

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra zoologie a rybářství



**Syntéza metalothioneinů v organizmu volně žijících drobných
zemních savců v závislosti na míře kontaminace prostředí
rizikovými prvky**

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Daniela Křivská

Školitel: prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci na téma „Syntéza metallothioneinů v organismu volně žijících drobných zemních savců v závislosti na míře kontaminace prostředí rizikovými prvky“ vypracovala samostatně a nebyla porušena autorská práva třetí osoby. Všechny zdroje použité při tvorbě této práce jsou uvedeny v kapitole Seznam použité literatury.

V Praze dne

.....
Ing. Daniela Křivská

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mnoha lidem za jejich spolupráci a podporu během získávání výsledků, jejich vyhodnocování a tvorby této práce. Můj obrovský vděk a zároveň i obdiv si zaslouží celý tým, který se podílel na náročných odchyltech volně žijících zvířat v terénu. Tato práce přinesla několik zranění, mnoho ztrát na materiálu a občas vedla i ke značnému fyzickému a psychickému vyčerpání. Přesto na tyto chvíle budu ráda vzpomínat a jsem vděčná za spousty krásných i vtipných okamžiků a také za navázání mnoha kratších i delších přátelství.

Jmenovitě musím poděkovat Zuzce Čadkové za její neuvěřitelnou energii a vervu, se kterou se pouští do těchto akcí, zřídka hraničících s šílenstvím, za její nikdy neutuchající snahu dělat vše správně a získat co nejlepší výsledky. Také za její vedení, podporu a nesčetné rady ve všech fázích mého studia. Dále chci velice poděkovat paní Ivaně Šestákové, která mě od začátku trpělivě vedla a zasvěcovala do tajů polarografických metod a pomohla mi zorientovat se v náročných biochemických aspektech tohoto tématu. Hlavní a největší dík této skvělé dámě ale patří za to, že ve všech případech dovedla korigovat moji roztěkanost a touhu zjistit všechno hned a vždy mě navedla tím správným směrem. Další velké díky patří i mojí školitelce Ivě Langrové, protože vždy podporovala moje aktivity a nápady a její úžasná autorita mě nejednou „dokopala“ k lepším výkonům.

Samozřejmě ze srdce děkuji také mojí mamince, rodině a přátelům za jejich podporu, rady a pomoc ve chvílích štěstí i neštěstí, které mě po celou dobu provázely. Můj přítel Jakub Drulák si místo v tomto poděkování vysloužil svým nejen IT supportem a péčí, která zahrnuje dokonce vaření skvělých jídel, kterými okouznil i moje kolegyně v posledních letech terénních odchytů. Za jeho dobře skryté nadšení při líčení živochytných pastí a jeho talent naskládat libovolné množství materiálu do jakéhokoliv úložného prostoru. Za jeho všestrannou pomoc a jeho zázračnou schopnost vždy vyřešit jakýkoliv problém.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled	7
2.1. Rizikové prvky	7
2.1.1. Kontaminace životního prostředí rizikovými prvky	7
2.1.2. RP v půdě	8
2.1.3. RP v rostlinách	9
2.1.4. RP v živočiších.....	11
2.1.5. Biodostupnost RP.....	13
2.2. Mechanizmy detoxikace RP	14
2.2.1. Fytochelatiny a GSH	15
2.2.2. Metalothioneiny	16
2.3. Biomonitoring.....	20
2.3.1. Potravinový řetězec v souvislosti s biomonitoringem	21
2.3.2. Drobní zemní savci jako modelové organizmy.....	22
2.3.3. MT jako marker kontaminace životního prostředí.....	23
2.4. Kvantifikace a speciace metalothioneinů v organickém materiálu	24
2.4.1. Stanovení koncentrace MT pomocí elektrochemických metod.....	24
3. Vědecké hypotézy	27
4. Cíl práce	28
5. Materiál a metody	29
5.1. Kvantifikace obsahu metalothioneinů ve tkáních.....	29
5.1.1. Extrakce MT.....	29
5.1.2. Analýza koncentrace MT v extraktu	29
5.1.3. Reprodukovatelnost metody extrakce MT	29
5.1.4. Příprava vzorků před analýzou MT.....	30
5.2. Terénní výzkum.....	31
5.2.1. Popis odchytných lokalit	31
5.2.2. Odběr vzorků půdy.....	32
5.2.3. Odběr vzorků drobných savců	32
5.2.4. Analýza rizikových prvků v půdě a tkáních.....	33
5.3. Statistické vyhodnocení výsledků	34
6. Výsledky	35

6.1. Stanovení koncentrace MT	35
6.1.1. Reprodukovatelnost metody extrakce a analýzy koncentrace MT	35
6.1.2. Modelový test stability MT v reálných vzorcích	35
6.2. Biomonitoring.....	38
6.2.1. Biodiverzita na odchytných lokalitách.....	38
6.2.2. Koncentrace RP v půdě.....	39
6.2.3. Koncentrace RP a MT v orgánech odchycených zvířat	40
7. Diskuse.....	44
7.1. Pre-analyzační metody nakládání se vzorky	44
7.1.2. Vliv přípravy vzorku na koncentraci MT v játrech analyzovaných zvířat.....	44
7.1.3. Diference v Brdičkově reakci.....	45
7.2. Biomonitoring kontaminace životního prostředí.....	46
7.2.1. Biodiverzita odchycených drobných zemních savců	46
7.2.2. Koncentrace půdy RP na vybraných lokalitách	47
7.2.3. Koncentrace PR v orgánech drobných zemních savců	48
7.2.4. Syntéza MT a její ovlivnění různými faktory	51
7.2.5. Distribuce prvků mezi orgány	52
8. Závěr	54
9. Seznam zkratk	56
10. Seznam obrázků a tabulek	57
11. Seznam použité literatury	58

1. Úvod

Každý den je do životního prostředí vypouštěno obrovské množství kontaminantů. Mezi tyto látky patří různé chemikálie, organické sloučeniny (např. polyaromatické uhlovodíky, polychlorované bifenylly) a další. Velmi vážným problémem současnosti je kontaminace toxickými rizikovými prvky. Tyto látky negativně působí na celé ekosystémy. Do této kategorie patří těžké kovy, které jsou tématem této práce.

K uvolňování prvků do vzduchu, vody a půdy dochází vlivem přírodních zdrojů, jako je eroze a vulkanická činnost, ale i vlivem antropogenní aktivity, která má vzrůstající tendenci. Mezi tyto činnosti patří například průmyslová činnost, zpracování kovů, spalování paliv a zemědělská činnost. Uvolňování rizikových prvků do prostředí může znamenat potenciální problém pro všechny živé organizmy. Tyto prvky nemají schopnost se v přírodě přirozeně denaturovat a dochází k jejich akumulaci v rostlinách i živočiších a dostávají se tak do potravinového řetězce. Některé stopové prvky jsou pro živý organizmus esenciální, ale ve větších koncentracích mohou způsobovat jeho poškození.

Mezi nejvíce kontaminované oblasti v České republice patří Příbramsko, kde ke kontaminaci dochází atmosférickou depozicí těžkých kovů při zpracování olova a vlivem vysokých obsahů kovů v geologickém podloží. Tato oblast je třeba monitorovat a sledovat vlivy kontaminace na organizmy, které zde žijí. Vhodným bioindikátorem jsou podle současných studií drobní zemní savci, kteří mají schopnost přežít v prostředí zatíženém těžkými kovy, mají početné populace a mají široké spektrum potravních preferencí, díky kterému je možné sledovat více složek potravinového řetězce.

Živé organizmy si vyvinuly celou řadu obranných mechanismů, díky kterým jsou schopny se adaptovat na zatížení rizikovými prvky. Mezi ně patří syntéza metaloproteinů, jako jsou fytochelatiny nebo metalothioneiny. Tyto nízkomolekulární polypeptidy či proteiny s vysokým obsahem cysteinu mají schopnost vázat kovy pomocí thiolových skupin. V organismu se nachází i za fyziologických podmínek, ale při expozici rizikovými prvky se jejich syntéza zvyšuje, jako reakce na vnější vlivy. Pomocí těchto proteinů může organizmus kovy detoxikovat. Metalothioneiny mohou být použity také jako biomarker pro monitoring kontaminace životního prostředí a adaptace živočichů, kteří v něm žijí.

2. Literární přehled

2.1. Rizikové prvky

Za rizikové prvky jsou v souvislosti s kontaminací životního prostředí považovány zejména takzvané těžké kovy. Ačkoli není jasná definice toho, co je těžký kov, ve většině případů se za určující faktor považuje hustota. Těžké kovy jsou tedy obecně definovány jako ty, které mají měrnou hustotu vyšší než 4.5 g/cm^3 , které mají sklon uvolňovat elektrony v chemických reakcích a tvoří jednoduché kationty. V pevném a kapalném skupenství mají dobrou tepelnou a elektrickou vodivost a jsou lesklé a neprůhledné. Mají vysokou teplotu tání a varu. Kovy klasifikované jako těžké zahrnují: měď (Cu), kobalt (Co), chrom (Cr), kadmium (Cd), železo (Fe), zinek (Zn), olovo (Pb), cín (Sn), rtuť (Hg), mangan (Mn), nikl (Ni), molybden (Mo), vanad (V) a wolfram (W); (Miettinen 1975; Szyzewski et al. 2009). Avšak tento termín je velmi obecný a v literatuře se používá pro velké množství prvků, které jsou spojovány s kontaminací a potenciální toxicitou (Duffs 2002). Rizikové prvky jsou silně toxické a ekotoxické a proto jsou považovány za kontaminanty životního prostředí. Hlavní hrozby pro lidské zdraví způsobené toxickými kovy jsou spojené s expozicí Pb, Cd, Hg a arsenu (As); (arsen je metaloid, ale obvykle se klasifikuje jako těžký kov). Přestože jsou škodlivé účinky těchto prvků na zdraví známé již dlouhou dobu, expozice těmito prvky pokračuje a v některých oblastech dokonce roste. Tyto kovy byly rozsáhle studovány a jejich účinky na lidské zdraví pravidelně posuzovány mezinárodními organizacemi, jako je WHO (Hu 2002; Järup 2003).

2.1.1. Kontaminace životního prostředí rizikovými prvky

Rizikové prvky (RP) se do životního prostředí dostávají z přírodních zdrojů i lidskou aktivitou. Nachází se ve vzduchu, půdě i vodě a stávají se globálním problémem. Jsou potenciálním nebezpečím pro všechny živočichy, žijící v tomto prostředí kvůli jejich toxicitě, bioakumulaci a biologické nerozložitelnosti v přírodě (Stankovic et al. 2014).

Toxické kovy a metaloidy dostávající se do půdy mají různý původ. Tyto prvky jsou v přírodě obecně všudypřítomné, ale mohou se koncentrovat v půdě v důsledku antropogenních a geochemických procesů. Mezi geogenní procesy patří zvětrávání na kovy bohatých základních zdrojů, vulkanická činnost, spalování dřeva/rostlin a mořské aerosoly. Primárním zdrojem znečištění půdy je však lidská činnost jako spalování paliva, likvidace odpadů, zemědělská (dlouhodobá aplikace hnojiv, kalů a městských odpadů, pesticidů apod.) a především průmyslová činnost. Jedním z hlavních zdrojů antropogenní kontaminace je důlní

činnost a zpracovávání kovů. To vede ke vzniku emisí – nežádoucích pevných, kapalných a plyných látek, přímo vlivem jejich těžby a zpracování a nepřímo, ve spojení se spotřebou surovin a vybavení, např. na výrobu elektrické energie, různých činidel a výbušnin. (Lombi et al. 2000; Norgate et al. 2006; Halim et al. 2003).

RP, které jsou jednou uvolněny do vzduchu, vody, nebo půdy se v životním prostředí nerozkládají, ale akumulují se do půd, sedimentů, do rostlin a živých organismů (Stankovic et al. 2014). V této formě mohou vstoupit do potravinového řetězce, a tudíž přímo ohrozit lidské zdraví. Existují obavy z toxicity řady těžkých kovů (např. Cd, Pb, Hg), hrozbu ale mohou znamenat i kovy, které jsou esenciální a biologicky důležité. Tyto prvky (např. Zn, Cu) mohou být v případě, že jsou přijímány ve vysokých koncentracích, toxické (Norgate et al. 2006; Vaněk et al. 2005)

2.1.2. RP v půdě

Toxicita a mobilita stopových prvků nezávisí pouze na jejich celkové koncentraci v půdě, ale také na jejich specifických chemických formách, vazebném stavu, jejich vlastnostech, environmentálních faktorech a půdních vlastnostech, jako je pH a obsah organické hmoty. Nejnižší nebezpečí v půdě představuje Pb, jako nejméně mobilní kov a nejvyšší možné riziko představuje Cd a Zn v jejich mobilních formách (Iftode et al. 2015; Vaněk et al. 2005; Šichorová et al. 2004). Ullrich et al. (1999) zjistili, že pro Zn a Pb existuje prahová hodnota pH (pH = 6) při níž bylo pozorováno významné zvýšení výměnné frakce. U Cd ale takováto hodnota neexistuje, protože je relativně labilní i v mírně alkalických půdách (pH = 7-8).

Pb výrazně ovlivňuje biologickou aktivitu půdy. Obecně je olovo akumulováno v blízkosti povrchu půdy a snadno se vstřebává do půdní organické hmoty. Jeho dostupnost závisí na půdních vlastnostech. (Iftode et al. 2015; Sharma & Shanker-Dubey 2005).

V půdě rizikové prvky podstupují řadu procesů, které mohou snížit, nebo zvýšit jejich mobilitu, dostupnost a toxicitu. Tyto reakce jsou ovlivněny například také kořenovou činností (uvolňování exudátů, změny pH atd.); (Lombi et al. 2000). Efekt organických složek na adsorpci kovů závisí na druhu a náboji organominerálních komplexů přítomných v půdním roztoku, vlastnosti povrchu minerálu a pH. Čím vyšší je pH, tím vyšší je obsah prvků v půdě. Nízkomolekulární alifatické kyseliny produkované kořeny rostlin a mikroorganismy mohou hrát důležitou roli v adsorpci a desorpci, a tudíž mobilitě těžkých kovů v půdě, speciálně v rizosféře. (Lombi et al. 2000; Perelomov et al. 2011; Stankovic et al. 2014).

2.1.3. RP v rostlinách

Několik stopových prvků, jako B, Cl, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, Mo a B, hraje dvojitou roli v systému rostlina – půda. Jsou esenciální pro specifické fyziologické funkce rostlinného metabolismu, ale ve vysokých koncentracích mohou působit toxicky. U prvků Cd, Cr a Pb zatím nebyly objasněny jejich funkce v rostlině. Rostliny dokáží ve svých tkáních akumulovat stopové prvky, zvláště těžké kovy, díky schopnosti adaptovat se na vlastnosti prostředí, ve kterém se nachází. V životním prostředí rostliny působí jako střední rezervoáry prvků mezi půdou, částečně i vodou a vzduchem, a faunou (Midar-ul-Haq et al. 2005).

Stopové prvky se v rostlinách mohou účastnit metabolických procesů, ale také mohou být pouze uloženy v jejich buňkách a membránách, kde narušují chemické složení rostlin, aniž by docházelo k viditelnému poškození. Chemický stres rostlin nemůže být zcela jasně definován, protože si v průběhu evoluce i vývoje během života vyvinuly řadu biochemických mechanismů, díky kterým jsou schopné se adaptovat a tolerovat nové, nebo chemicky nevyvážené prostředí. Mechanizmy adaptace na přebytek stopových prvků v růstovém médiu mohou probíhat různými procesy: komplexování a chelatace iontů mimo buňky rostliny (nejčastěji v kořenech), vazba iontů v buněčných stěnách, selektivní příjem iontů, imobilizace v různých orgánech jako imobilní sloučeniny obsahující minerály, uvolňování vymýváním z listů, extrakce ze špiček listů ve formě solí, odpařování toxických látek, výron přebytečných prvků z kořenů a odstranění prvků opadáváním listů, nebo jehličí. I přesto může vlivem expozice toxickým kovům docházet k oxidativnímu stresu, který vede k ničení buněk rostliny a narušení homeostázy buněčných iontů. Příjem prvku závisí na druhu a genotypu rostliny a její schopnosti absorbovat stopové prvky. Chemické složení rostliny obecně odráží složení prvků v růstovém médiu, které představuje hlavní zdroj příjmu prvků. Nejčastější cestou pro adsorpci elementů je kořenový systém a jejich příjem souvisí více s koncentrací prvků v půdním roztoku a jejich formou než s celkovou koncentrací kovů v půdě. Rozsah, v jakém tento vztah existuje je ale velice variabilní a řídí se mnoha faktory. Menší množství může být přijímáno listy z ovzduší, jako například v případě Pb, Hg a As (Sharma & Shanker-Dubey 2005; Yadav 2010; Kabata-Pendias 2010; Singh et al. 2011).

2.1.3.1. Působení RP na rostliny

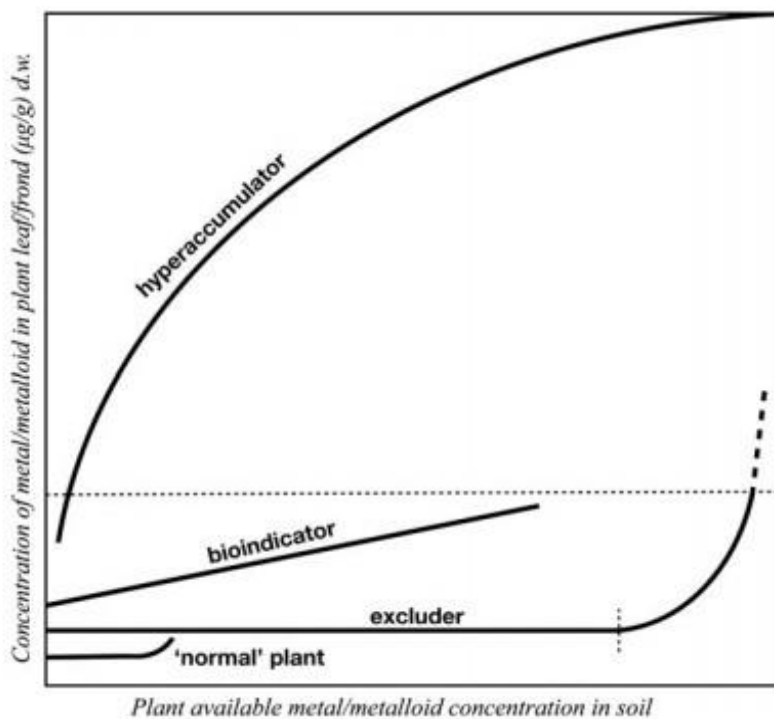
Vysoká expozice rizikovým prvkům může u rostlin způsobovat metabolické i morfologické změny a poškození. Rostliny vyskytující se v oblasti s nadlimitním obsahem Cd (>100mg/kg půdy) mají sníženou schopnost fotosyntézy a sníženou schopnost přijímat vodu a živiny. Na rostlinách jsou viditelná poškození jako chloróza, inhibice růstu, hnědnutí konců

kořenů, nebo definitivní zahubení. Cd také způsobuje rozpad membránových lipidů, proteinů a pigmentů vlivem oxidačního stresu (Hegedus et al. 2001). Při vysoké koncentraci Zn a Cr v kombinaci s Cd dochází k inhibici mnoha metabolických funkcí, což má za následek opožděný růst, stárnutí a omezení růstu kořenů i výhonů. Při dlouhodobé expozici způsobuje vysoká koncentrace Zn také chlorózu mladých listů, která se může rozšířit i na starší a také může vést k nedostatečnému vštřebávání Mn a Fe. Přebytek Cu také způsobuje zpomalený růst, chlorózu a oxidační stres (Ebbs & Kochian 1997). Rtuť, vyskytující se v půdě v několika formách, brání fyziologickému proudění vody v rostlině, snižuje obsah chlorofylu, zasahuje do mitochondriální aktivity a způsobuje oxidační stres tím, že vyvolává generování reaktivní formy kyslíku, ROS (Cargnelutti et al. 2006). Pb v rostlině inhibuje buněčnou aktivitu, poškozuje rovnováhu vody a příjem živin, má negativní vliv na morfologii, růst a fotosyntetickou funkci a ovlivňuje strukturu a propustnost membrán (Sharma & Shanker-Dubey 2005). As a Co mohou rostliny v malém množství akumulovat a detoxikovat či tolerovat, ale ve větších koncentracích mají nepříznivý efekt na růst výhonů a množství biomasy. Ni se v prostředí vyskytuje ve velmi malých koncentracích, ale při jeho nadbytku se mohou objevit fyziologické změny a různé příznaky toxicity jako chloróza a nekróza (Yadav 2010).

Primární reakcí rostlin na zvýšenou hladinu těžkých kovů v prostředí je produkce reaktivní formy kyslíku (Yadav 2010).

Přirozená citlivost nebo tolerance rostlin k akumulaci kovů je podstatně ovlivněna druhem rostliny a genotypem. Rostlinné druhy mohou být rozděleny do tří skupin: exkludory, tj. rostliny, které mají limitovaný příjem a akumulaci potenciálně toxických prvků (hlavně jednoděložné trávy); indikátory, tj. většina zemědělských plodin, jejichž akumulace prvků více méně lineárně odpovídá zvyšujícímu se obsahu stopových prvků v půdě (pšenice, oves, kukuřice atp.) a akumulátory, kam patří rostliny, které ve svých tkáních akumulují vysoké množství prvků podle jejich obsahu v půdě. Mezi akumulátory patří řada druhů zejména z čeledí Brassicaceae a Compositae. Existuje několik druhů extrémních akumulátorů (hyperakumulátorů), které mohou dokonce prosperovat na vysoce kontaminovaných lokalitách a akumulovat extrémně vysoké množství toxických prvků (Baker & Brooks 1989). Schéma rozdílů v akumulaci na základě tohoto rozdělení je znázorněno na obrázku č. 1.

Obrázek č. 1: Koncepční schéma pro rostliny dostupných kovů a metaloidů z půdy a odezva příjmu v listech rostlin (Van der Ent et al. 2012).



2.1.4. RP v živočiších

V živočišných organizmech se akumuluje mnoho xenobiotik, včetně těžkých kovů. Některé z nich jsou rychle detoxikovány, ale většina jich je ukládána ve tkáních a orgánech.

Nejvyšší toxické vlastnosti jsou charakterizovány u anorganických kovových sloučenin, které snadno disociují a jsou snadno rozpustné, protože mohou lehce proniknout přes buněčné membrány a dostat se do vnitřních orgánů. Jejich toxicita v organismu narušuje biologické procesy a může způsobit vysoký krevní tlak, kancerózní změny, poškození ledvin, jater i mozku. V některých případech může dojít dokonce k mentálním poruchám a ztrátě mozkových funkcí (Jaishankas et al. 2014). Důležitou roli hrají také metaloidy (zejména antimon, arsen a selen), které mohou způsobit enzymatické poruchy, kancerózní změny, změny kůže a gastrointestinální poruchy. Toxicita kovů a metaloidů závisí na jejich koncentraci, schopnosti tvořit komplexy a stupni oxidace (Szyzewski et al. 2009).

2.1.4.1. Působení RP na živočichy

Kovy z fyziologického hlediska spadají, stejně jako u rostlin do dvou kategorií: esenciální a neesenciální. Esenciální kovy (např. Fe, Zn, Cu) jsou nezbytné pro optimální funkci biologických a biochemických procesů v organismu, jako stabilizace proteinových struktur, podpora transferu elektronů a katalýza enzymatických reakcí. U neesenciálních prvků (např. Pb, Hg a Cd) nejsou známy biologické funkce a projevují svoji toxicitu narušováním správné činnosti enzymů a asociovaných kofaktorů. Může docházet ke kompetici s esenciálními kovy v aktivních enzymech, nebo membránových proteinech (Torres et al. 2008). Esenciální prvky mohou mít negativní efekt v živých organizmech jak při jejich nedostatku, tak při jejich nadbytku.

Prvky se do organismu mohou dostat různými mechanizmy a cestami. Nejčastěji se do těla vstřebávají prostřednictvím ingesce (potrava, voda), inhalace (vzduch) a absorpce kůží. Inhalace a gastrointestinální absorpce je v běžné populaci nejčastější formou vstřebávání, avšak záleží na konkrétním druhu kovu.

Hlavním zdrojem arzeny je kontaminovaná voda (Singh et al. 2007), zatímco u kadmia a rtuti dochází k příjmu přes kontaminovanou potravu. Chrom a olovo se do těla nejčastěji dostává inhalací kontaminovaných prachových částic a aerosolu, ale i přes kontaminovanou potravu a vodu (Sinicropi et al. 2010; Tchounwou et al. 2012).

Při ingesci závisí toxicita na formě kovu, pH, rychlosti průchodu potravy trávicím ústrojím, biotransformaci střevními organismy a množstvím komplexotvorných organických látek a metaloproteinů (Průša et al. 2004).

Těžké kovy mají tendenci se akumulovat v organismu v různých orgánech a tkáních i v závislosti na typu prvku. Tyto prvky se nejčastěji akumulují v ledvinách, nadledvinkách, játrech, plicích a kůži a ochlupení. Například u sladkovodních ryb byly pozorovány vyšší koncentrace RP v kostech než v mase u Pb, Cd, Cu, Zn, Fe, Ni a Mn. V případě Cr a V byla koncentrace stejná. U všech prvků byla naměřená koncentrace ve svalovině dvanáctkrát nižší než ve vnitřních orgánech, přičemž nejvyšší koncentrace byly naměřeny v játrech (Staniskiene et al. 2006; Stankovic et al. 2014). V metabolismu těžkých kovů ovšem hrají hlavní roli játra a ledviny. Tyto orgány neslouží pouze k jejich bioakumulaci, ale také k biotransformaci, detoxikaci a zvýšené eliminaci (Torres et al. 2008).

Některé kovy jsou v nadměrném množství dobře tolerovány, protože absorpce je limitována dávkou vyžadovanou individuálním organismem, ale jiné mohou vykazovat vysokou tendenci k akumulaci. Dalším důležitým faktorem je také poločas rozpadu prvků.

Například poločas rozpadu rtuti je 60 – 70 dní, zatímco u kadmia je to 10 – 20 let. Navíc je poločas rozpadu kovů v organismu ovlivněn i druhem tkáně, do které je akumulován. U olova se například poločas rozpadu v měkkých tkáních pohybuje v řádech týdnů, v kostech může dosáhnout až dvaceti let (Sinicropi et al. 2010).

Důležitými parametry pro toxicitu jednotlivých kovů jsou jejich chemická forma (elementární, organická, anorganická) a jejich schopnost vazby. Organické formy jsou obvykle vysoce lipofilní, což jim umožňuje průchod biologickými membránami a mohou se akumulovat v lipofilních tkáních, zatímco anorganické formy kovů způsobují hlavně renální toxicitu (Sinicropi et al. 2010; Tchounwou et al. 2012).

Procesy, při kterých se kovy akumulují do tkání živých organismů, jsou závislé na druhu organismu a také na mechanismu detoxikace a rychlosti metabolismu (Stewart et al. 2005). Důsledkem toho můžeme nalézt rozdílné obsahy kovů u různých organismů žijících ve stejném prostředí (Jakimska et al. 2011).

2.1.5. Biodostupnost RP

Biologická dostupnost prvků je ovlivněna fyzikálními faktory, jako je teplota, fázová asociace, adsorpce a sekvestrace. Chemické faktory ovlivňují termodynamickou rovnováhu, komplexační kinetiku, rozpustnost lipidů a hodnotu rozdělovacího koeficientu n oktanol/voda. Speciální kovu, která je velmi podstatná lze obecně definovat jako identifikaci a kvantifikaci různých definovaných druhů, forem nebo fází, ve kterých se prvek vyskytuje. Biologická dostupnost je však zlomek celkového množství kovu v určité složce životního prostředí, která je v daném časovém období k dispozici v přímém okolí organismu, nebo může být mikroorganismy zpřístupněna pro absorpci (Olaniran et al. 2013). Kungolos et al. (2006) zjistili, že humínové kyseliny (HA) působí na různé kovy rozdílně a toxicita prvků závisí i na jejich schopnosti kovů tvořit komplexy. Bylo například zjištěno, že přidání humínových kyselin snížilo toxicitu Cu, zatímco v případě zinku nedošlo k žádné změně. Tyto prvky vykazovaly nízkou hladinu komplexace a jejich toxicitu způsobuje spíše forma volných kovových iontů. V případě Pb se vytvořily komplexy Pb-Ha a toxicita se významně zvýšila. Biologická dostupnost se tedy liší i podle druhu kovu a jeho vlastností.

Biodostupnost rizikových prvků je závislá také na mnoha dalších faktorech souvisejících s organismem který může prvek potenciálně přijmout. Tyto faktory tvoří například věk, pohlaví, velikost, genetická charakteristika, chování (s ohledem na potravinový řetězec) a interakce mezi všemi těmito faktory.

Roli hraje také unikátnost jednotlivce, populace nebo druhu. González et al. (2006) pozorovali, že existuje vyšší intrapopulační variabilita v koncentracích prvků v orgánech myšic křovinných (*Apodemus sylvaticus*), než interpopulační variabilita. V tomto případě byla naměřena o 10 – 20 % vyšší intrapopulační variabilita u Zn a Mn, o 20 – 40 % u Cu a okolo 110 % v případě Cr. Je zde také mnoho interakcí mezi jednotlivými prvky a mezi kovy a fyzikálním prostředím. Některé faktory zvyšují příjem a adsorpci, zatímco jiné ji zmírňují (Peakall & Burger 2003; Tchounwou et al. 2012). Pascoe et al. (1991) hodnotili biodostupnost kovů a metaloidů z půdy v mokřadních systémech. Půdy měly neutrální až alkalické pH (průměr pH = 7,3), což nenaznačuje vysoký potenciál uvolňování kovů z půdy. To bylo také potvrzeno zjištěním, že vypočtená bioakumulační schopnost prvků v orgánech býložravců (*Peromyscus maniculatus* a *Microtus pennsylvanicus*) byla méně než 0,2 %.

Kontaminace životního prostředí se běžně hodnotila kvantifikací celkového obsahu rizikových prvků v půdě, avšak samotná tato informace, i když důležitá, je pro posouzení toxicity a dopadu na exponované organismy značně nedostačující. Běžné analytické techniky pro stanovení obsahu kovů jako chromatografie, polarografie, nebo iontově selektivní elektrody nejsou schopny rozlišit mezi přístupnými a nepřístupnými frakcemi kovů pro biologické systémy (Olaniran et al. 2013). V současnosti se pro stanovení biologicky dostupné frakce prvků v půdě používá například jednoduchá extrakce půdního vzorku činidlem (slabé roztoky organických kyselin nebo anorganických solí), které extrahuje mobilní podíly prvků (Žemberyová et al. 2007). Díky senzitivním analýzám gastrointestinální digesce je možné zjistit i vliv variance pH žaludečních šťáv na biologickou dostupnost prvků z půdy v případě ingesce této půdy, které mohou být vstřebávány přes střevní epitel (Pelfrêne et al. 2011). Přenos výsledků získaných chemicky v nebiologických systémech na biologické systémy, respektive živé organismy, však není snadno interpretovatelný. Tento fakt vedl k tendenci provádět terénní monitoring a k rozvoji studia biosenzorů, biomarkerů a biotestů jako nových analytických nástrojů schopných poskytovat spolehlivé vyhodnocení biodostupnosti prvků z prostředí do živých organismů (Rodríguez-Mozaz et al. 2004).

2.2. Mechanizmy detoxikace RP

Všechny živé organismy, včetně rostlin, si vyvinuly množství mechanismů, které kontrolují příjem a akumulaci esenciálních i neesenciálních kovů. Tyto mechanismy zahrnují chelaci a sekvestraci těžkých kovů pomocí některých ligandů. Dva nejlépe popsání ligandy vázající kovy jsou fytochelatiny (PC) a metalothioneiny (MT). MT jsou na cystein bohaté

proteiny, kódované skupinou genů, zatímco PC jsou skupina na cystein bohatých polypeptidů, syntetizovaných pomocí enzymů. Až do doby, kdy byly geny pro tvorbu MT objeveny u rostlin, se PC považovaly za alternativu MT pro rostliny. Byly nalezeny dokonce i organizmy, které dokáží syntetizovat PC i MT současně (Cobbett & Goldsbrough 2002; Merlos et al. 2014).

2.2.1. *Fytochelatiny a GSH*

Chelatace těžkých kovů je běžnou detoxifikační strategií, která je popsána u mnoha různých druhů rostlin. Základní třídou chelatorů těžkých kovů v rostlinách jsou PC, třída nízkomolekulárních polypeptidů bohatých na cystein se schopností vázat těžké kovy. Jejich primární struktura je $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$, přičemž γ -Glutamyl-cysteinová jednotka $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ se může opakovat 2 až 11krát (Cobbett 2000). PC jsou non-translačně syntetizovány z redukovaného glutathionu (GSH) při transpeptidické reakci katalyzované enzymem fytochelatin synteázou. Pro rostliny je proto, při jejich vystavení těžkým kovům, důležitá dostupnost GSH (Yadav 2010; Merlos et al. 2014).

GSH je tripeptid, nejčastěji se vyskytující thiol s nízkou molekulovou hmotností, který je přítomný ve všech eukaryotických organizmech nesoucích mitochondrie, včetně rostlin. Je syntetizován v plastidech a byl detegován prakticky ve všech buněčných částech, hlavně v cytosolu, chloroplastech, endoplazmatickém retikulu, vakuole a mitochondriích. Podle současných studií je obsah GSH hlavním faktorem určujícím relativní toleranci rostlin vůči RP. Díky tomuto detoxikačnímu mechanismu jsou některé rostliny schopny prosperovat i v kontaminované půdě, zatímco jiné hynou (Noctor & Foyer 1998; Yadav 2010).

PC nejsou syntetizovány pouze v rostlinách, ale také v houbách a dalších organizmech. Tyto polypeptidy vytváří komplexy s ionty těžkých kovů v cytosolu a následně jsou transportovány do vakuoly (Merlos et al. 2014).

V případě fytochelatinů byla doposud prokázána pouze jejich detoxikační funkce; jejich význam pro rostlinný metabolismus esenciálních kovů není dostatečně znám (Kizek et al. 2004).

2.2.2. *Metalothioneiny*

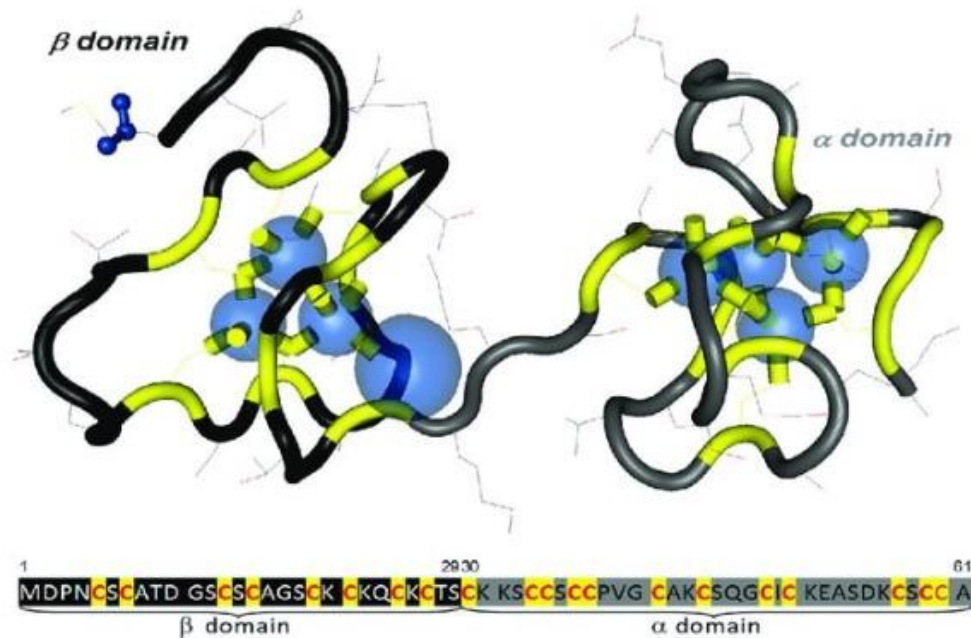
2.2.2.1. Charakteristika MT

Metalothioneiny byly charakterizovány jako nízkomolekulární proteiny (6-7 kDa), které mají vysoké zastoupení cysteinových zbytků. Mají vysokou afinitu ke kovovým iontům a jsou exprimovány v různých typech tkání. Nejvyšší koncentrace tohoto proteinu se nachází v játrech, ledvinách, střevní tkáni, slinivce břišní a mozku (Robinson et al. 2001; Coyle et al. 2002). Název metalothionein byl poprvé použit v roce 1957 pro hlavní protein vázající kadmium v kůře ledvin koně (Margoshes & Vallee 1957). Tyto sloučeniny byly poté identifikovány v mnoha organismech, zejména živočišných (obratlovců, korýšů, měkkýšů apod.), ale i v některých druzích hub a vyšších rostlinách (Klaassens 1999). Jejich základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny, které se pohybují v počtu mezi 61-68. MT jsou charakterizovány vysokým obsahem kovů, vysokým obsahem cysteinů (tvoří cca 30 % obsažených aminokyselin), neobsahují žádné aromatické aminokyseliny, histidin a disulfidy a mají unikátní rozložení cysteinových reziduí v aminokyselinové sekvenci. V molekulách savčích MT-1 se obvykle v primární sekvenci vyskytují aminokyseliny v následujících repetických: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X je označení pro jinou aminokyselinu než cystein (Kizek et al. 2004).

2.2.2.2. Molekulární struktura MT

Třídímenzionální struktura je zformována do dvou globulárních domén kovových klastrů. α – doména (AMK č. 32-61) se nachází na C-terminálním konci a β – doména (1-31 AMK) na N-terminálním konci. Toto uspořádání je znázorněno na obrázku č. 2. β - doména má 4 vazebná místa a α - doména 3 vazebná místa pro kovové ionty. Celkem má tedy molekula MT sedm vazebných míst, $M^{II}_4Cys_{11}$ a $M^{II}_3Cys_9$, pro divalentní ionty, zatímco pro monovalentní ionty je v molekule 12 vazebných míst. Ionty kovů v obou klastrech jsou tetrahedrálně koordinované oběma konci a přemostujícími thiolátovými ligandy, respektive obě domény jsou spojeny flexibilní spojovací oblastí složené ze zachovaného segmentu Lys - Lys uprostřed polypeptidového řetězce (Vašák 2005).

Obrázek č. 2: Strukturální charakteristika α a β domény potkanního MT-2 založená na datech z ExPASy databáze. Nahoře je zobrazena 3D prezentace terciálního uspořádání MT-2 (pdb ID 4MT2). Dole je sekvence aminokyselin MT-2 (P04355); (Babula et al. 2012).



Podoba třídimensionální struktury MT klastrů může být rozdílná pro bakterie, bezobratlé i obratlovce. Zvyšující se počet důkazů naznačuje, že různé funkce savčích izoform MT-1 / MT-2, včetně zapojení do homeostázy zinku, ochrany proti toxicitě těžkých kovů a oxidačnímu poškození souvisí právě s těmito klastry na bázi síry (Vašák et al. 2005). MT bez obsahu kovů, neboli apometalothineiny mají převážně neuspořádanou strukturu. Dobře definovaná proteinová struktura se vyvine až po navázání kovových iontů.

Nejčastěji vázané prvky v MT jsou zinek, kadmium, rtuť a měď v různém složení a mohou tvořit až 11% jeho váhy (Bobillier-Chaumont et al. 2006; Nordberg & Nordberg 2009). MT jsou rozděleny do tříd s ohledem na primární strukturu, množství cysteinových zbytků a druh organismu, ze kterého byly izolovány (Kägi & Kojima 1987, Robinson et al. 2001).

Ve všech zkoumaných obratlovcích byly nalezeny dvě, nebo více odlišných izoform MT. Hlavní MT izoformy jsou označeny jako MT-1 až MT-4. MT-1 je kódován jedenácti geny, zatímco ostatní hlavní izoformy jsou kódovány jedním genem. U savců jsou MT-1 a MT-2 přítomny ve všech orgánech, přestože mRNA MT-1 je více indukovaná, rozdíl mezi nimi není zcela objasněn (Vergani et al. 2009; Banni et al. 2010). MT-3 a MT-4, jsou tkáňově specifické.

MT-3 se vyskytuje v CNS, mozkové tkáni a ve skvamózním epitelu kůže a jazyka (Ghoshal & Jacob 2000). Nejméně prozkoumaný MT-4 byl u myši nalezen ve stratifikovaném spinocelulárním epitelu v buňkách ústní dutiny, jícnu, žaludku, ocasu, tlapkách a neonatální kůži (Quaife et al. 1994). Funkční diference jednotlivých izoform ještě není dostatečně prozkoumaná.

Tvorba izoform MT-1 a MT-2 je indukovaná množstvím stresových podmínek, včetně glukokortikoidů, cytokinů, volných radikálů a v největší míře kovových iontů. MT-3 a MT-4 na tyto faktory příliš nereagují (Vašák & Hasler 2000).

Nejlépe charakterizované savčí MT-1 a MT-2 izoformy přednostně váží sedm divalentních Zn^{II} , nebo až dvanáct monovalentních Cu^I kovových iontů in vivo, prostřednictvím metal-thiolátových koordinačních vazeb. Při in vitro testech MT-1/2 došlo i k vazbě dalších kovů jako Cd^{II} , Bi^{III} , Pt^{II} , Ag^I a Hg^{II} . Tyto kovy se mohou při podávání zvířatům na MT snadno navázat. Různé druhy kovů mají rozdílnou schopnost tvorby thiolátových komplexů s MT např. $Zn^{II} < Pb^{II} < Cd^{II} < Cu^I < Ag^I, Hg^{II}, Bi^{III}$, což způsobuje, že kovy s nižší afinitou mohou být v molekule MT nahrazeny kovy s vyšší afinitou. Při neutrálním pH má Cd 10 000 krát vyšší afinitu než Zn což může být způsobeno jeho o mnoho menším zastoupením v životním prostředí. (Kägi & Schäffer 1988; Hidalgo et al. 2009)

Nativní MT mají obvykle heterogenní složení kovů Zn, Cd a Cu, vyskytujících se v různých poměrech, ale mohou být navázány pouze jednotlivé druhy kovů jako Zn, Cd, Ni, Co, Hg, Pb, Bi (Kägi et al. 1984)

2.2.2.3. Genová exprese MT

Intracelulární koncentrace MT se přizpůsobuje požadavkům buňky, a to hlavně prostřednictvím regulované transkripce.

U všech živých organismů je hlavním mechanismem syntézy MT transkripce a regulátorem přebytku těžkých kovů MTF-1 (metal-responsive transcription factor 1); (Wang et al. 2004; Hardyman et al. 2016). Tento protein se navazuje na MRE (metal responsive elements) umístěný v promotoru genu MT (Höckner et al. 2015). MTF-1 je složen ze šesti zinkových „prstů“, které jsou zodpovědné za vazbu DNA a funguje jako senzor hladiny intracelulárního Zn. Pro vazbu MTF-1 na DNA je zapotřebí zvýšené koncentrace Zn. Nedostatek Zn naopak vede ke snížení exprese MT (Cui et al. 1998).

Preferenční vazba kadmia a mědi na MT, nebo oxidace molekuly peroxidem vodíku uvolňuje zinek do intracelulárního prostoru, což vede k aktivaci MTF-1. Naopak nově syntetizovaný thionein, forma metalothioneinu bez obsahu kovů, inhibuje aktivaci MTF-1.

Uvolňování zinku z buněčných složek, včetně metalothioneinů, a sekvestrace zinku nově vytvořeným apometalothioneinem by mohly být základním mechanismem regulace aktivity MTF-1 při buněčném stresu (Zhang et al. 2003). V přítomnosti kovů s vyšší vazebnou afinitou, nebo v důsledku oxidace molekuly je tedy Zn navázaný v proteinu nahrazen a jeho intracelulární koncentrace se zvýší, čímž se spustí posttranlační kontrolní mechanismus. Zvýšená intracelulární koncentrace Cd, která přesahuje MT vazebnou kapacitu, způsobuje dodatečnou syntézu metaloproteinu. Indukci exprese těchto genů způsobují kovy (Cd, Zn, Cu, Co, Hg a Bi), nebo také metabolicky aktivní látky (glukokortikoidy, cytokiny). (Vašák 2005; Balamurugan & Shaffner 2009; Petering et al. 2009). Podle Banni et al. (2010) ale exprese genu MT neodpovídá přímo intracelulární koncentraci kovů, ale pravděpodobně na stav oxidačního stresu buněk. Dále může na indukci MT syntézy působit fyzický a chemický stres. Chemický stres může vyvolávat velké množství toxikologicky významných sloučenin jako rozpouštědla (chloroform, ethanol), léčiva (acetaminophen, menadion) a také protinádorová léčiva (bleomycin, adriamycin); (Babula et al. 2012). Procesy (UV záření, RG záření, gama záření, produkty reakcí katalyzovaných kovy, znečišťující látky přítomné ve vzduchu, látky produkované neutrofily a makrofágy během zánětu a vedlejší produkty mitochondriálního respiračního řetězce), které jsou schopny indukovat volné radikály (zejména reaktivní druhy kyslíku), také patří do skupiny nejdůležitějších induktorů exprese MT genu (Cadenas 1989; Ruttkay-Nedecky et al. 2013).

Reakce organismu (genová transkripce MT), která je silně indukovaná zvláště při zatížení těžkými kovy, se ale může lišit v závislosti na druhu kovu a orgánu exponovaného organismu. V laboratorním experimentu zaměřeném na indukci MT při expozici laboratorních myší anorganickými formami Zn (chlorid zinečnatý), Cd (chlorid kademnatý) a Hg (chlorid rtuťnatý) byly zjištěny určité rozdíly. Hladina MT indukovaných esenciálním prvkem zinkem byla v játrech na maximum 48 h po expozici a v ledvinách nedošlo k žádné změně. V případě toxických kovů, Cd a Hg, byla maximální indukce zjištěna již po 24 hodinách v játrech i ledvinách (Tandon et al. 2001). Ovšem tato reakce není generalizovatelná na všechny těžké kovy. Při orálním podání anorganické formy Pb (octan olovnatý) laboratorním potkanům ve vodě nebyla zjištěna žádná signifikantní změna v koncentraci ani genové expresi MT-1 a MT2 v ledvinách oproti kontrolní skupině (Wang et al. 2009). Kombinovaná expozice Cd spolu s Pb však výrazně zvyšuje expresi MT (Wang et al. 2009).

Evoluční vztahy metalothioneinů jsou velmi těžko interpretovatelné z hlediska molekulární evoluce, což je způsobeno nedostatkem jednoznačných kritérií

klasifikace. V současné době jsou MT kategorizovány čistě podle taxonomických skupin, nebo podle preferencí a specifík vázání kovů tohoto proteinu (Capdevila & Atrian 2011).

2.2.2.4. Funkce MT

Tyto proteiny mají mnoho důležitých fyziologických funkcí, speciálně v metabolismu a pohybu kovů v organismu. Nejvíce diskutovanými funkcemi MT jsou efekt na homeostázu esenciálních prvků, jako je zinek a měď a detoxikace toxických kovů jako kadmium a rtuť, likvidace volných radikálů a hrají roli i v imunitních reakcích (Vašák & Hasler 2000; Hidalgo et al. 2009; Nordberg & Nordberg 2009).

Je také diskutováno spojení s protein-protein a protein-nukleotid interakcemi, mitochondriálními funkcemi a regulací energetického metabolismu, angiogenezí buněčném cyklu, a diferenciací buněk (Babula et al. 2012). Lze se domnívat, že toxický účinek rizikových prvků je dán pouze tím podílem prvku v živočišném organismu, který není zabudován v metalothioneinech (Friberg et al. 1974; Nordberg 1977; Suzuki et al. 1993; Liu et al. 2003). Například v savčích buňkách hraje vazba mědi na MT roli v sekvestraci Cu při poruchách souvisejících s tímto kovem jako je například Menkesova a Wilsonova choroba (Vašák 2005).

MT má významnou roli také v antioxidační odezvě organismu. Spolu s GSH reguluje výskyt volných kyslíkových radikálů (Maret 2000). Studie odhalily, že MT může chránit buňky před apoptózou indukovanou oxidačním stresem a kovy, a tedy že zasahují do regulace apoptózy (Shimoda et al. 2003). Hladina MT v periferní krvi a séru pacientů může také sloužit jako marker pro diagnostiku rakoviny. Zvýšená exprese u různých forem nádorů pravděpodobně souvisí se zvýšenou proliferací, a tedy právě ochranou před apoptózou (Krizkova et al. 2009). Řada studií prokázala také zvýšenou expresi MT v různých lidských nádorech, jak popsali ve své přehledné práci Cherian et al. (2003).

2.3. Biomonitoring

V kontextu monitoringu životního prostředí reflektují zatížení rizikovými prvky bioindikační organizmy (nebo části organismů, nebo společenství organismů), které obsahují informace o kvalitě životního prostředí (nebo částí životního prostředí). Na druhé straně jsou bioindikátory organizmy (nebo jejich části, nebo společenstva organismů), které obsahují informace i o kvantitativních aspektech kvality životního prostředí. Organizmy, populace, biocenózy a nakonec i celé ekosystémy jsou přirozeně ovlivňovány četnými biotickými a abiotickými stresovými faktory, jako jsou výkyvy klimatu, obstarávání

potravy, vztah mezi predátorem a kořistí, paraziti, nemoci a konkurence v rámci druhů i mezi nimi. V posledních staletích jsou ale organizmy nuceny odolávat i dalším změnám v kvalitě i kvantitě stresorů. Prostřednictvím antropogenní disturbance bylo prostředí konfrontováno s úplně novými látkami, které dříve neexistovaly (pesticidy, polychlorované bifenyly) a potenciálně škodlivé látky uvolňované v množství v minulosti nemyslitelném (těžké kovy, přírodní radionuklidy). Znalost chemické rozmanitosti (složení přítomných kontaminantů) a množství (kvantita stresoru za jednotku času) je nezbytné pro studium dopadu ekologického a antropogenního znečištění (Market et al. 2003)

Biomonitoring umožňuje dlouhodobé pozorování vybraných částí ekosystému, které se zaměřuje na vyhodnocování životních podmínek. Živé organizmy jsou obecně považovány za bioindikátory kontaminace životního prostředí a díky nim je měřitelná míra kontaminace i její efekt. Jako bioindikátory jsou využívány různé druhy rostlin i živočichů. Houby, rostliny, zvířata, a dokonce i lidé jsou používáni k biomonitoringu znečištění životního prostředí těžkými kovy díky jejich schopnosti absorbovat tyto kontaminanty ze vzduchu, vody, sedimentů, půdy a potravního řetězce (Stankovic & Stankovic 2013). Organizmy použité jako bioindikátory kontaminace životního prostředí v terénních studiích musí splňovat určitá kritéria: i) Jejich tělo musí konstantně akumulovat a tolerovat velké množství toxických prvků a musí být vázány na jednu lokalitu, aby výsledky reprezentovaly půdu, ovzduší a vodu ve vytipované oblasti; ii) Musí být možné je odchytnout, identifikovat a zpracovat a musí mít dostatečné množství tkání pro chemické analýzy; iii) Musí mít relativně dlouhou životnost, aby bylo možné vzorkování v delším časovém úseku (Hodkinson & Jackson 2005).

2.3.1. Potravinový řetězec v souvislosti s biomonitoringem

Biomonitoring kontaminace prostředí RP umožňuje posouzení reakce organismů na různých trofických úrovních. Souvislost mezi obsahem Cd v prostředí a ve tkáních byla na spodní úrovni potravního řetězce pozorována například u terestrických plžů, u nichž se jeho efekt projevuje již po krátké expozici (Dallinger 1996). Proces bioakumulace, který zahrnuje zvýšení koncentrace kovů ve tkáních živých organismů na vrchní úrovni potravního řetězce, je nejlépe viditelný ve vodním prostředí. Trvalé hydrofobní chemické látky a těžké kovy mohou být u akvatických organismů akumulovány neustále, a to několika cestami. Přímou z vody, cestou příjmu částic ve vodním prostředí, nebo konzumací jiných organismů (Torres et al. 2008). Toto bylo potvrzeno například v práci Bellante et al. (2012), kdy byly analyzovány orgány mořských kytovců a pozorovány rozdíly v koncentraci Cd a As u kytovců odchycených v různých oblastech. Na vrcholu potravního řetězce se také nachází mnoho druhů terestrických

i akvatických ptáků, kteří konzumují rostliny, bezobratlé i obratlovce. U druhů jako volavky, čápi, pelikáni, kormoráni, raci a rybáci byly naměřeny koncentrace rizikových prvků odpovídající lokalitě odchyty (Horai et al. 2007).

Primární cesty expozice druhů drobných terestrických savců rizikovými prvky spočívají v příjmu kontaminované potravy a vody a náhodným požitím půdy (Pascoe et al. 1994). Tato zvířata tedy nejsou exponována stejným způsobem jako ta akvatická a složení potravy na různých trofických úrovních je důležitým faktorem (Talmage & Walton 1991). Příjem prvků ale může být ovlivněn i ročním obdobím, a to hlavně v případě Pb (Tataruch & Kiredorf 2003), proto je vhodné brát v úvahu i tuto okolnost.

2.3.2. Drobní zemní savci jako modelové organizmy

Drobní zemní savci jsou často využíváni jako bioindikátory kontaminace prostředí. Hrají důležitou roli v potravinovém řetězci a nacházejí se v různých úrovních trofického systému. Zahrnují převážně býložravé, ale i omnivorní a masožravé druhy a také jsou kořistí širokého spektra dravých savců a ptáků. Dále se vyznačují vysokou početností a vazbou na určité prostředí (jejich areál výskytu je mezi 1 až 2 ha); (Andráš et al. 2006; Wijnhoven et al. 2007). Drobní zemní savci mají také dostatečnou délku života, což umožňuje sledovat projevy vnějších vlivů a intenzivní metabolismus, díky kterému je možné identifikovat vliv polutantů i v případě, že je jejich koncentrace v prostředí nízká (Shore & Douben 1994)

Herbivorní druhy, jako například *Microtus sp.* se živí různými druhy trav (*Holcus*, *Agrostis*, *Deschampsia* spp.) a mechu (*Hypnum sp.*). Složení potravy karnivorních druhů (*Sorex sp.*) zahrnuje převážně kroužkovce (včetně *Oligochaeta*) a larvy hmyzu (Coleoptera, Diptera a Lepidoptera). Z bezobratlých druhů žijících v půdě konzumují žížaly (*Lumbricina*), a také různé druhy pavouků a brouků žijících na povrchu půdy, přičemž žížaly vykazují největší akumulaci Cd a Pb (Ma et al. 1991). Omnivorní druhy se živí jak rostlinnou, tak živočišnou složkou (Cano et al. 2013). U drobných zemních savců byla nejlepší korelace mezi Cd a Pb v půdě a ve tkáních organismu zaznamenána u rejska obecného - hmyzožravce (*Sorex araneus*), a to hlavně z důvodu vysokého množství živočišné složky v jeho potravě (Merents et al. 2001). Závislost obsahu Cd a Pb játrech a ledvinách na obsahu prvků v půdě a potravě zvířat byla pozorována i u myšice křovinné - všežravce (*Apodemus sylvaticus*). Hladina prvků v orgánech se zvyšovala se vzrůstající koncentrací prvků v analyzované potravě a půdě (Rogival et al. 2007). Totéž bylo zjištěno i u krys (*Rattus rattus* a *Rattus tanezumi*) exponovaných Pb, Zn, Cd, Cu a Co (Nakayama et al. 2013). U hraboše mokřadního - býložravce (*Microtus agrestis*)

byl pozorován pouze malý vliv koncentrace RP na lokalitě, kdy byl naměřen zvýšený příjem olova pouze během února a března. Tento výkyv byl způsoben především zvýšenou koncentrací Pb v travním porostu v tomto období (Ma et al., 1991).

2.3.3. MT jako marker kontaminace životního prostředí

MT jsou v mnoha případech považovány za vhodný biomarker kontaminace prostředí, protože jsou syntetizovány jako odpověď organismu na expozici rizikovým prvkům. Syntéza a koncentrace MT ve tkáních může být ovlivněna řadou endogenních a exogenních faktorů, stejně jako je tomu u akumulace těžkých kovů, které mohou ovlivnit kvantitativní vztahy mezi expozicí kovem a indukcí syntézy MT (Jakimska et al. 2011).

V laboratorních podmínkách při stanovené přístupné dávce kovů, například u Cd (Tandon et al. 2001; Hispard et al. 2008a) je korelace průkazná a tím je patrný velký potenciál, ale při monitoringu volně žijících zvířat už interpretace tak snadná není.

Indukce syntézy MT jako reakce na kovové kontaminanty byla prokázána například u malých mořských druhů, což naznačuje použití obsahu MT v organizmech jako biomarkeru expozice. MT jsou v současnosti jedním z biomarkerů uznávaných na evropské úrovni a jsou zkoumány v rámci BEQUALM (Biological Effect Quality Assurance in Monitoring Programmes); (Amirad et al. 2006). Korelace mezi obsahem kontaminantů v prostředí a MT ve tkáních ale nemusí platit u všech organismů. Například ve studii Aly et al. (2014) bylo zjištěno, že ve tkáních mořských srdcovek (*Cerastoderma edule*) a hub (*Haliclona oculata*) byla naměřena hodnota rizikových prvků odpovídající prostředí, ale koncentrace MT neodpovídala. Tyto organizmy mají pravděpodobně vysokou toleranci vůči kovové kontaminaci a chronické expozici rizikovými prvky.

Na syntézu MT ve tkáních nemá vliv pouze kontaminace okolního prostředí, ale i biologický cyklus. U asijských škeblí (*Corbicula fluminea*), které byly sledovány celý jeden rok, byl naměřen stálý obsah kovů (Cd, Hg, Zn a Cu) v měkkých tkáních, ale koncentrace MT se v průběhu roku významně lišila. Nejvyšší úroveň MT byla naměřena v polovině května, kdy se škeble připravují k rozmnožování (Baudrimont et al. 1997). Při biomonitoringu kontaminace RP s modelovým organismem Jelenem evropským (*Cervus elaphus L.*) byla prokázána pouze pozitivní korelace mezi expresí MT-1 mRNA a koncentrací Zn a Cu v játrech jelenů. Nebyla zjištěna žádná korelace exprese MT-1 a obsahem Cd játrech (Durkalec et al. 2017). I v tomto případě byl MT vyhodnocen jako nevhodný biomarker pro kontaminaci životního prostředí Cd.

V práci Marques et al. (2008) byla u myši (*Mus spretus*) zjištěna vyšší koncentrace MT orgánech zvířat z kontaminovaných lokalit než u zvířat z lokalit referenčních. Byla

zaznamenána i sezónní variance, kdy byly naměřeny vyšší hodnoty v zimě a nižší na podzim. Tento poznatek naznačuje, indukce MT v játrech a ledvinách reflektuje jak fyziologické, tak environmentální faktory. MT se jako vhodný biomarker projevil i v případě myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), jak popsali Rogival et al. (2007). Nejvyšší koncentrace (Cu, Cd, Zn)-MT byly naměřeny na nejznečištěnějších lokalitách a klesaly v závislosti na zvětšující se vzdálenosti od zdroje kontaminace. Fritsch et al. (2010) zaznamenali u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) významný vztah mezi prostředím a hodnotami MT, ale hladina MT s vyšším množstvím RP v půdě stoupala v játrech a klesala v ledvinách. U norníka (*Clethrionomys sp.*) hladina stoupala pouze v ledvinách a u rejska obecného (*Sorex araneus*) v obou orgánech stoupala. Koncentrace MT se v závislosti na obsahu kontaminantů v půdě liší u jednotlivých druhů i jejich orgánů.

Při použití MT jako potenciálního biomarkru je třeba brát v potaz i další faktory jako pohlaví nebo věk jedinců (Fritsch et al. 2010) a měřenou izoformu metalothioneinu v konkrétním orgánu (Nakayama et al. 2013). Pro relevantní výsledky je tedy potřeba analyzovat široké spektrum jedinců a tkání a také dobře znát jejich metabolismus kovů a MT.

2.4. Kvantifikace a speciace metalothioneinů v organickém materiálu

Pro identifikaci a kvantifikaci obsahu metalothioneinů v živočišných tkáních byla vyvinuta celá řada více či méně úspěšných analytických metod (Shaw et al. 1992). Vodičková et al. (2001) rozdělili tyto metody na: 1) metody nezahrnující separaci (metody saturační, imunochemické a elektrochemické); 2) chromatografické metody (vylučovací chromatografie, afinitní chromatografie, reverzní HPLC); 3) elektroforetické metody (SDS -PAGE, CE, CZE); 4) metody HPLC a CE spojené s dalšími detekčními metodami (AAS, ICP AES a ICP MS).

Speciace izoform je možná pomocí metod jako např. HPLC (ICP-MS); (Rogival et al. 2007). Díky qPCR (real-time) můžeme kvantifikovat genovou expresi izoform se známou sekvencí AMK (např. Tom et al. 2004; Wang et al. 2009; Nakayama et al. 2013).

2.4.1. Stanovení koncentrace MT pomocí elektrochemických metod

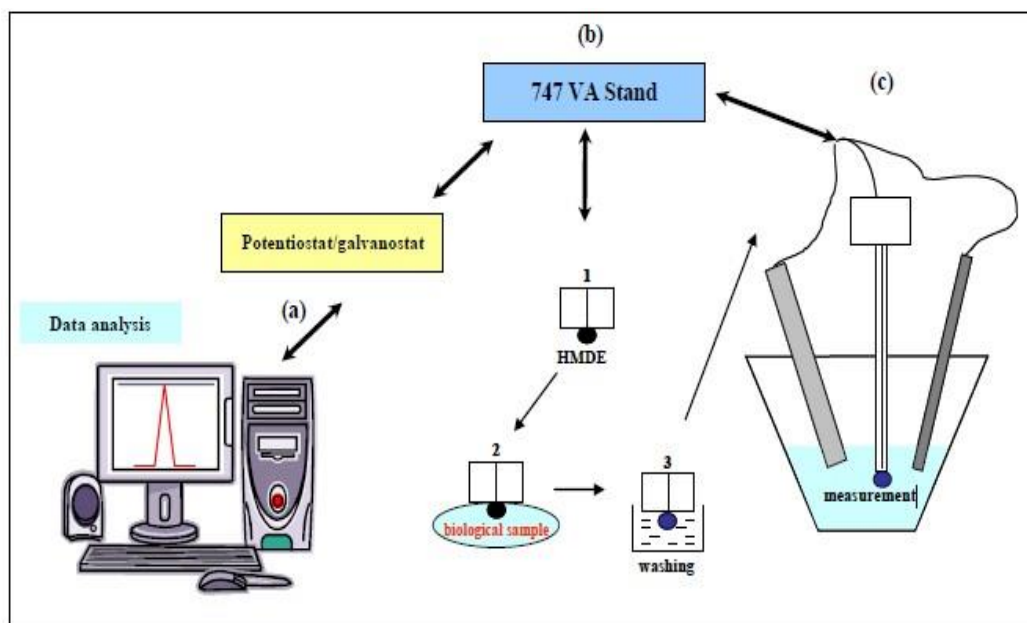
Jednou z nejpoužívanějších a nejúspěšnějších je aplikace metod elektrochemických, jako je například DC voltametrie, diferenční pulsní polarografie (Mendieta et al. 1995), square wave voltametrie a cyklická voltametrie (Harlyk et al. 1997). Tato metoda funguje na základě přítomnosti sirných zbytků na molekulách cysteinu (R – SH) a cystinu (R – SS – R). Jako polarizovatelná elektroda je používána rtuťová kapková elektroda (DME), nebo

visící rtuťová kapková elektroda (HMDE). V posledních letech dochází k výzkumu dalších elektrod s potenciálem použití pro kvantifikaci MT jako stříbrná amalgámová elektroda (AgSAE), nebo modifikované silikagelová uhlíková pastová elektroda (SiO₂-CPE); (Šestáková et al. 2019).

Pro stanovení celkových obsahů metalothioneinů v biologických vzorcích se nejčastěji využívá modifikovaná Brdičkova reakce (Brdička 1993). Jeho metoda byla původně vyvinuta pro analýzu sirných látek. O možnosti využití této metody pro stanovení MT bylo poprvé diskutováno v práci Olafson & Olsson (1991). Tato metoda je velice citlivá a díky ní je možné měřit i velmi nízké koncentrace MT (až 19 µg/l); (Raspor et al. 2001). Jde o katalytické vylučování vodíku v Brdičkově roztoku, který se skládá z amonného pufru (NH₄OH + NH₄Cl) a komplexu Co(III). V přítomnosti látky obsahující S-H skupiny dochází ke vzniku komplexu, jehož redukce je následována katalytickým vylučováním vodíku, jak je popsáno v rovnici $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{R}(\text{SH})_2 \rightarrow \text{RS}_2\text{Co} + 2\text{H}^+$ (Kizek et al. 2004). Výška tohoto katalytického signálu odpovídá koncentraci sulfhydrylové látky - např. MT – v analyzovaném roztoku.

Pro stanovení MT pomocí elektrochemických metod je potřeba vybavení schematicky zobrazené na obrázku č. 3. Skládá se z kontrolní jednotky (počítač připojený k potenciometru/galvanometru) a systému elektrod složeného z referenční, pomocné a pracovní elektrody (v tomto případě HMDE). HMDE je vložena do roztoku, kde dochází k akumulaci na povrchu kapky a na základě které probíhá elektrochemická detekce elektrolytu. Výsledkem je polarografická křivka (voltamogram), která je poté analyzována pomocí adekvátního softwaru (Adam et al. 2007).

Obrázek č. 3: Schéma zobrazující elektrochemickou analýzu (Adam et al. 2007).



Široké uplatnění našla Brdičkova reakce pro stanovení obsahu metalothioneinů u řady mořských a sladkovodních (Olafson & Olsson, 1991) a také terestrických živočichů, a to jak laboratorních, tak volně žijících (Dabrio & Rodríguez 2000; Rotchell et al. 2001; Hispard et al. 2008b; Fritsch et al. 2010).

3. Vědecké hypotézy

a) Zvýšený příjem rizikových prvků organismem pokusného zvířete vede ke zvýšené syntéze metalothioneinu, tedy obranné reakci organismu proti toxickým účinkům rizikových prvků.

b) Míru akumulace i koncentraci metalothioneinu v organismu zvířat ovlivňuje míra expozice rizikovým prvkům i druh, pohlaví a věk zvířete.

4. Cíl práce

Objasnění mechanismu příjmu a transformace rizikových prvků v interakci prostředí-rostlina-zvíře, popis translokace prvků v živočišných tkáních se zvýšenou schopností jejich akumulace a zvýšení hladiny poznání principů transformace a detoxikace rizikových prvků živočichy.

5. Materiál a metody

5.1. Kvantifikace obsahu metalothioneinů ve tkáních

5.1.1. *Extrakce MT*

Základní příprava extraktů MT probíhala dle lehce modifikované metodiky Hisparda et al. (2008b). Játra testovaných zvířat byla lyofilizována (LYOVAC GT2, GmbH, Germany) a navážka činila 100 mg. Navážený materiál byl homogenizován v 6 ml pufru [20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.6, 10 mM 2-mercaptoethanol s inhibitory proteáz (20 μ M leupeptin, 2 μ M aprotinin a 100 μ M benzamidin); Sigma-Aldrich] a následně centrifugovány při 4 °C a 16 090 g po dobu 30 minut. Jeden a půl ml supernatantu S1 bylo denaturováno při 97 °C po dobu 15 minut a poté zchlazeno na 4 °C a opět centrifugováno při 10 000 g po dobu 15 minut. Supernatant S2 byl zmrazen a uskladněn v – 80 °C až do vlastní analýzy.

Pro stanovení koncentrace metalothioneinů v játrech odchycených volně žijících drobných zemních savců byla z důvodu menší velikosti jater oproti laboratornímu potkanovi upravena navážka na 25 mg. Puf, ve kterém byl materiál homogenizován, byl 4x ředěn pro zachování poměru jednotlivých složek.

5.1.2. *Analýza koncentrace MT v extraktu*

Voltametrická stanovení koncentrace MT v S2 byla prováděna s použitím počítačově řízeného analyzátoru PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha, Česká republika) se softwarem POLAR PRO 5.1. Byla použita pracovní rtuťová tužková elektroda (Polaro-Sensors, Praha, Česká republika), referentní elektroda Ag/AgCl/KCl_{nas.} a pomocná elektroda s platinovým drátkem (Elektrochemické Detektory, Turnov, Česká republika). Měření probíhalo v laboratoři UFCH JH AV ČR při pokojové teplotě v dusíkové atmosféře. Jako elektrolyt byl použit 1M amonný puf, pH 9,5 (měřeno pomocí Jenway 3505 pH meter – Bibby Scientific Ltd., UK) a 1 mM Co(NH₃)₆Cl₃ (Sigma-Aldrich). Pro výpočet výsledků z analyzátoru PC – ETP byla pomocí metody standardního přídatku standardu Cd-Zn metalothioneinu (Enzo Life Sciences, USA) vytvořena kalibrační křivka. Výpočet byl proveden s použitím počítačového programu POLAR PRO 5.1.

5.1.3. *Reprodukovatelnost metody extrakce MT*

Reprodukovatelnost metody analýzy koncentrace MT na vzorku jater samce laboratorního potkana kmene Wistar, získaného z pokusné stáje ČZU v Praze, ze kterého bylo

možné vytvořit deset navážek lyofilizovaného materiálu. Potkan byl po dobu 40 dní krměn standardní krmnou směsí St – 1 (Velaz, Praha, Česká republika) s přídatkem CdCl_2 . Po usmrcení pomocí inhalační anestezie byla odebrána játra, která byla následně uskladněna v -80 °C. Vzorky byly pře použitím pro přípravu extraktů lyofilizovány, homogenizovány a rozděleny na 10 vzorků $n = 10$ po 100 mg. Vzorky byly dále zpracovány podle výše popsané metodiky extrakce a analýzy koncentrace MT.

5.1.4. Příprava vzorků před analýzou MT

Pro správné vyhodnocení obsahu metalothioneinů ve tkáních odchycených volně žijících zvířat bylo nutné vytvořit metodiku pro nakládání se vzorky získanými při odchycích na lokalitách v terénu, jejich dopravě do laboratoře a skladování pomocí pokusu v laboratorních podmínkách.

Pro experiment bylo využito dvanácti samců potkanů kmene Wistar (*Rattus norvegicus*, Institute of Physiology, Academy of Science, Czech Republic). Zvířata byla 6 týdnů chována v metabolických klecích při teplotě 21-25 °C a stabilní vlhkosti a krmeni standardní dietou ST-1 (Velaz Praha, Česká republika). Po eutanázii experimentálních zvířat proběhla pitva přizpůsobená získání tkáně jater pro analýzu MT. Játra byla jednotlivě homogenizována a rozdělena na 5 částí (A, B, C, D a E) a každá z nich byla uchovávána v jedné z pěti různých skladovacích podmínek před samotnou extrakcí a analýzou MT. Jednotlivé podmínky jsou pro přehlednost popsány v tabulce č. 1: vzorky ze skupiny A) skladovány v -80 °C a následně lyofilizovány (standardizovaná metoda pro laboratorní podmínky), vzorky ze skupiny B) čerstvé vzorky bez jakéhokoli zpracování, vzorky ze skupiny C) skladovány v -20 °C a následně lyofilizovány, vzorky ze skupiny D) skladovány 24 h při pokojové teplotě, poté v -80 °C a následně lyofilizovány a vzorky ze skupiny E) skladovány 24 h v pokojové teplotě, poté v -20 °C a následně lyofilizovány. Metoda E) znázorňuje možnou časovou prodlevu mezi usmrcením zvířete v a zpracováním vzorků v terénních podmínkách při použití konvenčních skladovacích pastí pro odchyt zvířat. Použitím tohoto postupu byla eliminována možná variabilita naměřených MT u jednotlivých metod, způsobená individualitou jednotlivých zvířat.

Pro metodu A, C, D a E byly použity navážky lyofilizovaného materiálu 100 mg a pro metodu B 356 mg čerstvého materiálu (navážka byla určena pomocí vypočítaného koeficientu). Všechny skupiny homogenizovaných tkání byly analyzovány pomocí DC voltametrie a modifikované Brdičkovy metody na HMDE (visící rtuťová kapková elektroda), která je popsána výše.

Tabulka č. 1: Popis jednotlivých metod nakládání se vzorky, před extrakcí a analýzou MT.

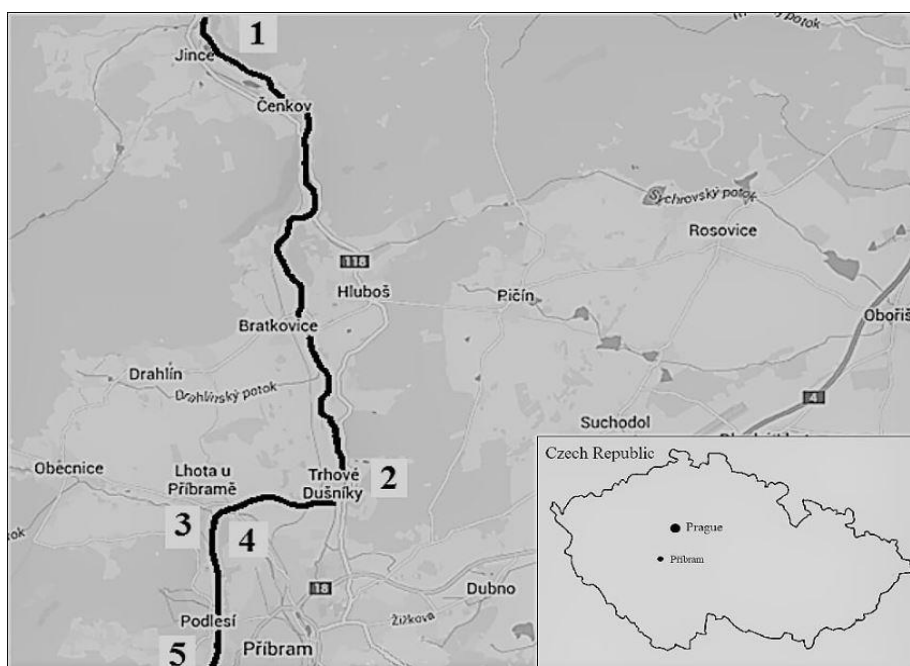
	24 h pokojová teplota	uložení v -80 °C	uložení v -20 °C	nativní	lyofilizace
metoda A		*			*
metoda B				*	
metoda C			*		*
metoda D	*	*			*
metoda E	*		*		*

5.2. Terénní výzkum

5.2.1. Popis odchyťových lokalit

Pro tuto studii bylo vybráno pět lokalit v oblasti Příbramska. Tyto lokality jsou rozmístěny v různých vzdálenostech od zdroje kontaminace s ohledem na možný směr šíření rizikových prvků (Šichorová et al., 2004). Dvě lokality jsou v těsné blízkosti místních kovohutí, jakožto zdroje kontaminace. První se nachází přímo pod odkalovací nádrží proplachovny kovových rud, která byla v minulosti několikrát protržena (loc 5) a druhá okolo 400 metrů po proudu řeky Litavky. Na tomto místě (loc 3) je na haldách uskladněn odpadní materiál z kovohutí včetně strusky. Další tři se nachází ve větší vzdálenosti. První z nich je 1,4 km proti proudu řeky (loc2). Druhá je situovaná okolo 4 km po proudu řeky a občas je zaplavována kontaminovanou vodou při povodních (loc4) a poslední je okolo 13 km po proudu řeky od kovohutí (loc1). Všech pět lokalit má podobný charakter vegetačního pokryvu; malé louky na břehu řeky v blízkosti lesa, obklopené skupinami stromů. GPS souřadnice: loc1: 49.785°N; 13.987°E; loc2: 49.678°N; 13.974°E; loc3: 49.710°N; 13.989°E; loc4: 49.719°N; 14.014°E; loc5: 49.705°N; 13.983°E.

Obrázek č. 4: Zobrazení lokalit na mapě (1) – loc1, 2) – loc4, 3) – loc5, 4) – loc3, 5) – loc2) a řeka Litavka (černá linie)



5.2.2. Odběr vzorků půdy

Na každé z vybraných lokalit bylo odebráno pět vzorků půdy pro stanovení obsahu rizikových prvků. Všechna místa odběru měla čtvercový tvar s délkou strany 20 m, odběrové body byly vždy ve všech čtyřech rozích čtverce a jeden uprostřed. Vzorky byly odebrány z horní vrstvy půdy (15 – 20 cm po odstranění svrchní travní vrstvy). Většina rostlinných zbytků (kořenů) a hornin byla separována. Vzorky byly sušeny na vzduchu při 20 °C, homogenizovány v třecí misce a prosety přes 2 mm plastové síto. Z tohoto materiálu poté byly připraveny kompozitní vzorky z každého čtverce pro laboratorní analýzy.

5.2.3. Odběr vzorků drobných savců

Odchyty drobných zemních savců probíhaly v letech 2013 – 2016, za pomoci speciálně vyrobených živochytných pastí. Pasti byly navazeny širokým spektrem návnad, aby přilákaly zvířata ze všech tří ekologických skupin (herbivoři, omnivoři a carnivori). Pasti byly umístěny do kvadrátů rozmístěných od sebe 5 x 5 m a denně kontrolovány po tři po sobě následující noci. Druh, pohlaví a věk odchycených jedinců byly určeny podle jejich morfologické charakteristiky (tělesná hmotnost, barva srsti, délka těla, ocasu, uší a zadní tlapky) na základě běžného určovacího klíče savců (Anděra & Horáček 2005). Zvířata byla usmrcena přímo na místě

pomocí inhalační anestezie. Během pitvy, která proběhla rovněž na odchytové lokalitě, byly odebrány vzorky orgánů (ledviny, slezina, játra). Tyto tkáně byly poté omyty v demineralizované vodě, během transportu do laboratoře uskladněny v suchém ledu (-78 °C) a následně lyofilizovány podle ověřené metodiky (Křivská et al. 2019). Veškerá manipulace se zvířaty probíhala v souladu s právními a etickými postupy.

5.2.4. Analýza rizikových prvků v půdě a tkáních

Pseudocelkový obsah rizikových prvků byl ve vzorcích půdy stanoven následujícím způsobem: alikvoty (~500 mg) vzorků sušených na vzduchu byly rozloženy mokřým rozkladem v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem v 10 ml lučavky královské (tj. směs kyseliny dusičné a chlorovodíkové v poměru 1:3). Směs byla zahřívána v mikrovlnném systému Ethos 1 (MLS GmbH, Německo) po dobu 33 minut při 210 °C. Pro stanovení koncentrací RP v půdním digestu byla použita optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Agilent 720, Agilent technologies Inc., USA) vybavená dvoukanálovou peristaltickou pumpou, mlžnou komorou Struman-Masters a pneumatickým zmlžovačem ve tvaru "V" vyrobeným z inertního materiálu.

Vzorky živočišných tkání byly mineralizovány mokřým rozkladem v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem (mikrovlnný digesční systém, SP-D Discovery Plus, CEM, USA) za použití zvýšeného tlaku po dobu 25 minut při teplotě 231 °C ve 3 ml 65% p.a. kyseliny dusičné a 2 ml p.a. peroxidu vodíku (Analytika Ltd., ČR). Po digesci byla přebytečná kyselina odpařena do vlhkého zbytku. Následně byly vzorky převedeny do 50 ml odměrných baněk a doplněny demineralizovanou vodou. Slepé vzorky byly připraveny stejným způsobem a představovaly 10 % celkového počtu vzorků. Ve všech slepých vzorcích byly koncentrace měřených prvků pod detekčním limitem použité analytické techniky. Současně byl pro zajištění kvality dat analyzován certifikovaný referenční materiál (BCR 185R Bovine Liver). Koncentrace RP ve tkáních byla stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS (model 7700x, Agilent Technologies, USA) s použitím kolizní cely pro snížení potenciálních interferencí. ICP-MS bylo vybaveno podavačem vzorků AX-500 (Agilent Technologies, USA), zmlžovačem typu MicroMist

5.3. Statistické vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení výsledků reprodukovatelnosti metody, přípravy extraktů a pre-analyzačních metod bylo provedeno v programu Statistika (ver. 12; StatSoft, USA). Pro pre-analyzační metody byl proveden test normality (Shapiro-Wilk test) a homogenity rozptylu (Bartlett test). Vliv nakládání se vzorky na koncentraci MT ve tkáních byl testován pomocí one-way ANOVA test ($p < 0.05$) a pro detailní vyhodnocení Tukey post hoc HSD test.

Data z terénních odchytů drobných zemních savců byla analyzována pomocí softwaru R verze 2.15.1 (R Development Team, 2012) s hladinou významnosti $\alpha = 0.05$. Bylo testováno, jak je zatížení rizikovými prvky (hodnoty v mg/kg) ovlivňováno vybranými fixními faktory: orgán (ledviny/ slezina/játra); ekologická skupina (herbivor/omnivor/carnivor); pohlaví (samec/samice) a lokalita (loc1/loc2/loc3/loc4/loc5). Protože existují tři hodnoty (od každého konkrétního orgánu) pro každého jedince, data nejsou nezávislá. Z tohoto důvodu byl použit faktor jedince jako faktor s náhodným efektem. Situace, kdy se testovaní drobní zemní savci se lišili celkovou hmotností je reflektována použitím hmotnosti jako náhodného faktoru vnořeného do faktoru jedince. Pro každý z měřených prvků byl samostatně použit lineární mix model (GLMM) s normálním rozdělením. Minimální adekvátní model byl dosažen zjednodušením modelu pomocí ACI (Akaike information criterion). MT byly stanoveny pouze v játrech, proto byl pro posouzení vlivu fixních faktorů použit klasický lineární model (GLM). Data byla před GLM a GLMM logaritmičticky transformována.

6. Výsledky

6.1. Stanovení koncentrace MT

6.1.1. Reprodukovatelnost metody extrakce a analýzy koncentrace MT

Pro splnění cíle práce a ověření hypotéz bylo potřeba nejprve optimalizovat metodu přípravy extraktů metalothioneinu pro analýzu jejich koncentrace a zjistit její reprodukovatelnost. Stanovení koncentrace MT proběhlo výše uvedenými postupy a výsledky vyhodnocení pomocí základních popisných charakteristik jsou uvedeny v tabulce č. 2. Vypočtená hodnota aritmetického průměru je 147 $\mu\text{g/ml}$ a rozsah hodnot od 120 do 173 $\mu\text{g/ml}$. Směrodatná odchylka, která udává kolísání hodnot sledovaného znaku při měření okolo aritmetického průměru (147 $\mu\text{g/ml}$), má hodnotu 21 $\mu\text{g/ml}$. Hodnota variačního koeficientu je 14 %, což je méně než 50 % a je tedy znakem sourodosti měření.

Metoda byla zhodnocena jako reprodukovatelná a bylo možné jí použít při dalších měřeních. Tyto výsledky byly publikovány v práci (Křivská & Šestáková 2015).

Tabulka č. 2: Základní popisné charakteristiky pro zjištění reprodukovatelnosti metody analýzy koncentrace MT v $\mu\text{g/ml}$.

<i>n</i> platných	průměr [$\mu\text{g/ml}$]	minimum [$\mu\text{g/ml}$]	maximum [$\mu\text{g/ml}$]	Směr. odch.	Var. koef [%]
10	146,955	119,862	172,768	20,599	14,018

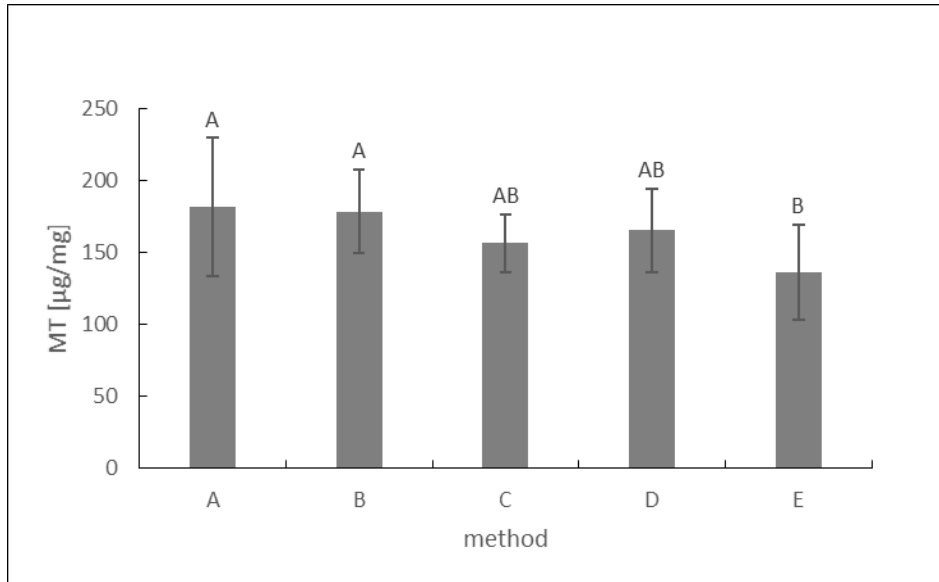
6.1.2. Modelový test stability MT v reálných vzorcích

Dále bylo nutné zjistit, jak nakládat se vzorky zvířecích tkání získaných v terénu. Literatura uvádí velké spektrum použitých metod, ale žádná standardizovaná pro tyto situace neexistuje. Výsledky porovnání různých metod nakládání se vzorky před vlastní analýzou jsou znázorněny na obrázku číslo 5, na kterém je zobrazena průměrná koncentrace metalothioneinu v játrech laboratorních potkanů (A: 181 $\mu\text{g/ml}$, B: 178 $\mu\text{g/ml}$, C: 156 $\mu\text{g/ml}$, D: 165 $\mu\text{g/ml}$, E: 136 $\mu\text{g/ml}$) v závislosti na pre-analyzační metodě zpracování individuálních vzorků spolu se základními popisnými statistikami.

Mezi metodami A – D nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v koncentraci MT. Porovnání metody A a metody B, při kterém nebyl žádný statisticky významný

rozdíl, ukázalo, že lyofilizace nemá vliv na determinaci koncentrace MT ve tkáni. Lyofilizace tedy nepoškozuje strukturu MT a může pomoci stabilizovat MT ve vzorku díky jednoduššímu a rychlejšímu nakládání se vzorkem a eliminuje nutnost opakovaného rozmrazování vzorku. Ve vzorcích skladovaných v - 20 °C (metody C a E) byly naměřeny nižší koncentrace, než ve vzorcích skladovaných v - 80 °C, ale rozdíl v metodě C není statisticky významný, ačkoli vykazuje odlišné výsledky. Data v tabulce č. 3 ukázala, že se pouze metoda E ($p = 0,0104$; $p < 0,05$) statisticky významně liší od ostatních, včetně metody A a B, které jsou považovány za standardní metodu používanou v laboratorních podmínkách. Tato metoda simulovala možnou časovou prodlevu mezi odchycením zvířete v terénních podmínkách a jeho následným zpracováním při nemožnosti zmrazení vzorků a byla použita pro ověření, jestli může časová prodleva ovlivnit stabilitu MT ve tkáních zvířete. Tyto faktory (časová prodleva a uskladnění) ovlivňují stabilitu metalothineinů ve vzorcích tkání odchycených zvířat a mohou tedy ovlivnit i výsledky následujících analýz.

Obrázek č. 5: Data reprezentují hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky ($n = 12$); metody označené odlišnými písmeny (A, AB, B) se od sebe statisticky významně liší ($p < 0,05$).

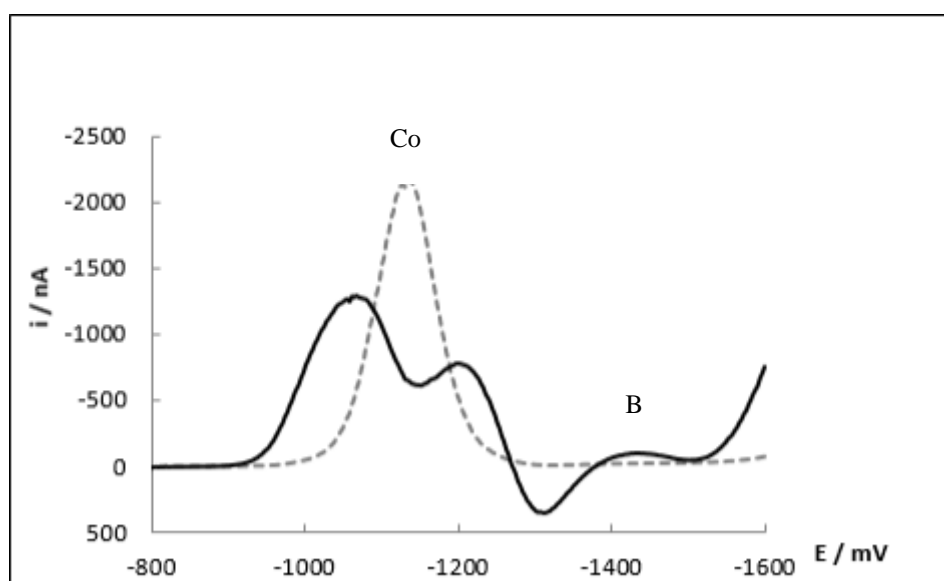


Tabulka č. 3: Detailní vyhodnocení vlivu metody na koncentraci MT ve vzorcích

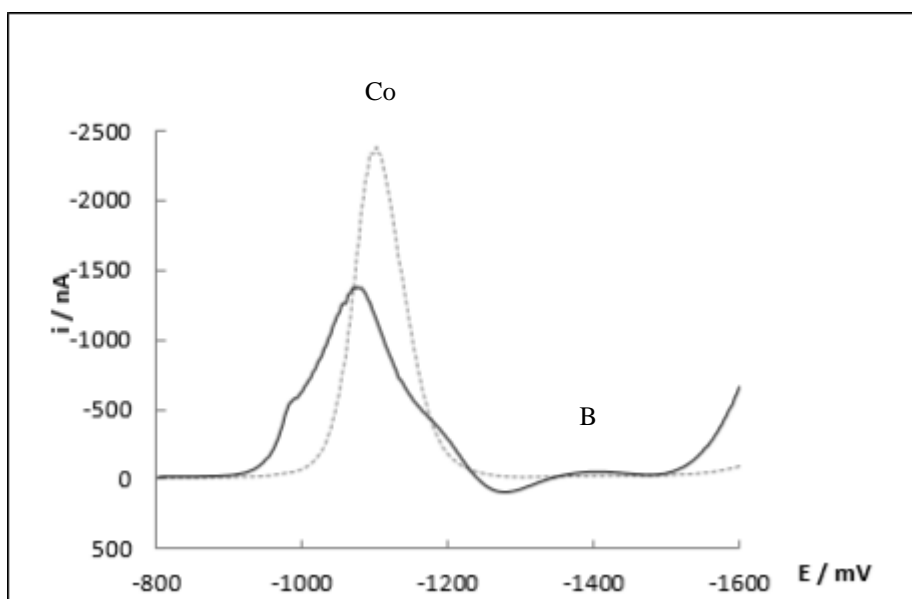
Tukey HSD test; variabilita [$\mu\text{g/ml}$]					
metoda	(1) 181,42	(2) 178,13	(3) 156,46	(4) 165,15	(5) 136,14
A		0.999268	0.358696	0.749531	0.012403
B	0.999268		0.502391	0.871785	0.024129
C	0.358696	0.502391		0.967376	0.565063
D	0.749531	0.871785	0.967376		0.216203
E	0.012403	0.024129	0.565063	0.216203	

Tyto výsledky ukazují, že vzorky připravované metodou E obsahují nejnižší obsah MT v porovnání se vzorky zpracovanými pomocí jiných metod, což naznačuje, že nevhodné uchovávání vzorků způsobuje degradaci MT. Při dlouhodobém vystavení okolní teplotě, nebo nedostatečném zmražení se na voltametrickém záznamu objeví tzv. předvlna (obrázek č. 6), která indikuje přítomnost nízkomolekulárních štěpů peptidů obsahujících cystein a dochází k odlišné komplexaci. Odezva Brdičkovy reakce je u takovýchto vzorků nižší a takovýto záznam není vhodný pro další vyhodnocení. Bylo tedy potřeba optimalizovat metodiku a předejít možné degradaci. Pro biomonitoring byla použita metoda A, upravená pro podmínky v terénu.

Obrázek č. 6: Zobrazení voltametrických záznamů determinace MT v játrech potkana (diferenční pulsní voltametrie) při použití HMDE elektrody, 20 μl extraktu vzorku v 10 ml amonného pufru s 1mM Co (III), puls -50 mV, scan rate 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Co – vlna redukce kobaltu, B – Brdičková reakce; a) vzorek skladovaný v $-80\text{ }^\circ\text{C}$ před lyofilizací, b) vzorek skladovaný 24 h v pokojové teplotě a následně v $-20\text{ }^\circ\text{C}$ před lyofilizací.



a)



b)

6.2. Biomonitoring

6.2.1. Biodiverzita na odchyťových lokalitách

Jako biomodel pro vyhodnocení akumulace rizikových prvků a reakci organismu na prostředí kontaminované rizikovými prvky byly vybráni drobní zemní savci, žijící na výše popsaných lokalitách. Během terénních odchytů bylo celkem nachytáno 92 jedinců. Jejich biodiverzita na jednotlivých lokalitách je znázorněna v tabulce č. 4. Jednotlivé druhy byly rozděleny do tří ekologických skupin podle jejich potravinových preferencí zahrnující herbivory (žíví se převážně rostlinami), omnivory (žíví se rostlinami a příležitostně hmyzem) a karnivory (žíví se jinými zvířaty - herbivory, omnivory i karnivory). Do ekologické skupiny herbivoři byla zařazena zvířata ze dvou druhů *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* a patří sem nejvíce odchycených jedinců. Ze skupiny omnivoři byly odchyceny druhy *Micromys minutus*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicolis* a *Mus m. domesticus*. Skupina karnivoři je reprezentována druhem *Sorex araneus*. Druhy monitorovaných zvířat tedy pokrývají všechny ekologické skupiny a je možné vyhodnotit účinek stravy a postavení v potravinovém řetězci na akumulaci RP a syntézu MT.

Věk byl u většiny odchycených jedinců určen jako adultní, nebo subadultní. Nejméně jedinců bylo chyceno na loc4 (kontaminovaná) a nejvíce na loc1 (kontrolní). Druh *Sorex araneus* byl zaznamenán pouze na lokalitách s nejmenší koncentrací rizikových prvků v půdě.

Tabulka č. 4: Rozdělení jedinců podle ekologických skupin (herbivoři, omnivoři, karnivoři), druhu, lokality (loc1, loc2, loc3, loc4, loc5), pohlaví (M – samec, F - samice) a věku (J – juvenil, SA – subadult, A – adult).

ekologická skupina	druh	lokalita	loc1			loc2			loc3			loc4			loc5			n total
			pohlaví	M	F	n	M	F	n	M	F	n	M	F	n	M	F	
			věk															
herbivoři	<i>Microtus arvalis</i>	J	7	8											2	4		
		SA	4	3		1	4				1			4	3			
		A	1	5		2	1	2		1	2			5	7			
		n			28		3			7			4			25		67
	<i>Microtus agrestis</i>	J				1												
		SA																
A									1									
	n						1						1				2	
omnivoři	<i>Micromys minutus</i>	J																
		SA					2											
		A				1	3											
		n						6										6
	<i>Apodemus flavicolis</i>	J																
		SA												1	1			
A			1															
	n				1											2	3	
<i>Mus m. domesticus</i>	J																	
	SA							1										
	A			1														
	n				1								1				2	
<i>Apodemus sylvaticus</i>	J																	
	SA								1	1								
	A								1	1								
	n												4					4
karnivoři	<i>Sorex araneus</i>	J																
		SA			1		1	3										
		A		2				1										
	n				3		5											8
n total				33		15		12		5		27		92				

6.2.2. Koncentrace RP v půdě

Analýza koncentrace rizikových prvků ve vzorcích půdy odebraných na pěti vybraných lokalitách (tabulka č. 5) ukázala, že na lokality nacházející se nejbližší oblasti zdroje kontaminace (pod kalovou nádrží, záplavová oblast) je vyšší obsah As, Pb, Zn Fe a Mn ve

srovnání s lokalitami, které jsou ve větší vzdálenosti. V případě Cd to platí také, ale vyšší koncentrace byla naměřena také na loc1, která se nachází 16 km po proudu řeky Litavky. V případě prvků Cr, Cu a Ni se koncentrace v půdě až tak významně neliší, až na zvýšený obsah Cu a Ni na lokalitě loc3, na které je skladován odpad z kovohutí.

Tabulka č. 5: Průměrné naměřené hodnoty koncentrace rizikových prvků ve vzorcích z pěti vybraných odchyťových lokalit.

lokality	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Fe	Mn
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
loc1	123,69	11,99	34,06	61,57	17,71	907,85	1612,92	27544,80	1733,80
loc2	75,82	3,51	43,13	48,30	22,13	1563,40	577,82	30989,11	1681,69
loc3	655,99	42,95	37,35	130,58	29,72	3971,63	6178,36	46511,05	7266,10
loc4	252,36	27,74	40,61	61,44	22,94	2821,61	3746,61	37167,25	3567,27
loc5	512,92	15,74	46,24	79,87	27,82	2263,22	2281,28	36541,58	4163,58

6.2.3. Koncentrace RP a MT v orgánech odchytených zvířat

Výsledky analýz byly zpracovány dvěma různými způsoby. Z důvodu relativně malého počtu odchytených zvířat ve vztahu k velkému množství faktorů nebylo možné vyhodnotit individuální interakce mezi měřenými prvky, jednotlivými orgány a ekologickými skupinami. GLMM model byl použit pro statistické vyhodnocení dat (Tabulka č. 6). Tento model ale vyhodnocuje data pouze separátně, takže pro znázornění interakcí byla použita grafická prezentace (Obrázek č. 4). Pomocí krabicových grafů jsou zde graficky porovnány obsahy prvků v jednotlivých orgánech pro jednotlivé ekologické skupiny.

Tabulka č. 6: Signifikantní fixní faktory vyhodnocené z minimálních adekvátních modelů (GLMM) pro chemické prvky (mg/kg) naměřené v orgánech odchycených drobných zemních savců.

prvek	signifikantní faktory	F-hodnota	P-hodnota	porovnání hladin fixního faktoru
Cd	ekologická skupina	29.01	< 0.0001	karnivoři > herbivoři > omnivoři
	pohlaví	4.73	< 0.05	samice > samec
	orgán	125.23	< 0.0001	ledviny > játra > slezina
Fe	orgán	4.86	< 0.01	slezina > ledviny
Hg	ekologická skupina	14.85	< 0.0001	karnivoři > herbivoři = omnivoři
	lokality	2.11	< 0.01	loc2 > loc1
	orgán	5.72	< 0.01	ledviny > slezina
As	ekologická skupina	12.62	< 0.0001	karnivoři > herbivoři > omnivoři
	lokality	4.13	< 0.01	loc5 = loc 1 > loc2
	orgán	1.83	< 0.05	játra > slezina
Pb	ekologická skupina	4.61	< 0.05	karnivoři > herbivoři = omnivoři
	lokality	24.55	< 0.0001	loc3 = loc5 > loc2 = loc1
	orgán	95.10	< 0.0001	ledviny > játra > slezina
Zn	ekologická skupina	4.34	< 0.05	karnivoři > herbivoři > omnivoři
Cu	ekologická skupina	6.27	< 0.01	karnivoři > herbivoři > omnivoři
	orgán	34.61	< 0.0001	játra = ledviny > slezina
Mn	ekologická skupina	11.35	< 0.0001	karnivoři > herbivoři > omnivoři
	orgán	57.09	< 0.0001	játra > ledviny > slezina
Se	ekologická skupina	12.83	< 0.0001	karnivoři > herbivoři = omnivoři
	lokality	19.53	< 0.0001	loc3 = loc5 > loc1
	orgán	52.13	< 0.0001	ledviny > játra > slezina

V tabulce č. 6 jsou uvedeny pouze statisticky významné rozdíly u jednotlivých prvků. GLMM ukazuje obecně silný efekt orgánů, protože každý orgán akumuluje chemické prvky odlišně. Velmi významný efekt má také příslušnost ke specifické ekologické skupině, která se projevila u všech měřených prvků, kromě Fe. Statisticky signifikantní rozdíl v pohlaví byl pozorován pouze v případě Cd. Vliv lokality na akumulaci prvků v orgánech byl významný pouze u těžkých kovů Hg a Pb a metaloidů As a Se. I přes velké rozdíly v koncentraci Cd na

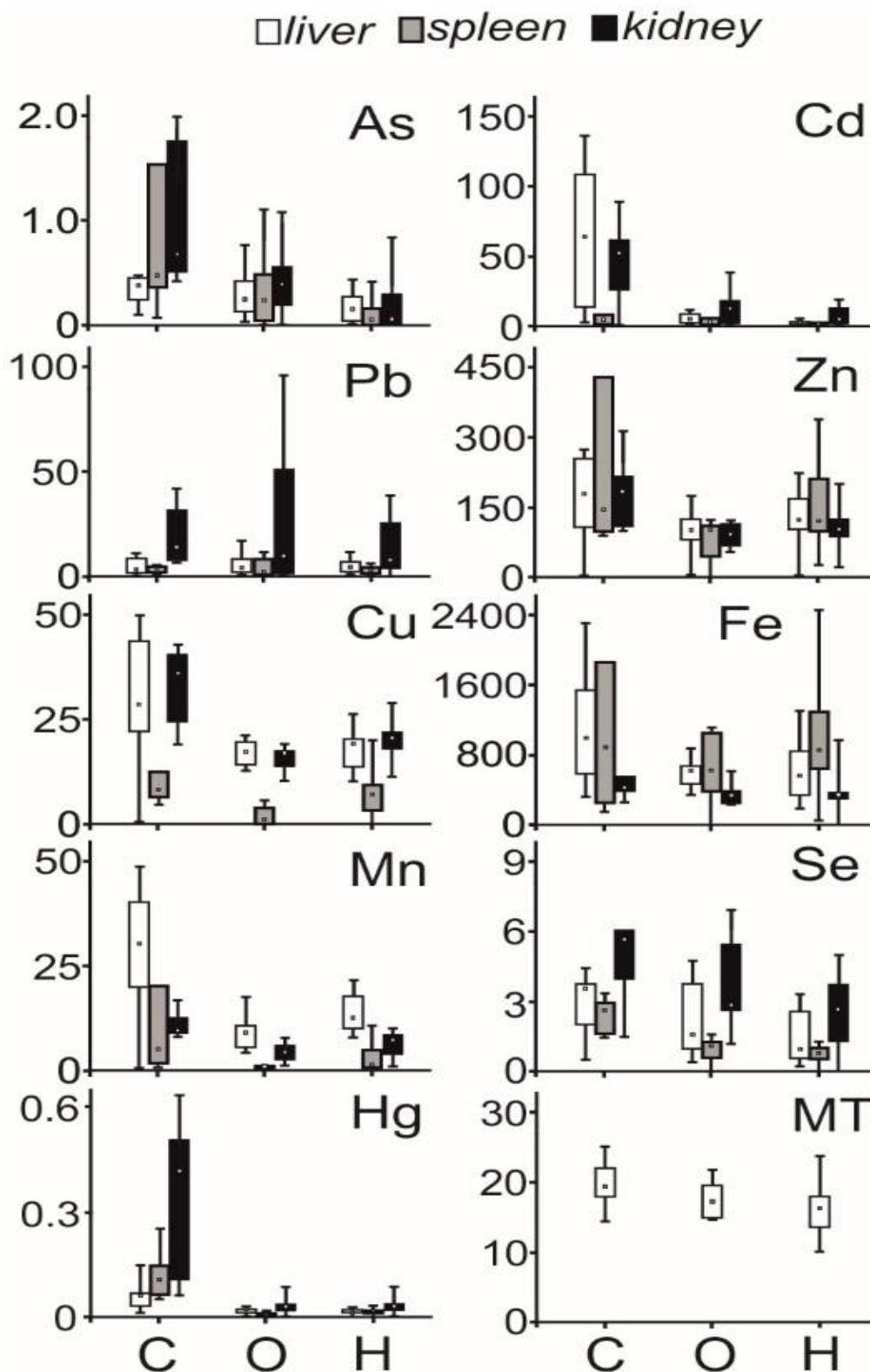
jednotlivých lokalitách, nebyl v případě tohoto prvku zjištěn vliv lokality na akumulaci ve tkáních.

Z výsledků statistické analýzy koncentrace MT v játrech odchytených zvířat vyplývá, že syntéza MT je ovlivněna hmotností jedince (respektive věk); (GLM: $F = 10.32$, $P < 0.0001$) a ekologickou skupinou (GLM: $F = 6.97$, $P = < 0.01$), kdy karnivoři vykazují nejvyšší hladiny MT, lišící se významně od hodnot naměřených u herbivorů. Omnivoři se statisticky významně neliší od ostatních skupin.

Porovnání koncentrace prvků v jednotlivých orgánech s ohledem na ekologickou skupinu je znázorněno na obrázku č. 7 a jsou z něj patrné rozdíly v akumulaci prvků v orgánech. Srovnání ukazuje, že některé prvky jsou více akumulovány v ledvinách (As, Pb, Cu, Se a Hg), zatímco jiné v játrech (Cd, Zn a Mn). Několik prvků (As, Zn, Fe a Hg) vykazovalo relativně vysokou akumulaci ve slezině a také vysokou variabilitu v jednotlivých ekologických skupinách.

U všech kovů a metaloidů jsou koncentrace velmi vysoké u skupiny karnivorů v porovnání s ostatními ekologickými skupinami (omnivoři, herbivoři). Ve všech ekologických skupinách je patrný podobný trend v distribuci jednotlivých prvků v orgánech. Rozdíly v koncentraci MT jsou v tomto zobrazení malé, nicméně u karnivorů je nejvyšší a u herbivorů nejnižší.

Obrázek č. 7. Rozsah koncentrace rizikových prvků a MT (mg/kg) stanovených v jednotlivých orgánech (označené barvou boxplotů) různých ekologických skupin drobných savců (C = karnivoři, O = mnivoři, H = herbivoři). Pro toto zobrazení byla sjednocena data ze všech studovaných lokalit). Úsečky představují min. – max. rozsah hodnot. Rámeček znázorňuje horní a dolní kvartil 25 – 75 % a čtverec představuje střední hodnotu.



7. Diskuse

7.1. Pre-analyzační metody nakládání se vzorky

7.1.2. Vliv přípravy vzorku na koncentraci MT v játrech analyzovaných zvířat

V případě získávání vzorků tkání volně žijících organismů a jejich správnému analyzování a vyhodnocení je třeba vzít v potaz některé detaily nakládání se vzorky. Tyto podrobnosti zahrnují metody odchyty (živochytné, nebo sklapovací pasti), získání vzorků v terénu (použité vybavení, prodleva mezi usmrcením a vyjmutím orgánů), přepravu (uchovávání vzorků během přepravy, doba přepravy) a podmínky uskladnění vzorků před dalším zpracováním. V této práci je uvedeno 5 možností, z nichž by čtyři měly být použitelné pro získávání vzorků tkání drobných zemních savců v terénních podmínkách. V předchozích studiích bylo použito mnoho různých metod pro získání tkání na analýzu MT (Rogival et al. 2007; Marques et al. 2008; Fritsch et al. 2010; Nakayama et al. 2013). Většina těchto studií bohužel přesně nedefinuje, jak byl tento proces přesně prováděn v terénu. Je proto obtížné určit, jaké mohl mít způsob odchyty a zpracování tkání na stabilitu MT a zda tím nebyly nějak ovlivněny výsledky. Tato důležitá kritéria by měla být zohledněna, protože nesprávná manipulace se vzorky může vést k nejasným výsledkům, ovlivnit stabilitu MT ve vzorku a tím i naměřenou koncentraci. Díky nestejným pre-analyzačním metodám je také znemožněno porovnání výsledků studií mezi sebou a utvoření komplexního náhledu na problematiku biomonitoringu kontaminace životního prostředí za použití drobných zemních savců jako modelového organismu.

Oaten et al. (2015), kteří ve své práci zaměřili na bezobratlé vodní živočichy, shrnují různé techniky zpracování vzorků před vlastní analýzou se zaměřením na MT. V této studii také upozorňují na nedostatek uniformity metod, protože výzkumné týmy nepoužívají přesně stejnou kombinaci pre-analytických postupů. Tato skutečnost může přispět k nejednoznačnosti výsledků, která je v tomto oboru takřka běžná.

V předchozích studiích byla játra experimentálních zvířat analyzována buď přímo z čerstvých (Erk et al. 2002; Oaten et al. 2015) nebo lyofilizovaných vzorků (Hispard et al. 2008b; Marques et al. 2008). Naše výsledky ukazují, že se metody A (lyofilizovaný materiál) a B (čerstvý materiál) statisticky významně neliší. To naznačuje, že lyofilizace vzorků nemá vliv na stanovenou koncentraci MT a potvrzuje, že tento proces nezpůsobuje degradaci MT ve vzorcích. Kromě toho, že je manipulace s lyofilizovaným vzorkem podstatně snazší

a rychlejší, je také zabráněno denaturaci způsobené opakovaným zmrazováním a rozmrazováním vzorku tkáně.

Z výsledků vyplynulo, že nejvhodnější metodou zpracování vzorků získaných v terénních podmínkách, je upravená metoda A, která se standardně používá v laboratorních podmínkách. Výsledky metody E) byly statisticky významně nižší než v případě metody A), proto byla tato metoda vyhodnocena jako nevyhovující.

V případě pre-analyzáční metody je ovšem nutné vzít v potaz i fyziologii organismu. Druh analyzovaného zvířete také ovlivňuje stabilitu MT, což se ukázalo při porovnání myších a rybích MT. Zatímco β -doména rybích (poikilotermní organismus) a myších (homiootermní organismus) MT nevykazovala podobnou teplotní senzitivitu, α -doména rybích MT se ukázala jako citlivější v důsledku změn chiroptických vlastností i přes to, že je jejich struktura velmi podobná (D'Auria et al. 2001; Capasso et al. 2005). MT chladnokrevných organismů jsou tedy citlivější na podmínky okolí a při zvýšené teplotě snadněji degradují. Naše výsledky ale dokládají, že degradace MT se může projevit ve vzorcích tkání savců.

7.1.3. Diference v Brdičkově reakci

Elektrochemické metody se často používají jako analytické metody pro stanovení MT v živočišných tkáních (Raspor et al. 1994; Yang et al. 1998; Šestáková & Navrátil 2005; Serrano et al. 2006) a jsou založeny na Brdičkově reakci (Raspor et al. 1994; Petrlova et al. 2006), která je podrobně popsána v práci Olafson & Olsson (1991).

Na běžném záznamu z měření MT jsou viditelné dva peaky redukce kobaltu (Cat1 a Cat2) a za nimi následuje Brdičkova reakce při cca -1400 mV. Na voltamogramu zachyceném u vzorků připravovaných metodou E (tj. 24 h v pokojové teplotě a uskladnění v -20 °C) je před kobaltovou vlnou vykreslena takzvaná předvlna. Takováto předvlna svědčí o přítomnosti kratších peptidů obsahujících cystein, kde dochází k odlišné komplexaci (Dorčák & Šestáková, 2006). V takovémto případě je Brdičkova odezva na záznamu nižší, protože odpověď kratších peptidů je výraznější (Olafson & Olsson, 1991) a tím pádem je nižší i naměřená koncentrace MT.

Stabilita MT je ovlivněna různými faktory, například prvkem navázaným v molekule, nebo živočišným druhem (Capasso et al. 2002; Coyle et al. 2002; Adam et al. 2007). Ačkoliv je známo, že vazba kov-síra (merkaptidová vazba) v MT má vysokou konstantní stabilitu, molekula MT obsahuje mnoho cysteinových zbytků, které jsou vysoce citlivé k oxidaci, což má za následek snadnou tvorbu disulfidických vazeb (Suzuki 1992; Ryvolová et al. 2012). Degradace molekuly tedy vyvolává postupné uvolňování volného

Cd a Zn z proteinu (Dabrio & Rodríguez 2000). Dalším procesem, který vede k rozpadu molekuly MT je enzymatická degradace (Klaassen et al. 1994; Saito & Hunziker 1996). Jak se ukázalo u 35s – značeného zinkového thioneinu a 35s – značeného kadmiového thioneinu (Feldman et al. 1978), oba thioneiny se rozložili na molekuly o velikosti přibližně 100 – 300 daltonů.

Tento jev svědčí o degradaci MT ve vzorku a není tedy vhodný k vyhodnocení. Obvykle se ve studiích zobrazují pouze části voltamogramu, kde se nachází Brdičkova reakce, takže není možné zjistit, jestli nedošlo k rozpadu některých molekul MT. Zaznamenání celé voltametrické křivky tedy může sloužit jako indikátor správné přípravy vzorku.

Tyto výsledky byly publikovány v práci Křivská et al. 2019 pod názvem “Sample handling and pretreatment as critical points in determining the quality of analytical data during metallothionein determination in wild animals”. Díky tomuto experimentu bylo možné optimalizovat metodu pro získávání vzorků z terénních odchytů, která byla použita pro další části této práce, i jejich správné vyhodnocení.

7.2. Biomonitoring kontaminace životního prostředí

7.2.1. Biodiverzita odchycených drobných zemních savců

Nejvíce užívaným druhem terestrických živočichů pro monitoring znečištění životního prostředí jsou drobní zemní savci, kteří se obvykle vyskytují jak na nekontaminovaných i kontaminovaných lokalitách (Talmage & Walton 1991). Struktura fauny na vybraných lokalitách může napovědět mnohé o míře kontaminace v oblasti. Phelps & McBee (2009) se zaměřili na porovnání složení struktury společenstev hlodavců na kontaminovaných a nekontaminovaných lokalitách a uvádějí, že se zvyšující se mírou kontaminace klesá druhová diverzita. Tento trend byl potvrzen i při našich odchycích. Na nejvíce kontaminovaných lokalitách (loc3, loc4 a loc5) bylo zaznamenáno méně druhů než na lokalitách kontrolních. Nejhojnější odchycený druh byl odchycen na všech lokalitách, ale u ostatních druhů už výskyt na lokalitách stejný není.

Například hmyzožravec *Sorex araneus*, zastupující karnivory, byl zaznamenán pouze na lokalitách loc1 a loc2, na místech s nižší mírou kontaminace. Stejně výsledky publikovali Fritsch et al. (2010) a předpokládali, že jejich výsledky jsou způsobeny různými biotopy a nadmořskou výškou sledovaných oblastí. V našem výzkumu však byla pouze stanoviště s velmi podobným charakterem. Podle tohoto zjištění je možné, že karnivoři (hmyzožravci) dávají přednost lokalitám s menší kontaminací rizikovými prvky.

Účinky kontaminujících látek se mohou projevit na celých komunitách, nejen na jedincích, avšak tato práce je zaměřena na vyhodnocení míry a dopadu kontaminace na volně žijící drobné zemní savce pomocí analýz jejich tkání. Výzkum dopadu RP na společenstva by vyžadoval mnohaletý výzkum a odchycení několika tisíc zvířat, avšak i naše data, pořízená během tří let reflektují dlouhodobé výzkumy dopadu antropogenní disturbance na druhovou diverzitu.

7.2.2. *Koncentrace půdy RP na vybraných lokalitách*

V České republice se nachází několik oblastí vyznačujících se zvýšeným obsahem rizikových prvků v půdě až na hodnoty, kdy hrozí reálné riziko kontaminace zemědělské produkce, a tedy i ohrožení zdraví lidí. Mezi nejvíce poškozené lokality v ČR patří Příbramsko, kde ke kontaminaci oblasti došlo především atmosférickou depozicí rizikových prvků při těžbě a zpracování olova. Místní kovohutě jsou v provozu od roku 1789 (Kalač et al. 1991). Důlní a hutní činnosti v této oblasti mají současně vliv na zastoupení dalších prvků v půdě, především arsenu, kadmia a zinku. Vysoký obsah rizikových prvků v půdě je umocněn i jejich zvýšeným obsahem v geologickém podloží. Kromě bezprostředního okolí zdroje znečištění (kovohutě) se vyskytuje vyšší koncentrace některých nežádoucích prvků i v naplaveninách v povodí Litavky, kde byly v dřívějších dobách soustředěny proplachovny rud. Dalším zdrojem RP je kontaminovaná voda vytékající z odkalovací nádrže v blízkosti kovohutí. V důsledku jejího poškození došlo několikrát k zaplavení části území u obce Trhové Dušníky. Obsahy rizikových prvků v zemědělských plodinách v této oblasti v mnoha případech překračují platné hygienické limity (Šichorová et al. 2004; Vaněk et al. 2005).

Z analýz půdy, uvedených v této práci, je patrné, že lokality nacházející se nejbliže ke zdroji, nebo v záplavové oblasti jsou více kontaminované. Na lokalitách Halda a Mlýny byly naměřeny vyšší obsahy Cd i Pb než je uvedeno v práci Šichorové et al. (2004), kde byl v této vrstvě půdy naměřen maximální obsah Pb 2538 mg/kg a obsah Cd 13 mg/kg. Při porovnání těchto výsledků s povolenými limity obsahu rizikových prvků v půdách, které jsou uvedené v tabulce číslo 7 (vyhláška č. 13/1994 Sb., vyhláška č. 382/2001 Sb.) je vidět, že jsou limity na všech lokalitách mnohonásobně překročeny v případě As, Cd, Pb a Zn a u Cu na všech lokalitách kromě loc2.

Tabulka č. 7: Mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových prvků v půdě (ukazatele pro hodnocení půd); (vyhláška č. 382/2001 Sb).

Mezní hodnoty koncentrací prvků v extraktu lučavkou královskou v mg.kg ⁻¹ sušiny v půdě								
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Běžné půdy	20	0.5	90	60	0,3*	50	60	120
Písky, hlinité písky, štěrkopísky	15	0.4	55	45	0,3*	45	55	105

V případě Cd byl ovšem naměřena jeho zvýšená koncentrace i na lokalitě, nacházející se 16 km po proudu od kovohutí. Může to souviset s distribucí prvku pomocí atmosferické depozice, v důsledku složení geologického podloží (Šichorová et al. 2004), jeho vysokou mobilitou (Vaněk et al. 2005), a vlivem distribuce kontaminovaných kalů vyplavovaných řekou (Borůvka et al. 1997). Rozdílná depozice kadmia na lokalitách s různou vzdáleností od kovohutí byla zaznamenána i v práci Rieuwerts et al., z roku 1994. V této práci byly ale hodnoceny obsahy prvků na lokalitách situovaných jižním (opačným) směrem od zdroje kontaminace a tento trend byl připsán depozici kouřem z komína kovohutí, obvykle unášeným tímto směrem. Nejvyšší obsahy všech prvků byly naměřeny na lokalitě Halda, která se nachází v přímé blízkosti zdroje a je na ní skladováno velké množství hutnického odpadu. Ve výsledcích je ale také vidět, že koncentrace většiny rizikových prvků nemá rovnoměrně se zvyšující trend a ukazuje na rozdílné podmínky pro mobilitu prvků. Tyto výkyvy mohou ovlivnit i biodostupnost prvků, a to řadou faktorů jako například speciace kovu, horizontální a vertikální variabilita pH půdy, mikrobiální aktivitou nebo obsahem organické hmoty (Iftode et al. 2015; Šichorová et al. 2004; Ullrich et al. 1999). Kovy v půdním roztoku, výměnně vázané kovy a kovy vázané na půdní organickou hmotu jsou považovány za snadno, nebo potenciálně dostupné a představují nejnebezpečnější formy pro životní prostředí (Kabata-Pendias & Pendias 2001). Tyto formy se z půdy snadno akumulují v rostlinách a dostávají se dále do potravního řetězce.

7.2.3. Koncentrace PR v orgánech drobných zemních savců

Terénní studie, zabývající se dopady znečištění životního prostředí jsou užitečné nejen pro hodnocení kvality životního prostředí, ale jsou také užitečné pro identifikaci druhů, které mohou sloužit jako bioindikátoři a zjišťování, jaký vliv na ně prostředí má. Drobní zemní savci jsou k monitoringu využíváni velmi často, protože se nachází na různých úrovních trofického systému a hrají důležitou roli v potravinovém řetězci (Stankovic et al. 2014). Tato skupina zahrnuje převážně býložravé druhy, ale jsou přítomni také všežravci a masožravci, kteří jsou

sami často kořistí širokého spektra predátorů. Navíc jsou velmi početní a jsou vázáni na konkrétní prostředí (rozloha 1-2 ha podle druhu) a veškerou potravu, vodu i vzduch přijímají z relativně malé oblasti (Andráš et al. 2006; Wijnhoven et al. 2007). Konzumují floru a faunu, která reflektuje lokální kontaminaci půdy, vody i ovzduší (Stankovic et al. 2014). Jsou tedy vhodnými modelovými organizmy. Jedním z cílů této práce bylo hodnotit reakci volně žijících zvířat na expozici rizikovými prvky z hlediska jejich potravinových preferencí.

Existují různé druhy rostlin, které mají akumulční schopnosti (Čadková et al. 2014) a potenciálně i rozdílný vliv na bioakumulaci prvků v potravinovém řetězci. Ozaki et al. (2019) zjistili, že zvířata, která konzumovala biomasu rostlinného akumulátoru kadmia (*Salicaceae*) příjem takovéto rostliny „ředí“ jinou potravou a tím míru expozice snižují. Dietní bohatost je tedy důležitým faktorem expozice RP. V případě zde uvedeného terénního biomonitoringu ale není možné zjistit, jaké rostliny konkrétně živočich dlouhodobě konzumoval.

Podle publikovaných studií je možné určit, jestli konkrétní druh zvířete přijímá spíše zelené části rostlin, nebo spíše semena, což také ovlivňuje množství přijatých prvků a dost možná i jejich formu (Cano et al. 2013). Z našich výsledků ovšem vyplynulo, že s největší pravděpodobností má největší vliv podíl rostlinné a živočišné složky, tedy celkově jejich potravinové preference, které se u našich tří ekologických skupin liší.

Přes to, že byli karnivoři odchyceni pouze na lokalitách s nižší koncentrací RP v půdě, bylo v jejich tkáních naměřeno podstatně vyšší množství všech prvků v porovnání s omnivory i herbivory odchycenými na nejvíce znečištěných lokalitách. Toto je pravděpodobně důsledek vyšší pozice v potravinovém řetězci. Karnivoři se živí jinými zvířaty s již naakumulovanými prvky v přístupné formě ve tkáních; podobné výsledky se objevily i v pracích jiných autorů (např. Pankakowski et al. 1994; Mertens et al. 2001). Skutečnost, že karnivoři hromadí ve svých tkáních nejvíce toxických kovů ovšem neznamena, že jsou i nejvíce ohroženi kontaminací. Pravděpodobně jsou na takovéto zatížení adaptováni. V jejich orgánech byly, v porovnání s ostatními skupinami, naměřeny také velmi vysoké koncentrace esenciálních prvků, což může být také jednou z forem přizpůsobení se zvýšenému příjmu RP. Vysoké koncentrace obsahu toxických prvků u hmyzožravců ve srovnání s hlodavci mohou být způsobeny také jejich velmi vysokou rychlostí metabolismu (Stewart et al. 2005).

Při porovnání omnivorů a herbivorů nejsou rozdíly až tak výrazné, ale jsou stále patrné. U omnivorů jsou rizikové prvky akumulovány intenzivněji, což lze očekávat na základě složení jejich potravy, která zahrnuje i živočišnou složku. V grafické prezentaci výsledků je ovšem vidět i mírně snížený obsah esenciálních prvků s výjimkou Se, který je vyšší a Fe, který je na stejné úrovni. Když jsou prvky jako Zn, Fe a Cu málo přijímány ve stravě, zvyšuje se míra

retence Cd (Coocke 2011). Podobně Reeves & Chaney (2008) zjistili, že mezní nedostatky esenciálních prvků Zn, Fe a Cu v potravě vedou ke zvýšenému vstřebávání, akumulaci a retenci Cd, které bylo při laboratorním experimentu absorbováno až desetkrát více než při normálním příjmu esenciálních prvků. Matović et al. (2001) zjistili, že zvýšený příjem zinku dokonce snižuje ukládání Cd v játrech a ledvinách. V této terénní studii nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi Cd v půdě a jeho akumulací v organismu. Tyto neprůkazné výsledky mohou být způsobeny jak vysokou mobilitou Cd v prostředí, tak skutečností, že největší expoziční cestou je inhalace toxických částic (Tataruch & Kiredorf, 2003; Khlifi & Hamza-Chaffai 2010). Wijnhoven a kol. (2007) také popsali slabou korelaci mezi půdou a orgány v případě Cd.

Talmage & Walton (1991) popsali vztah mezi trofickou úrovní drobných zemních savců a úrovní expozice kontaminanty. Výsledky v předkládané práci odpovídají předpokladu karnivoři > omnivoři > herbivoři (jako v předchozích studiích), ale snížená koncentrace esenciálních prvků u omnivorů může ukazovat na možný dietetický problém. Podle Sánchez-Chardi et al. (2007) jsou myšice (omnivoři) citlivější na míru kontaminace než rejsci (karnivoři). Tito autoři zaznamenali mírné zvýšení hladiny Zn a Cu v důsledku zvýšené expozice RP jakou důsledek snahy o detoxikaci (Sánchez-Chardi & Nadal 2007). To se v případě této práce nepotvrdilo, což může být způsobeno nedostatečným příjmem esenciálních prvků v potravě.

Cd interferuje biokinetiku a biologickou roli mnoha esenciálních kovů a metaloidů, jako jsou Ca, Mg, Na, K, Zn, Cu, Fe, Mn, Se, Mo, Cr, Co, B a dalších (Moulis 2010) a může způsobit mnoho zdravotních problémů kvůli narušené homeostáze (Schümann & Elhans, 2002).

Zvyšování koncentrace Cd v životním v prostředí v kombinaci s deficitem Zn u lidské populace v současnosti představují velký problém. Wuehler et al. (2005) provedli rozsáhlou studii, ve které odhadli, že nedostatečným příjmem zinku je ohroženo přibližně 20,5 % celosvětové populace. Na druhé straně esenciální kovy mohou mít negativní vliv na organismus jak v deficitu, tak v přebytku (Mertz 1981; Zorrodu et al. 2019).

Pro vyhodnocení statistických výsledků bylo použito GLMM a GLM modelu, které však nemohou ukázat interakce mezi prvky a orgány v závislosti na ekologických skupinách. Tyto interakce jsou velmi zajímavé a důležité pro posouzení dopadu expozice rizikovými prvky na volně žijící zvířata a potenciálně i člověka (Stankovic 2014). Jsou proto vyhodnoceny pomocí krabicových grafů, a i když touto cestou není možné ukázat statisticky významné rozdíly, jsou stále hodnotitelné. Například v práci Andráše et al. (2006) byla vyšší koncentrace toxických prvků pozorována ve tkáních zvířat, která konzumují převážně vegetativní části

rostlin (naši herbivoři) a nižší u zvířat, která se neživí zelenými částmi rostlin, ale hlavně semeny (naši omnivoři). Tyto výsledky jsou v souladu se statistickou analýzou uvedenou v této práci, ale podle grafické prezentace je výsledek odlišný. K vyhodnocování těchto druhů výsledků je tedy potřeba přistupovat komplexně.

7.2.4. Syntéza MT a její ovlivnění různými faktory

Rizikové prvky v prostředí spouštějí v živých organizmech mnoho detoxikačních procesů. Významným detoxikačním procesem je syntéza MT, která je ovlivněna nejen potřebou vychytávat volné toxické látky z oběhu, ale mimo jiné (fyziologické/metabolické) faktory i druhem organismu (Mertens et al. 2001; Rogival et al. 2007; Fritsch et al. 2010).

Ve výsledcích této práce je koncentrace MT v játrech průkazně ovlivněna hmotností (respektive věkem) zvířete a také ekologickou skupinou. Velké zastoupení herbivorů v tomto výběru mohlo zkreslit výsledky analýzy korelace mezi koncentrací MT v játrech a lokalitou. U býložravých druhů je podle předchozích studií tato korelace velmi nízká v porovnání s omnivorními a karnivorními druhy (Ma et al. 1991).

Koncentrace MT vykazuje stejný trend jako v případě měřených prvků: karnivoři > omnivoři > herbivoři. Vzhledem k velkému rozdílu v akumulaci prvků, byl očekáván mnohem vyšší obsah metalothioneinů u karnivorů, ale podle grafického znázornění nebyl až tak výrazný. V tomto případě nejspíše probíhají i jiné detoxikační procesy, anebo je jejich organismus na takovouto zátěž adaptován. Herbivoři mají podle očekávání nejnižší koncentraci MT v játrech, což také odpovídá i nejnižší akumulaci RP. Vztah mezi úrovní kontaminace na lokalitách a syntézou MT v játrech nebyl prokázán. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že je míra syntézy tohoto proteinu ovlivněna spíše faktory endogenními než exogenními.

Každý druh zvířete, ale i orgán příslušného druhu může reagovat jiným způsobem. Podle Fritsch et al. (2010) nemá pohlaví jedince u většiny druhů, kromě norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*), vliv na koncentraci MT ve tkáních. Cd má u drobných zemních savců vzrůstající tendenci vlivem věku, ale u dalších prvků a MT to závisí na druhu zvířete. MT se s věkem zvyšuje pouze v játrech norníka rudého. U myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) byl pozorován významný vztah mezi prostředím a hodnotami MT, ale hladina MT s vyšším množstvím RP v půdě stoupala v játrech a klesala v ledvinách. U norníka hladina stoupala pouze v ledvinách a u rejška obecného (*Sorex araneus*) v obou orgánech stoupala.

Každý druh zvířete, ale i orgán příslušného druhu tedy může reagovat jiným způsobem. Podle Nakayama et al. (2013) lze nalézt rozdíl dokonce i v expresi jednotlivých izoform MT

v různých orgánech. U kryš (*Rattus rattus* a *Rattus tanezumí*) exponovaných Cd a Pb bylo zjišřeno, že při vyšším obsahu prvků půdě stoupá mRNA exprese MT-2 v játrech, zatímco exprese MT-1 se nemění. V případě ledvin byla pozorována zvýšená exprese na základě expozice kontaminantům u MT-1 i MT-2. I tento fakt může ovlivnit výsledky a bude na něj brán zřetel v dalších terénních studiích

7.2.5. Distribuce prvků mezi orgány

Ke sledování Pb, As, Hg a Cd se obvykle používají vzorky jater a ledvin z důvodu jejich vysoké akumulací schopnosti (Bellante et al. 2012). Slezina je cílovým orgánem spíše pro Fe, Zn a Al (Kovalchuk et al. 2017). Vysoké hodnoty ve slezině byly podle výsledků této práce naměřeny nejen v případě Zn a Fe ale i As. U všech toxických kovů a metaloidů jsou koncentrace v orgánech velmi vysoké u karnivorů v porovnání s omnivory a herbivory. I přes to vykazují ve většině případů podobný trend v distribuci mezi jednotlivými orgány.

Významný rozdíl v akumulaci v orgánech je patrný pouze v případě Cd a Hg. Tataruch & Kriendorf (2003) uvádí, že nejvíce rtuti se akumuluje v ledvinách, poté v játrech, a nakonec ve slezině což je u omnivorů a herbivorů potvrzeno i zde. Karnivoři však mají nejvíce Hg v ledvinách pak slezině, a nakonec v játrech. Na základě předchozích studií (např. Sánchez-Chardi et al. 2007) byla nejvyšší koncentrace Cd očekávána v ledvinách a játrech, přičemž ledviny by měly být hlavním cílovým orgánem. Cd vytváří v játrech komplex Cd-MT (Stoeppler 1991), který je následně transportován do ledvin a absorbován v proximálním tubulu. Ve výsledcích této práce je ale v případě karnivorů tento prvek více akumulován v játrech. Je známo, že se Cd-MT hromadí v ledvinách a anorganická sůl CdCl₂ je nejprve transportována do jater, ale redistribuce Cd z jater do ledvin je v případě Cd-MT nižší než u CdCl₂ (Groten et al. 1992). Vzhledem k tomu, že karnivoři získávají živiny z živých organismů je pravděpodobné, že je přijímané Cd již v organické formě Cd-MT. Karnivoři v této studii (*Sorex araneus*) se živí hmyzem a žížalami, které mají schopnost MT syntetizovat (Van Vliet et al. 2005; Atrian 2009; Stützenbaum 2009). U omnivorů a herbivorů tvoří živočíšná složka menší, nebo žádný podíl a v jejich případě bylo v ledvinách detekováno více kadmia než v játrech. Výše uvedena zjištění ukazují, že výběr druhu a správného cílového orgánu je důležitý pro využití drobných zemních savců jako bioindikátoru kontaminace životního prostředí rizikovými prvky.

Výsledky monitoringu kontaminace životního prostředí rizikovými prvky a jejich dopadu na volně žijící drobné zemní savce jsou v době odevzdání této práce v recenzním řízení

ve vědeckém časopise s IF Ecological Indicators pod názvem „Risk Elements Accumulation and Metallothionein Synthesis in Wild Small Mammals from the Perspective of Dietary Category“.

8. Závěr

Tato doktorská disertační práce je zaměřena na posouzení kontaminace životního prostředí rizikovými prvky a jeho dopadu na živé organizmy z pohledu jejich reakcí na zvýšenou expozici těmito prvky. Cílem práce bylo objasnění příjmu a transformace rizikových prvků v interakci prostředí-rostlina-zvíře, zkoumání akumulace prvků v orgánech zvířat a jejich následnou detoxikační obranu proti těmto kontaminantům.

Jako modelový organismus byli vybráni drobní zemní savci žijící na lokalitách kontaminovaných těžkými kovy a kontrolních lokalitách. Markerem reakce organismu na prostředí kontaminované toxickými prvky byly zvoleny jaterní metalothioneiny a byla zkoumána míra jejich syntézy v korelaci s obsahem prvků v prostředí a orgánech odchycených zvířat.

V současnosti je v terénních studiích používáno velké množství metod získávání vzorků pro tyto účely. V laboratorních podmínkách se používají metody v závislosti na druhu následných analýz. Neexistuje ovšem žádná standardizovaná metoda pro získání vzorků pro analýzu koncentrace MT ve vzorku a manipulaci se získaným materiálem v terénu. Z tohoto důvodu bylo nejprve nutné přezkoumat různé alternativy metod a zhodnotit jejich vliv na stabilitu metalothioneinu. V laboratorních podmínkách bylo vyzkoušeno pět různých pre-analyzačních metod mezi které patřila běžná laboratorní metoda, ale také metoda simulující velkou časovou prodlevu mezi usmrcením zvířete a analýzou vzorku, ke které by v terénu mohlo dojít. Ze zde uvedených výsledků vyplývá, že lyofilizace, která velmi usnadňuje manipulaci se vzorky, nezpůsobuje denaturaci MT ve vzorcích a nejvhodnější teplotou pro uchovávání vzorků před lyofilizací je $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyhodnocení metod manipulace se vzorky v terénu byla navržena optimalizovaná metoda, kdy jsou orgány pro analýzu MT odebírány přímo na lokalitě odchyty a následně převezeny do laboratoře uložené v suchém ledu ($-79\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Díky tomuto experimentu bylo také prokázáno, že je denaturace MT, způsobená nevhodným nakládáním se vzorky, viditelná na voltmetrickém záznamu. Na záznamu měření takového vzorku je patrná tzv. předvlna, která signalizuje menší fragmenty proteinů, a tedy že došlo k rozpadu některých molekul MT. V případě takovýchto vzorků je zároveň snížena odezva Brdičkoví reakce a tím pádem i naměřena menší koncentrace metalothioneinů. Tyto poznatky byly publikovány v časopise s IF a možná budou v budoucnu sloužit jako vodítko i dalším vědeckým týmům zabývajícím se touto problematikou.

Výsledky získané aplikací optimalizované metody přípravy vzorku před analýzou přinesly mnoho poznatků. Tím hlavním je zjištění, že míra akumulace rizikových prvků

a syntéza metallothioneinů je nejvíce závislá na složení potravy zvířat. Odchycená zvířata byla pro vyhodnocení tohoto faktoru rozdělena do tří ekologických skupin; karnivoři, omnivoři a herbivoři. Koncentrace akumulovaných prvků v orgánech (játra, ledviny, slezina) i MT (játra) měly stejný trend: karnivoři > omnivoři > herbivoři. Ukázaly se ovšem i rozdíly v akumulaci různých kovů v různých orgánech, což je podle diskutovaných výsledků také důsledkem potravinových preferencí zvířat. Překvapivě byly v našich odchycených omnivorech naměřeny nižší koncentrace esenciálních prvků a vyšší koncentrace prvků toxických, což naznačuje možný dietetický problém spojený s interakcemi mezi esenciálními a neesenciálními prvky. Dále bylo zjištěno, že akumulace rizikových prvků stoupá se zvýšeným obsahem těchto prvků v půdě ve všech případech kromě Cd, které je v prostředí velmi labilní.

První hypotéza této práce, tedy že zvýšený příjem rizikových prvků organizmem vede ke zvýšené syntéze metallothioneinu, jako obranné reakci proti toxickým účinkům rizikových prvků je tedy potvrzena. Druhá hypotéza, ve které je uvedeno, že míru akumulace prvků i koncentraci metallothioneinu v organizmu ovlivňuje expozice rizikovými prvky, druh, pohlaví a věk zvířete byla potvrzena také, ale není možné všechny faktory aplikovat na všechny toxické kovy. U jednotlivých prvků se reakce organizmu liší a interpretace získaných výsledků není úplně jednoznačná. Tato definice tedy nemůže být použita jako obecný závěr.

Posouzení míry akumulace a syntézy metalothioneinů u volně žijících drobných zemních savců z hlediska jejich dietní kategorie podhalilo, co se odehrává v organizmu při expozici rizikovými prvky v přirozeném prostředí, kde jsou zvířata exponována mnohem větším spektrem vlivů a stresů než v laboratorních podmínkách. Různé složky potravy, které si živočich sám vyhledává a případně i loví, obsahují kovy uloženy v různých formách, a to se také odráží na rozdílné distribuci prvků mezi orgány.

Mnoho otázek zůstává nezodpovězených a jejich problematikou se zabývá velké množství výzkumných týmů po celém světě. Je třeba definovat interakce mezi jednotlivými prvky v živých organizmech, zjišťovat v jakých formách se v prostředí vyskytují, jak a v jaké formě se do organizmu dostávají a v neposlední řadě také dopad expozice všudypřítomnými kontaminanty v životním prostředí na zdraví a kvalitu života.

9. Seznam zkratek

AAS - atomová absorpční spektrometrie

ACI - akaike information criterion

AMK - aminokyseliny

CE - capillary electrophoresis

CNS - centrální nervová soustava

CZE - capillary zone electrophoresis

DC voltametrie - direct current voltammetry

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

GLM - generalized linear model

GLMM - generalized linear mixed model

GSH - glutathion

HA – humic acids

HPLC - high-performance liquid chromatography

ICP AES - inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

ICP MS - inductively coupled plasma mass spectroscopy

KDa - kilodalton

mRNA - messenger ribonucleic acid

qPCR - quantitative polymerase chain reaction

ROS – reactive oxygen species

SDS-PAGE - sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

WHO - World Health Organisation

10. Seznam obrázků a tabulek

Obrázky:

Obrázek č. 1: Konceptní schéma pro rostliny dostupných kovů a metaloidů z půdy a odezva příjmu v listech rostlin

Obrázek č. 2: Strukturální charakteristika α a β domény krysího MT-2

Obrázek č. 3: Schéma zobrazující elektrochemickou analýzu

Obrázek č. 4: Zobrazení lokalit na mapě

Obrázek č. 5: Data reprezentují hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky

Obrázek č. 6: Zobrazení voltametrických záznamů determinace MT v játrech potkana

Obrázek č. 7: Rozsah koncentrace rizikových prvků a MT

Tabulky:

Tabulka č. 1: Popis jednotlivých metod nakládání se vzorky, před extrakcí a analýzou MT

Tabulka č. 2: Základní popisné charakteristiky pro zjištění reprodukovatelnosti metody analýzy koncentrace MT v $\mu\text{g/ml}$

Tabulka č. 3: Detailní vyhodnocení vlivu metody na koncentraci MT ve vzorcích

Tabulka č. 4: Rozdělení jedinců podle ekologických skupin

Tabulka č. 5: Průměrné naměřené hodnoty koncentrace rizikových prvků ve vzorcích z pěti vybraných odchytových lokalit

Tabulka č. 6: Signifikantní fixní faktory vyhodnocené z minimálních adekvátních modelů

Tabulka č. 7: Mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových prvků v půdě (ukazatele pro hodnocení půd); (vyhláška č. 382/2001 Sb)

11. Seznam použité literatury

Adam V, Beklova M, Pikula J, Hubalek J, Trnkova L, Kizek R. 2007. Shapes of differential pulse voltamograms and level of metallothionein at different animal species. *Sensors* **7**: 2419-2429.

Amirad JC, Amirad-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology* **76**: 160-202.

Anděra M, Horáček I. 2005. *Poznáváme naše savce*. Sobotáles, Praha.

Andráš P, Križáni I, Stanko M. 2006. Free-living rodents as monitors of environmental contaminants at polluted mining dump area. *Carpathian Journal of earth and Environmental Sciences* **1**(2): 51-62.

Atrian, S. 2009. Metallothioneins in diptera. Pages 155-182 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editors. *Metal Ions in Life Sciences*. (5th Ed.). RSC Publishing, Cambridge.

Babula P, Mararik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Skutkova H, Provaznik I, Hubalek J, Kizek R. 2012. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics* **4**: 739-750.

Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.

Balamurugan K, Shaffner W. 2009. Regulation of metallothionein gene expression. Pages 31-49 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO. *Metal ions in life sciences*. RSC Publishing, Cambridge.

Banni M, Messaoudi I, Said L, Heni JE, Kerani A, Said K. 2010. Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**: 513-519.

Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Rybeire F, Alain B. 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **118C**(3): 361-367.

- Bellante A, Sprovieri M, Buscaino G, Buffa G, Vincenzo S, Manta DS, Barra M, Filiciotto F, Bonanno A, Mazzola S. 2012. Distribution of Cd and As in organs and tissues of four marine mammal species stranded along the Italian coast. *Journal of Environmental Monitoring* **14**: 2382-2391.
- Bobillier – Chaumont S, Maupoil V, Berthold A. 2006. Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta of cadmium and isoproterenol treated rats. *Journal Of Applied Toxicology* **26**: 47-55.
- Borůvka L, Kozák J, Křišťoufková S. 1997. Heavy metal accumulation in plants grown in heavily polluted soils. *Folia Microbiologica* **42**(5): 524–526.
- Brdička R. 1993. Polarographic studies with dropping mercury kathode. Part XXXII. Activation of hydrogen in sulphhydryl group of some thioacids in cobalt salt solutions. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **5**: 148-164.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 79-110.
- Cano ARG, Fernández MH, Álvarez-Sierra MA. 2013. Dietary ecology of Murinae (Muridae, Rodentia): A geometric morphometric approach. *Plos One* **8**(11): e79080.
- Capasso C, Carginale V, Crescenzi O, Di Mario D, Spadaccini R, Temussi PA, Parisi E. 2005. Structural and functional studies of vertebrate metallothioneins: cross-talk between domains in the absence of physical contact. *Biochemical journal* **391**: 95-103.
- Capdevila M, Atrian S. 2011. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *Journal of Biology and Inorganic Chemistry* **16**: 977-989.
- Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, Jucoski GO, Battisti V, Redin M, Linares CEB, Dressler VL, Flores EMM, Nicoloso FT, Morsch VM, Schetinger MRCh. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedings. *Chemosphere* **65**: 999-1006.
- Cobbett Ch, Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of plant biology* **53**: 159-182.
- Cobbett Ch. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* **3**(3): 211-216.

Coocke JA. 2011. Cadmium in small mammals. Pages 627-642 in Beyer WN, Meador J, editors. Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations (2nd ed.). CRC Press, New York.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences **59**: 627-647.

Cui L, Takagi Y, Wasa M, Iiboshi Y, Inoue M, Khan J, Sando K, Nezu R, Okada A. 1998. Zinc deficiency enhances interleukin-1 alpha-induced metallothionein-1 expression in rats. Journal of Nutrition **128**(7): 1092-1098.

Čadková Z, Száková J, Miholová d, Horáková B, Kopecý O, Křivská D, Langrová I, Tlustoš P. 2014. Bioaccessibility versus bioavailability of essential (Cu, Fe, Mn, and Zn) and toxic (Pb) elements from phyto hyperaccumulator *Pistia stratiotes*: potential risk of dietary intake. Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**: 2344-2354.

D'Auria S, Carginale V, Scudiero R, Crescenzi O, Di Maro D, Temussi PA, Parisi E, Capasso C. 2001. Structural characterization and thermal stability of *Notothenia coriiceps* metallothionein. Biochemical journal **354**: 291-299.

Dabrio M, Rodríguez AR. 2000. Study of zinc metallothionein from rat liver using electrochemical techniques. Electroanalysis **12**(13): 1026-1033.

Dallinger R. 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology **113**(2): 125-133.

Dorčák V, Šestáková I. 2006. Electrochemical behavior of phytochelatin and related peptides at the hanging mercury drop electrode in the presence of cobalt(II) ions. Bioelectrochemistry **68**(1): 14-21.

Duffs JH. 2002. „Heavy metals“ – a meaningless term? Pure and Applied Chemistry **74**(5): 793-807.

Durkalec M, Kolenda R, Owczarek T, Szkoda J, Nawrocka A, Grzegórlka J, Dzięgiel P, Socha P, Kolacz R, Schierack P, Zmudzki J, Posyniak A. 2017. Expression of metallothionein in the liver and kidneys of the red deer (*Cervus elaphus L.*) from an industrial metal smelting area of Poland. Ecotoxicology and environmental Safety **137**: 121-129.

- Ebbs SD, Kochian LV. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: Implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* **26**: 776-781.
- Erk M, Ivanković D, Raspor B, Pavičić J. 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* **57**: 1211-1218.
- Feldman SL, Failla ML, Cousins RJ. 1978. Degradation of rat liver metallothioneins in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* **544**: 638-646.
- Friberg L, Piscator M, Nordberg GF, Kjellstroem T. 1974. Cadmium in the environment. 2nd Edition. CRC Press, Cleveland.
- Fritsch C, Cosson RP, Coeurdassier M, Raoul F, Giraudoux P, Crini N, de Vaufleury A, Scheifler R. 2010. Responses of wild small mammals to pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environmental Pollution* **158**: 827-840.
- Ghoshal K, Jacob ST. 2000. Regulation of metallothionein gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **66**: 357-384.
- González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeria A. 2006. Considerations on the sample size of wood mice used to biomonitor metals. *Science of the Total Environment* **366**: 910-914.
- Groten J, Sinkledam EJ, Luten JB, van Bladeren PJ. 1992. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallothionein in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **111**(3): 504-513.
- Halim M, Conte P, Piccolo A. 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* **52**(1): 265-275.
- Hardyman JEJ, Tyson J, Jackson KA, Aldidge C, Cockell SJ, Wakeling LA, Valentine RA, Ford D. 2016. Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics* **8**: 337-343.
- Harlyk C, Bordin G, Nieto O, Rodriguez AR. 1997. Cyclic voltametry study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT in the presence of cadmium. *Electroanalysis* **9**(8): 608-613.

Hegedus A, Erdei S, Horváth G. 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barely seedlings under cadmium stress. *Plant Science* **160**: 1085-1093.

Hidalgo J, Chung R, Penkowa M, Vašák M. 2009. Structure and function of vertebrate metallothioneins. Pages 279-317 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editors. *Metal ions in life sciences*. RSC Publishing, Cambridge.

Hispard F, de Vaufleury A, Cosson RP, Devaux S, Scheifler R, Coeurdassier M, Gilbert F, Martin H, Richert L, Berthold A, Badot P.-M. 2008b. Comparison of transfer and effects of cadmium on rats exposed in short experimental snail – rat food chain or to CdCl₂ dosed food. *Environment International* **34**: 381-389.

Hispard F, de Vaufleury A, Martin H, Devaux S, Cosson RP, Scheifler R, Richert L, Berthelot A, Badot P.-M. 2008a. Effect of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **70**: 490-498.

Höckner M, Dallinger R, Stürzenbaum SR. 2015. Metallothionein gene activation in the earthworm (*Lumbricus rubellus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**: 537-542.

Hodkinson ID, Jackson JK. 2005. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. *Environmental Management* **35**(5): 649-666.

Horai S, Watanabe I, Takada H, Iwamizu Y, Hayashi T, Tanabe S, Kuno K. 2007. Trace element accumulations in 13 avian species collected from the Kanto area, Japan. *Science of Total Environment* **373**(2-3): 512-525.

Hu H. 2002. Human health and heavy metals exposure. Pages 65-82 in McCally M, editor. *LifeSupport: the environment and human health*. MIT Press, Cambridge.

Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **533**(1-2): 201-209.

Iftode S, Huzum R, Sirbu-Radasanu DS, Buzgar N. 2015. Geochemical distribution of some potentially toxic trace elements in soil contaminated by mining activity in Suceava county,

Romania. 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConferences SGEM2015. 153-159.

Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* **7**(2): 60-72.

Jakimska A, Konieczka P, Skora K, Namiesnik J. 2011. Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, Part II: metal concentrations in animal tissues. *Polish Journal of Environmental Studies* **20**(5): 1127-1146.

Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* **68**(1): 167-182.

Kabata-Pendias A, Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Washington D.C.

Kabata-Pendias A. 2010. Trace elements in soils and plants. CRC press, Washington D.C.

Kägi JH, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Supplementum* **52**: 25-61.

Kägi JH, Schäffer A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**(23): 8509-8515.

Kägi JHR, Vašák M, Lerch K, Gilg DEO, Hunziker P, Bernhard WR, Good M. 1984. Structure of mammalian metallothionein. *Environmental Health Perspectives* **54**: 93-103.

Kalač P, Nižanská M, Bevilacqua D, Stašková I. 1991. Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and copper smelter. *Science of the Total Environment* **177**(1-3): 251-258.

Khelifi R, Hamza-Chaffai A. 2010. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **248**(2): 71-88.

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

Klaassen CD, Choudhuri S, McKim Jr. JM, Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC. 1994. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environmental Health Perspectives* **102**: 141-146.

Klaassens CD. 1999. *Metallothionein IV*. Birkhauser. Basel.

Kovalchuk LA, Mikschevich NV, Chernaya LV. 2017. Accumulation of heavy metals by small mammals the background and polluted territories of the Urals. *Vestnik Zoologii* **51**(4): 325-334.

Krizkova S, Fabrik I, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Kizek R. 2004. Metallothionein - A promising tool for cancer diagnostics. *Bratislavské Lekárske Listy* **110**(2): 93-97.

Křivská D, Šestáková I, Száková J, Čadková Z, Kotíková Z, Langrová I. 2019. Sample handling and pretreatment as critical points in determining the quality of analytical data during metallothionein determination in wild animals. *Ecological Indicators* **98**: 214–217.

Křivská D, Šestáková I. 2015. Determination of metallothioneins in the liver of small terrestrial mammals, living at hazardous element contaminated sites. Pages 115-119 in Srsenova L, editor. XXXV Modern electrochemical methods (18.-22.5.2015, Jetřichovice). Best servis Ústí nad Labem, Czech Republic.

Kungolos A, Samaras P, Tsiridis V, Petala M, Sakellaropoulos G. 2006. Bioavailability of toxic heavy metals in the presence of natural organic matter. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/hazardous substances and environmental engineering* **41**(8): 1509-1517.

Liu ZP. 2003. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non-ferrous metal smelters. *The Science of the Total Environment* **309**: 117-126.

Lombi E, Wenzel WW, Gobran GR, Adriano DC. 2000. Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. Pages 1-22 in Groban GR, Wunzel WW, Lombi E, editors. *Trace trace elements in the rhizosphere*. CRC Press, USA.

Ma W, Denneman W, Faber J. 1991. Hazardous exposure of ground-living small mammals to cadmium and lead in contaminated terrestrial ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **20**: 266-270.

Maret W. 2000. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *Journal of Nutrition* **130**(5S Suppl): 1455S – 1458S.

Marghoses M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal Of The American Chemical Society* **79**: 4813-4814.

Market AB, Breure AM, Zechmeister HG. 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. Pages 3-40 in Market BA, Breure AM, Zechmeister HG, editors in *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier Science Ltd., USA.

Marques CC, Gabriel SI, Pinheiro T, Viegas-Crespo AM, da Luz Mathias M, Bebianno MJ. 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere* **71**: 1340-1347.

Matović V, Buha A, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. 2011. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **62**(1): 65-76.

Mendieta J, Chivot J, Munoz A, Rodriguez AR. 1995. Electrochemical behavior of metallothioneins and related molecules. Part I: Lys–Cys–Thr–Cys–Cys–Ala thionein fragment [56–61] MT I. *Electroanalysis* **7**(7): 663-669.

Merlos MA, Michálek P, Kryštofová O, Zítka O, Adam V, Kizek R. 2014. The role of phytochelatins in plant and animals: A review. *Journal Of Metallomics and Nanotechnologies* **4**: 22-27.

Mertens J, Luyssaert S, Verbeeren S, Vervaeke P, Lust N. 2001. Cd and Zn concentrations in small mammals and willow leaves in disposal facilities for degraded material. *Environmental Pollution* **115**: 17-22.

Mertz W. 1981. The essential trace elements. *Science* **213**(4514): 1332–1338.

Midar-ul-Hag, Khattak R A, Puno HK, Saif MS, Memon KS, Sial NB. 2005. Bioaccumulation of trace elements by different plant species grown on potentially contaminated soils of NWFP, Pakistan. *Asian Journal of Plant Sciences* **4**(4): 383-387.

Miettinen JK. 1975. The accumulation and excretion of heavy metals in organisms. Pages 215-229 in McIntyre AD, Mills CF, editors. *Ecological toxicology research*, Springer, Boston (MA).

- Moulis JM. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *BioMetals* **23**(5): 877-896.
- Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Yabe J, Umemura T, Ishizuka M. 2013. Accumulation and biological effects of metals in wild rats in mining areas of Zambia. *Environmental monitoring and assessment* **185**: 4907-4918.
- Nordberg M, Nordberg GF. 2009. Metallothioneins: Historical development and overview. Pages 1-29 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editors. *Metal ions in life sciences*. RSC Publishing, Cambridge.
- Nordberg M. 1977. Studies on metallothionein and cadmium. *Environmental Research* **15**(3): 381-404.
- Norgate TE, Jahanshahi S, Rankin WJ. 2006. Assessing the environmental impact of metal production processes. *Journal of Cleaner Production* **15**(8-9): 838-848.
- Notcor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* **49**: 249-279.
- Oaten J, Hudson MD, Jensen A, Williams I. 2015. Effects of organism preparation in metallothionein and metal analysis in marine invertebrates for biomonitoring marine pollution. *Sci. Total Environ* **518-519**: 238-247.
- Olafson RW, Olsson PE. 1991. Electrochemical detection of metallothionein. *Methods in Enzymology* **205**: 205-213.
- Olaniran AO, Balgobind A, Pillay B. 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: Impact of microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 10197-10228.
- Ozaki S, Fritsch C, Valot B, Mora F, Cornier T, Scheifler R, Raoul F. 2019. How Do Richness and Composition of Diet Shape Trace Metal Exposure in a Free-Living Generalist Rodent, *Apodemus sylvaticus*. *Environmental science and Technology* **53**(10): 5977-5986.
- Pankakowski E, Koivisto I, Hyvärinen H, Terhivuo J. 1994. Shrews as indicators of heavy metal pollution. *Special Publications of Carnegie Museum of Natural History* **18**: 137-149.

- Pascoe GA, Blanchet RJ, Linder G. 1994. Bioavailability of metals and arsenic to small mammals at mining waste-contaminated wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**: 44-50.
- Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: Speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and environmental safety* **56**(1): 110-121.
- Pelfrène A, Waterlot Ch, Douay F. 2011. In vitro digestion and DGT techniques for estimating cadmium and lead bioavailability in contaminated soils: Influence of gastric juice pH. *Science of the Total Environment* **409**: 5076-5085.
- Perelomov L, Cozzolino V, Pigna M, Violante A. 2011. Adsorption of Cu and Pb on goethite in the presence of low-molecular mass aliphatic acids. *Geomicrobiology* **28**(7): 582-589.
- Petering DH, Krezoski S, Tabatabai M. 2009. Metallothionein toxicology: Metal ion trafficking and cellular protection. Pages 353-389 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO. *Metal ions in life sciences*. RSC Publishing, Cambridge.
- Petrlova J, Potesil D, Mikelova R, Blastik O, Adam V, Trnkova L, Jelen F, Prusa R, Kukacka J, Kizek R. 2006. Attomole voltametric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta* **51**: 5112-5119.
- Phelps K, McBee K. 2009. Ecological characteristics of small mammal communities at a superfund site. *American Midland Naturalist* **161**: 57-68.
- Průša R, Kizek R, Trnková L, Vacek J, Zehnálek J. 2004. Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA Method. *Clinical Chemistry* **50**: 28-29.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JCh, Froelick GJ, Undakat JD, Zambrowicz BP, Palmiter RD. 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**(23): 7250-7259.
- Raspor B, Paić M, Erk M. 2001. Analysis of metallothioneins by the modified Brdička procedure. *Talanta* **55**: 109-115.
- Raspor B, Pižeta I, Branica M. 1994. Comparative quantitative analysis overlapping voltametric signals. *Analytica Chimica Acta* **285**: 103-111.

- Reeves PG, Chaney RL. 2008. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment* **398**(1–3): 13-19.
- Rieuwerts JS, Farago M, Cikrt M, Bencko V. 1999. Heavy metal concentrations in and around households near secondary lead smelter. *Environmental Monitoring and Assessment* **58**: 317-335.
- Robinson NJ, Whitehall SK, Clavet JS. 2001. Microbial metallothioneins. *Advances In Microbial Physiology* **44**: 183-213.
- Rodríguez-Mozaz S, Marco MP, de Alda ML, BarcelÃ D. 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure and Applied Chemistry* **76**(4): 723-752.
- Rogival D, Van Campenhout K, Infante HG, Hearn R, Scheirs J, Blust R. 2007. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(3): 506-514.
- Rotchell JM, Clarke KR, Newton LC, Bird DJ. 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in european flounders (*Pleuronectes fleus*) from Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* **52**: 151-171.
- Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R. 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of Molecular Science* **14**(3): 6044-6066.
- Ryvolova M, Hynek D, Skutkova H, Adam V, Provaznik I, Kizek R. 2012. Structural changes in metallothionein isoforms revealed by capillary electrophoresis and Brdicka reaction. *Electrophoresis* **33**: 270-279.
- Saito S, Hunziker PE. 1996. Differential sensitivity of metallothionein-1 and-2 in liver of zinc-injected rat toward proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1289**: 65-70.
- Sánchez-Chardi A, Nadal J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere* **68**(4): 703–711.

Sánchez-Chardi A, Penarroja C, de Oliveira Ribeiro CA, Nadal J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* **70**(1): 101-109.

Serrano N, Šestáková I, Díaz-Cruz JM. 2006. Constant current stripping chronopotentiometry for the study of adsorbing inert and electrochemically nonreversible metal complexes at low concentrations: Application to Cd and Zn metallothioneins. *Electroanalysis* **18**: 169-176.

Sharma P, Shanker-Dubey R. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**(1): 35-52.

Shaw CF III, Stillman MJ, Suzuki KT. 1992. Metallothioneins. Pages 1-13 in Stillman MJ, Shaw CF III, Suzuki KT, editors. *Metallothioneins: Synthesis, structure and properties of metallothionein, phytochelatin and metal-thiolate complexes*. VCH, New York.

Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes M. 2003. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicological Sciences* **73**(2): 294-300.

Shore RF, Douben PET. 1994. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicity* **134**: 49-89.

Schümann K, Elsehans B. 2002. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **16**(3): 139-144.

Singh N, Kumar D, Sahu APOD. 2007. Arsenic in the environment: effect on human health and possible prevention. *Journal of Environmental Biology*. **28**(2): 359-365.

Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R. 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology* **43**(3): 246-253.

Sinicropi MS, Amaneta 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.

Staniskiėne B, Matusėvicius P, Budreckiėne R, Skibniewska KA. 2006. Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**(4): 585-591.

Stankovic S, Kalaba P, Stankovic AR. 2014. Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry Letters* **12**(1): 63- 84.

Stankovic S, Stankovic RA. 2013. Bioindicators of toxic metals. Pages 151-228 in Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Didier R., editors. *Environmental chemistry for sustainable world*. Springer, Berlin.

Stewart JM, Woods AK, Blakely JA. 2005. Maximal enzyme activities, and myoglobin and glutathione concentrations in heart, liver and skeletal muscle of the Northern Short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*; Insectivora: Soricidae). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B* **141**(3): 267-273.

Stoeppler M. 1991. Cadmium. Pages 803-851 in Mertian E, Clarkson TW, editors. *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. VCH Publishers, New York.

Stürzenbaum SROV. 2009. Earthworm and nematode metallothioneins. Pages 183-198 in Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editors. *Metal Ions in Life Sciences*. (5th ed.). RSC Publishing, Cambridge.

Suzuki KT, Imura N, Kimura M. 1993. *Metallothionein III, Biological Roles and Medical Implications*. Birkhauser, Basel.

Suzuki KT. 1992. Preparation of metallothioneins. Pages 14-30 in Stillman MJ, Shaw CF, Suzuki KT, editors. *Metallothionein: Synthesis, structure, and properties of metallothioneins, phytochelatins, and metal-thiolate complexes*. Wiley-VCH, New York.

Szyczewski P, Siepak J, Nedzielski P, Sobczyński, T. 2009. Research on heavy metals in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* **18**(5): 755-768.

Šestáková I, Navrátil T, Josypčuk B. 2019. Metal Exchange reactions in metallothioneins explored by electrochemical methods. *Electroanalysis* **31**: 1-5.

Šestáková I, Navrátil T. 2005. Voltammetric methods in metallothionein research. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **3**: 43-53.

Šichorová K, Tlustoš P, Száková J, Kořínek K, Balík J. 2004. Horizontal and vertical variability of heavy metals in the soil of polluted area. *Plant, Soil and Environment* **50**(12): 525-534.

Talmage SS, Walton BT. 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **119**: 47-145.

Tandon SK, Singh S, Parsad S, Mathur N. 2001. Hepatic and renal metallothionein induction by oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food and Chemical Toxicology* **39**: 571-577.

Tataruch F, Kierdorf H. 2003. Mammals as biomonitors. Pages 737-772 in Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, editors. *Bioindicators & Biomonitors, Principles, Concepts and Applications, Volume 6*. (1st ed.). Pergamon Press, Oxford.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. 2012. Heavy metals toxicology and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* **101**: 133-164.

Tom M, Chen N, Segev M, Herut B, Rinkevich B. 2004. Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for this utilization as an environmental biomarker. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 705-710.

Torres MA, Barros M, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**: 1-15.

Ullrich SM, Ramsey MH, Helios-Rybicka E. 1999. Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in Upper Silesia, Poland. *Applied Geochemistry* **14**: 187-796.

Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard JA, Schat H. 2012. Hyperaccumulators of metals and metalloids trace elements: Fact and fiction. *Plant and Soil* **262**(1): 319-334.

Van Vliet PCJ, van der Zee SEATM, Ma VC. 2005. Heavy metal concentrations in soil and earthworms in floodplain grassland. *Environmental Pollution* **138**(3): 505-516.

- Vaněk A, Borůvka L, Drábek O, Mihaljevič M, Komárek M. 2005. Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. *Plant, Soil and Environment* **51(7)**: 316-321.
- Vašák M, Hasler D. W. 2000. Metallothioneins: New functional and structural insights. *Current opinion in Chemical Biology* **4(2)**: 177-183.
- Vašák M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**: 13-17.
- Vergani L, Lanza C, Scarabelli L, Canesi L, Gallo G. 2009. Comparative Biochemistry and physiology part C. *Toxicology & Pharmacology* **149(4)**: 572-580.
- Vodičková H, Pacáková V, Šestková I, Mader P. 2001. Analytické metody pro stanovení metalothioneinů. *Chemické listy* **95**: 477-483.
- Wang L, Chen D, Wang H, Liu Z. 2009. Effects of lead and/or cadmium on the expression of metallothionein in the kidney of rats. *Biological Trace Element Research* **129**: 190-199.
- Wang Y, Lorenzi I, Georgjev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. High zinc concentration. *Biological Chemistry* **385(7)**: 623-632.
- Wijnhoven S, Leuven RSEW, van der Velde G, Jungheim G, Koelemij EI, de Vries FT, Eijsackers HJP, Smits AJM. 2007. Heavy-metal concentrations in small mammals from diffusely polluted floodplain: Importance of species- and location-specific characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**: 603-613.
- Wuehler S, Peerson J, Brown K. 2005. Use of national food balance data to estimate the adequacy of zinc in national food supplies: methodology and regional estimates. *Public Health Nutrition* **8(7)**: 812-819.
- Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**: 167-179.
- Yang J, Cao Y, Yang M. 1998. Determination of metallothionein content in hepatoma cells by differential pulse polarography. *Chemico-Biological Interactions* **115**: 109-116.

Zhang B, Georgjev O, Hagmann M, Günes C, Cramer M, Faller P, Vašák M, Schaffner W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Molecular and Cellular Biology* **23**(23): 8471-8485.

Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. 2019. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* **195**: 120-129.

Žemberyová M, Barteková J, Závadská M, Šišoláková M. 2007. Determination of bioavailable fractions of Zn, Cu, Ni, Pb and Cd in soils and sludges by atomic absorption spectrometry. *Talanta* **71**(4): 1661-1668.