Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Vliv helmintů na snížení koncentrace těžkých kovů v *in vitro* modelu střeva

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Adéla Soukupová

Obor studia: Výživa a potraviny, AMD

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv helmintů na snížení koncentrace těžkých kovů v *in vitro* modelu střeva" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za jeho cenné rady, čas a pomoc při zpracování této práce.

Vliv helmintů na snížení koncentrace těžkých kovů v *in vitro* modelu střeva

Souhrn

Hlavním cílem helmintů je přežít v hostitelském organismu tak dlouho, jak jen to je možné. Z tohoto důvodu se u helmintů vyvinula celá řada složitých mechanismů, pomocí kterých se úspěšně vyhýbají imunitnímu systému svého hostitele, nebo pomocí kterých jeho imunitní systém regulují. Kromě toho bylo také prokázáno, že některé druhy helmintů jsou ve srovnání se svými hostiteli schopni bioakumulace toxických prvků ve vyšších koncentracích. Tím mohou být užiteční nejen pro hostitelský organismus, ale mohou být také využíváni jako bioindikátory znečištění prostředí. S ohledem na akumulaci kovů se jako nejslibnější skupiny organismů ukázaly *Cestoda* a *Acanthocephala*.

Pomocí *in vitro* metody využívající buněčný model lidského střeva kultivovaný společně s tasemnicí *Hymenolepis diminuta* a olovem byly simulovány co nejpřesnější podmínky v gastrointestinálním traktu člověka. Touto metodou byla sledována schopnost tasemnic absorbovat olovo z prostředí v porovnání se střevními buňkami. Obsah olova ve vzorcích byl stanoven pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Koncentrace olova vstřebaného strobilou tasemnic byla po první expozici olova 1,6 × vyšší než v případě buněk střevního epitelu bez přítomnosti *H. diminuta*. Měření po 12h intervalu však ukázalo nárůst koncentrace olova absorbovaného buňkami střevního epitelu, kdy v buňkách bylo 10,6 × více olova, než ve strobile tasemnice. Tento rozdíl může být způsoben malým množstvím analyzovaných vzorků, nebo také anorganickou formou, ve které bylo olovo podáváno, a které tasemnice po delší době expozice vyloučila zpět do média.

Doposud nebyla publikována žádná studie zabývající se absorbancí těžkých kovů střevními buňkami v interakci s *H. diminuta*. Dosažené výsledky jsou tedy předběžné a slouží zejména pro optimalizaci použité kultivace buněk s *H. diminuta*. Proto navrhujeme další analýzu *in vitro* modelu lidského střeva pro získání jednotnějších dat.

Klíčová slova: helminti; těžké kovy; buněčné linie; kultivace; olovo

Effect of helminths

Summary

The main goal of helminths is to survive in the host organism for as long as possible. For this reason, helminths have developed a number of complex mechanisms by which they can successfully avoid their host's immune system, or by which they regulate the immune system itself. In addition, some helminth species have also been shown to be able to bioaccumulate toxic elements at higher concentrations compared to their hosts. This can be useful not only for the host organism, but also allows helminths to be possibly used as bioindicators of environmental pollution. With regard to metal accumulation, *Cestoda* and *Acanthocephala* have proved to be the most promising groups of organisms.

Using the *in vitro* method with the cellular model of the human intestine, cultivated together with *Hymenolepis diminuta* and lead, the most accurate conditions in the human gastrointestinal tract were simulated. By this method, the ability of tapeworms to absorb lead from the environment was compared to intestinal cells. The lead content of the samples was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry.

After the first lead exposure the concentration of lead absorbed by the tapeworms strobile was 1.6 times higher than in the case of intestinal epithelial cells without the presence of *H. diminuta*. However, measurements after the 12h interval showed an increase in the lead concentration absorbed by the intestinal epithelial cells, with 10.6 times more lead in the cells than in the tapeworm strobile. This difference may be be caused by the small amount of samples analyzed, or also to the inorganic form in which the lead was administered and which tapeworms expelled back into the medium after prolonged exposure.

To date, no study has been published on the absorption of heavy metals by intestinal cells in interaction with *H. diminuta.* Thus, the results obtained are preliminary and serve in particular to optimize the cell culture used with *H. diminuta*. Therefore, we propose a further analysis of the *in vitro* model of the human intestine to obtain more uniform data.

Keywords: helminths; heavy metals; cell lines; cultivation; lead

Obsah

1 Úvod 7
2 Cíl práce 9
3 Literární přehled 10
3.1 Parazitičtí helminti 10
3.1.1 Kmen Ploštěnci (*Platyhelminthes*) 10
3.1.2 Kmen Hlístice (*Nematoda*) 12
3.1.3 Kmen Vrtejši (*Acanthocephala*) 13
3.2 Vztah hostitel – parazit 14
3.2.1 Gastrointestinálnáí imunitní systém hostitele 15
3.2.1.1 Specializovaný multifaktoriální slizniční imunitní systému 17
3.2.2 Obranné mechanismy parazitů 19
3.2.2.1 Biotransformační enzymy parazitů 21
3.3 Metabolismus a transport těžkých kovů v organismech 24
3.3.1 Těžké kovy 24
3.3.2 Vliv parazitů na fyziologii hostitele 29
4 Materiál a metodika 32
4.1 Materiál 32
4.2 Metodika 32
4.2.1 Paraziti 32
4.2.2 Kultivace buněčných linií 32
4.2.3 Založení 24-jamkové destičky 33
4.2.4 Testování absorbce olova 33
4.2.5 Chemická analýza 33
4.2.6 Statistika 33
5 Výsledky 35
6 Diskuze 38
7 Závěr 44
8 Použitá literatura 45
9 Seznam použitých zkratek 57
10 Seznam použitých obrázků a tabulek 58

1 Úvod

Parazitičtí helminti indukují v hostiteských organismech oxidační stres, avšak navzdory tomuto faktu, bylo u střevních parazitů sledováno vyrovnané soužití mezi hostitelem a parazitem. Jako možným vysvětlením se zdá být antioxidační aktivita parazitů. Antioxidační systém helminů obsahuje celou řadu enzymatických i neenzymatických antioxidantů, které mohou sloužit jako obranný mechanismus proti volným radikálům generovaných organismem jejich hostetele. A právě některé z těchto antioxidantů, jako je kataláza, superoxid dismutáza, vitamin E atd., se podílejí na antioxioxidačních interakcích, které slouží k zabránění kovy zprostředkované tvorbě volných radikálů (Chiumiento & Bruschi, 2009). Oxidační stres, zprostředkovaný těžkými kovy má za následek různá poškození organismu, především jater, ledvin, centrální nervové soustavy a DNA (Valko et al. 2006).

Hlavním cílem helmintů je přežít v hostitelském organismu tak dlouho, jak jen to je možné. Z tohoto důvodu došlo u helmintů k vývoji řady složitých mechanismů, pomocí kterých se vyhýbají imunitnímu systému hostitele, nebo pomocí kterých samotný imunitní systém svých hostitelských organismů regulují (Peón et al. 2012).

Již počátkem 20. století byla prokázána schopnost organismů koncentrovat ve svém těle škodliviny ze svého prostředí. A právě u některých parazitických helminů byla prokázána vysoká schopnost akumulovat těžké kovy. Z počátku bylo v tomto směru nejvíce prostudovanou oblastí vodní prostředí, ve kterém zkoumali nejčastěji skupiny *Cestoda* a *Acanthocephala* ze střev ryb, které akumulovaly těžké kovy v koncentacích, které mnohonásobně převyšovaly koncentrace v tkáních jejich hostitelů (Sures & Siddall 1999; Poulin 1999; Sures 2004; Al-Bayati 2018).

První studie, která potvrdila hypotézu o prospěšném efektu helmintů na hostitele byla publikována v roce 1999, kde byl testovaným organismem jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*), který byl *in vivo* infikován *Pomphorhynchus laevis*. Testované infikované organismy prokazatelně vykazovaly menší koncentrace olova v porovnání s organismy bez helmintů (Sures & Siddall 1999). Helminti se tak jeví jako užitečné bioindikátory znečištění prostředí. V případě, že mohou být polutanty, tedy v tomto případě těžké kovy, detekovány u *Acanthocephala* a *Cestoda*, pak jsou biologicky dostupné, a tedy schopné procházet skrz biologické membrány. V posledních letech proběhla celá řada studií, zaměřených na akumulační potenciál helmintů parazitujících na suchozemských savcích, které vykazují vysokou akumulační kapacitu a zároveň také zvýšenou odolnost vůči těmto prvkům.

V závislosti na zvoleném druhu helmintů, hostiteli či zvoleném polutantu se výsledky značně liší. Avšak stále se jedná pouze o zlomek prozkoumaných druhů, a proto si tato problematika žádá dalších zkoumání (Sures 2006; Sures & Radszuweit 2007; Marcogliese & Pietrock 2011; Gismondi et al. 2012; Chang & Flores 2015; Sures et al. 2017).

2 Cíl práce

Hypotéza: Helminti mají schopnost vstřebávat těžké kovy a snižovat jejich koncentraci v trávicím traktu. Tím mohou snížit následky, které těžké kovy vyvolávají.

Cílem práce je vytvoření *in vitro* metody vhodné pro testování vlivu expozice helmintů těžkými kovy při využití buněčného modelu lidského střeva. Dílčím cílem je změřit vlastní koncentraci těžkých kovů v helmintu, buňkách a kultivačním mediu a potvrdit možnost využití této metody pro další testování.

3 Literární přehled

3.1 Parazitičtí helminti

Helminti jsou bivalentně souměrné mnohobuněčné organismy, které tvoří různorodou skupinu živočichů s velmi variabilním ontogenetickým vývojem. Během svého vývoje využívají jednoho, či více hostitelů a prochází různým počtem morfologicky odlišných larválních stádií, využívajících několik typů hostitele. V definitivním hostiteli dochází k pohlavnímu dospívání a následně sexuální reprodukci helmintů (Volf et al. 2007). Do skupiny helmintů řadíme dále zástupce neodermátních platyhelmintů (*Trematoda, Cestoda, Monogenea*), hlístic (*Nematoda*) a vrtejšů (*Acanthocephala*).

3.1.1 Kmen Ploštěnci (*Platyhelminthes*)

Třída Motolice (*Trematoda*)

Odhaduje se, že třída Motolic obsahuje více než 20 tisíc druhů. Motolice jsou rozděleny do dvou podtříd (*Digenea, Aspidogastrea*), téměř všechny motolice jsou parazité měkkýšů a obratlovců. Všechny druhy jsou endoparazité, přežívající ve žlučových cestách, zažívacím traktu, nebo cévním systému konečného hostitele (Chiumiento & Bruschi 2009).

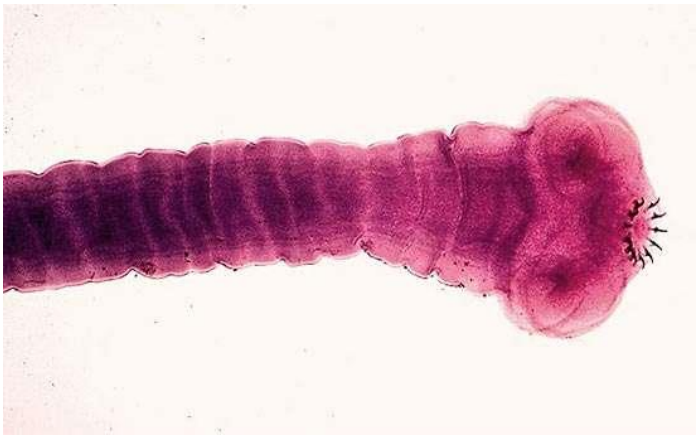
Velikost většiny helmintů třídy Trematoda se pohybuje do několika milimetrů. Avšak existují i výjimky, které mají až několik metrů (čeleď *Didymozoidea*). Tělo mají Trematoda dorzoventrálně zploštělé, kopinatého či oválného tvaru (Obr. 1), s jednou či více přísavkami, které mají především přichycovací funkci. U některých zástupců však přísavky mohou být nahrazeny jinými strukturami. Povrch těla motolic tvoří metabolicky aktivní tegument, který slouží k příjmu potravy (Volf et al. 2007).

Obr. 1: Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) (upraveno dle proprofs.com)

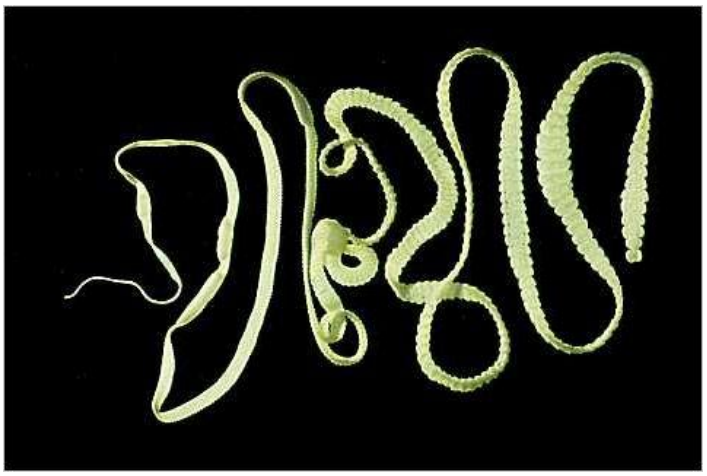
Třída Tasemnice (*Cestoda*)

U tasemnic se jedná o třídu obligátních parazitů ve střevech obratlovců (Shuker 2001). Skupina má přes 5000 známých druhů tasemnic, až na pár výjimek jde o parazity s vícehostitelským životním cyklem. Z medicínského hlediska může jít o závažné patogeny, a to především ve stádiu larev napadajících obratlovce (Volf et al. 2007).

Tělo tasemnic se dělí na skolex (hlavičku) a segmentovanou strobilu (tělo). Významným taxonomickým znakem jsou nápadné přichycovací orgány (Obr. 2), které najdeme na skolexu. Strobila tasemnic je tvořena samostatnými reprodukčními jednotkami, které představují články (proglotidy). Tasemnice mohou mít tělo nečlánkované (monozoické), tedy tvořené jedním článkem. Nebo jejich tělo může být tvořeno více články (polyzoické) (Obr.3) (Volf et al. 2007). Je zajímavé, že tasemnicím chybí všechny části zažívacího systému. Místo toho využívají živin svého hostitele, které absorbují celým povrchem těla, který tvoří tegument (Shuker 2001).



Obr. 2: Tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*) (upraveno dle researchgate.net)



Obr. 3: Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) (upraveno dle web.stanford.edu)

Třída Jednorodí (*Monogenea*)

Třída *Monogenea,* v češtině také označována jako žábrohlísti. Jedná se o parazity s vysokou specifitou k druhu hostitele i orgánové lokalizaci. Nejčastěji však parazitují na rybách, pro které mohou být nebezpečnými patogeny. *Monogenea* je kosmopolitně rozšířená skupina, která zahrnuje přes 5000 druhů (Volf et al. 2007). Třída *Monogenea* se vyznačuje tím, že většina jejích členů jsou ektoparazité, tedy že žijí na vnější straně orgánů svého hostitele (nejčastěji kůže a žábry) (Shuker 2001). Avšak mezi nimi lze najít jedince, kteří jsou endoparazité (např. kloaka obojživelníků, střevo ryb apod.) (Volf et al. 2007).

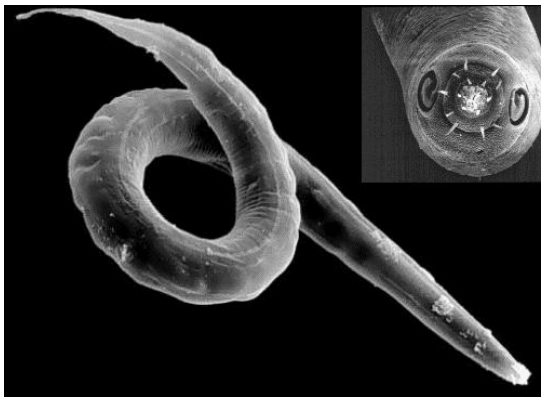
Jedná se o helminty velmi malých rozměrů (0,03 až 20 mm). Pro klasifikaci mezi jednotlivými taxony slouží opisthaptor (Obr. 4). Jedná se o výrazný přichycovací orgán, který se nachází v zadní části těla dospělých jedinců. Dalším výrazným poznávacím rysem mohou být typická vyústění hlavových žláz. Sekrety z nich napomáhají přichycení na hostitele (Volf et al. 2007).

Obr. 4: *Gyrodactylus aquatic* (upraveno dle fotolia.com)

3.1.2 Kmen Hlístice (*Nematoda*)

Hlístice jsou kmenem, u kterého bylo rozpoznáno a popsáno přes 20 tisíc druhů, což z nich dělá jednu z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin živočichů. Jedná se o parazity obratlovců, bezobratlých a rostlin, přičemž spousta jedinců žije i volným způsobem života. U některých druhů dochází ke střídání parazitujících a volně žijících generací. Parazitické hlístice obratlovců nejčastěji nalezneme v trávicím traktu (Volf et al. 2007).

Velikost a délka těla je u hlístic různorodá (Volf et al. 2007). Nejmenší hlístice jsou mikroskopických rozměrů, jiné druhy dosahují přes metr délky (Shuker 2001). Typickým rysem těla hlístic je jeho kruhový průřez (Obr. 5) (Volf et al. 2007).

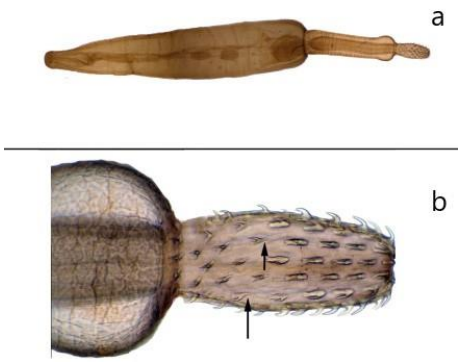


Obr. 5: Škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) (upraveno dle mmdskeletal.weebly.com

3.1.3 Kmen Vrtejši (*Acanthocephala*)

Acanthocephala, neboli vrtejši, patří mezi pseudocoelní organismy rozšířené po celém světě. U tohoto kmene bylo objeveno a popsáno asi 1100 druhů (Volf et al. 2007). Vrtejši v dospělosti parazitují výhradně v tenkém střevě obratlovců. Nejčastějším konečným hostitelem bývají ryby a ptáci. Vrtejši nemají, stejně jako tasemnice, trávicí soustavu. Výživa je tedy zajišťována příjmem živin celým povrchem těla – tegumentem (Volf et al. 2007).

Dospělí jedinci mají válcovité tělo, o délce od 1 mm do více než 60 cm (Shuker 2001). Tělo vrtejšů dělíme do dvou částí – přední část (praesoma) a zadní část (metasoma). Přední část zahrnuje především chobotek (Obr. 6) , který slouží k přichycení vrtejšů ve střevě hostitele. V zadní části se nachází především reprodukční orgány (Volf et al. 2007).



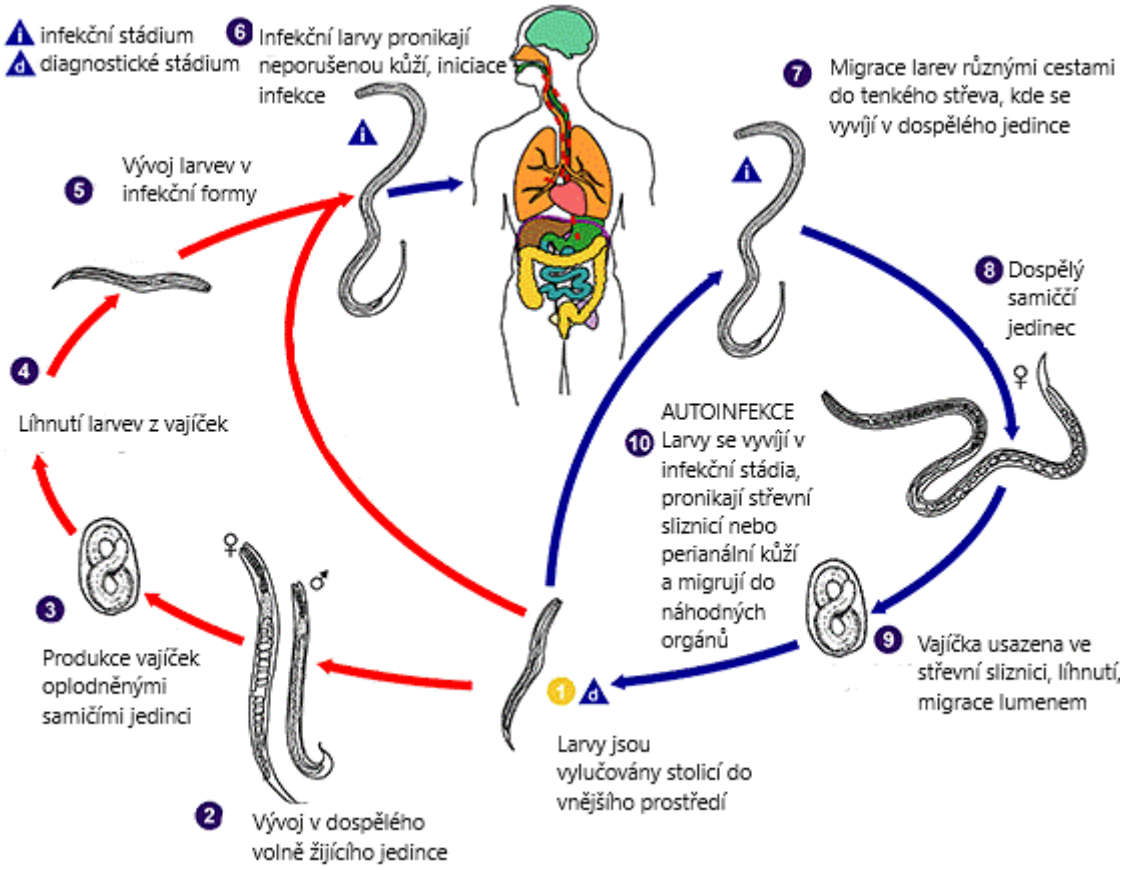
Obr. 6: *Pomphorhynchus laevis*: a) celé tělo; b) chobotek (upraveno dle naturalhistoryintechnology.wordpress.com)

3.2 Vztah hostitel – parazit

Jednou z nejvíce rozšířených životních strategií organismů je právě parazitismus. Jedná se o významný fenomén v evoluci, který tvoří vztah parazitického organismu a jeho hostitele (Jíra 1998). Zpravidla je s parazitismem spojováno patogenní působení na hostitelský organismus, to znamená, že hostitel je ovlivňován negativně, přičemž parazit má z tohoto soužití prospěch. Avšak snahou parazita není hostitelský organismus zabít, ale ideálně najít „rovnováhu" v soužití, aby mohl využívat hostitelský organismus k reprodukci a zachování existence vlastního druhu po co nejdelší dobu. Pro parazita je tedy z hlediska dlouhodobé životní strategie smrt hostitele nevýhodná, jelikož tím odsoudí k zániku i sam sebe (Gaba et al. 2005; Hall et al. 2009). Rovnováha mezi většinou hostitelů a parazitů je výsledkem pozoruhodné dlouhodobné koevoluce obou organismů, především pak na úrovni imunitní obrany hostitele a úniku parazita před imunitním systémem hostitele (Moreau & Chauvin 2010).

Během svého vývojového cyklu helminti procházejí několika vývojovými stádii, kdy se různě šíří v populacích mezihostitelů a hostitelů (Obr. 7). Pokud v hostiteli probíhá vývoj sexuálních stádií, pak jej označujeme jako konečného (definitivního) hostitele. Jako mezihostitele označujeme organismus, ve kterém dochází k vývoji ostatních nepohlavních stádií. Avšak hostitelský organismus může být poměrně často definitivním hostitelem a zároveň i mezihostitelem (Jíra 1998).

Jelikož životní podmínky ve vnějším prostředí a v organismu hostitele se podstatně liší, jsou helminti obdařeni četnou řadou biologických adaptací. Antiimunitní adaptace, neboli také úniková, je podstatným typem biologického přizpůsobení, jež představuje ochranu před obranými mechanizmy hostitele. Dále jsou helminti schopni modulace imunitních reakcí a útlumu zánětlivých procesů. Adaptací na hostitelský organismus oplývá řada parazitů, díky čemuž mají schopnost snižovat imunitní odpověď hostitelského organismu (Čermáková et al. 2009).



Obr. 7: Vývojový cyklus helmintů (upraveno dle cdc.gov)

3.2.1 Gastrointestinálnáí imunitní systém hostitele

Imunitní obrana může být vnímána jako jeden z nejvíce sofistikovaných produktů mezidruhových interakcí. Je výsledkem častých a dlouhých "závodů ve zbrojení" mezi hostiteli a parazity. V důsledku toho hostitelé vyvinuli komplexní strategie, aby se zabránilo negativním účinkům parazitů, a parazité si vyvinuli mnoho adaptivních odpovědí, jak odolávat a vyhnout se obraně hostitele (Medzhitov & Janeway 1997). Imunitní systém může být rozdělen na vrozenou a získanou imunitu, a tyto dva typy imunity jsou navzájem úzce propojeny. Zatímco vrozená imunita je vlastní všem druhům mnohobuněčných organismů, získaná imunita existuje pouze u obratlovců. V získané imunitě jsou dominatními silami reakce antigen-protilátka, při které hrají důležitou roli T-lymfocyty a B-lymfocyty (Kohchi et al. 2009). Naproti tomu vrozená imunita je primitivním profylaktickým systémem, pro odstranění cizorodých látek, kde jsou významné dendritické buňky, neutrofily a makrofágy. Buňky podílející se na vrozené imunitě rozpoznavají cizí látky a regulují aktivaci jiných buněk produkcí celé řady cytokynů. Buňky mohou fagocytovat cizorodé látky a poté aktivovat získaný imunitní systém tím, že na svém membránovém povrchu prezentují část fagocytované natrávené látky (Takeda & Akira 2005). Během tohoto procesu rozpoznání a reakce

(fagocytózy) se produkují volné radikály a to zejména reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Reaktivní kyslík (RO), který se objevuje během fagocytózy vzniká na membránách endosomu fagocytujících buněk za účasti nikotinamidadenin dinukleotid fosfátu (NADPH) oxydasy v buněčných membránách (Minakami & Sumimoto 2006).

Volný radikál se charakteristicky stabilizuje získáním či uvolněním elektronu. Tím dojde ke změně struktury prvotní substance na volný radikál a následně proces pokračuje dál, proto má radikálové poškození obvykle podobu řetězové reakce. Reakce je ukončena přítomností takzvaného zhášeče volných radikálů, nebo reakcí dvou volných radikálů za současného vzniku stabilní molekuly. Během života jsou oxidačnímu stresu, který způsobuje nerovnováha mezi oxidačním a antioxidačním systém, vystaveny všechny typy biomolekul (Havelková 2006; Pláteník 2009). Aby se zabránilo oxidačnímu stresu, buňky vytváří základní antioxidační enzymy (např. superoxid dismutáza - SOD; kataláza - CAT; glutation peroxidáza - GPX a další), které detoxikují ROS a opravují jimi způsobené škody. Silný oxidační stres může zapříčinit poškození buněk až jejich usmrcení (Greguška 1997).

K nejvýznamnější a nejkomplexnější interakci se zevním prostředím dochází v trávicím traktu organismů. Zajištění ochrany před hojným počtem patogenních organismů a látek představuje gastrointestinální (GI) imunitní sýstém. Lidský GI trakt je jedinečný orgán, který má v těle dvojí roli. Udržuje střevní integritu, tedy celistvost, a ve svém důsledku i homeostázu celého organismu. A na druhou starnu musí odlišit neškodné organismy a složky výživy, které pro organismus nepředstavují zdravotní riziko, od četné řady antigenních patogenních stimulů (Závada 2010). Je totiž důležité, aby organismus zůstal tolerantní vůči neškodným potravinám, bakteriím a vlastním antigenům, stejně tak jako je důležité zachování konstatní intenzity odezvy imunitního systému vůči patogenům. Toho je dosaženo přítomností vysoce účinné mukózní bariéry a specializovaného multifaktoriálního slizničního imunitního systému, který se skládá ze střevní epiteliální bariéry, lamina propria a organizované střevní lymfoidní tkáně (GALT) (Ahluwalia et al. 2017). GALT se skládá z dalších několika částí, které jsou funkčně i anatomicky rozdílné – může být tedy rozdělena na peyerovy pláty, izolované lymfoidy folikulů a mezenterické lymfatické uzliny (Mowat 2003; Závada 2010). Slizniční povrch gastrointestinálního traktu tvoří unikátní anatomickou a fyziologickou niku, která slouží jako dominantní strukturní a imunologická bariéra proti patogenům. Enterocyty, které tvoří jednovrstvý slizniční epitel navíc absorbují vodu a živiny během trávicího procesu, což je pro přežití hostitele rozhodujícím faktorem.

3.2.1.1 Specializovaný multifaktoriální slizniční imunitní systému

Střevní epiteliální bariéra

Střevní epiteliárlní bariéra je největší slizniční povrch těla, složený z jedné vrstvy střevních epiteliálních buněk (IEC), které zaujímají u dospělého člověka průměrně 200 m^2 (Peterson & Artis 2014). IEC společně se slizniční vstvou vytvářejí hlavní fyzikální a biochemickou bariéru, která odděluje střevní lumen a jeho obsah od buněk v lamina propria. Střevní epiteliální bariéra obsahuje enterocyty, endokrinní buňky, membránové epitelové buňky (M-buňky) a Panethovi buňky, které společně předstvují obranu proti antigenům, toxinům, patogenním organismům a zároveň je selektivně propustná pro umožnění absorbce živin, elektrolytů a vody (Bischoff et al. 2014). Tato selektivní bariérová funkce je udržováná prostřednictvím komplexní sítě proteinů nazývaných těsná spojení, která spojují přilehlé epiteliální buňky a zárověň utěsňují mezibuněčné prostory. Exprese těchto proteinů ve střevě je intenzivně regulována pro udržení integrity a střevní propustnosti (Förster 2008).

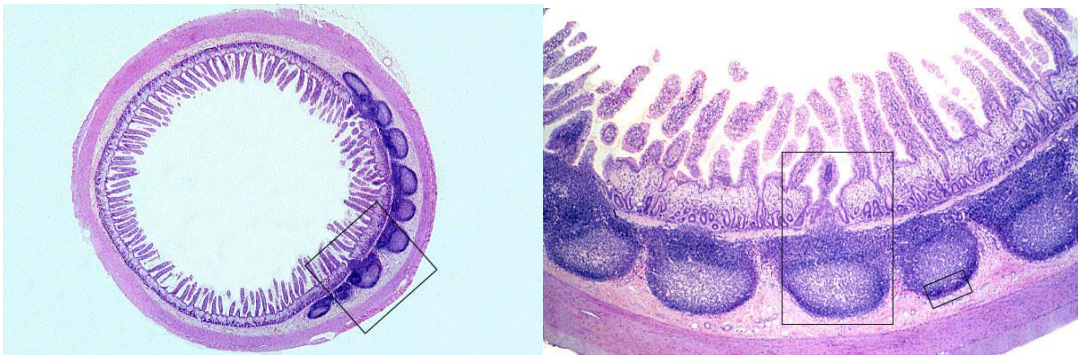
Lamina propia

Vrstva pojivové tkáně, která leží pod střevním epitelem, tak lze jednoduše charakterizovat lamina propria. Jedná se o místo, kde se nachází většina střevních imunitních buněk, které jsou důležitým faktorem v imunitní odpověď organismu, která vede k zabránění vstupu a následného šíření patogenů přes střevní sliznici (Ahluwalia et al. 2017). Lze si ji tedy představit jako součást T-lymfocytů a B-lymfocytů, makrofágů, natural-killer buněk (NK-buněk), plazmatických buněk, dedritických buněk a žírných buněk (Závada 2010), produkující převážně polymerní IgA imunoglobuliny (Acheson & Luccioli 2004; Mowat & Agace 2014). Syntéza a sekrece IgA imunoglobulinů je podstatným imunitním mechanizmem travicího traktu. Lamina propria je spolu s epitelem považována za místo s nejvyšším počtem T-lymfocytů v lidském organismu a většina těchto lymfocytů jsou buňky s antigenem, tj. buňky, které již byly v kontaktu s antigeny v Peyerových plátech (Atreya & Neurath 2010; Závada 2010).

3.2.1.1.1 Organizovaná střevní lymfoidní tkáň (GALT)

Peyerovy pláty (PP)

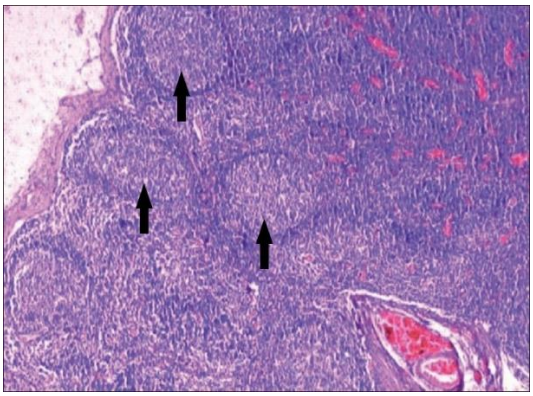
Peyerovy pláty (PP) (Obr. 8), které se typicky nacházejí v distálním ileu, jsou považovány za primární indukční místo pro imunitní odpověď sliznice. PP jsou organizované struktury, jejichž hlavní funkcí je rozpoznání antigenů, které zajišťují speciální buňky, nazývané jako M-buňky. M-buňky zprostředkovávají vzorkování a transport luminálních antigenů, ty následně přicházejí extraluminálně do kontaktu s lymfocyty, makrofágy a dendritickými buňkami (Mowat 2003; Mabbott et al. 2013). Lymfoblastům, tedy nezralým lymfocytům, jsou zde prezentovány v lymfoidních folikulech antigeny, díky čemuž dojde k jejich aktivaci a následné migraci do aferentních lymfatik, kde se mění na B a T lymfocyty (MacDonald 2003; MacDonald 2005).



Obr. 8: Peyerovy pláty (upraveno dle chegg.com)

Izolované lymfoidy folikulů (ILF)

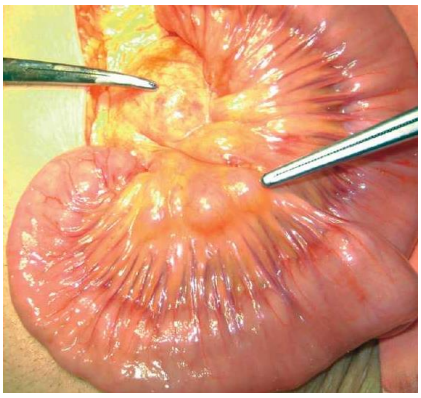
Izolované lymfoidy folikulů (ILF) (Obr. 9) lze nalézt po celé délce tenkého i tlustého střeva. Jedná se o jenotlivé lymfoidní folikuly, bez organizace do jakýchkoli vyšších celků, které jsou strukturně a funkčně podobné jednotkám, které tvoří PP a jsou považovány za ekvivalentní nebo komplementární systém s PP, sloužící k indukci IgA reakcí (Hamada et al. 2002). Tyto folikuly ve sliznici střeva obsahují B-lymfocyty a dendritické buňky, a každý z těchto slizničních folikulů je lemován oblastmi tkání bohatými na T-lymfocyty a kryt epitelem, který obsahuje M-buňky. Zde je hlavní funkcí M-buněk transport bakterií a antigenů ze střeva směrem dovnitř folikulů, kde aktivují lymfocyty a ty následně migrují cévami do krevního oběhu (Neutra et al. 2001; Newberry 2005).



Obr. 9: Izolované lymfoidy folikulů (upraveno dle researchgate.net)

Mezenterické lymfatické uzliny (MLN - Mesenteric lymph nodes)

Všechny lymfatické uzliny mají v podstatě stejnou stavbu a množství buněk, a právě mezenterické lymfatické uzliny (MLN) jsou největšími uzlinami v těle (Obr. 10). Jejich stěžejními funkcemi je filtrace lymfy pochazející ze střeva a iniciování imunitních odpovědí proti příchozím antigenům buď ve volné formě, nebo pomocí dendritických buněk, které migrují z lamina propria (Willard-Mack 2006). Kromě velkého počtu lymfocytů obsahují MLN makrofágy a antigenpresentující buňky (APC), které zde mohou buď interagovat s neaktivovanými lymfocyty, nebo dále diferencovat již aktivované (Perez-Lopez et al. 2016).



Obr. 10: Mezenterické lymfatické uzliny (upraveno dle medind.nic.in)

3.2.2 Obranné mechanismy parazitů

Existuje celá řada vysvětlení, která popisují, jak helmintičtí parazité dokáží přežít v nepřátelských podmínkách svých hostitelů (Chiumiento & Bruschi 2009). Na rozdíl od jiných parazitů jsou gastrointestinální helminti makropatogeny, tak tedy nemohou být fagocytováni, pomocí makrofágů a jiných fagocytyckých buněk, z tohoto důvodu se vytvořila celá řada efektorových mechanizmů jak těmto parazitům odolávat. Ty zahrnují aktivaci a mobilizaci

eozinofylů, žírných a NK-buněk, či T-lymfocytů a B-lymfocytů a pokud je infekce lokalizována na povrchu sliznice, pak jsou do imunitní odpovědi zapojeny pohárkové buňky produkující hlen (Johnston et al. 2009). Antihelmintická odpověď je považována za odezvu adaptivní imunity koordinované především pomocí T-helperů druhého typu (Th2), které produkují interleukiny (IL). Tyto chemické signály mobilizují další buňky, příkladem je řízení izotopového přepínání, kdy následně mohou být produkovány vysoce afinitní imunogobuliny (Ig-G, Ig-E a Ig-A). Paraziticti helminti jako skupina vylučují řadu molekul, které mají imunomodulační vlastnosti. Tyto molekuly mohou být klasické proteiny, včetně proteázových enzymů, glykolitických enzymů, inhibitorů proteázových enzymů, antigenů homologních s alergeny a lektinů. Avšak jelikož se složení vylučovaných molekul různí dle druhu helminta a je ovlivněno stupněm jejich životního cyklu, pak mohou pouze odrážet produkty fagocytózy (ROS, RNS) pomocí antioxidačních enzymů (McKay 2009; Motran et al. 2018).

Produkce antioxidačních enzymů je výsledkem adaptace na několik stresorů, jako je například aerobní metabolismus jejich hostitele, či jako ochrana proti ROS produkovaných imunitním systémem hostitelského organismu. Při zamezení interakce mezi ROS s povrchem těla parazita dojde zároveň k zabránění tvorby lipidových peroxidů, které vytvářejí cytotoxické karbonyly, molekuly odpovědné za napadení biologické struktury parazita a jeho následnou smrt. Současně kromě adaptace došlo u helmintů k vývoji různých mechanizmů úniku před imunitním systémem hostitele, jedním z nich je schopnost začlenit hostitelské molekuly do svého povrchu těla. Čímž se stává parazit pro imunitní systém hostitele "neviditelným", neboť ten jej rozezná jako součást hostitelského organismu (Volf et al. 2007; Moreau & Chauvin 2010). Schopnost helmintů modulovat imunitní systém hostitele je velmi důležitá pro setrvání v organismu hostitele po co nejdelší dobu (Chiumiento & Bruschi 2009; Oliveira & Oliveira 2002).

Enzymatické antioxidanty fungují ve dvou různých obranných liniích – primární a sekundární (Carocho & Ferreira 2013). Enzymy, jako je SOD, CAT a GPX, představují první linii při omezování škod způsobených volnými radikály v místě fosfolipidových membrán a biologických makromolekul (Rahman 2007). Avšak tyto enzymy nezaručují kompletní obranný účinek proti oxidačnímu poškození organismu, protože řada produktů jejich vlastní katalytické aktivity je vysoce reaktivních. Z tohoto důvodu buňky nevyužívají pouze enzymatické ochrany, ale i dalších antioxidačních systémů, které jsou schopny zachytit elektrony v průběhu vzniku radikálů (Chiumiento & Bruschi 2009). Enzymatický antioxidační

systém byl objeven *in vitro* i u celé řady parazitických hlístic (např. peroxiredoxin – PRX, který má zásluhu na odstranění peroxidu vodíku). Objev tohoto enzymového systému představuje významný pokrok směrem k pochopení, jak se parazitické hlístice vypořádávají s oxidačním stresem (Henkle-Dührsen & Kampkötter 2001).

3.2.2.1 Biotransformační enzymy parazitů

ROS mají buněčnou toxicitu především pro parazity, jako je *Schistosoma, Angiostrongylus, Dirofilaria,* kteří jsou nuceni změnit svůj metabolismus z aerobního na anaerobní v určitých fázích svého životního cyklu, čímž zamezují produkci ROS ve svých buňkách, které by dále zvýšilo jejich oxidační stres (Chiumiento & Bruschi 2009). Každý parazit vytváří své vlastní antioxidační systémy v různých množstvích v porovnání s jinými parazity (Drzik 2006).

Studie Smith & Bryant (1989) provedená na dvou střevních hlísticích, které infikovaly hlodavce, *Nippostrongylus brasiliensis* a *Nematospiroides dubius/Heligmosomoides polygyrus*, ukázaly, že dospělí jedinci *N. brasiliensis* byli ze střeva hostitele vyloučeni za 10 – 12 dní po nákaze, zatímco jedinci *N. dubius* / *H. polygyrus* přežili až po dobu několika měsíců. Rozdíl je způsoben skutečností, že tyto dva druhy hlístic nemají podobnou enzymatickou antioxidační aktivitu. *N. dubius* produkuje dvojnásobné množství SOD a čtyřnásobné množství CAT a glatathion reduktasy, než *N. brasiliensis*. Enzymatická antioxidační aktivita u parazitických hlístic nezáleží pouze na druhu, ale také na vývojové fázi, v které se daný parazit nachází. Během vývoje parazita v hostiteli lze sledovat různé fáze, které mají odlišnou morfologii, ale i rozdílnou schopnost přizpůsobit se vnějšímu prostředí, jakož i hostiteli. S tím souvisí různé množství produkce antioxidačních enzymů podle úlohy každé fáze, například ve fázi invaze je pozorována vysoká produkce těchto enzymů (Drzik 2006). Kromě své úlohy proti obrannému systému hostitele, může antioxidační aktivita hlístů zřejmě sloužit jako obranný mechanismus proti volným radikálům, což doprovází vychytávaní toxických prvků. Tato adaptace umožňuje parazitu přežít v zažívacím traktu, kde je ohrožen vysokou úrovní znečišťujících látek z životního prostředí, přijímaných z tráveniny. Bylo také prokázáno, že antioxidační látky produkované sekrečním systémem parazitů se zdají být schopny měnit antioxidační aktivitu hostitelského organismu (Dautremepuits 2002). Přehled parazitů a jejich taxonomické zařazení viz Tab. 1 (Volf et al. 2007).

Kmen Ploštěnci *(Platyhelminthes)* - Třída Tasemnice *(Cestoda)*

Tasemnice krysí *(Hymenolepis diminuta)* má každou část strobila s odlišnou strukturou a funkcí. U *H. diminuta* bylo zjištěno, že přední část strobila je metabolicky aktivnější, než zadní část. To může být příčinou vysoké koncentrace prvků, zjištěných v předních částech tasemnice (Horáková et al. 2016). *H. diminuta* parazitují na různých druzích savců (včetně člověka), ale jejich nejčastějším konečným hostitelem bývají hlodavci. Tento druh je velmi dobře uzpůsoben k životu v nepříznivých podmínkách tenkého střeva potkanů. Antioxidační aktivita *H. diminuta* zahrnuje glutation (GSH) spolu s antioxidačními enzymy (SOD, CAT a Glutation-S-transferasa - GST). Aktivita SOD je poměrně vysoká ve všech částech *H. diminuta*, oproti tomu CAT projevuje, ve srovnání s ostatními antioxidačními enzymy, jen druhořadou aktivitu. Největší podíl na celkové aktivitě enzymatického systému tvoří GST a SOD. GST přeměňuje toxické metabolity. Konjugací toxických metabolitů s GSH vznikají více rozpustné a lépe vylučitelné sloučeniny (Czeczot et al. 2012).

Kmen Hlístice *(Nematoda)*

Měchovec americký *(Necator americanus)* má u dospělých jedinců enzymatickou aktivitu v podobě GST, kromě toho je v sekrečních produktech přítomen Cu/Zn SOD. Naopak CAT a GPX jsou přítomny pouze jen v malých množstvích (Taiwo et al. 1999). U druhu *Nippostrongylus brasiliensis* byla popsána přítomnost GPX a SOD, jehož enzymatická úroveň se redukuje v průběhu zrání, je tedy nižší u více zralých parazitálních fází (Chiumiento a Bruschi 2009).

Škrkavka prasečí *(Ascaris suum)*, u tohoto druhu je ve všech stádiích životního cyklu parazita přítomen enzym PRX, což naznačuje důležitou roli jako hlavní detoxifikační prostředek ROS (Tsuji et al. 2000). Dalším antioxidačním enzymem, který byl u *A. Suum* objeven je GST (AsGST1), který vykazuje specifičnost s řadou modelových substrátů a vedlejších produktů peroxidace lipidů (Liebau et al. 1997). Haemonchus contortus, krevsající parazit přežvýkavců, vytváří GST enzym, který je schopný vázat hematin, což naznačuje alternativní roli tohoto enzymu v detoxifikaci nebo trasportu hem skupiny hostitele, nebo jiné příbuzné skupiny (Van Rossum et al. 2004).

Vlasovec kožní *(Onchocerca volvulus)*, u tohoto parazita byly popsány jak MnSOD, tak Cu/ZnSOD, intracelulární i extracelulární (Chiumiento a Bruschi 2009). *O. volvulus* neprodukuje CAT, ale v endosymbióze bakterie tohoto Filaria, Wolbachia, je přítomen DNA

kódující enzym, jenž je schopen nepřímo syntetizovat CAT také pro parazita (Henkle-Dührsen et al. 2001). Dalšími enzymy charakterizovanými u tohoto parazita jsou tři formy GST, které jsou charakterizované svou rozdílnou lokalizací v parazitu. OvGST1 je neglykosylovaná dimerní molekula, lokalizovaná na povrchu, zejména výčnělcích pokožky a v syncytiální epidermis (intracelulární kutikule) parazita (Chiumiento a Bruschi 2009). OvGST2, protein, distribuovaný uvnitř syncytialní epidermis, stejně jako v děložním epitelu dospělých jedinců. Různé lokalizace OvGST1 a OvGST2 naznačují zřetelnou roli těchto dvou enzymatických forem – OvGST1 je vylučován parazitem z podkoží do pokožky a působí na rozhraní hostitel/parazit, čímže je ochranou proti imunitní obraně hostitele, naopak OvGST2 se používá jako antioxidant ve fyziologickém buněčném metabolismu (Wildenburg et al. 1998). Třetí forma GST, OvGST3, je citlivá na oxidační stres, čímž je vymezena klíčová úloha tohoto enzymu – antioxidační obrana parazita (Liebau et al. 2000). U *O. volvulus* byly dále charakterizovány dva PRX enzymy – OvPRX1 a OvPRX2. Zejména OvPRX2 byl zaznamenán ve větší míře a lokalizován v pokožce a střevě dospělého jedince. Enzym GPX zdá se chybí, ale tento nedostatek může být kompenzován sekrecí GST během dospělé fáze parazita (Chiumiento a Bruschi, 2009).

Dospělí jedinci a larvy **Svalovece (*Trichinella spp.)***, mají vynikající antioxidační obranu ve srovnaní s "novorozenými larvami", protože musí čelit silné imunitní odpovědi na střevní úrovni a ve svalech (Bass a Szejda 1979). U *Trichinella pseudospiralis*, stejně jako *Trichinella spiralis*, byly rozpoznány dvě enzymatické formy SOD. U larválního stádia je ve svalech přítomna pouze jedna forma – Cu/Zn SOD (Chiumiento a Bruschi 2009).

U **kmene Vrtejši *(Acanthocephala)*** byl popsán antioxidační systém, který zahrnuje GPX, glutathion reduktasu, GST a vitamín E (Radovanović et al. 2015). Dále byla zjištěna vysoká aktivita GST u *P. laevis*, u kterých je i popsána extrémně zvýšená koncentrace některých toxických prvků. Vzhledem k tomu hraje GST klíčovou roli v eliminaci exogenních látek, jeho vysoká aktivita umožňuje parazitům přežít v přítomnosti vysokých koncentrací toxických prvků (Sures a Siddall 1999).

Tab. 1: Přehled parazitů z kapitoly a jejich taxonomické zařazení (viz. kapitola 3.2.2.1. Biotransformační enzymy parazitů)

Kmen	Třída	Zástupci	
Ploštěnci *(Platyhelminthes)*	Motolice *(Trematoda)*	*Schistosoma mansoni*	Krevnička střevní
	Tasemnice *(Cestoda)*	*Hymenolepis diminuta*	Tasemnice krysí
Hlístice (*Nematoda*)	*Secernentea/ Phasmida*	*Necator americanus*	Měchovec americký
		Onchocerca volvulus	Vlasovec kožní
	Chromadorea	*Nippostrongylus brasiliensis*	-
		Ascaris suum	Škrkavka prasečí
		Nematospiroides dubius/ Heligmosomoides polygyrus	-
	Adenophorea	*Trichinella spiralis*	Svalovec stočený
		Trichinella pseudospiralis	-
Vrtejši (*Acanthocephala*)	*Palaeacanthocephala*	*Pomphorhynchus laevis*	-

(dle Volf et al. 2007)

3.3 Metabolismus a transport těžkých kovů v organismech

3.3.1 Těžké kovy

Některé z výše uvedených enzymatických antioxidantů (např. SOD, CAT a GPX) či neenzymatických antioxidantů (např. vitamín C, vitamín E a karotenoidy) a další se podílejí na antioxidačních interakcích organismu proti tvorbě volných radikálů, zprostředkovaných kovy (Valko et al. 2006). Během posledních dvou desetiletí je termín "těžké kovy" používán pro označení skupiny kovů a polokovů. Většina prvků spadajících do skupiny těžkých kovů jsou přechodné prvky, které nemají plně zaplněny d-orbitaly, což umožňuje vytvářet kationtům těžkých kovů komplexní sloučeniny. Takové sloučeniny pak mohou mít redoxní aktivitu (Cibulka 1991; Duffus 2002). Všechny takzvané těžké kovy a jejich sloučeniny mají vysoce toxické, nebo ekotoxické vlastnosti, avšak v závislosti na koncentraci, které je organismus vystaven. Při zvýšených koncentracích těžkých kovů dochází v organismu k tvorbě komplexních sloučenin, které působí na buňky organismu toxicky. Těžké kovy jako arzen, olovo a kadmium mají k dispozici elektron pro vytvoření kovalentní vazby, tato vazba vzniká především mezi těžkým kovem a sulfhydrylovou skupinou proteinů (Ercal et al. 2001).

Arzen, kadmium a olovo jsou toxické prvky, patřící do již zmíněné skupiny těžkých kovů. Tyto prvky jsou v nízkých koncentacích takřka všudypřitomné, a to především díky

antropogenním vlivům (Clemens & Ma 2016). Převážná většina prvků vstupuje do těla živých organismů prostřednictvím perorálního příjmu a je vstřebávána v zažívacím traktu, kde dochází do kontaktu i s případným gastrointestinálním parazitem, který je schopen přijímat živiny z tenkého střeva hostitele celým povrchem těla (Dalton et al. 2004; Mushak 1991). V těle živého organismu dochází k přenosu kovů především krví, která je následně distribuje do ostatních tělních tkání, jako jsou játra, ledviny, mozek, plíce, slezina, kůže, a nebo i zuby. Kovy se zde pak mohou akumulovat do vysokých koncetrací a tak mít významně negativní dopad na zdraví živého organismu (Sinicropi et al. 2010). Prostřednictvím bioakumulace těžkých kovů ve vybraných živých organismech může být monitorován stupeň toxicity daného prvku. Studie z posledních desetiletí naznačují, že několik parazitárních helmintů je schopno bioakumulovat nápadně vyšší koncentrace těžkých kovů, než tkáně jejich hostitelů, což z nich činí dobré bioindikátory zněčistění kovy (Torres et al. 2004; Torres et al. 2006; Jankovská et al. 2009; Nhi et al. 2013; Al-Quraishy et al. 2014; Horáková et al. 2016; Horáková et al. 2018).

Prakticky všechny těžké kovy jsou v dostatečně vysoké koncentraci pro člověka toxické. Vzhledem ke koncentraci, ve které se vyskytují v životním prostředí, jsou olovo, arzen a kadmium předmětem největšího zájmu (Sharma et al. 2014). Existuje celá řada kovů, které jsou esenciální, tedy životně důležité pro správnou funkci metabolických procesů v organismu. Avšak u některých kovů po vstupu do biologických metabolických cyklů může dojít k biotrancsformaci. Tedy ke změně jejich valenčního stavu, či chemické formy, která pak může být pro organismus toxičtější než ta původní (Ercal et al. 2001).

Kadmium (Cd)

Většina biologicky dostupného kadmia v prostředí má antropogenní původ. Hlavními zdroji kontaminace prostředí je uvolňování při těžbě a tavení těžkých kovů a využívání fosfátových hnojiv s obsahem kademnatých nečistot. Kadmium se vyskytuje pouze v anorganické formě a jeho biologická dostupnost zavisí převážně na půdních podmínkách, kdy větší dostupnost vykazuje v aerobních půdách oproti anaerobním, ve kterých vzniká nerozpustný sulfid kademnatý (CdS) (Meharg et al. 2013; Clemens & Ma 2016).

Největší význam, z toxikologického hlediska, mají především sloučeniny Cd^{2+}. Nejpodstanější příjem alimentární cestou představuje kadmium absorbované z GI traktu, i přesto, že je zde poměrně špatně absorbováno (pouhých 5 – 8 %). Absorpce kadmia vzrůstá při nedostatku jiných prvků, jako je železo, zinek a vápník či při dietě s nízkým příjmem proteinů. Kadmium je tělem distribuováno krví, kde se váže na krevní buňky, metalothionein,

albumin a alfaglobuliny. Akutní i chronická toxicita kadmia a jeho solí byla prokázána pro celou řadu orgánů, jako jsou játra, ledviny, či plíce. V těchto orgánech dochází k jeho kumulaci, důvodem je obsah metalothioneinu, který je ke kadmiu vysoce afinitní (Vopršalová & Žáčková 1996; Gaurav et al. 2010). Kadmium je klasifikováno jako lidský karcinogen, mutagen a teratogen s toxickým účinkem na centrální nervový systém (Sloup et al. 2018).

Tvorba ROS s následným nárůstem oxidačního stresu je jedním z několika mechanismů toxicity kadmia. Dlouhodobá expozice vede ke zvýšení lipoperoxidace a způsobuje inhibici aktivity CAT, SOD a GPX, což vede k oxidačnímu poškozením jater, ledvin a varlat. K inhibici mitochondriální MnSOD dochází v důsledku nahrazení manganu kadmiem. Možným chelátovým činidlem pro kadmium je ve vodě rozpustný antioxidant thiamin – vitamin B1 (Casalino et al. 2002). Thiamin zabraňuje oxidačnímu poškození na buněčné membráně prostřednictvím přímé interakce s volnými radikály. Inhibiční mechanismus kadmia pro CAT je pravděpodobně způsoben imidazolovým zbytkem vazby His-74, která je nezbytná v rozkladu peroxidu vodíku (Gaurav et al. 2010).

Kadmium je z organismu vylučováno především prostřednictvím trávicího ústrojí, které zahrnuje i sekreci střevní stěnou a nebo také exkreci pomocí pankreatických šťáv. Nejpodstanější vylučování kadmia je skrze žluč, kdy zvýšený obsah kadmia se projeví až po dosažení určité míry hladiny v játrech (Vopršalová & Žáčková 1996).

Arzen (As)

Zemská kůra je v porovnání s kadmiem bohatší na arzen. Proto lze konstatovat, že ke kontaminaci životního prostředí arzenem ve stejné míře přispívají přirozené přírodní procesy, jako je například vulkanická činnost, tak i lidský faktor, jako je využití pesticidů, herbicidů a konzervačních přípravků na bázi arzenu, nebo i spalování uhlí (Zhu et al. 2014). Arzen může být přítomen v půdních roztocích v různých formách jako je arzenit, arzenát a různé pentavalentní methylované druhy arzenu (kyselina monomethylarsonová, kyselina dimethylarsinová). Jejich výskyt je velmi variabilní v závisloti na zdrojích kontaminace a půdních podmínkách. Například v anaerobních půdách převažuje arzen v oxidačním stavu As^{V}, zatímco za redukčních podmínek (například na polích se zaplavenou rýží) převládá forma As^{III} (Zhao et al. 2010; Zhao et al. 2013; Clemens & Ma 2016). Trojmocné sloučeniny arzenu, za zvýšené koncentrace ROS v buňkách, reagují jako sulfhydrylová činidla především

s proteiny a enzymy. Důsledkem toho dochází k poškození buněk a zvýšení rizika rakoviny. Uvádí se, že trojmocné sloučeniny mohou mít vliv na celou řadu orgánů, zejména játra, ledviny a kůži (Vahter 1983). Při pokusech na drůbeži bylo zjištěno, že orgány podílející se na absorpci, akumulaci a vylučování jsou na arzen velmi citlivé. Pokusy na kohoutech s použitím As_2O_3, dokázaly, že způsobuje zánětlivou reakci v žaludku, žaludečních žlázách, dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a slepém střevu (Falnoga et al. 2000).

Po absorbci z jakéhokoliv povrchu se 95-99 % veškerého anorganického arzenu nachází v červených krvinkách ve sloučenině s globinem hemoglobinu, v séru je tedy arzen vázán na bílkoviny. Krev arzen opustí po 24 hodinách, kdy je distribuován do jater, ledvin, plic a stěny trávicího traktu. Anorganický arzen způsobuje rozsáhlá poškození kombinací se snadno dostupnou sulfhydrylovou skupinou proteinů. Systémy sulfhydrylových enzymů, které jsou nezbytné pro buněčný metobolismus, jsou inhibovány a tím dochází k propustnosti kapilár a malých arteriol s vaskulární dilatací (Vahter 1998).

Toxicita arzenu klesá při methylaci organických forem, například na kyselinu methyl-arzonovou (MMA) a kyselinu dimethyl-arzinovou (DMA) (Vahter 1998). Methylace je považována za detoxifikační mechanismus, protože methylované formy arzenu jsou méně toxické, méně reaktivní a jsou rychleji vylučovány močí. Aby mohlo dojít k methylaci, musí být pětimocný arzen nejdříve redukován na trojmocný, k čemuž dochází skrz reakci arzenu s redukovanou formou GSH. Avšak míra methylace klesá spolu se zvyšující se koncentrací anorganického arzenu (Del Razo et al. 1997).

Olovo (Pb)

Olovo lze označit za jeden z prvních antropogenních prvků znečišťující životní prostředí (Clemens & Ma 2016). Těžba olova se datuje již kolem roku 3000 př.n.l., jelikož se jedná o měkký a snadno zpracovatelný kov se širokým spektrem využití. Další antropogenní činností, která ovlivňuje obsah olova v životním prostředí je uvolňování při tavení, či při výrobě a likvidaci baterií. Obrovské množství olova se do životního prostředí dostává také v důsledku využívání olovnatého benzínu (Landrigan et al. 2002). Olovo je v půdě vysoce perzistentní, protože je ve většině případů těžko biologicky dostupné z důvodu nízké rozpustnosti při hodnotách pH vyšších jak 5 a zároveň při silné interakci s organickou hmotou (Clemens & Ma 2016).

Nejčastější způsob vstupu olova do oragismu přestavuje vstup skrz respirační aparát a GI trakt. Transport skrz střevní bariéru je zprostředkován stejným transportním mechanizmem jako je u vápníku, vzhledem ke kompetici olovnatých a vápenatých iontů. Největší množství olova je v organismu vázáno na erytrocytech. Takto vázané olovo představuje až 90 % z celkového obsahu olova v organimu. Anorganické olovo je pomocí krve transportováno nejdříve do měkkých tkání, jako ledviny a játra, po následné redistribuci a hlavním depotním místem jsou ve finále kosti, kde jeho toxicita klesá. Avšak některé faktory, jako je infekce, intoxikace alkoholem či gravidita, mohou zapříčit vyplavování olova (Vopršalová & Žáčková 1996; Clemens & Ma 2016).

Olovo je všudypřítomný ekologicky trvalý toxin, který způsobuje neurologická, hematologická, gastrointestinální, reprodukční, oběhová a imunologická poškození. Olovo se chová jako katalyzátor oxidačních reakcí a vytváří tak ROS. Toxicita olova je multifaktoriální, protože olovo přímo přeruší aktivaci enzymu, inhibuje absorpci stopových prvků, váže se na thiolovou skupinu lipidů (přeruší tak syntézu strukturálních proteinů), mění homeostázu vápníku a snižuje hladinu dostupných sulfhydrylových antioxidačních rezerv v těle (Ercal et al. 2001). Olovo má vysokou afinitu k místům, která vážou vápník. Mechanismus zahrnuje substituci Ca^{2+} olovem, což má vliv na všechny fyziologické a biochemické procesy buněk, které vyžadují vápník ke správnému fungování (Sharma et al. 2014).

Toxicita olova vede k poškození volnými radikály přes dvě oddělené, ačkoliv související cesty. První je tvorba ROS, včetně hydroperoxidů, singletového kyslíku a peroxidu vodíku. A druhou cestou je přímé vyčerpání antioxidačních rezerv (Lyn 2006). Olovo inhibuje sulfyhrylovou funkční skupinu hned několika enzymů (SOD, CAT, GPX, GSH). GPX, CAT a SOD jsou potenciálním cílem pro toxicitu olova, protože tyto antioxidační enzymy jsou závislé na různých základních stopových prvcích, důležitých pro jejich správnou molekulární strukturu a aktivitu (Patra et al. 2011).

Narozdíl od většiny organických znečišťujících látek, které se nakonec degradují na oxid uhličitý a vodu, těžké kovy jako prvky nemohou být rozloženy, a proto přetrvávají v životním prostředí, kde mají tendenci se hromadit (Pliešovská et al. 1997). Hlavní problematikou u těžkých kovů je tedy jejich schopnost akumulace v životním prostředí, ale i v různých organických tkáních (Clemens & Ma 2016). Zněčištění životního prostředí těžkými kovy je v současné době považováno za jeden z mnoha závážných globálních enviromentálních problémů, který je potřeba řešit (Sinicropi et al. 2010). Proto v posledních letech došlo

k výraznému nárůstu výzkumů a případových studií s cílem odhalit možné dopady antropogenních změn na parazity a potažmo jejich hostitele. Mezi nejrůznějšími studiemi se jako nejslibnější ukázaly tři hlavní směry výzkumů: a) parazité jako akumulační indikátory pro vybrané znečišťující látky; b) parazité jako ukazatelé účinku v nejširším slova smyslu a c) vliv parazitů na zdraví svých hostitelů (Sures et al. 2017).

3.3.2 Vliv parazitů na fyziologii hostitele

Parazité jsou již po dlouhou dobu označováni jako důležité patogenní organismy jak u zvířat, tak lidí. V posledních letech se však, díky celé řadě molekulárních zkoumání, podařilo získat podrobnější znalosti o fyziologických a molekulárních interakcích parazitů s jejich hostiteli. Tyto interakce ovlivňují fyziologickou homeostázu hostitele, což často vede k negativním dopadům na jeho zdraví (Sures et al. 2017). Kromě toho, ale bylo také prokázáno, že některé druhy parazitních helmintů, jak bylo zmíněno výše, jsou schopni bioakumulace vyšších koncentrací toxických prvků, než jejich hostitelský organismus, čímž mohou být užiteční například jako bioindikátory znečištění prostředí, či jako jeden z možných způsobů, jak zmírnit dopad negativního působení těžkých kovů na organismus hostitele (Poulin 1999; Sures & Siddall 1999). Neslibnějšími skupinami parazitických hlístů, s ohledem na akumulaci kovů, se ukázala třída *Cestoda* a kmeny *Nematoda* a *Acanthocephala*, které mají schopnost absorbovat As, Cu, Fe, Zn, Mn, Pb a Cd (Sures 2004; Al-Bayati 2018).

Fyziologická reakce organismů na znečišťující látky je důsledkem vychytávání a akumulace různých toxických látek. Rozmanitost odpovědi organismu se pohybuje od zvýšené úrovně stresu a zvýšené produkce obranných molekul až po úplný rozpad fyziologické homeostázy a fyziologickou smrt exponovaného organismu. Nejčastěji využívané biomarkery jsou zaměřené na oxidační stres, hormonální regulaci, energetickou bilaci, stejně tak jako na geny a proteiny, které se podílejí na metabolismu a vylučování polutantů (Marcogliese & Pietrock 2011; Sures et al. 2017). Proto tyto biomarkery nejsou obvykle specifickou odpovědí na polutanty, ale mohou být spíše indukovány řadou dalších stresorů, včetně parazitů (Sures 2004; Forbes et al. 2006). V reálných podmínkách prostředí jsou však organismy vystaveny nejen znečišťujícím látkám, ale jsou také konfrontovány řadou dalších endogenních a exogenních faktorů. V souladu s tím tedy zůstává míra, do jaké jsou biomarkery schopny poskytnout jednoznačnou a ekologicky relevantní indikaci expozice nebo účinků toxických látek značně sporné (Forbes et al. 2006; Marcogliese & Pietrock 2011). Forbes et al. (2006) proto zdůraznil, že biomarkery lze nejúspěšněji využívat při generování

hypotéz v kontrolovaných experimentech, dále že je zapotřebí více úsilí k vývoji modelů vhodné složitosti, které mohou charakterizovat systémy reálného světa. V posledních letech vzrůstá povědomí o tom, že helminti silně interagují s odezvami biomarkerů indukovaných polutanty svých hostitelů a tím ovlivňují jejich fyziologii různými způsoby. Studie se liší v závislosti na zvoleném druhu parazitů a hostitelských druzích, stejně tak jako na zkoumaném polutantu (Sures 2006; Sures & Radszuweit 2007; Marcogliese & Pietrock 2011; Gismondi et al. 2012; Sures et al. 2017). Modulace biomarkerových odpovědí v organismech, infikovaných parazity a za současné expozice těžkých kovů, je fenomén, který není aktuálně dobře pochopen a který si zaslouží ještě mnoho dalších zkoumání. V některých případech se zvyšuje nebo snižuje biomarkerová odpověď, což značně stěžuje interpretaci. Příkladem jsou biomarkery oxidačního stresu, kdy je vhodné využít několik enzymů a substrátů, které se podílejí na metabolismu stresu, abychom lépe porozuměli stresové reakci a fyziologickému účinku na hostitele (Martínez-Álvarez et al. 2005; Sures et al. 2017). Hodnocení hladin antioxidačních enzymů u infikovaných a neinfikovaných organismů helminty může poskytnout cenné informace o stavu antioxidantů a jejich schopnosti čelit více stresovým podmínkám. Všechny tyto účinky jsou pravděpodobně závislé na fyziologické změně, která je ovlivněna teplotou a tím i změnou klimatu. Předpokládané zvýšení teploty v tomto století pravděpodobně zvýší i toxicitu polutantů, stějně tak jako přenos, distribuci a četnost parazitických helmitů (Heinonen et al. 1999; Noyes et al. 2009).

Acanthocephala a *Cestoda* vykazují dosud nejvyšší akumulační kapacitu. Například koncentrace kadmia a olova se ukázaly být až 2,7 × vyšší u parazitů *P. laevis*, než v tkáních svalů hostitele (Sures & Taraschewski 1995; Sures 2004) Podobně tomu tak bylo u *Cestoda*, kde koncentrace sledovaných toxických prvků byla 1,1 × vyšší v tkáních parazitů (Malek et al. 2007). Laboratorní studie Sures & Siddall (1999) zaměřená na akumulaci olova naznačuje, že *Acanthocephala* vstřebávají kovy ve formě kovů vázaných ve žluči. Při expozici kovů se v játrech tvoří organokovové komplexy, které pak procházejí žlučovodem do tenkého střeva, kde mohou být buď reabsorbovány střevní stěnou a procházet hepato-intestinálním cyklem, nebo mohou být vyloučeny stolicí (Sures et al. 2017). Pokud je organismus infikován střevním parazitem *Acanthocephala*, parazit přerušuje hepato-intestinální cyklus kovů, jelikož bylo prokázáno, že helminti využívají žlučových kyselin hostitele (Sures & Siddall 1999; Sures et al. 2017). V zásadě musí všechny látky, které vstupují do *Acanthocephala* a *Cestoda* projít skrze jejich tegument. V případě, že mohou být polutanty, tedy v tomto případě těžké kovy, detekovány u *Acanthocephala* a *Cestoda*, jsou biologicky dostupné v tom smyslu, že jsou

schopny procházet skrz biologické membrány. Studie o akumulačním potenciálu helmintů jsou omezené a dosud byl prozkoumán pouze u zlomku druhů, některé druhy však vykazovaly vysokou akumulační kapacitu a zároveň zvýšenou odolnost vůči těmto prvkům (Chang & Flores 2015). Dle studie Sures (2004) vykazuje tento potenciál většina studovaných druhů *Acanthocephala, Cestoda* a některé *Nematoda*. Nejdůležitější je, že hladiny polutantů v parazitech odpovídají hladinám polutantů v životním prostředí. Naproti tomu u jiných taxonů parazitů (např. *Monogenea*) nejsou splněny některá kritéria pro akumulační indikátory (vysoká akumulační kapacita a zároveň zvýšená odolnost vůči těžkým kovům). Sures et al. (2005) uvádí, že *Acanthocephala* a *Cestoda* jsou schopny akumulovat toxické kovy v koncentracích nad detekčními limity konvenčních technik a mohou být slibnými organismy pro studie zaměřené na dostupnost nanočástic.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Buněčné kultura Caco-2, byla zakoupena z European Collection of Cell Culture (ECACC). Dulbeco Modified Egles Medium-high glucose (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, penicilín, streptomycin, trypsin, fosfátový pufr (PBS) a dusičnan olovnatý byly získány od Sigma-Aldrich (CZ). Kultivační láhve, serologické pipety a Petriho misky byly pořízeny od ThermoFisher (UK).

4.2 Metodika

4.2.1 Paraziti

Živé tasemnice byly získány z katedry obecné zoologie a rybářství, kde byly izolovány živé z trávicího traktu potkanů.

Pro tento expiremnet byli použiti brouci druhu Potemník moučný (*Tenebrio molitor*), kteří byli infikováni *H. diminuta*. Infekční larvy (cysticerkoidy) *H. diminuta* se nechaly vyvíjet po dobu 2 týdnů při teplotě 29 °C. Následně se z těl brouků odebraly zralé cysticerkoidy, které byly perorálně podávány potkanům. Potkani byli umístěni v boxech E4 (1730 m^2) při teplotě vzduchu 22 °C (± 2 °C) a 50% vlhkosti a poskytnutého krmiva (komerční peletová výživa ST-1, získaná od Velaz, CZ) a vody *ad libitum*. Pět týdnů po infikování bylo provedeno koproskopické vyšetření potkanů, aby se zjistila přítomnost parazita. Po 6 týdnech expozice byli všichni potkani usmrceni a z jejich střev byly odebrány tasemnice. Každá tasemnice byla pečlivě dvakrát promyta destilovanou vodou. Následně byl parazit uložen v PBS na Petriho misce na nezbytně nutnou dobu, než byl parazit umístěn na buněčné linie.

4.2.2 Kultivace buněčných linií

Narostlé buněčné linie v kultivačních láhvích byly opláchnuty pomocí PBS a rozvolněny pomocí trypsinu, který byl po 5 minutách neutralizován pomocí DMEM media. Rozvolněné buňky byly centrifugovány po dobu 10 minut a 200 × g. Bylo odstraněno staré medium a nahrazeno novým, kdy byly buňky rozvolněny a nasazeny do nové kultivační láhve s čerstvým mediem v CO_2 inkubátoru s 5% CO_2 atmosférou a teplotou 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny.

4.2.3 Založení 24-jamkové destičky

Z důkladně rozpuštěné buněčné suspenze byl pomocí Bürkerovy komůrky spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Pomocí výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace buněk a případně naředěna na požadovanou koncentraci. Následně bylo do Petriho misek pipetováno 5000 µl suspenze a poté uloženo v kultivačním CO_2 boxu. Výměna media probíhala každé dva dny po požadovanou dobu.

4.2.4 Testování absorbce olova

Po požadované době byly k buňkám přidány vzorky tasemnic spolu se vzorkem dusičnanu olovnatého ($Pb(NO_3)_2$, který byl získán z komerčního zdroje (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), v koncentraci 500 µg/ml. Medium bylo měněno každých 12 h a nahrazeno čerstvým s totožnou koncentrací Pb. Odebrané medium bylo následně zamraženo pro rozbor. Po 24 h byly odebrané medium, tasemnice a střevní buňky odebrány a samoststaně zamraženy pro další analýzu.

4.2.5 Chemická analýza

Jednotlivé vzorky mezi které patřilo medium, buňky i tasemnice byly mineralizovány v 6 ml kyseliny dusičné 65% p.a. (Analytika ®, s.r.o., Praha, Česká republika) a 2 ml peroxidu vodíku (Analytika ®) a následovným mokrým trávením pomocí mikrovlnného ohřevu (mikrovlnná trouba Ethos 1, Milestone, Leutkirch im Allgäu, Německo) po dobu 25 minut při 231 °C. Po trávení byla přebytečná kyselina odstraněna pomocí extraktorového ventilátoru. Následně byly vzorky převedeny do 10ml odměrné baňky obsahující deionizovanou vodu. Slepé vzorky, připravené za použití identického postupu jako v případě vzorků tkáně představovaly 10 % z celkového počtu vzorků.

Obsah olova ve vzorcích byl stanoven pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) na přístroji Agilent 7700x (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA). Stanovení proběhlo na Katedře zoologie a rybářství na České zemědělské univerzitě v Praze. Pro stanovení obsahu olova byl vždy každý vzorek analyzován ve 2 opakováních.

4.2.6 Statistika

Získané výsledné koncentrace olova v jednotlivých vzorcích byly analyzovány pomocí softwaru Statistica 12. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a ± směrodatná odchylka (SD).

K porovnání výsledných koncentrací byla použita analýza rozptylu – ANOVA, kde hladina významnosti byla stanovena jako $p < 0,05$.

5 Výsledky

V této práci byla stanovena *in vitro* koncentrace olova ve vzorcích media, buněk a tasemnic. Výsledné koncentrace olova jsou uvedeny v mg/kg (Tab. 2; Obr. 11). Na začátku experimentu byla stanovena koncentrace ve vzorku krmícího media obsahujícího olovo. Tato koncentrace byla po celou dobu experimentu konstantní. Výsledné koncentrace zbylého Pb v mediu po prvním krmení potvrdily schopnost tasemnic absorbovat výšší množsví Pb, než vzorky, které obsahovaly jen buňky střevního epitelu. Avšak po druhém krmení výsledené koncentace zbylého Pb v médiu vyšly vyšší pro vzorky, které obsahovaly pouze vzorek buňek střevního epitelu.

Ze vzorků skupiny B, ve kterých bylo zjištěno 1,6 × více zbylého Pb v porovnání se vzorky C, které navíc obsahovaly vzorky tasemnic. Ve vzorcích skupiny B z původní koncentrace olova zbylo 2,49 % Pb, ve vzorcích C, kde byly umístěny vzorky tasemnic, byla koncentrace zbylého olova 1,53 %. Statistická významonost na hladině $p < 0,05$ pro tyto dva vzorky nebyla potvrzena (Tab. 3).

Statisticky významný rozdíl byl však potvrzen po druhém krmení u stejných vzorků, s tím rozdílem, že výsledná koncentrace zbylého Pb u vzorků F, kde byly umístěny vzorky tasemnic, byly naměřeny koncentrace Pb 10,6 × vyšší, to odpovídá 49,73 % původní koncentace Pb, než u vzorků H, bez tasemnic, kde z původní koncentrace zbylo 4,68 %.

Ve vzorcích skupiny B, bez tasemnic, byly zbylé koncentrace Pb 15,8 × nižší oproti vzorkům skupiny E, které tasemnici obsahovaly. Ve vzorcích skupiny B, činily zbylé koncentrace Pb 2,49 % a zbylé koncentrace Pb ve vzorcích E, kde se nacházely vzorky tasemnic, odpovídaly 39,21 % původní koncentrace. Pro tyto dva vzorky byla potvrzena statistická významnost na hladině $p < 0,05$.

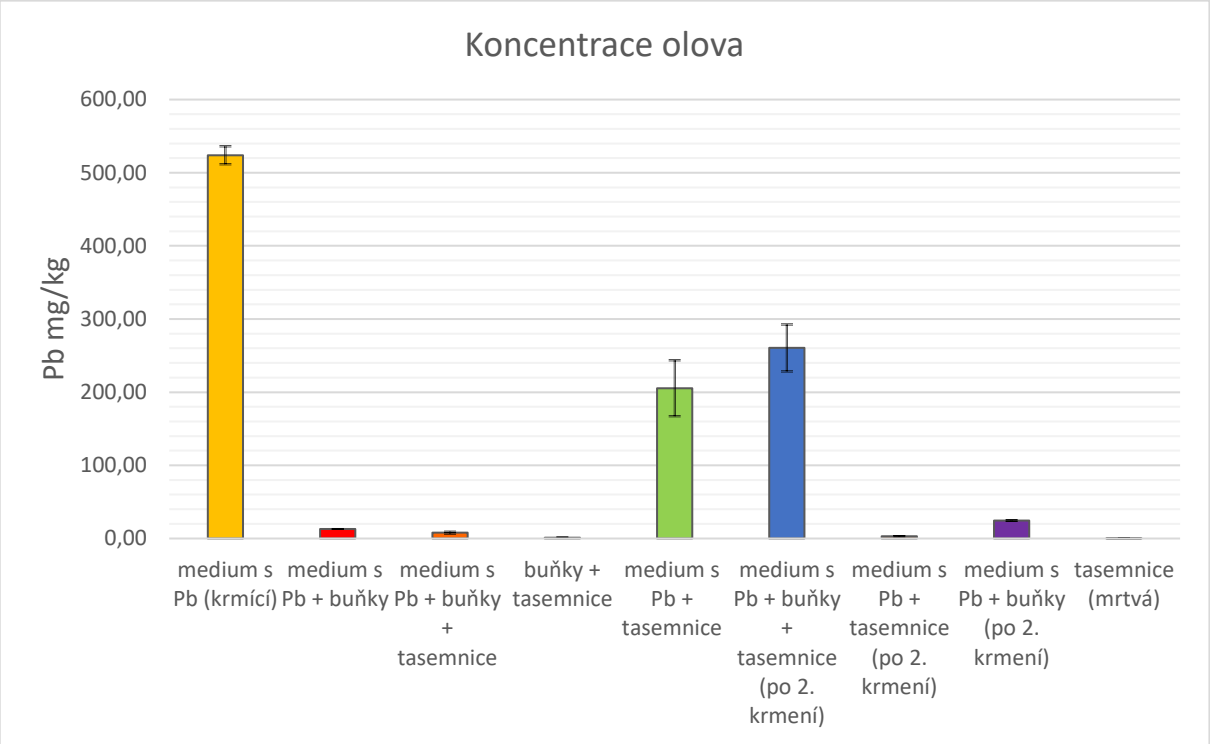
U stejných vzorků, po druhém krmení, činila konečná koncentrace Pb pro vzorky H, které neobsahovaly tasemnice, 4,68 % z původní koncentrace Pb. Ve srovnání se vzorky skupiny F, které tasemnice obsahovaly, kde byly namřeny koncentrace odpovídající 49,73 % původní, tedy 7,9 × vyšší. Pro tyto dva vzorky nebyla potvrzena statistická významnost na hladině $p < 0,05$.

Ve vzorku I s tasemnicí, která byla během experimentu mrtvá, ale byla stejně jako ostatní vzorky dvakrát krmena, byla výsledná koncentrace Pb nejnižší ze všech analyzovaných vzorků, druhá nejnižší koncentrace Pb byla naměřena u vzorků D, které sloužily jako kontrolní

skupina a byla krmena mediem bez obsahu Pb. Mezi těmito dvěmi vzorky nebyla zjištěna statistická významnost na hladině $p < 0,05$.

Tab. 2: Výsledné koncentrace olova v analyzovaných vzorcích.

Označení vzorků	Analyzovaný materiál	koncentrace Pb ve vzorku mg/kg průměr ± SD
A	medium s Pb (krmící)	523,82 ± 12,301
B	medium s Pb + buňky	13,02
C	medium s Pb + buňky + tasemnice	8,02 ± 1,312
D	buňky + tasemnice	1,10 ± 0,403
E	medium s Pb + tasemnice	205,37 ± 38,249
F	medium s Pb + buňky + tasemnice (po 2. krmení)	260,47 ± 32,111
G	medium s Pb + tasemnice (po 2. krmení)	3,09 ± 0,134
H	medium s Pb + buňky (po 2. krmení)	24,53 ± 0,028
I	tasemnice (mrtvá)	0,45 ± 0,212



Obr. 11: Sloupcový graf výsledných koncentrací olova v analyzovaných vzorcích. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné ze dvou opakování ± SD.

Tab. 3: Porovnání koncentrací na základě analýzy rozptylu – ANOVA (na hladině $p < 0,05$) .

	medium s Pb (krmící)	medium s Pb + buňky	medium s Pb + buňky + tasemnice	buňky + tasemnice	medium s Pb + tasemnice	medium s Pb + buňky + tasemnice (po 2. krmení)	medium s Pb + tasemnice (po 2. krmení)	medium s Pb + buňky (po 2. krmení)	tasemnice (mrtvá)
medium s Pb (krmící)	-	A	A	A	A	A	A	A	A
medium s Pb + buňky	A	-	N	A	A	A	N	N	N
medium s Pb + buňky + tasemnice	A	N	-	N	A	A	N	N	N
buňky + tasemnice	A	N	N	-	A	A	N	N	N
medium s Pb + tasemnice	A	A	A	A	-	N	A	A	A
medium s Pb + buňky + tasemnice (po 2. krmení)	A	A	A	A	N	-	N	A	A
medium s Pb + tasemnice (po 2. krmení)	A	N	N	N	A	A	-	N	N
medium s Pb + buňky (po 2. krmení)	A	N	N	N	A	A	N	-	N
tasemnice (mrtvá)	A	N	N	N	A	A	N	N	-

(A – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$)

6 Diskuze

Znečištění kovy je v současné době považováno za jeden z nejvýznamnějších globálních enviromentálních problémů (Horáková et al. 2018). Těžké kovy v závisloti na jejich oxidačním stavu mohou být vysoce reaktivní a v důsledku toho toxické pro většinu organismů. Jsou produkovány rozšiřující se řadou antropogenních zdrojů, což také naznačuje stálý růst významnosti této formy znečištění (Pinto et al. 2003). V těle živého organismu dochází k transportu kovů především krví, která je distribuuje do tělesných tkání. Kovy se zde pak mohou hromadit ve vysoce toxických úrovních, a tak mít zásadně negativní vliv na živé organismy (Sinicropi et al. 2010). Toxický účinek těžkých kovů souvisí s oxidačním stresem a zvýšenou produkcí ROS a tedy výsledným nevyváženým buněčným redoxním stavem. Oxidační stres doprovází veškeré aerobní organismy po celý jejich život a do jisté míry je fyziologickým důsledkem celé řady bioenergetických a biochemických pochodů organismu, jako je například přirozené stárnutí. Avšak velmi důležitou úlohu oxidační stres zastává v imunologických odpovědích organismu. Pro minimalizování radikálového nebezpečí, je nutné aby byly tyto molekuly detoxikovány prostřednictvím komplexního antioxidačního systému, který má vyvinut každý organismus (Chmátalová & Skoumalová 2014). Podstatná část prvků se do těla živých organismů dostává skrze perorální příjem a následně je vstřebávána v GI traktu. A právě zde mohou přicházet do kontaktu s gastrointestinálními helminty (Mushak, 1991; Dalton et al. 2004).

V naši práci jsme se proto zaměřili na interakci mezi gastrointestinálními helminty, olovem a buňkami GITu. Jelikož parazitičtí helminti jsou již po velmi dlouhou dobu považováni za důležité patogenní organismy, a to jak u zvířat, tak i lidí. Po celém světě se odhaduje, že helmintózy způsobují infenkci u více jak 1,5 miliardy lidí, což odpovídá 24 % celé lidské populace (Motran et al. 2018). Hlavním cílem helmintů je přežít v hostitelském organismu tak dlouho, jako jen to je možné. Z tohoto důvodu došlo u řady helmintů k vyvinutí řady složitých mechanismů, kterými ovlivňují imunitní systém hostitele (Peón et al. 2012). Ve studii Sures & Siddall (1999) bylo popsáno, že ionty olova z hostitelova GIT jsou schopny projít přes epiteliální membránu, a tak vstupovat do krevního řečiště, kde se váží na erytrocyty a jsou oběhovým systémem transportovány do různých orgánů v těle, například jater. V játrech je většina olova odstraněna z krve a vylučována žlučí do střeva. Žluč obsahuje steroidy, s nimiž ionty těžkých kovů tvoří organokovové komplexy, které pak procházejí žlučovodem do tenkého střeva, kde přichází do stiku s případnými GIT helminty.

Obvykle jsou interakce mezi hostitelem a helmintem považovány za negativní, avšak bylo prokázáno, že některé druhy helmintů jsou schopni zvýšené bioakumulace toxických prvků v porovnání s hostitelskými tkáněmi. Tím mohou výrazně zmírnit dopady negativního působení těžkých kovů na hostitelský organismus, a nebo být například využiti jako indikátory znečištění prostředí (Poulin 1999; Sures & Siddall 1999; Sures 2004; Al-Bayati 2018). Neslibnějšími skupinami parazitických hlístů, s ohledem na akumulaci kovů v terestrických podmínkách, se ukázaly skupiny *Cestoda* a *Acanthocephala*, z tohoto důvodu jsme si pro náš experiment vybrali *H. diminuta* z třídy *Cestoda.*

Nejvíce prací (Sures et al. 1999; Sures et al. 1994; Sures & Taraschewski 1995; Sures et al. 1995, Sures 2003), zkoumajících schopnost helmintů akumulovat těžké kovy, je zaměřeno na vodní prostředí. Jedny z prvních výsledků byly prezentovány studií (Sures et al. 1999), ve které byly hodnoty získány ze střevních parazitů sladkovodních ryb nakažených převážně *Acanthocephala*. Vzorky byly odebrány ze středně znečištěných lokalit v Německu a koncentrace olova v tkáních ryb (svalovina, játra a střeva) byly porovnávány s koncentracemi olova v jejich příslušných parazitech. Koncentrace olova v parazitech, stanovené atomovou absorpční spektrometrií, byly řádově 25 × vyšší, než koncentrace olova v hostitelských tkáních či ve vodním prostředí. V našem experimentu jsme se také zaměřili, na rozdíl absorbce olova buňkami střevního epitelu a strobilou *H. diminuta*. Při první expozici byly buňky střevního epitelu schopny absorbovat z prostředí až 15,7 × více olova než tasemnice. Avšak po druhé expozici, tedy po 12 h od počátku experimentu se výsledky diametrálně lišily. Vzorky, kde byla umístěna *H. diminuta* byly schopny ze svého prostředí absorbovat až 7,9 × více olova než buňky střevního epitelu. Z těchto výsledků je patrné, že využití tasemnic, jako akumulujících organismů, či jako indikátorů škodlivin znečišťujících prostředí je výhodnější, než přímá analýza, jelikož živočichové přijímají a koncentrují pouze biologicky dostupné frakce (Sures et al. 1994; Sures & Taraschewski 1995; Sures et al. 1995).

Vzhledem k faktu, že *Cestoda* jsou u suchozemských savců hojnější než *Acanthocephala*, jsou pro většinu studií (Sures et al. 2002; Sures et al. 2003) zaměřených na savce, využíváni právě zástupci této třídy. Jak Sures et al. (2002) uvádí, tento model host-parazit může být velmi dobře využit pro monitorování znečištění životního prostředí, zejména v městských oblastech, a zároveň také využit jako prostředek ke snížení koncentrace těžkých kovů v orgánech a tkáních hostitele. Terénní a experimentální studie prokázala, že zejména *H. diminuta* v potkanech

mohou být vhodnými bioindikátory olova zejména díky své vysoké akumulační kapacitě. Potkani v této studii byli odebráni z lokalit s menším a větším znečištěním olovem. Při srovnání hladin olova mezi hostitelskými tkáněmi a tkáněmi parazitů, byla zjištěna významně vyšší koncentace olova u *H. diminuta* ve srovnání s tkání hostitele. Tkáň *H. diminuta* obsahovala 36 × vyšší koncentrace olova něž střevní stěna, 29 × násobně vyšší koncentrace něž játra a 6 × vyšší koncentrace něž ledviny hostitele (Sures et al. 2003). Obdobné výsledky byly publikovány Sures et al. (2000), kde se zaměřili na parazita *M. moniliformis*, který parazituje na potkanech. Na infikovaných potkanech zjistili, že samice *M. moniliformis* obsahovaly až 25, 39, 2 a 9 × více olova, než játra, tenké střevo, ledvinová kůra a ledvinová dřeň, poměr u samců těchto parazitů byl odlišný (7, 11, 0,5 a 3 × více Pb, než játra, tenké střevo, ledvinová kůra a ledvinová dřeň). V našem experimentu jsme se zaměřili pouze na efekt *H. diminuta* na koncentraci olova v buňkách střevního epitelu. Tasemnice jsou hermafroditi, tudíž nejsme s našimi výsledky experimentu schopni poskytnou takové srovnání. Námi naměřené hodnoty u vzorků obsahujících buňky střevního epitelu společně se vzorky tasemnic po první expozici se přibližují hodnotám uvedených ve studii Sures et al. (2000). U našich vzorků však byla výsledná koncentrace olova pouze 1,6 × nižší, než u buněk střevního epitelu u kterých nebyl umístěn vzorek *H. diminuta*. Rozdíl ve výsledcích může být způsoben malým množstvím námi analyzovaných vzorků, nebo také rozdílnou vstupní koncentraci olova. Jistou roli, zde hraje i použitá metodika, kde se jedná o první experiment tohoto druhu, jelikož doposud nebyla publikována metodika na kultivaci *H. diminuta* na buňkách střevního epithelu. Naše výsledky mohla ovlivnit i samotná krmení. Kde jsme absolutně rozdílných hodnot dosahovali po druhé expozici Pb, po které vzorky s obsahem tasenic vykazovaly až 10,6 × menší koncentrace olova v porovnání se vzorky, ke kterým nebyl umístěn vzorek tasemnic. To může být způsobeno absorpční rychlostí, velikostí vstřebatelné dávky, malým počtem analyzovaných vzroků, množstvím olova tasemnicí vyloučeného do media nebo také formou, ve které bylo olovo podáváno. Jak ukazují výsledky studie Čadková et al. (2013), kde se zaměřili na význam zdroje olova, tedy organické a anorganické formy kovu z hlediska absorbance a vylučování. Během pokusu byl potkanům orálně podáván octan olovnatý a olovo vázané v rostlině *Pistia stratiotes.* Výsledky ukázaly, že 53 % požitého olova formou *Pistia* a 73 % požitého olova formou octanu olovnatého bylo z exponovaných potkanů rychle vyloučeno stolicí během 24 hodin po expozici. Tyto výsledky se shodují s výsledky u našich vzorků, kde byly umístěny buňky střevního epitelu zároveň s tasemnicí. Po první expozici anorganického olova u vzorků, které neobsahovaly tasemnice, ale pouze buňky střevního epitelu, byla naměřená koncentace olova 1,6 × vyšší než ve vzorcích, kde tasemnice umístěny byly. Ve shodných vzrocích odebraných

po druhé expozici, tedy do 24 h od začátku experimentu, byla výsledná koncetrace zbylého olova v mediu 10,6 × vyšší pro vzroky, které tasemnici obsahovaly. Jak ukazují výsledky studie Čadkové et al. (2013), v hladinách celkově vyloučeného olova byly zjištěny značné rozdíly. Olovo, podávané formou octanu olovnatého, bylo vylučeno ve větším množství než olovo podáváné v anorganické formě skrz *P. stratiotes*. Toto zjištění naznačuje, že olovo vázané v *P. stratiotes* je absorbováno GIT ve větším rozsahu, s čímž souvisí i vyšší koncentrace olova v dalších tkáních. Tento fakt by mohl být možným vysvětlením proč v našem experimentu, ve kterém bylo olovo podáváno formou anorganického dusičnanu olovnatého, byla výsledná koncentrace Pb ve zbylém mediu u vzorků s buňkami střevního epitelu společně s tasemnicí, po první expozici 32,5 × nižšší než po expozici druhé. Další studie Horáková et al. (2018) také potvrdila, že distribuce olova je závisla na formě podvané potkanům. Poměr mezi koncetracemi prvků v tkáních byl 1 – 1,7 × vyšší u neparazitovaných potkanů. Tasemnice ze skupiny *Pistia* akumulovaly výrazně větší koncentrace olova než tkáň hostitele. Koncentrace olova ve strobile tasemnic byla 83,2 × vyšší než koncentrace ve střevech hostitele. Pro skupinu, která byla krmena dusičnanem olovnatým, byly výsledné koncentrace olova v těle tasemnic pouze 4,6 × vyšší, než koncentrace ve střevech hostitele. Výsledky pro nitrátovou skupinu korespondují s našimi výsledky po první expozici, kde výsledná zbylá koncentrace v odebraném mediu ze vzorků, které obsahovaly buňky střevního epitelu společně s tasemnicí, byla 1,6 × nižší než u vzorků, které tasemnice neobsahovaly. Dle Volf et al. (2007) je vylučovací soustava helmintů tvořena různým počtem protonefrií. Tyto plaménkové buňky filtrují tělní tekutinu z parenchymových prostor a filtrát je odváděn soustavou kanálků, které se spojují a jsou zakončeny exkrečním měchýřkem. Exkreční měchýřek následně ústí na povrchu těla helmintů exkrečním pórem, kterým by se právě mohly opět zbavovat vyšších koncentrací toxických prvků, tedy jako v našem případě olova. Náš experiment proběhl *in vitro* na *H. diminuta*, i přesto je pravděpodobné, že se olovo v tělech tasemnic bude chovat obdobně, jako v *in vivo* podmínkách u potkanů. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi Sures & Siddall (2003) a Oyoo-Okoth et al. (2012), které ukázaly, že tasemnice jsou schopny hromadit těžké kovy mnohem rychleji než měkké tkáně hostitelských organismů. Avšak hladiny olova dosahují rovnovážného stavu až za 4 týdny po expozici.

V nesouladu s předchozími zmiňovanými výsledky studií, které uvádějí, že střevní helminti jsou schopni zmírnit a nebo zabránit jejich hostiteli v absorbci požitých těžkých kovů je studie Čadková et al. (2014). V této studii některé hostitelské tkáně parazitovaných potkanů vykazovaly vyšší koncentrace olova, než tkáně neinfikovaných jedinců. Ačkoliv tkáň tasemnic

hromadí velké množství olova, může přítomnost tasemnic v duodenu paradoxně usnadnit absorbci olova v těle hostitele. Hlavním důvodem může být fakt, že kyselé produkty metabolismu glukózy u *H. diminuta* mohou snižovat hladiny střevního pH hostitele pod 6 (Mettrick 1971), a tím zvyšovat biologickou dostupnost olova. Tento fakt může být dalším možným vysvětlením proč výsledné zbylé koncentrace olova u našich vzorků buněk střevního epitelu, ke kterým byl umístěn vzorek tasemnic, vykazovaly po druhé expozici 32,5 × vyšší hodnoty než po první. Dalším vysvětlením nesouladu výsledků studie Čadková et al. (2014) s předchozími zmiňovanými studiemi může být fakt, že strobila tasemnic částečně ucpává střevní lumen a zpomaluje tak pohyb trávěniny střevem (Dwinell et al. 1997), což umožňuje vyšší absorbci olova ve střevu hostitele. Dle Čadkové et al. (2014) střevní stěna, skrz kterou prochází absorbované olovo, vykazovala také vyšší koncetrace olova u parazitovaných potkanů, kteří byly vystaveni vyšší koncetraci olova po delší čas, než u potkanů bez helmintů. Vzhledem k tomu, že tedy nebyla vysoká koncentrace olova v tkáních tasemnic spojena se současným významným poklesem koncetrace olova ve střevní stěně hostitele, lze předpokládat, že tasemnice nejčastěji přijímají olovo vázané na žluč, která je primárně absorbována do těla hostitele a sekundárně vylučována do dvanáctníku, tedy přes jaterní cyklus. Podobný proces byl již prokázán ve studii Sures et al. (1998) a Sures & Siddall (1999). Tento fakt potvrzuje také studie Sures et. al. (2003b), která byla zaměřena na ryby nakažené *P. laevis*.

V této prácí jsme se zaměřili na schopnost helmintů vstřebávat těžké kovy a snižovat tak jejich koncentraci v trávicím traktu. Hypotéza byla potvrzena pouze pro první expozici olova, po druhé expozici olova naše výsledky ukazují na sníženou absorbci olova strobilou *H. diminuta*. Tyto výsledky zdůrazňují potřebu dalších výzkumů zaměřených na význam zdroje organické a anorganické formy kovu, koncentraci přijatého olova a také dobu expozice olova. Dalším zajímavým směrem výzkumu by mohl být fakt, že ROS, které jsou produkovány hostitelským organismem v průběhu parazitární infekce, hrají důležitou roli jako mediátory při interakci mezi hostitelem a parazitem (Maizels a Yazdanbakhsh, 2003). Parazité, kteří se vyznačují vysokou enzymovou antioxidační aktivitou, mohou přežívat v těle hostitele po velmi dlouhou dobu. Jejich antioxidační systémy mohou být použity jako součást obrany proti ROS produkovaných hostitelem. Antioxidační aktivita helmintů může mimo jiné také zřejmě sloužit jako obranný měchanismus proti volným radikálům, který doprovází vychytávání toxických prvků, potažmo těžkých kovů. Takováto adaptace umožňuje helmintům přežívat v GITu hostitele, který je vystaven vysokým úrovním zněčišťujících látek z prostředí. Tyto látky se

následně dostávají do zažívacího traktu, kde dochází k interakci s případným helmintem (Dautremepuits, 2002).

7 Závěr

Hypotéza, že helminti mají schopnost vstřebávat těžké kovy, snižovat jejich koncentraci v trávicím traktu, a tím snížit následky, které těžké kovy vyvolávají, byla pro *H. diminuta* testované v *in vitro* modelu lidského střeva potvrzena pouze pro první expozici olova. Po delší době expozice se nám hypotézu nepodařilo potvrdit. To může být zapříčiněno malým množstvím analyzovaných vzorků, ale i faktem, že výsledky byly získáný v *in vitro* modelu lidského střeva a v případě *in vivo* podmínek se mohou odlišovat, jelikož je velice obtížné vytvořit přesnou simulaci tak dynamického prostředí, jako je gastrointestinálního trakt.

Z důvodu, že samotné hledání vhodné metodiky pro *in vitro* analýzu nám zabralo poměrně dlouhý čas, navrhujeme další analýzu *in vitro* modelu lidského střeva pro získání jednotnějších dat. Dalším zajímavým směrem výzkumu by mohl být význam zdroje olova, jakožto organické a anorganické formy kovu, z hlediska absorbance. Nebo také jak je vstřebávání olova do strobily *H. diminuta* ovlivněno antioxidanty, které sama tasemnice produje. Helminti vykazují různorodou škálu biologických účinků na svého hostitele, které stále nejsou dokonale objasněny, a proto je v tomto ohledu neustále co zkoumat.

8 Použitá literatura

Ahluwali B, Magnusson MK, Öhman L. 2017. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. Scandinavian Journal of Gastroenterology **52**:1185–1193.

Acheson DW, Luccioli S. 2004. Mucosal immune responses. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **18**:387-404.

Al-Bayati NY. 2018. Cestodes are Bioremediation Tools by Absorbing the Heavy Metals from Their Hosts. Diyala Journal For Pure Science **14**:154-169.

Al-Quraishy S, Gewik MM, Abdel-Baki AAS. 2014. The intestinal cestode Hymenolepis diminuta as a lead sink for its rat host in the industrial areas of Riyadh, Saudi Arabia. Saudi journal of biological sciences **21**:387-390.

Atreya R., Neurath MF. 2010. Factors affecting mucosal homeostasis: a fine balance. Pages 52-63 in Targan SR, Shanahan F, Karp LC, editors. Inflammatory Bowel Disease: Translating basic science into clinical practice. Wiley-Blackwell. Hoboken, New Jersey.

Bass DA, Szejda P. 1979. Mechanisms of killing of newborn larvae of Trichinella spiralis by neutrophils and eosinophils: killing by generators of hydrogen peroxide in vitro. Journal of Clinical Investigation **64**:1558-1564.

Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. 2014. Intestinal permeability–a new target for disease prevention and therapy. BMC gastroenterology **14**:189.

Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and chemical toxicology **51**:15-25.

Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. Toxicology **179**: 37-50.

Cibulka J. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. Academia. Praha.

Clemens S, Ma JF. 2016. Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods. Annual review of plant biology **67**:489-512.

Czeczot H, Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Salamatin R, Grytner-Zięcina B. 2012. Enzymatic antioxidant system in the cestode Hymenolepis diminuta after chronic infection of the rat. Open Life Sciences **7**:987-995.

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.

Čadková Z, Száková J, Miholová D, Válek P, Pacáková Z, Vadlejch J, Langrová I, Jankovská I. 2013. Faecal excretion dynamic during subacute oral exposure to different Pb species in Rattus norvegicus. Biological trace element research **152**:225-232.

Čermáková Z, Valenta Z, Buchta V. 2009. Parazitičtí helminti člověka I. část – úvod do světa červů. Folia Gastroenterol Hepatol **7**:21-24.

Dalton JP, Skelly P, Halton DW. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. Canadian Journal of Zoology **82**:211-232.

Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (Cyprinus carpio L.) by Ptychobothrium sp.(Cestoda). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1573**:4-8.

Del Razo LM, García-Vargas GG, Albores A, Vargas H, Gonsebatt ME, Montero R, Ostrosky-Wegman P, Kelsh M, Cebrián ME. 1997. Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. Archives of Toxicology **71**:211-217.

Duffus JH. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry **74**:793-807.

Dwinell MB, Bass P, Schaefer DM, Oaks JA. 1997. Tapeworm infection decreases intestinal transit and enteric aerobic bacterial populations. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. **273**:G480-G485.

Dzik JM. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Biochimica Polonica **53**:33-64.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. Current Topics in Medicinal Chemistry **1**:529-539.

Falnoga I, Stibilj V, Tušek-Žnidarič M, Šlejkovec Z, Mazej D, Jaćimović R, Ščančar J. 2000. Effect of arsenic trioxide on metallothionein and its conversion to different arsenic metabolites in hen liver. Biological trace element research **78**:241-254.

Ferenčík M, Rovenský J, Shoenfeld Y, Maťha V. 2005. Imunitní systém: Informace pro každého. Grada. Praha.

Forbes VE, Palmqvist A, Bach L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry **25**:272-280.

Forchielli ML, Walker WA. 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. British Journal of Nutrition **93**:S41-S48.

Gaba S, Ginot V, Cabaret J. 2005. Modelling macroparasite aggregation using a nematode-sheep system: the Weibull distribution as an alternative to the negative binomial distribution?. Parasitology **131**:393-401.

Gaurav D, Preet S, Dua KK. 2010. Chronic cadmium toxicity in rats: treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals. Journal of Food and Drug Analysis **18**:464-470.

Gismondi E, Beisel JN, Cossu-Leguille C. 2012. Polymorphus minutus affects antitoxic responses of Gammarus roeseli exposed to cadmium. PloS ONE 7:e41475.

Greguška O. 1997. Kyslíkové radikály, oxid dusnatý a antioxidačný systém v kĺboch postihnutých zápalom. Rheumatologia **11**:161-166.

Hall A, Horton S, de Silva N. 2009. The costs and cost-effectiveness of mass treatment for intestinal nematode worm infections using different treatment thresholds. PLoS Neglected Tropical Diseases **3**:e402.

Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H, Ishikawa H. 2002.

Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. The Journal of Immunology **168**:57-64.

Havelková A. 2006. Oxidační stres, lidské choroby a biomarkery. Bioprospect: Bulletin Biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice **16:**24-25.

Heinonen J, Kukkonen JV, Holopainen IJ. 1999. The effects of parasites and temperature on the accumulation of xenobiotics in a freshwater clam. Ecological Applications **9**:475-481.

Henkle-Dührsen K, Kampkötter A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. Molecular and biochemical parasitology **114**:129-142.

Henkle-Dührsen K, Tawe W, Warnecke C, Walter D. 1995. Characterization of the manganese superoxide dismutase cDNA and gene from the human parasite Onchocerca volvulus. Biochemical Journal **308**:441-446.

Horáková B, Čadková Z, Száková J, Jankovská I, Langrová I. 2018. Lead accumulation in rats: The effect of the presence of a rat tapeworm and the different forms of metal in the host diet. Ecological Indicators **85**:753-757.

Horáková B, Čadková Z, Száková J, Jankovská I. 2017. The identification of risk and essential elements along the strobila of the rat tapeworm Hymenolepis diminuta. Journal of helminthology **91**:555-560.

Chang ACG, Flores MJC. 2015. Morphology and viability of adult Fasciola gigantica (giant liver flukes) from Philippine carabaos (Bubalus bubalis) upon in vitro exposure to lead. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **5**:493-496.

Chiumiento L, Bruschi F. 2009. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. Parasitology research **105**:593-603.

Chmátalová Z, Skoumalová A. 2014. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. **22**: 189-195.

Jankovská I, Miholová D, Langrová I, Bejček V, Vadlejch J, Kolihová D, Šulc M. 2009. Influence of parasitism on the use of small terrestrial rodents in environmental pollution monitoring. Environmental pollution **157**:2584-2586.

Jankovská I, Miholová D, Lukešová D, Kalous L, Válek P, Romočuský Š, Vadlejch J, Petrtýl M, Langrová I, Čadková Z. 2012. Concentrations of Zn, Mn, Cu and Cd in different tissues of perch (Perca fluviatilis) and in perch intestinal parasite (Acanthocephalus lucii) from the stream near Prague (Czech Republic). Environmental research **112**:83-85.

Jíra J. 1998. Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci. Galén. Praha.

Johnston MJG, MacDonald JA, McKay DM. 2009. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. Parasitology **136**:125-147.

Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma GI. 2009. ROS and innate immunity. Anticancer research **29**:817-821.

Landrigan PJ, Schechter CB, Lipton J, Fahs MC, Schwartz J. 2002. Environmental pollutants and disease in American children: estimates of morbidity, mortality, and costs for lead poisoning, asthma, cancer, and developmental disabilities. Environmental health perspectives **110**:721-728.

Liebau E, Eckelt VHO, Wildenburg G, Teesdale-Spittle P, Brophy PM, Walter RD, Henkle-Dührsen K. 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from Ascaris suum. Biochemical Journal **324**:659-666.

Liebau E, Eschbach ML, Tawe W, Sommer A, Fischer P, Walter RD, Henkle-Dührsen K. 2000. Identification of a stress-responsive Onchocerca volvulus glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display. Molecular and Biochemical Parasitology **109**:101-110.

Lyn P. 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. Alternative Medicine Review **11**:114-127.

Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. Mucosal immunology **6**:666-677.

MacDonald TT. 2003. The mucosal immune system. Parasite immunology **25**:235-246.

MacDonald TT. 2005. Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. Science **307**:1920–1925.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nature Reviews Immunology **3**:733-744.

Malek M, Haseli M, Mobedi I, Ganjali MR, Mackenzie K. 2007. Parasites as heavy metal bioindicators in the shark Carcharhinus dussumieri from the Persian Gulf. Parasitology **134**:1053-1056.

Marcogliese DJ, Pietrock M. 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. Trends in Parasitology **27**:123–130.

Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and fisheries **15**:75-88.

McKay DM. 2009. The therapeutic helminth?. Trends in parasitology **25**:109-114.

Medzhitov R, Janeway CA. 1997. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. Cell **91**:295-298.

Meharg AA, Norton G, Deacon C, Williams P, Adomako EE, Price A, Zhu Y, Li G, Zhao F, McGrath S, Villada A, Sommella A, De Silva PMCS, Brammer H, Dasgupta T, Islam MR. 2013. Variation in rice cadmium related to human exposure. Environmental science & technology **47**:5613-5618.

Mettrick DF. 1971. Hymenolepis diminuta: pH changes in rat intestinal contents and worm migration. Experimental Parasitology **29**:386-401.

Minakami R, Sumimoto H. 2006. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family. International journal of hematology **84**:193-198.

Moreau E, Chauvin A. 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. BioMed Research International **2010**:1-9.

Motran CC, Silvane L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, Celias DP, Cervi L. 2018. Helminth infections: Recognition and Modulation of the immune Response by innate immune Cells. Frontiers in immunology **9**:1-12.

Mowat AM, Agace WW. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. Nature Reviews Immunology **14**:667-685.

Mowat AM. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nature Reviews Immunology **3**:331–341.

Mushak P. 1991. Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: overview of biological and biophysico-chemical aspects. Chemical Speciation & Bioavailability **3**:87-104.

Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nature Immunology **2**:1004–1009.

Newberry RD, Lorenz RG. 2005. Organizing a mucosal defense. Immunological reviews **206**:6-21.

Nhi TTY, Shazili NAM, Shaharom-Harrison F. 2013. Use of cestodes as indicator of heavy-metal pollution. Experimental parasitology **133**:75-79.

Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, Erwin KN, Levin ED. 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. Environment international **35**:971-986.

Oliveira PL, Oliveira MF. 2002. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species: Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites?. FEBS letters **525**:3-6.

Oyoo-Okoth E, Admiraal W, Osano O, Kraak MH, Were-Kogogo PJ, Gichuki J, Ngure V, Makwali J, Ogwai C. 2012. Dynamics of metal uptake and depuration in a parasitized cyprinid fish (Rastrineobola argentea). Aquatic toxicology. **124**:34-40.

Patra RC, Rautray AK, Swarup D. 2011. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. Veterinary Medicine International **2011**:1-9.

Peón AN, Espinoza-Jiménez A, Terrazas LI. 2012. Immunoregulation by Taenia crassiceps and its antigens. BioMed research international **2013**: 1-13.

Perez-Lopez A, Behnsen J, Nuccio SP, Raffatellu M. 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. Nature Reviews Immunology **16**:135-148.

Peterson LW, Artis D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature Reviews Immunology **14:**141–153.

Pinto E, Sigaud-kutner TC, Leitao MA, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. 2003. Heavy metal–induced oxidative stress in algae 1. Journal of phycology **39**:1008-1018.

Pláteník J. 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi **11**:30-33.

Poulin R. 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels?. International Journal for Parasitology **29**:903-914.

Radovanović TB, Prokić MD, Gavrić JP, Despotović SG, Gavrilović BR, Borković-Mitić SS, Pavlović SZ, Saičić ZS. 2015. Glutathione-dependent enzyme activities and concentrations of glutathione, vitamin E and sulfhydryl groups in barbel (Barbus barbus) and its intestinal parasite Pomphorhynchus laevis (Acanthocephala). Ecological indicators **54**:31-38.

Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical interventions in aging **2**:219-236.

Sánchez MI, Pons I, Martínez-Haro M, Taggart MA, Lenormand T, Green AJ. 2016. When parasites are good for health: cestode parasitism increases resistance to arsenic in brine shrimps. PLoS Pathogens **12**:1-19

Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. 2014. Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems. BioMed Research International **2014**:1-26.

Shuker K. 2001. The hidden powers of animals: uncovering the secrets of nature. Readers Digests. Pleasantville.

Siddall R, Sures B. 1998. Uptake of lead by Pomphorhynchus laevis cystacanths in Gammarus pulex and immature worms in chub (Leuciscus cephalus). Parasitology Research **84**:573-577.

Sinicropi MS, Amantea D, Caruso A, Saturnino C. 2010. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. Archives of toxicology **84:**501-520.

Sloup V, Jankovská I, Száková J, Magdálek J, Sloup S, Langrová I. 2018. Effects of tapeworm infection on absorption and excretion of zinc and cadmium by experimental rats. Environmental Science and Pollution Research **25**:35464-35470.

Smith N C, Bryant C. 1989. The effect of antioxidants on the rejection of Nippostrongylus brasiliensis. Parasite immunology **11**:161-167.

Sorci G, Faivre B. 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences **364**:71-83.

Sures B, Dezfuli BS, Krug HF. 2003b. The intestinal parasite Pomphorhynchus laevis (Acanthocephala) interferes with the uptake and accumulation of lead (210Pb) in its fish host chub (Leuciscus cephalus). International Journal for Parasitology **33**:1617-1622.

Sures B, Jürges G, & Taraschewski H. 1998. Research note Relative concentrations of heavy metals in the parasites Ascaris suum (Nematoda) and Fasciola hepatica (Digenea) and their respective porcine and bovine definitive hosts. International Journal for Parasitology **28**:1173-1178.

Sures B, Jürges G, Taraschewski H. 2000. Accumulation and distribution of lead in the archiacanthocephalan Moniliformis moniliformis from experimentally infected rats. Parasitology **121**:427-433.

Sures B, Nachev M, Selbach C, Marcogliese DJ. 2017. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. Parasites & Vectors **10**:1-19.

Sures B, Radszuweit H. 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod Gammarus roeseli is affected by larvae of Polymorphus minutus (Acanthocephala). Journal of helminthology **81**: 191-197.

Sures B, Scheef G, Klar B, Kloas W, Taraschewski H. 2002. Interaction between cadmium exposure and infection with the intestinal parasite Moniliformis moniliformis

(Acanthocephala) on the stress hormone levels in rats. Environmental Pollution **119**: 333-340.

Sures B, Scheible T, Bashtar AR, 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, Siddall R, Taraschewski H. 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. Parasitology Today **15**:16-21.

Sures B, Siddall R. 1999. Pomphorhynchus laevis: The Intestinal Acanthocephalan as a Lead Sink for its Fish Host, Chub (Leuciscus cephalus). Experimental Parasitology **93**:66-72.

Sures B, Siddall R. 2003. Pomphorhynchuslaevis (Palaeacanthocephala) in the intestine of chub (Leuciscuscephalus) as an indicator of metal pollution. International Journal for Parasitology **33:** 65-70.

Sures B, Taraschewski H, Haug C. 1995. Determination of trace metals (Cd, Pb) in fish by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave digestion. Analytica Chimica Acta **311**: 135–139

Sures B, Taraschewski H, Jackwerth E. 1994. Lead content of Paratenuisentis ambiguus (Acanthocephala), Anguillicola crassus (Nematodes) and their host Anguilla anguilla. Diseases of aquatic Organisms **19**: 105–107

Sures B, Taraschewski H. 1995. Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, Pomphorhynchus laevis andAcanthocephalus lucii, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae ofA. lucii as compared with their crustacean host. Parasitology Research **81**:494-497.

Sures B, Thielen F, Baska F, Messerschmidt J, Von Bohlen A. 2005. The intestinal parasite Pomphorhynchus laevis as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. Environmental Research **98**:83-88.

Sures B. 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends in parasitology **20**:170-177.

Sures, B. 2006. How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. Journal of helminthology **80**:151-157.

Taiwo FA, Brophy PM, Pritchard DI, Brown A, Wardlaw A, Patterson LH. 1999. Cu/Zn superoxide dismutase in excretory-secretory products of the human hookworm Necator americanus: An electron paramagnetic spectrometry study. European Journal of Biochemistry **264**:434-438.

Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. International immunology **17**:1-14.

Tichý M. 1998. Toxikologie pro chemiky,toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa, Karolinum. Praha.

Torres J, De Lapuente J, Eira, C, Nadal J. 2004 . Cadmium and lead concentrations in Gallegoides arfaai (Cestoda: Anoplocephalidae) and Apodemus sylvaticus (Rodentia: Muridae) from Spain. Parasitology Research **94**:468-470.

Torres J, Peig J, Eira C, Borrás M. 2006. Cadmium and lead concentrations in Skrjabinotaenia lobata (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, Apodemus sylvaticus (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). Environmental Pollution **143**:4-8.

Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Yoshihara S. 2000. Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm Ascaris suum. International Journal for Parasitology **30**:125-128.

Vahter M. 1983. Metabolism of arsenic. Page 171-198 in Fowler BA, editor. Biological and enviromental effects of arsenic. Elsevier. Amsterdam.

Vahter M. 1998. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. Science progress **82**:69-88.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions **160**:1-40.

van Rossum AJ, Jefferies JR, Rijsewijk FA, LaCourse EJ, Teesdale-Spittle P, Barrett J, Tait A, Brophy PM. 2004. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the

blood-feeding parasitic nematode Haemonchus contortus. Infection and immunity **72**:2780-2790.

Volf P, Horák P, Čepička I, Flegr J, Lukeš J, Mikeš L, Svobodová M, Vávra J, Votýpka J. 2007. Paraziti a jejich biologie. TRITON. Praha.

Vopršalová M, Žáčková P. 1996. Základy toxikologie pro farmaceuty. Karolinum. Praha.

Wildenburg G, Liebau E, Henkle-Dührsen K. 1998. Onchocerca volvulus: Ultrastructural Localization of Two GlutathioneS-Transferases. Experimental Parasitology **88**:34-42.

Willard-Mack CL. 2006. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. Toxicologic pathology **34**:409-424.

Závada F. 2010. Gastrointestinální imunitní systém. Medicína pro praxi **7:**268-269.

Zhao FJ, Harris E, Yan J, Ma J, Wu L, Liu W, McGrath SP, Zhou J, Zhu Y. 2013. Arsenic methylation in soils and its relationship with microbial arsM abundance and diversity, and As speciation in rice. Environmental science & technology **47**:7147-7154.

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA. 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. Annual review of plant biology **61**:535-559.

Zhu YG, Yoshinaga M, Zhao FJ, Rosen BP. 2014. Earth abides arsenic biotransformations. Annual Review of Earth and Planetary Sciences **42**:443-467.

9 Seznam použitých zkratek

APC	antigenpresentující buňky
CAT	kataláza
DMA	kyselina dimethyl arzinová
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GALT	organizovaná střevní lymfoidní tkáň
GI	gastrointestinální
GIT	gastrointestinální trakt
GPX	glutation peroxidáza
GSH	glutation
GST	glutation-S-transferasa
IEC	střevní epiteliální buňky
IFL	izolované lymfoidy folikulů
Ig	imunoglobuliny
MLN	mezenterické lymfatické uzliny
MMA	kyselina methyl arzonová
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBS	fosfátový pufr
PP	Peyerovy pláty
PRX	peroxiredoxin
PRX	peroxiredoxin
RNS	reaktivní dusíkové radikály
RO	reaktivní kyslík
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SOD	superoxid dismutáza

10 Seznam použitých obrázků a tabulek

Obr. 1: Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) (upraveno dle proprofs.com) 10

Obr. 2: Tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*) (upraveno dle researchgate.net) 11

Obr. 3: Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) (upraveno dle web.stanford.edu) 11

Obr. 4: *Gyrodactylus aquatic* (upraveno dle fotolia.com).....12

Obr. 5: Škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) (upraveno dle mmdskeletal.weebly.com 13

Obr. 6: *Pomphorhynchus laevis*: a) celé tělo; b) chobotek (upraveno dle naturalhistoryintechnology.wordpress.com).....13

Obr. 7: Vývojový cyklus helmintů (upraveno dle cdc.gov) 15

Obr. 8: Peyerovy pláty (upraveno dle chegg.com) 18

Obr. 9: Izolované lymfoidy folikulů (upraveno dle researchgate.net).....19

Obr. 10: Mezenterické lymfatické uzliny (upraveno dle medind.nic.in).....19

Obr. 11: Sloupcový graf výsledných koncentrací olova v analyzovaných vzorcích. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné ze dvou opakování ± SD. 36

Tab. 1: Přehled parazitů z kapitoly a jejich taxonomické zařazení (viz. kapitola 3.2.2.1. Biotransformační enzymy parazitů).....24

Tab. 2: Výsledné koncentrace olova v analyzovaných vzorcích 36

Tab. 3: Porovnání koncentrací na základě analýzy rozptylu – ANOVA (na hladině $p < 0,05$) 37