, a sice ve varlatech a ve svalovině. V obou případech tasemnice akumulovala zhruba 2,5x vyšší množství kadmia. Mezi koncentracemi kadmia v tasemnici a v orgánech hostitele nebyla zjištěna významná korelace (tab5).

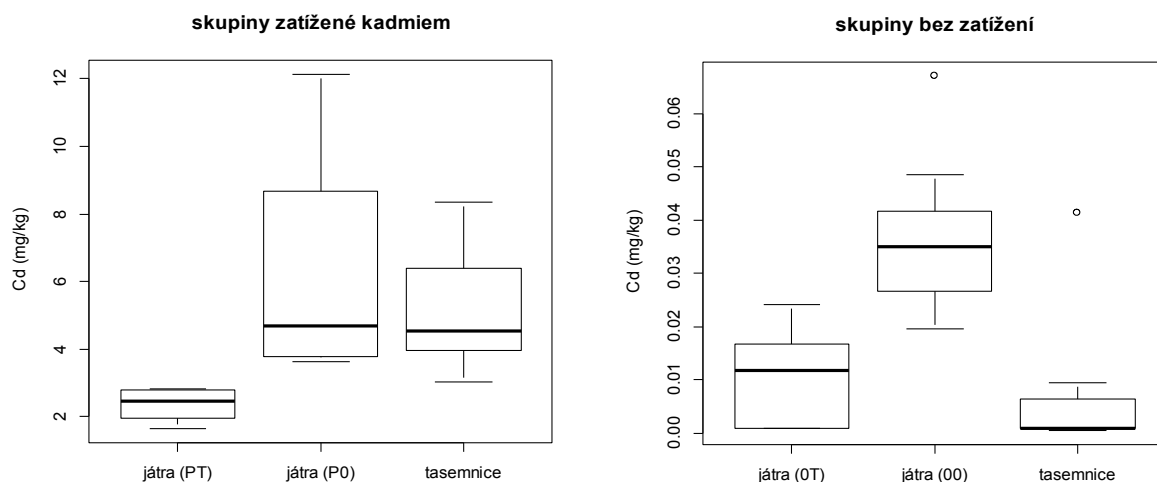
Tabulka č. 6: medián \pm směrodatná odchylka koncentrace zinku v jednotlivých orgánech (mg/kg) v sušině.

	kost	svalovina	varlat a	slezina	střevo	játra	ledviny	Tasemnic e
PT	146,7 $\pm 17,9$	35,21 $\pm 5,06$	166,8 $\pm 5,87$	87,2 $\pm 4,6$	120,5 $\pm 12,8$	110,4 $\pm 2,69$	103,0 $\pm 2,94$	183,3 $\pm 34,3$
PO	202,5 $\pm 17,2$	52,58 $\pm 20,9$	191,9 $\pm 36,1$	82,17 $\pm 9,02$	160,6 $\pm 101,1$	121,6 $\pm 45,6$	119,8 $\pm 15,2$	N
OT	156,7 $\pm 23,0$	39,03 $\pm 5,74$	167,8 $\pm 7,70$	78,05 $\pm 3,2$	59,40 $\pm 23,9$	83,4 $\pm 10,3$	76,33 $\pm 12,7$	150,8 $\pm 29,5$
00	193,2 $\pm 9,72$	43,21 $\pm 9,07$	203,8 $\pm 7,62$	79,52 $\pm 17,5$	103,2 $\pm 27,13$	111,5 $\pm 22,6$	111,4 $\pm 8,97$	N

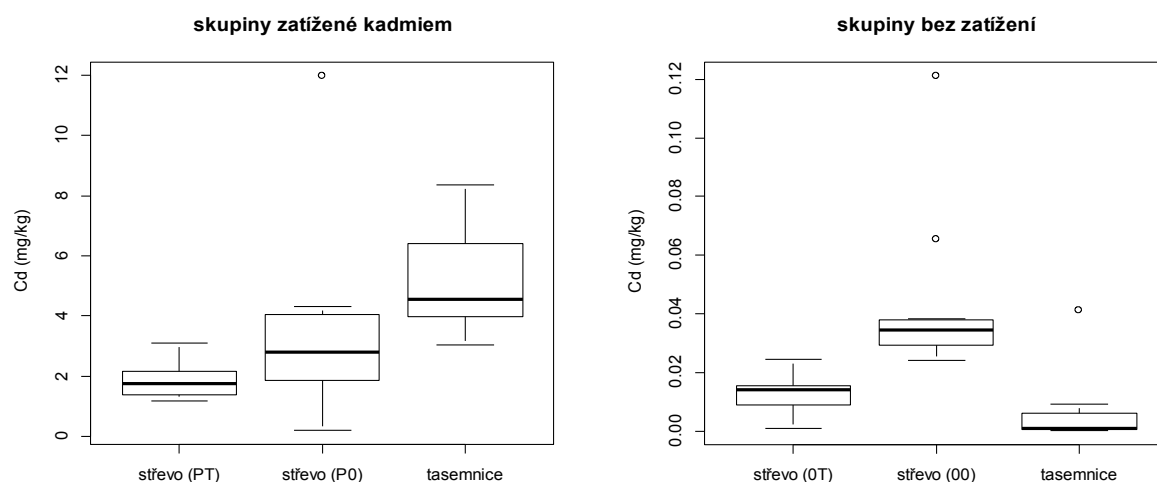
Jelikož hodnoty koncentrace Cd v orgánech jednotlivých potkanů ve většině případů nepocházely z normálního rozdělení, byl v této diplomové práci použit neparametrický Mann – Whitneyův U test. Tento test porovnává mediány dvou nezávislých výběrů.



Graf č.3 a,b: Podrobnější srovnání koncentrace kadmia v ledvinách a v tasemnici potkanů krmených hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b). Medián je v tomto grafu znázorněn silnou čarou uvnitř obdélníku. Horní a dolní hrany obdélníku označují kvartily, tzv. fousy vyjadřují variabilitu nad třetím a pod prvním kvantilem, zatímco jejich zakončení horizontální čarou naznačuje maximální a minimální hodnotu. Kolečka označují odlehle hodnoty.



Graf č.4 a,b: Srovnání koncentrace kadmia v játrech a v tasemnici potkanů krmených hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b). Játra byla u pokusných skupin (PT a P0) po ledvinách druhým nejvíce zatíženým orgánem kadmíem.



Graf č. 5 a,b: Podrobnější srovnání koncentrace kadmia ve tkáni tenkého střeva a v tasemnici u skupin krmených hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b). Rozdíl mezi skupinami PT a P0 v tomto případě nebyl prokazatelný ($p=0,08$).

5. 2. Zinek

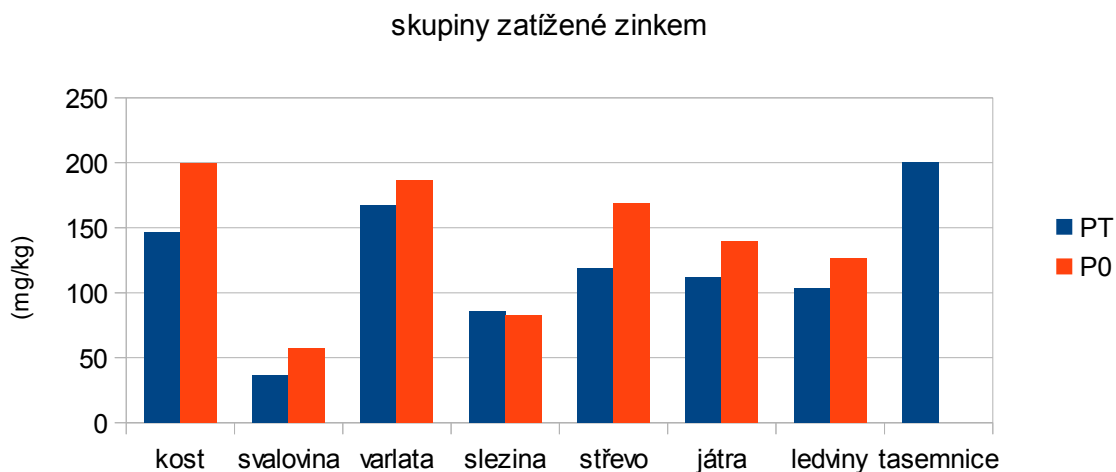
Rozložení zinku v jednotlivých orgánech se značně lišilo od toho, co bylo pozorováno u kadmia (graf6,7) Nejvyšší koncentrace zinku byla zjištěna ve varlatech a ve stehenní kosti, a to jak u skupin krmených hyperakumulující rostlinou, tak u skupin bez zatížení. Dále následovaly v různém pořadí ledviny játra a střevo. U zatížených skupin (PT a OT) bylo toto pořadí: střevo, játra, ledviny. Zatímco ve skupinách bez zatížení (OT a 00) bylo zjištěno pořadí: ledviny, játra, střevo. Nejnižší koncentrace byla v rámci všech skupin změřena opět ve svalové tkáni (tab7).

Tabulka č. 7: průměrná koncentrace zinku jednotlivých orgánech (mg/kg v sušině).

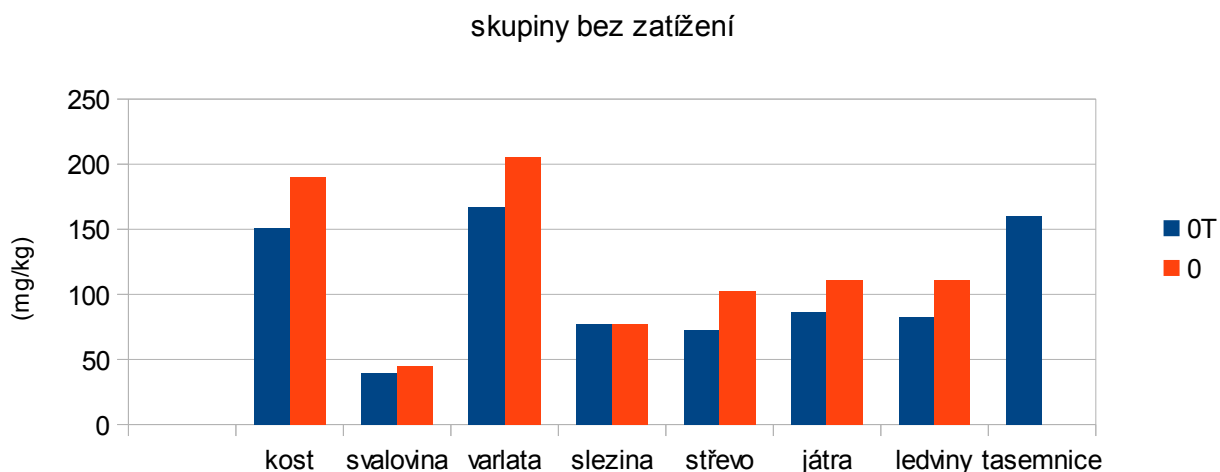
	kost	svalovina	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny	Tasemnice
<i>PT</i>	146,7	36,6	167,5	85,8	119,2	111,6	103,1	200,2
<i>PO</i>	199,4	57,2	186,8	82,9	168,9	139,3	126,5	N
<i>OT</i>	150,8	39,7	167,3	76,9	72,83	86,08	82,3	160,3
<i>00</i>	190,2	44,8	205,3	77,0	102,1	110,6	111,0	N

Játra, ledviny, střevo a slezina potkanů ze skupiny krmené hyperakumulující rostlinou (PT) obsahovaly prokazatelně vyšší koncentrace zinku oproti skupině OT, krmené standardním krmivem (tab5). Naopak co se týče kosti a svalové tkáně, rozdíl mezi oběma skupinami v případě těchto orgánů nebyl statisticky významný ($p=0,4$; $0,06$), stejně jako v případě varlat, kde se průměrná koncentrace zinku u skupin PT a OT lišila pouze o dvě desetiny miligramu ($p=0,8$).

U skupin potkanů bez infekce tasemnicí tasemnice (PO a 00) byly získány podobné výsledky. Prokazatelně vyšší koncentrace zinku byla zaznamenána v ledvinách, játrech a ve tkáni tenkého střeva potkanů krmených hyperakumulující rostlinou (PO) oproti skupině krmené standardním krmivem (00). Rozdíly mezi koncentracemi ve svalu, kosti a varlatech byly opět neprůkazné ($p=0,1$; $0,2$; $0,1$). Statisticky významný rozdíl zde nebyl zjištěn ani mezi koncentracemi zinku ve slezině ($p=0,5$). Obsah zinku v tasemnici potkanů ze skupiny PT byl prokazatelně vyšší než u potkanů bez zátěže (tab7).



Graf č.6: Průměrná koncentrace zinku v orgánech potkanů ze skupin krmených hyperakumulující rostlinou (PT, P0).



Graf č.7: Průměrná koncentrace zinku v orgánech potkanů ze skupin krmených standardní směsí.

Srovnání obou pokusných skupin potkanů krmených hyperakumulující rostlinou (PT a P0) ukázalo, že konečná koncentrace zinku byla nižší v orgánech potkanů infikovaných tasemnicí, s výjimkou sleziny a varlat, kde rozdíl mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný (tab8). U skupin bez zvýšené zátěže zinkem byl prokazatelný rozdíl mezi koncentracemi zinku zjištěn pouze ve střevě ($p=0,015$), játrech ($p=0,02$) a také v ledvinách ($p=0,01$). Podrobnější srovnání koncentrace zinku v orgánech, kde byl rozdíl mezi skupinami s tasemnicí a bez tasemnice prokazatelný zobrazují grafy 9 – 12.

Tabulka č. 8: hodnoty p*, získané z Mann – Whitneyova U testu.

skupiny	kost	sval	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny	tasemnic e
(PT/OT)	0,37	0,059	0,8	0,0003	9,9*10⁻⁵	7,4*10⁻⁷	0,00014	3,5*10⁻⁵
(PO/00)	0,24	0,11	0,10	0,5	0,0015	0,029	0,0115	
(PT)/(PO)	0,0086	0,0003	0,17	0,19	0,00151	9,3*10⁻⁵	8,89*10⁶	
(OT)/(00)	0,2	0,1	0,1	0,5	0,015	0,02	0,01	

*Zvýrazněné p - hodnoty značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).

Koncentrace zinku v tasemnici byla vždy vyšší, než koncentrace ve tkáni hostitele s výjimkou varlat u potkanů ze skupiny OT (tab9). Nejvíce zinku akumulovala tasemnice v poměru ke svalové tkáni potkanů ze skupiny PT zatížené vyššími dávkami zinku (BF=5,4) Biokoncentrační faktor tasemnice u potkanů ze skupiny PT vyšel 1,94 ve srovnání s ledvinami a ledviny a 1,79 ve srovnání s játry. U potkanů ze skupiny OT byla průměrná koncentrace ve varlatech lehce vyšší, než v tasemnici. (BF= 0,95).

Tabulka č.9: Porovnání koncentrace zinku v tasemnici kryší s koncentracemi v jednotlivých orgánech.

	kost	sval	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny
BF _(PT)	1,3	5,4	1,2	2,3	1,7	1,8	1,9
BF _(OT)	1,06	4,0	0,96	2,0	2,2	1,8	2,0
r _(PT)	-0,4	0,5	-0,03	-0,6	0,5	0,3	0,4
r _(OT)	0,6	0,08	-0,22	-0,4	-0,2	0,6	0,5

BF= biokoncentrační faktor (podíl mezi koncentrací zinku ve tkáni tasemnice a ve tkáni hostitele.

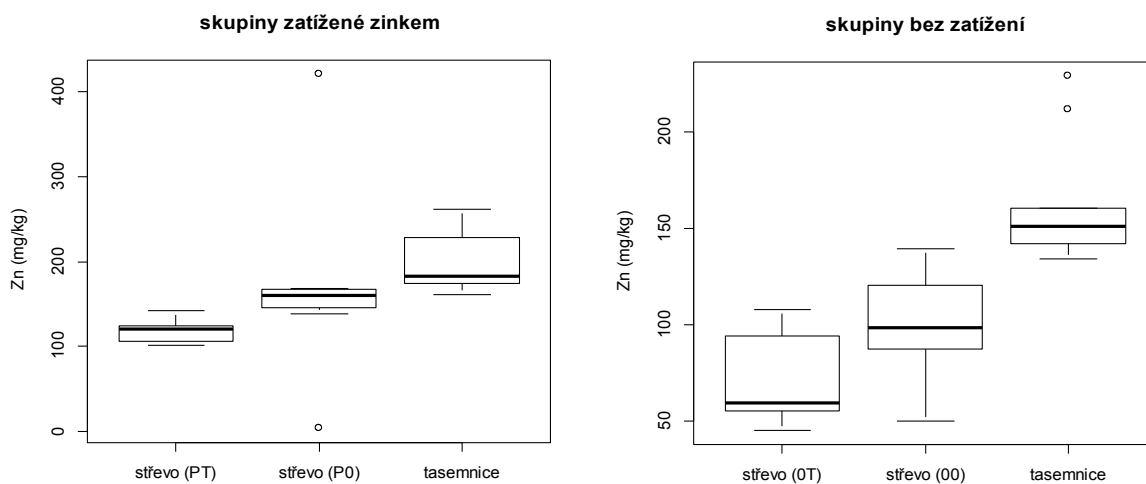
r= korelační koeficient vyjadřující závislost mezi koncentrací zinku v tasemnici a v orgánech.

Ve srovnání s ledvinami, játry a střevem potkanů ze skupiny OT byla koncentrace ve tkáni parazita vyšší (BF= 1,94; 1,86 a 2,2). Stejně jako v případě potkanů ze skupiny (PT) byl i u skupiny OT nejvýraznější rozdíl mezi koncentrací v tasemnici a tkáni hostitele pozorován ve svalovině (BF=5,4). Ve většině orgánech nebyla zjištěna korelace s koncentrací zinku v tasemnici, pouze ve slezině potkanů vystavených zvýšené zátěži zinkem byl pozorován mírný pokles ($r = -0,6$) s rostoucí koncentrací zinku ve tkáni tasemnice, zatímco koncentrace v kosti a játrech potkanů bez zátěže s koncentrací v tasemnici mírně rostla ($r = 0,6$).

Tabulka č. 2: medián \pm směrodatná odchylka koncentrace kadmia v jednotlivých orgánech (mg/kg v sušině).

	kost	svalovina	varlata	slezina	střevo	játra	ledviny	Tasemnic e
<i>PT</i>	0,04 $\pm 0,1$	0,003 $\pm 0,003$	0,086 $\pm 0,01$	0,13 $\pm 0,04$	1,75 $\pm 0,6$	2,45 $\pm 0,5$	7,85 $\pm 1,2$	4,5 $\pm 1,6$
<i>PO</i>	0,14 $\pm 0,04$	0,022 $\pm 0,006$	0,216 $\pm 0,117$	0,51 $\pm 0,20$	2,795 $\pm 3,264$	5,192 $\pm 2,90$	24,58 $\pm 6,42$	N
<i>OT</i>	0,004 $\pm 0,03$	0,001 $\pm 0,002$	0,001 \pm 0,002	0,02 $\pm 0,06$	0,0142 $\pm 0,006$	0,011 $\pm 0,008$	0,056 $\pm 0,02$	0,001 $\pm 0,01$
<i>OO</i>	0,085 $\pm 0,04$	0,005 $\pm 0,10$	0,006 $\pm 0,002$	0,026 $\pm 0,04$	0,034 $\pm 0,03$	0,035 $\pm 0,013$	0,059 $\pm 0,009$	N

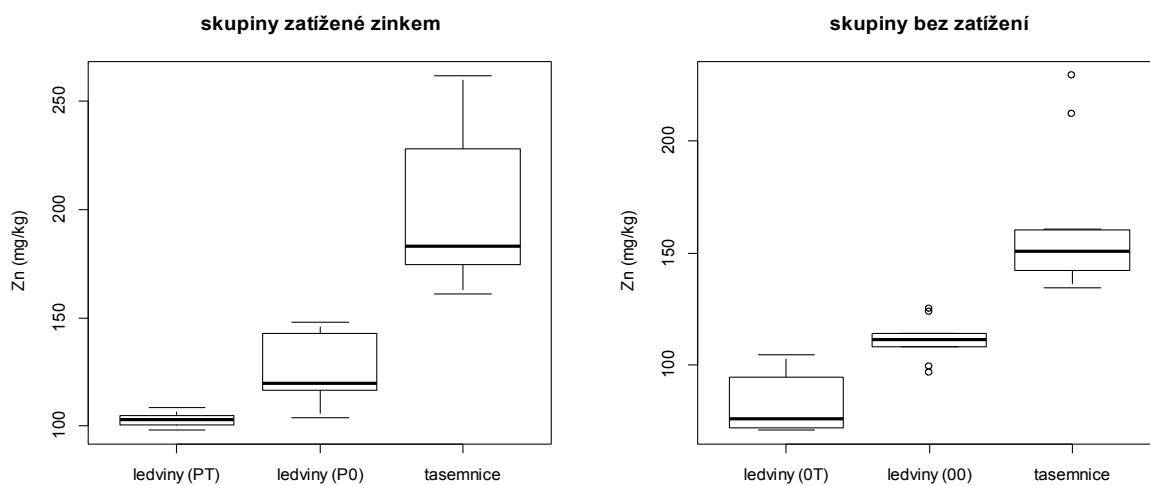
Jelikož hodnoty koncentrace Zn v orgánech jednotlivých potkanů ve většině případů nepocházely z normálního rozdělení, byl v této diplomové práci použit neparametrický Mann – Whitneyův U test. Tento test porovnává mediány dvou nezávislých výběrů.



Graf č.9 a,b: Podrobnější srovnání koncentrace zinku ve tkáni tenkého střeva a v tasemnici skupin krměných hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b).



Graf č.10 a,b: Podrobnější srovnání koncentrace zinku v játrech a v tasemnici skupin krmených hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b).



Graf č.11 a,b: Podrobnější srovnání koncentrace zinku ve tkáni tenkého střeva a v tasemnici skupin krmených hyperakumulující rostlinou (a) a standardní směsí (b).

6 Diskuse

V minulosti byly opakovaně pozorovány nižší koncentrace v orgánech zvířat infikovaných parazitem oproti neinfikovaným jedincům. Například autoři (Sures et al., 2002; Jankovská et al., 2010; Brožová et al., 2015). Také v této diplomové práci byla ve většině orgánů potkanů, infikovaných tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) zjištěna prokazatelně nižší koncentrace kadmia oproti potkanům bez infekce. Například koncentrace v ledvinách, játrech a ve tkáni tenkého střeva potkanů vystavených zvýšeným dávkám kadmia a zároveň napadených tasemnicí krysí byla 2,9; 2,5 a 1,8 krát nižší ve srovnání s neinfikovanými jedinci. Pouze mezi koncentracemi ve tkáni střeva nebyl rozdíl statisticky významný pravděpodobně díky nízkému počtu sledovaných jedinců. Podobné výsledky získali Teimoori et al. (2014). Tito autoři zkoumali schopnost tasemnice (*Hymenolepis diminuta*) absorbovat kadmium ve střevě potkana (*Rattus norvegicus*), přičemž zaznamenali v ledvinách, játrech a svalovině potkanů infikovaných tasemnicí krysí 3; 3,5 a 2,7 krát nižší koncentrace kadmia oproti orgánům neinfikovaných potkanů. Co se týče zinku, také výsledná koncentrace tohoto kovu byla nižší v orgánech potkanů ze skupiny s tasemnicí s výjimkou varlat a sleziny, kde rozdíl nebyl statisticky významný. Ve varlatech je přítomnost zinku nezbytná pro spermatogenezi a také zde má prokazatelně ochranný účinek proti toxicitě kadmia (Burukoglu et al., 2008). Slezina je u potkanů rezervárovým orgánem pro T-lymfocyty, které se uplatňují při imunitní reakci na parazita a její hmotnost při infekci tasemnicí roste (John, 1995).

Koncentrace stopových prvků v těle se může měnit pod vlivem různých infekcí a onemocnění, přičemž tyto změny koncentrací odrážejí změny v buněčném metabolismu a ve schopnosti plasmatických bílkovin vázat kationty (Yatoo et al., 2013). Parazitární infekce v tenkém střevě například podle autorů Brown et al., (2004) obecně způsobuje dočasné snížení koncentrace zinku v játrech a celkové narušení homeostázy metabolismu tohoto kovu. Naopak v akutní fázi imunitní odpovědi na infekci dochází ke zvýšení syntézy metallothioneinů (Cuevas et al., 2005), což má za následek zvýšené ukládání zinku do jater a jeho následný nedostatek v krevním séru (García et al., 2015). Také výsledky práce autorů Brožová et al., (2015) potvrzují zvýšené hladiny Cr, Cu, Fe, Mn, Ni a Zn v orgánech lišek infikovaných měchožilem bublinatým (*Echinococcus multilocularis*), což tito autoři dávali do souvislosti s aktivací imunitního systému.

Přestože zinek je esenciálním kovem pro imunitní systém, v této diplomové práci byly jeho koncentrace v orgánech s výjimkou sleziny vždy nižší právě u skupin s parazitem.

Snížení koncentrace kovů vlivem parazita může změnit výsledné pořadí orgánů. U potkanů zatížených olovem pozorovali autoři Čadková et al. (2013) vliv přítomnosti tasemnice na rozložení kovu v orgánech hostitele pouze při nízkých dávkách. Zatímco při aplikaci nízkých dávek olova bylo u neinfikovaných jedinců pozorováno typické rozložení koncentrace: (svaly < varlata < střevo < játra < ledviny < kost), u skupiny infikované tasemnicí krysí byla nejvyšší koncentrace zjištěna ve střevě a svalovině. Při vysokých dávkách olova bylo rozložení naopak shodné, bez ohledu na přítomnost parazita v GIT.

Výsledky získané v této diplomové práci potvrzují toto schéma i pro kadmium. U obou skupin vystavených vyšší zátěži kadmiem bylo pozorováno shodné rozložení kovu. Naopak u kontrolních skupin bez zatížení kovem se rozložení lišilo podle přítomnosti tasemnice krysí. U potkanů ze skupiny bez infekce tasemnicí byla největší část kovu uložena v kosti, zatímco u jedinců ze skupiny s tasemnicí byla kost až třetí v pořadí po ledvinách a slezině, přičemž koncentrace v kostní tkáni infikovaných potkanů byla 4 krát nižší oproti neinfikovaným. Kost se oproti měkkým tkáním vyznačuje mnohými odlišnostmi. Jak uvádí autoři Martiniaková et al. (2010), od okamžiku kdy je kov vázán v kostní tkáni, podléhá vnitřnímu metabolismu kosti a jelikož remodelace se u dospělých jedinců týká ročně jen asi 10% kostní tkáně, poskytuje tato tkáň dlouhodobý záznam o zatížení prostředí kovy. Přítomnost tasemnice krysí tedy pravděpodobně způsobila sníženou schopnost absorbce kadmia v kostní tkáni. Co se týče zinku, zde vlivem tasemnice došlo ke změně pořadí koncentrací kovu orgánů naopak pouze u skupiny vystavené vyšším dávkám. Zatímco potkani bez infekce akumulovali nejvíce zinku v kosti, u infikovaných byla nejvíce postižena varlata.

Jedno z možných vysvětlení snížení obsahu kovů v orgánech potkanů infikovaných tasemnicí vychází z dříve zmiňované schopnosti tasemnic akumulovat ve svých tkáních vysoké množství kovů. Snížená koncentrace kovu v orgánech hostitele mohla být důsledkem kompetice mezi tegumentem tasemnice a střevní sliznicí o ionty kovů (Dalton et al., 2004). U potkanů, kteří v průběhu experimentu popisovaného v této diplomové práci přijímali kadmium v dávce 3 mg/týden akumulovala tasemnice krysí větší množství tohoto kovu ve srovnání se všemi sledovanými orgány s výjimkou ledvin.

Nejnápadnější byl tento rozdíl ve svalovině, oproti které byla koncentrace v tasemnici krysí 1695x vyšší. Jak ale uvádějí autoři Baudrimont and Montaudouin (2007), svalovina není cílovou tkání pro ukládání kadmia. Naopak játra hrají v metabolismu kovu důležitou roli.

V této diplomové práci byla koncentrace v tasemnici oproti játrům dvojnásobná. Ještě o něco vyšší hodnoty BF ve srovnání s játry získali autoři Teimoori et al. (2014) během studie prováděné na území Teheránu. Zde byla ve tkáni tasemnice zjištěna téměř pětinašobně vyšší koncentrace (BF=4,95). Průměrná koncentrace kadmia ve tkáni tasemnic zatížených potkanů v této diplomové práci byla nižší, než v ledvinách (BF=0,64). V ledvinách existují mechanismy, které efektivně akumulují toxické prvky, jako je kadmium (Shimamura et al. 2013). Výsledky této diplomové práce tedy potvrdily úlohu ledvin, jakožto hlavního akumulátoru kadmia v těle při zvýšené zátěži tímto kovem. Zcela opačný výsledek pro model tasemnice krysí/potkan obecný popisují Teimori et al. (2014). Tito autoři uvádějí ve tkáni tasemnice téměř šestkrát vyšší (BF=5,95) množství kadmia oproti ledvinám hostitele, potkana obecného. Co se týče dřívějších záznamů o akumulaci kadmia, obsah tohoto kovu v tasemnicích zpravidla nepřesahoval koncentraci v ledvinách. Například u modelu tasemnice *Skrjabinotaenia lobata*/myšice křovinná *Apodemus sylvaticus*, popisují autoři Toreset al. (2006) biokoncentrační faktor (BF=0,17). Nízký biokoncentrační faktor (0,3) zjistili také autoři Jankovská et al. (2010b) pro tasemnici rodu *Mesocestoides*, parazitující u lišky obecné (*Vulpes vulpes*). Mírně vyšší koncentrace oproti ledvinám (BF=1,2) pozorovali autoři Jankovská et al. (2011) u tasemnice ovčí (*Moniezia expanza*) a Tores et al. (2011) u tasemnice *Rodentolepis microstoma*, parazita myši domácí (*Mus domesticus*). Tato tasemnice je druhem příbuzným tasemnici krysí (*Hymenolepis diminuta*) a v minulosti byla také řazena do rodu *Hymenolepis*.

V souladu s dřívějšími výsledky získanými pro olovo (Čadková et al., 2013) byl v této diplomové práci vyšší biokoncentrační faktor tasemnice krysí pro kadmium zjištěn u potkanů ze skupiny vystavené vyšším dávkám kadmia. Tento poznatek však nelze vztáhnout na všechny případy. Například biokoncentrační faktor tasemnice (*Skrjabinotaenia lobata*) parazitující u hlodavců žijících v oblasti méně zatížené kadmiiem byl téměř dvojnásobný oproti jedincům ze silněji znečištěné oblasti (Tores et al., 2006). V případě zinku nebyl prokázán rozdíl mezi biokoncentračními faktory tasemnic potkanů vystavených zvýšené zátěži zinkem (235,7 mg/týden) a tasemnic potkanů bez zátěže (10,5 mg/týden).

Relativní množství zinku akumulované tasemnicí krysí tak pravděpodobně nezávisí na množství zinku přijímaného v potravě.

V rámci vlastního přežití v hostiteli některé patogeny vyvinuli specializované systémy pro získání výhody. Například bakterie *Salmonella thyphimurium*, přežívá v tenkém střevě díky chelataci zinku. (García et al., 2015). O schopnosti tasemnic akumulovat ve svém těle zinek zatím není mnoho záznamů. Například ve tkáni tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) byla zjištěna nižší koncentrace zinku ve srovnání s játry ledvinami a svalovou tkání ovcí zatížených vyššími dávkami kadmia (Jankovská et al., 2011). Naopak střední hodnota (medián) obsahu zinku v tasemnici rodu *Mesocestoides spp.* byla 24x vyšší, než v ledvinách a 18x vyšší, než v játrech lišek z oblasti kontaminované těžkými kovy (Jankovská et al., 2010). V této diplomové práci tasemnice u obou infikovaných skupin obsahovala v porovnání s ledvinami, játry a střevem přibližně dvojnásobné množství zinku. Jediným orgánem, kde byla koncentrace zinku vyšší, než v tasemnici byla varlata. Rozdíl v koncentraci zinku mezi hostitelem a parazitem byl stejně jako v případě kadmia nejvíce patrný ve svalové tkáni, která obsahovala zhruba 5x méně zinku ve srovnání s tasemnicí.

Využití modelu potkan obecný/tasemnice krysí jako bioindikátoru zatížení prostředí kadmíem, je sporné. Například u vrtějše krysího (*Moniliformis moniliformis*) byla ve srovnání s tasemnicí krysí zjištěna dvojnásobná bioakumulační kapacita pro kadmium (Teimori et al., 2014). Navíc zatímco autoři Scheef et al. (2000) zaznamenali ve tkáni tohoto vrtějše 23 krát vyšší koncentraci kadmia oproti ledvinám, v této diplomové práci byla koncentrace v ledvinách 0,64 krát nižší. Naopak vyšší koncentrace kadmia v tasemnici v porovnání se všemi ostatními orgány (zejména se svalovinou hostitele), vyšší koncentrace zinku oproti všem orgánům hostitele, kosmopolitní rozšíření a hojný výskyt potkana obecného spolu s tasemnicí krysí naznačují možnost využití modelu *Hymenolepis diminuta/ Rattus norvegicus* pro hodnocení zatížení prostředí těmito kovy.

Přestože u potkanů vystavených infekci tasemnicí byly pozorovány nižší koncentrace kadmia oproti neinfikovaným jedincům, v této diplomové práci nebyla zjištěna korelace mezi koncentrací kadmia v jednotlivých orgánech a koncentrací v těle tasemnice. Podobný výsledek získali autoři Čadková et al. (2013) v případě olova. Co se týče zinku, mírný pokles hladiny tohoto kovu s rostoucí koncentrací ve tkáni tasemnice krysí ($r=-0,6$) byl pozorován pouze ve sezině potkanů zatížených vyššími dávkami zinku.

Tasemnice mimo jiné může přijímat také ionty kovu vázané na žluč, které již prošly jaterním cyklem (Sures and Sidall et al., 1999). Zvýšená absorpce kovů tedy pravděpodobně není jediným mechanismem, kterým přítomnost parazita ovlivňuje zatížení orgánů kovy.

Narušení homeostázy parazitem a následná modulace imunitní odpovědi mohly mít u infikovaných potkanů v této diplomové práci za následek klesající hladinu transportních metalothioneinů, jak pozorovali například Baudrimont and Montaudouin, (2007) u srdcovky jedlé (*Cerastoderma edule*) infikované motolicí z podtřídy Digenea, (*Himasthla elongata*). Exprese genů pro tvorbu metallothioneinů může být ovlivňována prostřednictvím cytokinů vznikajících při imunitní reakci hostitele, například Interleukin IL-6, mediátor syntézy proteinů při infekci zvyšuje tvorbu metallothioneinů v jaterních buňkách, což vede ke zvýšené akumulaci zinku (Schroeder and Cousins, 1990).

Pro poznání vztahu mezi parazitickou infekcí a změnami v úrovni zatížení hostitele kovy bude třeba provést biochemické a molekulární studie na vysokém počtu vzorků, jak navrhli (Brožová et al., 2015).

Parazitární infekce v tenkém střevě obecně přispívají k malnutricii, snižují schopnost vstřebávání a mohou způsobit chronický zánět (García et al., 2015). Snižená absorpce kovu a následně nižší koncentrace v orgánech může být způsobena poškozením střevní sliznice. Například při infekci střevního epitelu prvokem *Giardia lamblia* byla pozorována snížená funkce enzymů a transportních systémů. Následné zvýšení absorpce zinku po podání antiparazitik spojovali autoři Buret et al. (2008) s obnovou střevního epitelu. Skolex tasemnice krysí není opatřen háčky, zuby, ani brusnými plochami a narozdíl od většiny parazitických helmintů tato tasemnice nezpůsobuje poškození tenkého střeva (Lopes et al., 2015). Při infekci tasemnicí krysí byl v minulosti naopak pozorovány protizánětlivé účinky. Autoři Hunter et al., (2005) zaznamenali u myši zvýšenou produkci protizánětlivého interleukinu IL-10 a také AAM makrofágů, které se uplatňují při obnově tkáně po zranění a mají protizánětlivý účinek. Diferenciace těchto makrofágů je ovlivněna interleukiny IL-4 a IL-13, což jsou typické cytokiny pro imunitní reakci typu TH2 spojenou s parazitární infekcí. Jelikož pokusné skupiny potkanů v této diplomové práci byli krmeni zároveň zvýšenými dávkami kadmia a zinku, na výsledné koncentrace obou kovů mohla mít vliv mimo jiné jejich vzájemná interakce.

Autoři Schroeder and Nason (1974) sledovali interakci mezi stopovými prvky ve tkáni potkana. Výsledky jejich studie potvrdili, že přítomnost kadmia způsobila zvýšení koncentrace zinku, manganu a mědi v ledvinách. Zvýšené koncentrace zinku vlivem kadmia v orgánech potkana obecného popisují také autoři Noel et al. (2004).

Spierenburg et al. (1988) měřili koncentraci olova, kadmia a zinku v játrech a ledvinách dobytka z oblastí zinkových rafinérií v Holandsku, přičemž zaznamenali prokazatelně vyšší úroveň zatížení ledvin, v případě kadmia desetkrát oproti kontrolní skupině. Naopak u ovcí, kterým bylo podáváno vyšší množství kadmia nebyl pozorován prokazatelný rozdíl v koncentraci zinku oproti kontrolním skupinám v žádném orgánu (Jankovská et al., 2011). Autoři Schimamura et al. (2013) zjistili v ledvinách potkanů rostoucí koncentraci zinku spolu se zvyšující se koncentrací kadmia ($r=0,77$). Výsledky této diplomové práce potvrdily podobnou závislost v ledvinách potkanů vystavených vysoké zátěži kadmia bez přítomnosti parazita. V této diplomové práci nebyla zohledněna hmotnost tasemnice. Jak uvádí autoři Tores et al. (2006), schopnost parazita účinně vázat těžké kovy pravděpodobně závisí na velikosti povrchu metabolicky aktivního tegumentu, přičemž tento povrch je v pozitivní korelaci s hmotností parazita. Jelikož byli v této diplomové práci použiti pouze samci potkana obecného nebylo možné potvrdit vliv pohlaví na koncentraci kovu v orgánech. Například autoři Jankovská et al. (2014) zjistili 2,4 krát vyšší koncentraci rtuti v gonádách samců okouna říčního (*Perca fluviatilis*) oproti samicím. Také autoři Uchino et al. (1990) pozorovali v průběhu dospělosti potkana obecného vyšší obsah zinku v ledvinách samic oproti samcům.

7 Závěr

Výsledky této práce potvrdily předpoklad, že přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) v gastrointestinální soustavě hostitele, laboratorního potkana (*Rattus rattus* var *alba*) má za následek snížení koncentrace kadmia a zinku v tkáni tohoto hostitele. Při zátěži kadmíem byla ve všech orgánech s výjimkou tenkého střeva potkanů infikovaných tasemnicí krysí zjištěna prokazatelně nižší koncentrace kadmia oproti neinfikovaným jedincům.

U skupin zatížených zinkem byl významný rozdíl pozorován ve všech orgánech s výjimkou sleziny a varlat.

Dále je z výsledků této práce patrné, že tasemnice krysí je schopna akumulovat ve své tkáni vyšší množství kadmia ve srovnání se všemi orgány potkana s výjimkou ledvin, které jsou hlavním akumulátorem tohoto kovu. Zinek byl tasemnicí krysí akumulován ve větším množství oproti všem orgánům hostitele. Díky této schopnosti se model laboratorní potkan/tasemnice jeví, jako možný bioindikátor zatížení prostředí kadmíem a zinkem.

8. Seznam použité literatury

BAKER, A., J., M., 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*. 3. (643 – 654).

BAKER, A., J., M., BROOKS, R., R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1. (81 – 126).

BERT, V., BONNIN, I., SAUMITOU-LAPRADE, P., DE LAGUERIE, P., PETTIT, D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*. 155. (47 – 57).

BERTIN, G., AVERBECK, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 88. (1549 – 1559).

BLINDAUER, C., A., HARRISON, M., D., PARKINSON, J., A., ROBINSON, A., K., CAVET, J., S., ROBINSON, N., J., SADLER, P., J. 2001. A metallothionein containing a zinc finger within a four metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98. (17). (9593 – 8).

BONAVENTURA, P., BENEDETTIA, G., ALDARÉDEB, F., MIOSSEC, P. 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmunity Reviews*. 14. (4). (277 – 285).

BAUDRIMONT, M., DE MONTAUDOUIN, X. (2007). Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). *Parasitology*. 134. (237–245).

BROWN, K., H., RIVERA, J., A., BHUTTA, Z., GIBSON, R., S., KING, J., C., LÖNNERDAL, B., RUEL, M., T., SANDTRÖM, B., WASANTWISUT, E. 2004. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. Food and Nutrition Bulletin. 25. (99 - 203).

BROŽOVÁ, A., JANKOVSKÁ, I., MIHOLOVÁ, D., SCHÁŇKOVÁ, Š., TRUNEČKOVÁ, J., LANGROVÁ, I., KUDRNÁČOVÁ, M., VADLEJCH, J. 2015. Heavy metal concentrations in the small intestine of red foxes (*Vulpes vulpes*) with and without *Echinococcus multilocularis* infection. Environmental Science and Pollution Research. 22. (3175 – 3179).

BURET, A., G. 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalius*. Parasite. 15. (261–265).

BURUKOGLU, D., BAYCU, C. 2008. Protective effects of zinc on testes of cadmium treated rats. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 81. (521 – 524).

CHAN, H., M., CHERIAN, M., G. 1993. Mobilization of hepatic cadmium in pregnant rats. Toxicology and applied Pharmacology. 120. (308 – 314).

CHANDRA, R., K. 1984. Excessive intake of zinc impairs immune responses. Journal of the American Medical Association. 252. (1443 – 1446).

CHANMUGAM, P., WHEELER, C., HWANG, D., H. 1984. The effect of zinc deficiency on prostaglandin synthesis in rat testes. Nutrients. 114. (2066 – 2072).

CUEVAS, L., E., KOVANAGI, A. 2005. Zinc and infection: A review. Annals of Tropical Pediatrics. 25. (149–160).

CZAPLINSKI, B. & VAUCHER, C. 1994. Family Hymenolepididae Ariola, 1899. In: Khalil, L. F., Jones, A., Bray R .A. (eds). Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates (751). CAB International. ISBN: 0851988792.

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).

DALTON, J., P., SKELLY, P., HALTON, D., W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake of parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology*. 82. (211 – 232).

ELSENHANS, B., STRUGALA, G., J., SCHAFER S., G. 1997. Small – intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Human and experimental toxicology*. 16. (429 – 434).

EL-SHAZLY, A., M., EL-NAHAS, H., A., SOLIMAN, M., SULTAN, D., M., ABEDL-TAWAB, A., H., MORSY, T., A. 2006. The reflection of control programs of parasitic diseases upon gastrointestinal helminthiasis in Dakahlia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 36. (467–480).

ENJALBERT, F., LEBRETON, P., SALAT, O. 2006. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90. (459 – 466).

FOSMIRE, G., J. 1990. Zinc toxicity. *The American journal of Clinical Nutrition*. 51. (2). (225 – 227).

FRANK, S., N., FAUST, S., KALBE, M., TRUBIROHA, A., KLOAS, W., SURES, B. 2011. Fish hepatic glutathione-S-transferase activity is affected by the cestode parasite *Schistocephalus solidus* and *Ligula intestinalis*: evidence from field and laboratory studies. *Parasitology*. 138. (939–944).

FRIBERG, L., KJELLSTROM, T., NORDBERG, G., F. 1986. *Handbook on the Toxicology of Metals*, second ed. Elsevier, Oxford. (130–184).

GARCÍA, A., H., FIGUEROA, G., I., QUIHUI – COTA, L., ANDURO – CORONA, I. 2015. Crosstalk between zinc status and *Giardia* infection: A new Approach. *Nutrients*. 7. (4438 – 4452).

GÉLINAS, Y., YOULA, M., BÉLIVEAU, R., SCHMIT, J., P. 1992. Multi-element analysis of biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry: healthy Sprague Dawney rats. *Analytica Chimica Acta*. 269. (115 – 122).

GOTTSTEIN, B. 1992. *Echinococcus multilocularis* infection: immunology and immunodiagnosis. *Advances in parasitology* 31. (321 – 380).

GREICHUS, A., GREICHUS, Y., A. 1980. Identification and quantification of some elements in the hog roundworm. *Ascaris lumbricoides suum* and certain tissues of its host. *International Journal for Parasitology*.

GRESSLEY, T., F. 2009. Zinc, copper, manganese, and selenium in dairy cattle rations. *Proceedings of the 7th Annual Mid - Atlantic Nutrition Conference*.

HAUKISALMI, V., HENTTONEN, H., HARDMAN, L. M., FORONDA, P., FELIU, C., LAAKONEN, J., NIEMIMAA, J., LEHTONNEN, T. 2010a. Systematic relationships of Hymenolepidid cestodes of rodents and shrews inferred from sequences of 28S ribosomal RNA. *Zoologica skripta* 39. (6). (631 – 641).

HOFFMAN, H., N., PHYLIKY, R., L., FLEMING, C., R. 1988. Zinc – induced cooper deficiency. *Gastroenterology*. 94. (508 – 512).

HUNTER, M. M., WANG, A., HIROTA, C. L., MCKAY, D. M. Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically-induced colitis *Journal of Immunology*. 174. (7368–7375).

HUSSEIN, H., A., STAUFENBIEL, R. 2012. Variations in copper concentration and ceruloplasmin activity of dairy cows in relation to lactation stages with regard to ceruloplasmin to copper ratios. *Biological Trace Elements Research*. 146. (1). (47-52).

JANIK, A. 1992. Effect of cadmium on certain factors of lipid metabolism in the aorta and myocardium of rats. *Folia Medica Cracoviensia*. 33. (53 – 58).

JANKOVSKÁ, I., VADLEJCH, J., SZÁKOVÁ, J. 2010a. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Moniezia expansa* (Cestoda: Anoplocephalidae) and its final host (*Ovis aries*). *Ecotoxicology*. 19. (928–932).

JANKOVSKÁ, I., MIHOLOVÁ, D., BEJČEK, V., VADLEJCH, J., ŠULC, M., SZÁKOVÁ, J., LANGROVÁ, I. 2010b. Influence of parasitism on trace element contents in tissues of red fox (*Vulpes vulpes*) and its parasites *Mesocestoides spp.* (Cestoda) and *Toxascaris leonina* (Nematoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58. (469–477).

JANKOVSKÁ, I., LUKEŠOVÁ, D., SZÁKOVÁ, J., LANGROVÁ, L., VADLEJCH, J., ČADKOVÁ, Z., VÁLEK, P., PETRTÝL, M., KUDRNÁČOVÁ, M. 2011. Competition for minerals (Zn, Mn, Fe, Cu) and Cd between sheep tapeworm (*Moniezia expansa*) and its definitive host sheep (*Ovis aries*). *Helminthologia* 48. (4). (237 – 243).

JANKOVSKÁ, I., MIHOLOVÁ, D., ROMOČUSKÝ, Š. PETRTÝL, M., LANGROVÁ, I., KALOUS, L., SLOUP, V., VÁLEK, P., VADLEJCH, J., LUKEŠOVÁ, D. 2014. Importance of fish gender as a factor in environmental monitoring of mercury. *Environmental Science and Pollution Research* 21. (6239 – 6242).

JIN, T., KONG, Q., YE, T., WU, X., NORDBERG, G., F. (2004). Renal dysfunction of cadmium-exposed workers residing in a cadmium-polluted environment. *Biometals*. 17. (513–518).

JOHN, J. I. 1995. Parasites and the avian spleen. *Biological Journal of the Linnean Society*. 54. (87 – 106).

KIDO, T., NOGAWA, K., HOCHI, Y., HAYANO, M., HONDA, R., TSURITANI, I. 1993. The renal handling of calcium and phosphorus in environmental cadmium-exposed subjects with renal dysfunction. *Journal of Applied Toxicology* 13. (43–47).

KITA, K., MIURA, N., YOSHIDA, M. 2006. Potential effect of cellular response to cadmium of a single nucleotide A/G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein. *Human Genetics*. 120. (553 – 560).

KRAMER, U., 2010. Metal hyperaccumulate in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 61. (517 – 534).

KÜPPER, H., LOMBI, E., ZHAO, F., J., MCGRATH, S., P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212. (75 – 84).

KURIWAKI, J., NISHIJO, M., HONDA, R., TAWARA, K., NAKAGAWA, H., HORI, E. (2005). Effect of cadmium exposure during pregnancy on trace elements in fetal rat liver and kidney. *Toxicology Letters*. 156. (369 – 376).

KUSCHNER, I. 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 389. (39 – 48).

LOPES, F., REYES, J., WANG, A., LEUNG, G., MCKAY, D. 2015. Enteric epithelial cells support growth of *Hymenolepis diminuta* in vitro and trigger TH2-promoting events in a species-specific manner. *International Journal of Parasitology*. 45. (691 – 695).

MARET, W. 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in Nutrition*. 4. (82 – 91).

MARKESBERY, W., R., MONTINE, T., J., LOVELL, M., A. (2001). Oxidative alterations in neurodegenerative diseases. Pathogenesis Disorders. Humana Press. Conclusion Totowa. NJ, USA.

MARTINIAKOVA, M., OMELKA, R., JANCOVA, A., STAWARZ, R., FORMICKI, G. 2011. concentrations of selected heavy metals in bones and femoral bone structure of bank (*Myodes glareolus*) and common (*Microtus arvalis*) voles from different polluted biotopes in Slovakia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 60. (524–532).

MAS-COMA, S., TENORA, F. 1997. Proposal of *Arostrilepis* n. gen. (cestoda: Hymenolepidae). Researches and Reviews in Parasitology. 57. (93–101).

MCDOWELL, L., R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich 23. Publishers, San Diego, CA.

MCKAY, D. M., 2010. The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. Parasitology 137. (385–394).

MIZARI, N., HIRBOD, A., SAHINPOUR, S., GHALICHI, M., BEIGI, M., YAMINI, A., REZA DEPHOUR, A. 2012. Effect of subchronic zinc toxicity on rat salivary glands and serum composition. Toxicology and industrial health. 28. (10). 917 – 922.

NINKOV, M., POPOV, A., DEMENESKU, J., MIRKOV, I., MILEUSNIC, D., PETROVIC, A., GRIGOROV, I., ZOLOTAREVSKI, L., TOLINACKI, M., KATARANOVSKI, D., BRCESKI, I., KATARANOVSKI, M. 2015. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. Toxicology Letters. 237. (89 – 99).

NOEL, L., GUÉRIN, T., COLF – KLAUW, M. 2004. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. Food and Chemical Toxicology. 42. (8). (1203 – 1210).

O'DONOGHUE, D., G., BOLAND, M. 2002. The effect of proteinated trace minerals on fertility and somatic cell counts of dairy cattle. *Journal of dairy Science*. 78. (248 – 255).

OTEIZA, P. 2012. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*. 53. (1748–1759).

PATHAK, P., KAPIL, U. 2004. Role of elements zinc, cooper and magnesium during pregnancy and its outcome. *Indian Journal of Pediatrics*. 71. (1003 – 1005).

PRASAD, S. 2008. Clinical, anti – inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology*. 43. (5). (370 – 377).

PORTER, K.,G., MCMASTER, D., ELMES, M., E., LOVE, A., H. 1977. Anaemia and low serum – coper during zinc therapy. *Lancet*. 2. (774).

PROZIALECK, W., VANDREEL, A., ACKERMAN, CH., D., STOCK, I., PAPAELIOU, A., YASMINE, CH., WILSON, K., LAMAR, P., SEARS, V., GASIOROWSKI, J., DINOVO, K., VAIDYA, V., EDWARDS, J. 2015. Evalution of cystain C as an early biomarker of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Biometals*. 29. (131 – 146).

RAUDENSKÁ, M., ŠMERKOVÁ, K., TANHÄUSEROVÁ, V., GUMULEC, J., HLAVNA, M., SZTALMACHOVÁ, M., PÁCAL, L., BABULA, P., ADAM, V., ECKSCHLAGER, T., KIZEK, R., MASARÍK, M. 2012. Metallothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám. *Praktický lékař*. 6. (322 – 326).

SCHANMUGAM, V., LO, J., C., WU, C., L., WANG, S., L., LAI, C., C., CONOLLY, E., L. 2011. Differential expression and regulation of iron – regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. *New Phytologist*. 190. (125 – 137).

SCHANMUGAM, V., JING – CHI, L., KUO – CHEN, Y. 2013. Control of uptake in *Arabidopsis halleri*: a balance between Zn and Fe. *Frontiers in Plant Science*. 4. 281.

SCHEEF, G., SURES, B. & TARASCHEWSKI, H. 2000. Cadmium accumulation in *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) from experimentally infected rats. *Parasitology Research*. 86. (688–691).

SCHROEDER, J., J., COUSINS, R., J. 1990. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 87. (8). (3137 – 3141).

SCHROEDER, H., A., NASON, A., P. 1974. Interactions of trace metals in rat tissues. Cadmium and nickel with zinc, chromium, copper and manganese. *Journal of nutrition* 104. (167 – 178).

SHIMAMURA, T., IJIMA, S., HIRAYAMA, M., IWASHITA, M., AKIYAMA, S., TAKAKU, Y., YUMOTO, S. 2013. The concentrations of major and trace elements in rat kidney: Aging effect and mutual relationships. *Journal of trace elements in medicine and biology*. 27. (4). (286 – 294).

SORDILLO, L., M. 2013. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Veterinary Medicine International*. (1 – 8).

SPIERENBURG, T.,H., J., DE GRAAF, G.,J. BAARS, A.,J. 1988. Cadmium, zinc, lead and cooper in liver and kidneys of cattle in the neighborhood of zinc refineries. *Enviromental Monitoring Assesment*. 11. (107 – 114).

STEFANIDOU, M., MARAVELIAS, C., DONA, A., SPILIOPOULOU, C. 2006. Zinc: a multi purpose trace element. *Archives of Toxicology*. 80. (1 – 9).

SURES, B., SIDALL, R., TARASCHEWSKI, H., 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitology Today*. 15. (16 - 21).

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).

SURES, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. 20. (170 – 177).

SUTTLE, N., F. 2010. Mineral Nutrition of Livestock. 4th Edition. CABI Publishing, USA. ISBN: 9781845934729

SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, R., 2001. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microscopy Research and Technique*. 55. (208 – 222).

TALKE, I., N., HANIKENNE, M., KRAMER, U. 2006. Zinc – dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*. 142. (148 – 16).

TEIMOORI, S., SABOUR YARAGHI, A., MAKKI, M., SHAHBAZI, F., NAZMARA, S., ROKNI, M., MESDAGHINIA, A., 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).

TENORA F., BARUS, V., KRACMAR, S., DVORACEK, J. 2000. Concentrations of some heavy metals in *Ligula intestinalis* plerocercoids (Cestoda) and *Philometra ovata* (Nematoda) compared to some their host (Osteichthyes). *Helmintologia*. 37. (15-18).

- TIAN, X., ZHENG, Y., LI, Y., SHEN, Z., TAO, L., DOU, X., QIAN, J., SHEN, H. 2014. Psychological stress induced zinc accumulation and up-regulation of ZIP14 and metallothionein in rat liver. *BMC Gastroenterology*. 14. (32).
- TOMLINSON, D., J., SOCHA, M., T., DEFRAIN, J., M. 2008. Role of trace minerals in the immune system. *Micro minerals in of trace minerals in the immune system. The Mineral Nutrition of Livestock*, 3th edition. (39 – 52).
- 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., BORRAS M. 2006. Cadmium and lead concentrations in *Skrjabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). *Environmental Pollution*. 143. (1–5).
- TORRES, J., EIRA, C., MIQUEL, J., FORONDA, P. AND FELIU, C. 2011. Cadmium and lead concentrations in *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) and *Rodentolepis microstoma* (Cestoda), and in their definitive hosts, *Rattus rattus* and *Mus domesticus* in El Hierro (Canary Archipelago, Spain). *Acta Parasitologica*. 56. (320–324).
- UCHINO, E., TSUZUKI, T., INOUE, K. 1990. The effect of age and sex on seven elements in Sprague – Dawley rat organs. *Lab animals Magazine* 24. (253 – 264).
- Watwe, S., Dardi, C., K., 2008. *Hymenolepis diminuta* in a child from rural area. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 51. (149–150).
- WAISBERG, M., JOSEPH, P., HALE, B., BEYERSMANN, D. 2003 Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192. (95–117).

WEAVER, V., M., KIM, N., S., LEE, B., K., PARSONS, P., J., SPECTOR, J., FADROWSKI, J., JAAR, B., G., STEUERWALD, A., J., TODD, A., C., SIMON, D., SCHWARTZ, B., S. 2011. Differences in urine cadmium associations with kidney outcomes based on serum creatinine and cystatin C. *Environmental Research*. 111. (1236–1242).

YAGHMAEI, P., ESFAHANI-NEJAD, H., AHMADI, R., HAYATI-ROODBARI, N., EBRAHIM, A. 2013. Maternal zinc intake of Wistar rats has a protective effect in the alloxan-induced diabetic offspring. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 69. (1). (35 – 43).

YATOO, M., SAXENA, A., DEEPA, P., M., HABEAB, B., P., DEVI, S., JATAV, R. S., DIMRI, U. 2013. Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary World*. 6. (12). 963 – 967.

ZHAO, F., J., LOMBI, E., BREEDON, T., MCGRATH, S., P. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment*. 23. (507 – 514).