

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Toxikokinetika rizikových prvků v savčím organismu
infikovaném gastrointestinálními helminty**

Diplomová práce

Bc. Kristýna Válková

Zájmové chovy

Ing. Zuzana Čadková, Ph.D., DiS.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Toxikokinetika rizikových prvků v savčím organismu infikovaném gastrointestinálními helminty" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své práce Ing. Zuzaně Čadkové, Ph.D., DiS. Za pomoc a dohled nad úspěšným sepsáním této práce. Dále pak Ing. Lukáši Prasovi, Ph.D., s jehož pomocí se mi úspěšně povedlo absolvovat celou cestu zpracování vzorků a také za rady, kterých se mi od něj dostalo. Nakonce také mému partnerovi Zdeňkovi, který mi vždy pomohl v nejtěžších chvílích.

Toxikokinetika rizikových prvků v savčím organismu infikovaném gastrointestinálními helminty

Souhrn

Ač je únik rizikových prvků, a nebezpečných látek obecně, do přírody všemožnými způsoby omezován, není možné vyloučit jejich absenci v ekosystému. Je to způsobeno nešetrným hospodařením a průmyslem v minulosti, ale i v současnosti může dojít k nechtěným únikům nebezpečných látek do přírody. Je proto potřeba blíže prozkoumat vliv těchto látek na všechny složky ekosystému jako jsou vodní zdroje, půda, ovzduší, flora, fauna a samozřejmě i člověk a veškeré interakce mezi těmito složkami.

Pro tuto práci je důležitá zejména toxikokinetika rizikových prvků v paraziticko-hostitelském systému. Pokládáme si zde otázky, zda-li jsou játra hostitele napadeného gastrointestinálními parazity schopna akumulovat stejné množství vybraných rizikových prvků jako játra jedinců neinfikovaných. Dále pak chceme zhodnotit, jestli přítomný parazit je schopný absorbovat do svých tkání větší množství rizikových prvků oproti tkáním svého hostitele. Abychom mohli na tyto otázky úspěšně odpovědět bylo potřeba nejprve získat potřebné tkáně. V nichž byly stanoveny koncentrace sledovaných prvků pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a získané hodnoty byly následně porovnány a vyhodnoceny vhodnou statistickou metodou.

Výsledky bylo dosaženo zjištění, že při porovnání jater parazitovaných a neparazitovaných jedinců nebyly prokázány výrazné rozdíly v koncentracích sledovaných RP. Ve druhé části procesu došlo k porovnání koncentrací RP u jater parazitovaných jedinců a jejich parazitů. Zde byl zjištěn rozdíl pouze u koncentrací olova, přičemž parazité obsahovali větší koncentrace olova oproti játrům hostitele. Tyto výsledky se zcela neslučují s doposud získanými vědeckými poznatky, jelikož při většině pokusů s vybranými RP byla potvrzena větší koncentrace námi sledovaných těžkých kovů v játrech neinfikovaných jedinců oproti jedincům obsahující v tkáních parazity GIT. Zároveň koncentrace těžkých kovů v tkáních parazitů byla vyšší oproti tkáním jejich hostitele. Námi získané výsledky potvrzují i zjištěné biokoncentrační faktory. Tedy poměry koncentrací rizikového prvku v tkáních parazita vůči jeho vnějšímu prostředí, v našem případě v játrech. Toto ukázalo průměr $BCF_{(As)} = 1,69$, $BCF_{(Cd)} = 1,87$ a u $BCF_{(Pb)} = 19,78$ (mg/kg).

Jelikož pro výsledky byl vybrán relativně malý soubor hodnot, mohou být námi získané výsledky zkreslené a bylo by vhodné experiment zopakovat s větším souborem dat.

Klíčová slova: Cestoda, Nematoda, akumulace, transport, absorpce, těžké kovy, As

Risk element toxicokinetics in mammals infected by gastrointestinal helminths

Summary

While the leak of risk elements and dangerous substances in general into the nature is limited in every possible way, there is no chance to eliminate their presence in ecosystem completely. It is caused by inconsiderate agriculture and industry from past and also there can be some unintentional leaks of dangerous substances into the nature. So, there is a need to research influence of these substances on all components of ecosystem like water sources, soil, atmosphere, flora and fauna and also men and all interactions between these components.

For this work is especially important toxicokinetics of risk elements in parasite-host system. We are asking if the livers of host of gastrointestinal helminths are able to accumulate same amount of chosen risk elements as livers of healthy animals. Further of we wanted to evaluate if the parasite body is able to absorb bigger amount of risk elements than his host tissues. Therefore we need to gain needed tissues to be able to answer mentioned questions. In these tissues we are gonna determine concentrations of traced element with the help of inductively coupled plasma mass spectrometry. Gained values will be compare and evaluate with suitable statistical method.

Results showed that there were not any significant differences between concentration of risk elements in livers of healthy animals and livers of animals with parasites. The second part of this work compared concentrations of risk elements in livers of host and parasite tissue. The only difference between concentrations of RE was found in lead, whereas parasite tissue contained bigger amount of lead than its host liver. These results are not completely in similar way as so far gain knowledge as most experiments with chosen risk elements shows that concentrations of heavy metals are most likely higher in tissues of healthy animals than in animals with gastrointestinal parasites. Simultaneously the parasite bodies are able to accumulate bigger amount of heavy metals than its host tissues. Our results are confirmed thanks to the bioconcentration factor. Thus with the ratio between concentration of risk element in parasite body against its external environment, in our case it is the host liver. The result showed on average: $BCF_{(As)} = 1,69$, $BCF_{(Cd)} = 1,87$ a u $BCF_{(Pb)} = 19,78$ (mg/kg).

Since the results were acquired from relatively small data set, our results can be distorted and it would be appropriate to repeat the experiment with bigger data set.

Keywords: Cestoda, Nematoda, accumulation, transport, absorption, heavy metals, As

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Rizikové prvky	3
3.1.1 Arsen.....	4
3.1.1.1 Toxikokinetika arsenu	5
3.1.2 Kadmium	5
3.1.2.1 Toxikokinetika kadmia	6
3.1.3 Olovo	7
3.1.3.1 Toxikokinetika olova.....	7
3.2 Parazitě trávicího traktu savců	8
3.2.1 Tasemnice (Cestoda)	8
3.2.2 Motolice (Trematoda).....	9
3.2.3 Vrtejši (Acanthocephala).....	9
3.2.4 Hlístice (Nematoda).....	9
3.3 Detoxikační mechanismy	10
3.3.1 Detoxikační mechanismy hostitele	10
3.3.1.1 Metaloproteiny jako základní ochrana před intoxikací.....	11
3.3.2 Detoxikační mechanismy parazita	12
3.3.3 Bioakumulační potenciál RP v tělech parazitů vs. hostitele.....	14
3.4 Kompetice o rizikové a esenciální prvky v paraziticko-hostitelském systému	15
4 Metodika	19
4.1 Výběr tkání pro analýzu koncentrace RP	19
4.2 Příprava vzorků	20
4.3 Hmotnostní spektrometrie ICP – MS	21
4.4 Statistické metody	21
5 Výsledky	23
5.1 Přehled vzorků	23
5.2 Přepočítání dat a ověření normálního rozdělení	23
5.3 Porovnání jater infikovaných a neinfikovaných jedinců	27
5.4 Porovnání jater infikovaných jedinců a jejich parazitů.....	29
6 Diskuse	32
7 Závěr	35
8 Citace	36
9 Seznam využitých obrázků, tabulek a grafů	41

9.1	Obrázky	41
9.2	Tabulky.....	41
9.3	Grafy	41
10	Seznam použitých zkratek a symbolů	43
11	Přílohy	44

1 Úvod

I přes veškerá opatření a monitorování nebezpečných látek vznikajících v průmyslu, ale i v dalších odvětvích jako je zemědělství či zdravotnictví není unik rizikových prvků, jako jsou těžké kovy vyloučený. Jsou to látky ovlivňující svým působením veškeré složky ekosystému. Pro tuto práci je však důležité sledování cesty těžkých kovů jako je arsen, kadmium a olovo v savčím organismu a také jak je tato cesta ovlivnitelná přítomností parazitů gastrointestinálního traktu.

Pro parazity obecně je typické, že svého hostitele okrádají o živiny obsahující esenciální látky a minerály. Ne jinak je tomu u parazitů trávicího traktu. Avšak je možné, aby kromě důležitých živin odebírali z těla hostitele i nebezpečné látky, jako jsou těžké kovy? Ano, ale přesto to není možné, aby každý parazit reagoval na všechny prvky stejně a zrovna tak existují rozdíly mezi metabolismem rizikových prvků i mezi jednotlivými druhy parazitů gastrointestinálního traktu.

První, rešeršní část této práce se zaměřuje na přiblížení konkrétních rizikových prvků (As, Cd, Pb), jejich negativních vlivů a způsoby, jakým dochází v těle k jejich metabolizaci. Zároveň jsou zde zmíněny nejvýznamnější skupiny parazitů trávicího traktu – tasemnice (Cestoda), motolice (Trematoda), hlístice (Nematoda), vrtejši (Acanthocephala) a samozřejmě způsob jakým mohou v těle hostitele pozměnit toxikokinetiku výše zmíněných rizikových prvků.

Helmintóza, je jeden z velmi významných faktorů, který ovlivňuje etabolismus savčího hostitele. Tato diplomová práce má za cíl shrnout dosavadní poznatky z vědecké literatury v oblasti zabývající se toxikokinetikou v hostitelsko-parazitickém systému a zároveň ve své praktické části ověřit vědecké hypotézy. První z nich je změřená na podobnost koncentrací rizikových prvků mezi tělními tkáněmi hrabošů polních (*Microtus arvalis*) a to konkrétně rozdílem mezi játry pocházejících ze zdravých jedinců a infikovaných. Druhá hypotéza se pak zabývá otázkou rozdílů koncentrací rizikových prvků mezi játry jedinců napadených parazity a parazity samotnými.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Prvním cílem diplomové práce bude stanovení koncentrací vybraných rizikových prvků v tkáních hostitelů a jejich střevních helmintů a vyhodnocení případného vlivu přítomnosti parazita na transport a akumulaci RP v organismu hostitele.

Vědecká hypotéza 1: Parazit průkazně neovlivňuje toxikokinetiku v organismu hostitele mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci proto není signifikantní rozdíl v detekovaných koncentracích RP.

Druhým cílem bude stanovení koncentrací RP v tkáni nalezených gastrointestinálních helmintů a její porovnání s koncentracemi ve vybraných tkáních jejich hostitelů.

Vědecká hypotéza 2: Parazit akumuluje rizikové stejně intenzivně jako hostitel-proto mezi koncentracemi RP v tkáních parazita a jeho hostitele nejsou signifikantní rozdíly.

3 Literární rešerše

3.1 Rizikové prvky

Rizikovým prvkem míníme takový prvek, jehož vlastnosti dokážou negativně ovlivňovat nejen organismus, ale i prostředí v němž se vyskytuje. Z toxikologického hlediska můžeme rizikový prvek definovat jako chemickou substanci, která je schopná negativně ovlivňovat ekosystém, přičemž svým působením dokáže pozměnit vlastnosti vody, půdy, ovzduší, rostlin, živočichů, člověka nevyjímaje.

Pod pojmem rizikové prvky si můžeme představit látky, které pocházejí nejčastěji z antropogenní činnosti. Obecně sem můžeme zařadit těžké kovy, což jsou prvky vyznačující se specifickou měrnou hmotností vyšší než 5 g.cm^{-3} , tedy prvky těžší jak železo. Pro tuto práci je důležitý zejména arsen (As), kadmium (Cd) a olovo (Pb). Těmito prvky se budeme blíže věnovat v následujících stranách. Nebezpečnost těchto prvků tkví v jejich schopnosti vázat se na stavební látky organismu, jako jsou bílkoviny, enzymy, nukleové kyseliny, v jejichž struktuře nahrazují místo esenciálních minerálů, díky čemuž je můžeme nazývat enzymatickými jedy, přičemž jejich průnik do těla nemusí být přímý, ale mohou být součástí potravního řetězce. Nebezpečný vliv na organismus mají již při nízkých koncentracích, hlavně díky schopnosti se v tělních tkáních kumulovat, jelikož jsou jen těžko odbouratelné.

Pro přímý vstup těžkých kovů do těla může dojít několika způsoby, a to požitím, perkutánně (skrz kůži) a inhalací (přes sliznice dýchacího systému). V první možnosti může rizikový prvek ovlivňovat organismus ihned v lokální úrovni, nebo po delší době při prostupu látek z tráveniny do krevního řečiště. Proto se jako první pomoc při požití RP okamžitě vyvolává zvracení, podává projímadlo, případně vyplachuje žaludek (Bates et al. 2015). Další postup daného prvku tělem je pak dán rozpustností v tucích (Gupta et al. 2012). Látky lipofilní, tedy dobře rozpustné v tucích, snadno prostupují skrz buněčné membrány, které mají též lipofilní charakter. Dalším z faktorů, který ovlivňuje vstřebatelnost rizikového prvku do tkání organismu, je rozpustnost látky jako taková, a tedy rychlost její absorpce z trávicího traktu.

Během inhalace rizikový prvek vstupuje nejprve do nosu či úst, následně hrtanem do průdušnice, průdušek a průdušinek až do plicních alveolů, kde díky vysokému prokrvení velmi snadno dochází k absorpci rizikových prvků do krve. Ke vstřebání RP však může dojít i v dříve jmenovaných částech dýchacího systému, avšak ne s takovou měrou, jako je tomu u plicních alveolů. K lepšímu vstřebávání pak opět dochází u látek s lipofilním charakterem.

Nejsložitější pro vstup rizikového prvku do těla organismu je vstup perkutální, jelikož látka musí zdolat všechny tři vrstvy kůže, tedy pokožku, škaru a podkoží. Nesmíme opomenout ani *stratum corneum*, což je vrstva odumírajících a odlupujících se kožních buněk, které tvoří na pokožce kyselý ochranný film sloužící jako další bariéra proti cizorodým částicím a látkám. Rizikový prvek, který přijde s touto vrstvou do kontaktu, musí mít jednak nízkou polaritu, tak i nízkou lipofilitu, aby byl schopen prostoupit do dalších částí. Absorpce kůží je proto velmi pomalý proces. (Gupta et al. 2012).

Další z možných cest rizikového prvku do organismu je intravenózní podání, tedy vstup xenobiotika přímo do krevního oběhu. Tento způsob je nejrychlejší možná cesta intoxikace, ale pro účely této práce není nijak zásadní, a proto nebude dále rozebírán.

Dalšími podkapitolami budou přiblíženy rizikové prvky sledované ve výzkumné části této práce. Rešerže se bude věnovat jejich negativním vlastnostem na organismus, metodami jejich diagnostiky uvnitř tkání, ale zejména jejich toxikokinetice, tedy pohybu uvnitř infikovaného organismu.

3.1.1 Arsen

Dle výzkumů je nejzásadnějším zdrojem arsenu pitná voda (National research council 2001), která je bohatá zejména na anorganické sloučeniny arsenu. Je to způsobeno tím, že i přes využívání pesticidů a hnojiv s obsahem arsenu v zemědělství, arsen v plodinách jako jsou obilovina či zelenina nemá takovou biologickou dostupnost, jako je tomu u arsenu rozpustného ve vodě. Díky tomu je intoxikace kontaminovanou vodou nebezpečnější a zároveň častější nežli při požití kontaminovaných potravin (Akter et al. 2005). Pro tuto práci jsou důležití zejména hlodavci, jakožto hostitelé gastrointestinálních helmintů. V případě, že u těchto zvířat dojde k intoxikaci anorganickými či methylovanými sloučeninami arsenu, které jsou obsažené v pitné vodě, může docházet ke změnám na pohlavních ústrojích samců i samic. V případě gestace samic může dojít k ovlivnění mozkové aktivity plodu a následným postnatálním behaviorálním změnám (Wang et al. 2006). Zároveň byl potvrzen vznik malformací mláďat hlodavců při podání arsenu v brzké fázi gestace (DeSesso et al. 1998).

Toxicitu arsenu ovlivňuje zejména forma, kterou se dostane do těla organismu. V čisté formě je arsen nerozpustný ve vodě i v kyselinám, díky čemuž v tomto stavu postrádá jakékoliv toxické vlastnosti. Problematické jsou však jeho anorganické i organické sloučeniny, u kterých dochází k přesnému opaku. Jejich původní využití bylo zejména ve farmaceutickém průmyslu jako součásti léčiv, či v zemědělství jako pesticidy. V dnešní době se od použití sloučenin arsenu v těchto odvětvích opouští, jelikož jsou již blíže prozkoumané jejich toxické vlivy nejen na člověka, ale i na prostředí. Díky tomu nedochází k intoxikaci arsenem příliš často.

Existují tři formy intoxikace organismu arsenem. První a zároveň nejrychlejší je forma perakutní. Při této formě intoxikace dochází ke zhroucení krevního oběhu. Jeho větší množství způsobuje rozšíření, tedy dilataci cév, čímž dochází zároveň ke zvýšení jejich permeability. Větší propustnost stěn cévního systému napomáhá k exudaci séra do tkání a zvířata hynou z důvodu kolapsu kardiovaskulárního systému.

Druhou formou intoxikace s pomalejším nástupem příznaků je intoxikace akutní. Ta se projevuje zvracením, gastroenteritidou, kolikovými bolestmi a silnými průjmy, díky čemuž dochází k dehydrataci postiženého organismu. Při současném narušení kardiovaskulárního systému zvíře umírá současným působením všech příznaků (Ratnaike 2003).

Třetí a zároveň poslední formou je intoxikace chronická. Zvíře je opět postiženo silnými vodnatými průjmy a můžeme pozorovat též nechutenství. Organismus je dehydratovaný, zaznamenáváme vysoký úbytek váhy. Můžou se objevit dýchací obtíže. (Landrigan 1998).

Jelikož arsen při svém působení velmi negativně ovlivňuje trávicí trakt, můžeme pro diagnostiku intoxikace tímto rizikovým prvkem použít právě změny na gastrointestinálním traktu, dále pak GIT, jakými jsou nekrózy či záněty. Typickým vodítkem je také profusní průjem.

Při perakutní intoxikace, kdy je postižen kardiovaskulární systém, jako indikátory slouží překrvení a zarudnutí pokožky a zároveň snížený tlak, což je způsobeno dilatací cév a jejich větší permeabilitou.

Jestliže chceme pro zjištění intoxikace arsenu použít laboratorní vyšetření, je vhodné využít moč, jelikož se jedná o primární cestu exkrece arsenu z těla. V moči se pak hodnotí jeho koncentrace (Landrigan 1982). Pro laboratorní analýzu můžeme využít též srst, případně krev zvířete (Ratnaike 2003).

3.1.1.1 Toxikokinetika arsenu

Pro sloučeniny arsenu je nejsnadnější resorpce přes sliznice, ať už v dýchací soustavě nebo přes sliznice gastrointestinálního traktu. Resorpce může probíhat též přes pokožku, která nemusí být nutně poškozena. Účinky toxických sloučenin jsme schopni rozpoznat téměř na všech tělních tkáních. Sloučeniny arsenu totiž velmi snadno rozrušují sliznice GIT i membrány stěn krevních kapilár, díky čemuž se dostávají snadno do celého těla. Není neobvyklé ani ovlivnění pohybového ústrojí, přičemž u postižených můžeme pozorovat obrny či parézy. Stupeň resorpce do tkání organismu ovlivňuje hlavně typ sloučeniny. Zde můžeme vidět několik sloučenin arsenu a procentuálně ukázaný stupeň jejich resorpce: arsenobetain 90 %, arsenocholin 70 – 80 %, kyselina dimethylarsenilová 45 % (Pechová & Vávrová 2019).

Anorganické formy arsenu se v přírodě vyskytují nejčastěji a jejich nejsnadnější cesta do těla je sliznicemi GIT. Po jejich resorpci zde dochází k biotransformaci v játrech a dalších tkáních. U většiny savců, včetně drobných zemních savců či člověka, probíhá biotransformace arsenu díky střídavé redukci a oxidační methyloací. Klasický postup začíná přeměnou anorganických arseničných iontů (As^{+V}) v ionty arsenité (As^{+III}). Ty se dále mění na kyselinu monomethylarsenovou (MMA^{+V}), z ní na monomethylarsenitou (MMA^{+III}) kyselinu. Další přeměnou pak vzniká dimethylarsenová kyselina (DMA^{+V}), která se mění ve finální produkt oxid dimethylarsenitý (DMA^{+III}). Ten se ještě u některých savců, včetně krys a potkanů, může přeměňovat na oxid trimethylarsenitý ($TMA^{+V}O$) (Wang et al. 2006). Všechny tyto redukční reakce jsou usnadněny redukovanou formou glutathionu (GSH) společně s dalšími elektronovými donory. Hlavním donorem methylu je pak methyltransferasa a S-adenosylmethionin (SAM).

Exkrece, tedy vylučování arsenu z těla, probíhá převážně v ledvinách. Moč je tedy primární cesta pro vyloučení látky z těla. Co se týče dalších detoxikačních mechanismů, můžeme zmínit ještě játra, avšak vylučování arsenu z těla za pomoci žluči je pouze minimální. V případě březích hlodavců pak při inhalaci arsenu dochází k jeho kumulaci v mozku plodu a v jeho játrech, díky čemuž játra i placenta březí samice obsahují mnohem méně arsenu oproti plodu (Miyazaki et al. 2005).

3.1.2 Kadmium

Ve volné přírodě nalezneme kadmium zejména v rudách, které jsou dále upotřebovány v různých průmyslových odvětvích jako je zpracování plastů, výroba akumulátorů, spalování fosilních paliv, elektronický průmysl a další. Během procesů zpracování se pak následně do ovzduší dostává ve formě prachu či plynu již jako kontaminant. Kadmium může zatěžovat

vodní systém, a to při úniku odpadních vod. Případné znečištění půdy vzniká hlavně vlivem těžby, kdy se kadmium uvolňuje do půdy.

Některé sloučeniny kadmia mohou velmi dobře fungovat jako enzymatické jedy tím, že v těle organismu fungují jako inhibitory některých enzymů. Zároveň ale můžou fungovat jako antagonisté některých stopových a biogenních prvků jako je měď, železo, zinek a vápník. Díky schopnostem blokovat karbamáthydrolázy jsou schopny sloučeniny kadmia zasahovat do aktivity pohlavních žláz. Následně pak vyvolávají nekrotické změny na varlatech samců, případně umožňují přímo vznik tumorů. U březích samic pak můžeme často pozorovat nekrotické změny na placentě plodu. Kadmium v těle vyvolává zvýšenou sekreci vápenatých iontů (Ca^{2+}). Jestliže intoxikace jedince je chronická, zvýšení sekrece vápenatých iontů v těle zvířete vede k osteomalacii a proteinuriemi (Nomiyama 1975).

Stejně jako arsen i kadmium způsobuje několik forem intoxikace. Avšak u kadmia rozeznáváme pouze intoxikace akutní a chronickou. Při akutní formě dochází nejčastěji k poškození krevetvorby, což vede ke změně krevního obrazu. Dále pak dojde k poškození ledvin a jater. Jestliže se kontaminant dostal do těla inhalací, je možný vznik pneumonie.

Druhá forma, tedy chronická se v prvotních příznacích projevuje jako osteomalacie, později však opět dochází ke změnám funkce ledvin a jater. Není vyloučen ani vznik nekrotických změn na pohlavním ustrojí, které vedou až ke ztrátě fertility (Nomiyama 1975).

K diagnostice otravy rizikovým prvkem jako je kadmium se využívá histologické vyšetření centrální nervové soustavy, které zjišťuje obsah degenerovaných nervových buněk. Dalším ze způsobů diagnostiky je pak rozbor moči (Landrigan 1982).

3.1.2.1 Toxikokinetika kadmia

Do organismu kadmium vstupuje zejména při pozření kontaminantu, nebo při jeho inhalaci. Co se týče vstřebávání kadmia přes sliznice gastrointestinálního traktu, jde pouze o velmi malé koncentrace, uvádí se kolem 5–8 % (Vávrová 2019). Nejintenzivnější a zároveň nejrychlejší cestou pro vstřebávání kadmia jsou sliznice dýchacího systému. Zde snadno z plicních alveolů, které jsou dobře prokrveny, proniká do krevního řečiště a zůstává v krvi. Pouze krátkou dobu je kadmium v krvi ve vazbě s albuminy, globuliny nebo metallothioneinem, jelikož distribuce k cílovým tkáním je velmi rychlá. Kadmium má velký potenciál se v těle kumulovat, a to zejména v ledvinách a játrech (Sanders et al. 2008) a to až z 50 % (Vávrová 2019) z celkového obsahu v těle.

Toxikokinetika kadmia je silně ovlivněna přítomností metallothioneinu v intoxikovaném organismus. Metallothionein (MT) patří mezi nízkomolekulární proteiny a je schopný velmi dobře vázat ke své struktuře další proteiny, které ve své struktuře obsahují zinek či kadmium, přičemž přítomnost kadmia v těle indukuje syntézu MT. Spojení tohoto proteinu a kadmia při dlouhodobé expozici působení vlivu tohoto rizikového prvku způsobuje jeho pozdější redistribuci z jater do ledvin (Nordberg 2009).

Výzkum sledující toxikokinetiku u laboratorních myši ukázal, že při jednorázové aplikaci chloridu kademnatého (CdCl_2) dojde během 48 hodin k vazbě kadmia k albuminům v krevní plazmě (Nordberg 2009). Tou je pak následně transportován do jater, kde se kadmium odpoutává od albuminu a místo něj se pojí vazbou s metallothioneinem. Menší koncentrace MT vázaného s kadmiiem jsou postupně uvolňovány z jater do ledvin, kde se po glomerulární filtraci

kadmium reabsorbuje z primární moči do proximálního tubulu ledvin. Komplex kadmia spolu s metalothioneinem způsobuje v případě chronické intoxikace kadmiiem narušení renálních tubulů. Vliv kadmia na proximální způsobuje poškození buněk a neschopnost samoobnovy dle výzkumu Prozialeck & Walter 2012. Zároveň bylo zjištěno, kde je poškození ledvin v případě intoxikace kadmia je kritické pro projevení dalších negativních vlivů kadmia na organismus (Nordberg 2009).

3.1.3 Olovo

Olovo, stejně jako jeho sloučeniny, je častou příčinou chronických i akutních intoxikací zvířat a zároveň i člověka. Setkat se s ním můžeme jako s kontaminantem životního prostředí, zároveň může být zabudováno přímo do potravního řetězce (Gupta et al. 2012). Nejvýznamnější sloučeninou olova z hlediska ovlivnění ekosystému je tetraetyl olovnatý ($C_8H_{20}Pb$) (Haschek et al. 2013), který se po dlouhou dobu využíval jako součást tzv. aditivových benzínů. Spaliny vytvořené motory poháněnými těmito pohonnými hmotami se staly nejzákladnějším kontaminantem životního prostředí. Ostatní sloučeniny pak pocházejí zejména z průmyslových exhalátů a svým působením následně způsobují kontaminaci půdy, flóry či vodních ploch.

Přítomnost kontaminantu jako je olovo samotné, či jeho anorganické sloučeniny způsobuje v organismu narušení intermediálního metabolismu sacharidů v nervové tkáni a inhibici enzymatických systémů. Olovo vázané v organických sloučeninách pak v organismu způsobuje především poškození centrální nervové soustavy, např. dochází ke vzniku krvácenin do bílé hmoty mozkové, dále jsou zjišťovány změny mozkových cév případně degenerativní změny gangliových buněk (Needleman 2003). Na rozdíl od anorganických sloučenin organické formy sloučenin olova ovlivňují krvetvorbu pouze minimálně.

Pro zjištění intoxikace olovem a jeho sloučeninami se využívá laboratorní diagnostika využívající sledování vzrůstající hladiny kyseliny δ -aminolevulové v krvi a v moči (Morgan et al. 1972). Dalšími způsoby diagnostiky pak může být zvýšený obsah protoporfyrinu v erythrocytech, což zapříčiňuje inhibice syntézy hemu. V případě, že se jedná již o patologicky-anatomický nález, bývá běžný charakteristický zápach kadaveru, a zelenočervené zbarvení kosterní svaloviny. Dále pak můžeme vidět, že i sliznice gastrointestinálního traktu vykazují změny způsobené lokálním drážděním. Často se vyskytuje distrofie ledvin a nález krvácenin v orgánech a plenách mozku (Needleman 2003). Kromě vnitřních orgánů může být diagnostika intoxikace olova provedena i ze vzorků srsti, drápů, kopyt a rohů, kam se olovo deponuje právě z vnitřních orgánů.

3.1.3.1 Toxikokinetika olova

Olovo do organismu vstupuje skrz trávicí trakt, kde se vstřebává 5–10 % (Gupta et al. 2012) v celkového obsahu požitého těžké kovu. Proces může být uspišen díky přítomnosti vápníku, železa a tuků v trávenině. V případě inhalace olova jsou plicní tkáně schopny absorbovat až 40 % kontaminantu. Další možnost intoxikace je placentou z matčina těla do plodu. Pro organické sloučeniny olova je významným způsobem intoxikace absorbce přes kůži. Následný transport olova po těle je umožněn krví. Červené krvinky pomocí krevních albuminů a α -globulinů váží až 90 % olova obsaženého v krevní plazmě (Haschek et al. 2013).

Jakmile se olovo dostane do jater je jeho větší přijatá část deponována do jaterních buněk, hepatocytů. Zbytek olova je po těle opět transportován krví a postupně je dopraveno do orgánů jako jsou ledviny. Další možnosti pro deponování olova jsou pak kosti, kosterní svalovina či srst (Gupta et al. 2012, Haschek et al. 2013).

Eliminace olova probíhá díky exkreci ledvinami do moči a žluči do feaces. Zároveň může docházet i k exkreci olova skrz mléčnou žlázu v případě, že intoxikovaným jedincem je laktující samice. Na rychlost eliminace olova z těla má podíl jeho forma, tedy zda-li se jedná o organickou či anorganickou sloučeninu. Nejrychleji dochází k odbourávání organických sloučenin olova. V případě sloučenin anorganických je pak eliminace a exkrece zpravidla pomalejší (Wani et al. 2018).

3.2 Parazité trávicího traktu savců

Pro správné chápání toxikokinetiky rizikových prvků v paraziticko-hostitelském systému je potřeba si blíže představit nejběžnější parazity trávicího traktu, které můžeme najít v organismu savců. Seznámit se s jejich způsobem získávání potravy z těla hostitele, jelikož rozdílné způsoby získání živin u jednotlivých kmenů a tříd spolu s místem, kde parazitují hraje roli v celkovém toku živin přijímaných hostitelem, ale i v další distribuci, kumulaci či exkreci rizikových prvků jak uvnitř těla hostitele, tak helminta.

Obecně můžeme říci, že parazité trávicího traktu drobných zemních savců, převážně hlodavců, kteří jsou významní pro experimentální část práce, jsou velmi rozsáhlá skupina. Řadí se sem prvoci (Protozoa), tasemnice (Cestoda), vrtejší (Acanthocephala) a hlístice (Nematoda). Pro některé druhy slouží hlodavci jako mezihostitelé, pro jiné zas jako hostitelé definitivní. Pro tuto práci jsou důležité zejména dva druhy spadající do třídy tasemnice a budou dále využívány ve výzkumné části. Následující podkapitoly se budou zaměřovat na parazity GIT savců obecně.

3.2.1 Tasemnice (Cestoda)

Tasemnice, latinsky Cestoda, patří do kmene plostěnců (Plathelminthes). Typickými znaky této skupiny je protáhlé tělo, které je často segmentované. Tasemnice jsou endoparazité GIT obratlovců – dospělce nalezneme ve střevech. V přední části těla mají přichytný orgán, který slouží k úspěšnému uchycení v těle hostitele. Trávicí soustava chybí, živiny jsou proto přijímány pomocí tegumentu, což je kožně svalový vak schopný absorbovat živiny a částečně je přeměňovat (Rohde 2018).

Tasemnice dělíme na dvě podtřídy: tasemnice primitivní a tasemnice pravé. Pro první jmenované je typické, že nemají článkované tělo a larva, onkosféra, je opatřena deseti embryonálními háčky. Těla pravých tasemnic jsou naopak tvořena řadou článků-progloditů (Bogitsh et al. 2012), ve kterých uzrávají vajíčka. Z vajíček se po opuštění těla hostitele tvoří larvy, které mají na rozdíl od nepravých tasemnic pouze šest embryonálních háčků.

Vývojový cyklus tasemnic je velmi složitý. Začíná odškrcením progloditu s vajíčky a jeho opuštěním těla spolu s feaces. Nejčastěji je zde jen jeden mezihostitel a tím je bezobratlý živočich. Výjimku tvoří čeleď Taeniidae. Mezihostitelem u této čeledi jsou obratlovci. Dále pak některých tasemnic z řádu Diphylobothrium mají ve svém vývojovém cyklu až dva mezihostitele.

Čeď Taeniidae je pro tuto práci nejzajímavější, jelikož jako definitivní hostitele využívá především terestrické savce, včetně domestikovaných hospodářských zvířat (Rohde 2018). Čeď zahrnuje druhy jako jsou tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*), tasemnice bezbranná (*Taenia saginata*), tasemnice hrášková (*Taenia pisiformis*), tasemnice vrtohlavá (*Taenia multiceps*) apod.

3.2.2 Motolice (Trematoda)

Motolice společně s tasemnicemi spadají do kmene ploštěnců. Jsou to endoparazité s lístkovitým tvarem těla. Pro uchycení v těle hostitele využívají ústní a břišní přísavky. Jejich trávicí soustava stejně jako u tasemnic končí slepě, a proto pro příjem potravy využívají metabolicky aktivní tegument. Zástupci jsou převážně hermafrodité, výjimkou je čeď Schistosomatidae, kde se vyskytují obě pohlaví.

Vývojový cyklus motolic je dlouhý a obsahuje velké množství mezihostitelů. Z pravidla prvním mezihostitelem je však zásadně měkkýš (Littlewood & Bray 2000).

Pro člověka a hospodářská zvířata jsou významné motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*), motolice obrovská (*Fascioloides magna*). Tyto motolice parazitují zejména na játrech hostitele. Dále je pak zajímavá krevnička močová (*Schistosoma haematobium*), jež parazituje převážně v močových cestách hostitele (Rohde 2018).

3.2.3 Vrtejši (Acanthocephala)

Vrtejši tvoří na rozdíl od tasemnic a motolic samostatný kmen parazitů, zejména ryb. Pro udržení v těle hostitele mají ve vrchní části těla chobotek se zpětnými háčky (Moore 2018). Jednotliví zástupci z kmene vrtejšů jsou gonochoristé. Samci při kopulaci využívají orgán nazývaný *bursa copulatrix* k lepšímu uchycení samice. Kromě trávicí soustavy chybí též soustavy cévní a dýchací. Povrch těla je pokrytý tegumentem schopným přijímat a určitým způsobem i trávit živiny. Tělo vrtejšů je převážně válcovitého tvaru a má bílou až béžovou barvu. Jedinci dosahují délky od jednoho centimetru až po 80 cm (Divers et al. 2019). Vrtejši jsou biohelminté a jejich vývojový cyklus je díky tomu vázán jen na jednoho hostitele (Moore 2018). V těle oratlovců parazitují uvnitř gastrointestinálního traktu.

Ve vývojovém cyklu vrtejšů se obvykle vyskytuje takzvaný paratenický hostitel. V paratenickém hostiteli se mohou infekční stádia parazita kumulovat a delší dobu přežívat, aniž by ztratili svou infekčnost pro definitivního hostitele.

Z významných druhů pro člověka a hospodářská zvířata můžeme uvést vrtejše velikého (*Macracanthorhynchus hirudinaceus*). Ten parazituje v trávicím traktu prasat a příležitostně dalších savců včetně člověka.

3.2.4 Hlístice (Nematoda)

Hlístice jsou samostatný kmen bezobratlých živočichů. Jedinci jsou bílé či krémové barvy a mají oblá protáhlá těla. Na rozdíl od předchozích skupin parazitů nemají slepou trávicí soustavu, ale jejich tělo začíná ústním a končí řitním otvorem. Trávicí soustava je tudíž plně průchozí. Jedná se o nejpočetnější skupinu živočichů s velmi složitou taxonomií (Frazer 2020).

Některé druhy patřící do kmene hlístic žijí neparazitickým způsobem volně v půdě (Saari et al. 2019). Hlístice jsou převážně gonochoristé. Není zde však výjimečná ani partenogeneze či hermafroditismus. Samci mají podobně jako vrtejší pářící plchetku (*bursa copulatrix*).

Významnými parazity člověk a hospodářských zvířat je rod svalovec (*Trichinella*). Jeho zástupci nikdy neopouští tělo hostitele a jejich vývojový cyklus probíhá kompletně v těle jednoho hostitele. Dalším zajímavým rodem je pak rod tenkohlavec (*Trichuris*), jehož zástupce nacházíme ve sliznicích tlustého střeva malých přežvýkavců i člověka. Oba rody patří do řádu Enoplida.

Velmi početným řádem jsou měchovci (Strogylida), kteří se dále dělí do třech podřádů – zubovky (Strongyloidea), vlasovky (Trichostrongyloidea) a plicnivky (Metastrongyloidea). Jednotliví zástupci pak parazitují zejména v trávicí soustavě či dýchací soustavě hostitele (Guerrant et al. 2011).

Velmi nebezpeční jsou zástupci z řádu škrkavek (Ascaridida). Tito geohelmintové velkých rozměrů jsou schopni somatické migrace v případě, že jsou larvy pozřeny nespecifickým hostitelem (Vagholkar et al. 2016). Zároveň může dojít k nakažení ještě nenarozených mláďat migrací larev srst placentu matky. Případně po porodu mohou škrkavky migrovat do mléčné žlázy a již narozená mláďata se tak nakazí při sání mateřského mléka. Tomuto procesu se říká galaktogenní infekce (Saari et al. 2019). Významné druhy jsou škrkavka psi (*Toxocara canis*), škrkavka šelmí (*Toxocara leonina*), škrkavka kočičí (*Toxocara cati*), škrkavka koňská (*Parascaris equorum*) a škrkavka tuří (*Neoascaris vitulorum*).

K dalším řádům kmene Nematoda patří ještě háďata (Rhabditida), roupy (Oxyurida) a spirury (Spirurida).

3.3 Detoxikační mechanismy

Stejně jako samotné rizikové prvky, či druh parazita, toxikokinetiku rizikových prvků v paraziticko-hostitelském systému ovlivňují zároveň detoxikační mechanismy, které na svou ochranu využívá jak organismus hostitele, tak parazita. Následující podkapitoly jsou tedy věnovány shrnutí těchto pochodů, které nastávají v případě, že je organismus vystaven působení rizikového prvku.

3.3.1 Detoxikační mechanismy hostitele

Toxikokinetika je pojem, který se používá k popisu cesty xenobiotika, tedy cizorodé látky, uvnitř organismu. Tato cesta začíná aplikací xenobiotika načež navazuje další fáze - resorpce, kdy se xenobiotikum dostává z místa aplikace do krevního řečiště, případně do lymfatických cév a následně putuje k cílovým orgánům. Této fázi se říká distribuce. Její rychlost je dána koncentrací cizorodé látky, v našem případě rizikového prvku, její rozpustností i fyzikálně-chemickými vlastnostmi. O celém procesu nerozhoduje však jen samotná cizorodá látka, ale i tělní mechanismy organismu, jako jsou specifické tkáňové bariéry, či prokrvení cílového orgánu (Krměčik 2007).

Ve chvíli, kdy xenobiotikum dosáhne cílového orgánu dochází k jeho biotransformaci a stává se metabolitem. Ten může být metabolicky aktivní či nikoliv. Zároveň není vyloučena

toxicita pro tělo. Faktory ovlivňující tuto fázi jsou věk, pohlaví a celkový zdravotní stav zvířete, způsob výživy, v případě hospodářských zvířat i zoohygiena stájí.

Eliminace je poslední fází detoxikace organismu od cizorodých látek a jejich metabolitů. Nejběžnější cestou pro eliminaci rizikových prvků je močí případně stolicí (Krmencič 2007). Detoxikačně nejaktivnější orgány jsou zejména ledviny a játra, díky čemuž jsou těž náchylnější pro kumulaci rizikových prvků.

3.3.1.1 Metaloproteiny jako základní ochrana před intoxikací

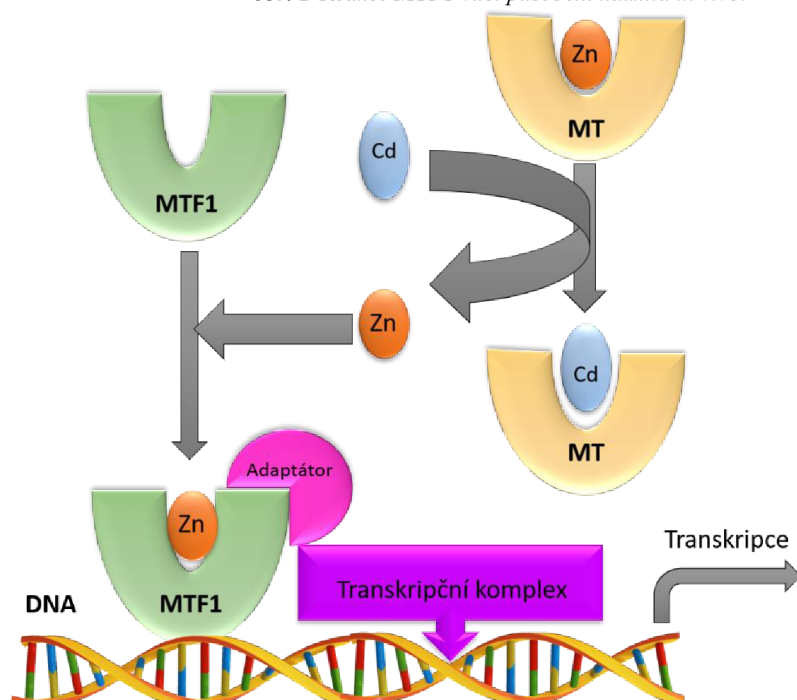
Metalothionein, stejně jako několik dalších podobných proteinů, na které se zaměří tato kapitola, můžeme klasifikovat jako metaloprotein. Tedy bílkovinu, jejímž kofaktorem je kov, a to jak volný, tak i jako součást prostetické skupiny nacházející se v organismu. Metaloproteiny obecně slouží jako základní ochrana hostitele při intoxikaci rizikovými prvky jako jsou právě arsen, kadmium či olovo. Kromě metalothioneinu mezi metaloproteiny dále patří hemoproteiny, mezi které se řadí hemoglobin, myoglobin a další. Obecně tyto bílkoviny v těle katalyzují nejdůležitější a nejsložitější reakce jako je udržování homeostáze, dýchání a v případě rostlin též fotosyntéza (Lu et al. 2009).

Pro vazbu se správným prvkem musí být součástí metaloproteinů senzory, které rozlišují jednotlivé anorganické sloučeniny. Vazby pak mohou mít různou sílu, nejsilnější jsou zejména u prvků jako je měď a zinek, slabší vazby pak metaloproteiny tvoří s niklem a kobaltem, manganem a železem ve formě Fe^{2+} (Rutherford et al. 2009). Kromě toho je vazba ovlivněna též dostupností rizikových prvků v organismu. Proto, aby se do somatických buněk dostaly správné a potřebné kovy mají velkou roli kinetické faktory (např. metalochaperony), které distribuci kovů ovládají (Rutherford et al. 2009). Pro navázání správného prvku je pro metaloprotein důležitý kontext buněčného prostředí a množství kovů a proteinů mimo buňku.

Proteiny sloužící k transportu či ukládání kovů mají pouze omezený počet receptorů pro jednotlivé kovy, které jsou schopny vázat. Jako příklad vhodného kovu pro vazbu můžeme uvést měď. Tu se proteiny k sobě pokusí vázat dříve než ostatní přítomné molekuly, čímž je téměř eliminován konkurenční boj ostatních kovů pro vazbu na protein. Metaloproteiny zároveň obsahují senzory pro minimalizaci návaznosti těžkých a vzácných kovů, což je klíčové pro selektivitu kovů a schopnost rozlišovat kovy pro organismus chtěné a potřebné a zároveň nasazení metaloproteinu, které budou pro daný kov nejvhodnější (Rutherford et al. 2009).

Metaloproteiny zahrnují bílkoviny ze všech klasifikačních tříd enzymů. Patří sem tedy transferázy, liázy, hydrolázy, oxydoreduktázy, ligázy i isomerázy. Jedním z nejdůležitějších živočišných metaloproteinů je MTF1, celým názvem „Metal regulatory transcription factor 1“. Tento transkripční faktor indukuje expresi metalothioneinů a dalších faktorů zapojených do homeostázy kovů v případě, že je tělo vystaveno působení těžkých kovů či jiných rizikových prvků jako je kadmium, zinek, měď nebo stříbro (Rutherford et al. 2009). Schéma působení MTF1 v těle při přítomnosti kadmia můžeme vidět na obr. 1. Kadmium s vyšší afinitou se zde váže k metalothioneinu (MT) a tím vyvazuje zinek, jež se následně váže k faktoru MTF1, čímž ovlivňuje transkripci DNA, kam je zinek transportován.

obr. 1 Reakce MTF1 vůči působení kadmia in vivo.



Již dříve zmíněný metalothionein patří mezi nízkomolekulární bílkoviny a je schopen ke své struktuře vázat rizikové prvky jako je zinek, kadmium, rtuť a měď. Jeho struktura je ochuzena o disulfidické můstky a jedná se o tepelně stabilní látku (Nordberg 2009). Syntézu v těle spouští zejména přítomnost kadmia a nalezneme ho zejména v cytoplasmě somatických buněk. V organismu obratlovců ho můžeme pozorovat hned ve 4 formách – MT1, MT2, MT3 a MT4. První dvě zmíněné formy se nachází ve všech savčích organismech včetně člověka a váží se zejména na kadmium. Jednotlivé formy pak můžeme nalézt v různých částech těla. Například zatím co forma MT3 je syntetizována v mozku a ledvinách, forma MT4 je tvořena převážně keratynocyty (Nordberg 2009).

Dalšími důležitými metaloproteiny jsou IRP1 a IRP2, celým názvem „Iron-responsive proteins“, jež slouží pro kontrolu translace a zároveň stabilitu mRNA, na níž se nachází oblast kódující receptory pro transferin, který funguje jako transportní bílkovina přenášející železo do potřebných tkání. Mimo jiné se zde nachází i oblast kódující syntézu feritinu, čímž dochází k zajištění normální krvevorbě.

Z dalších důležitých metaloproteinů v savčím organismu můžeme zmínit CCS (Copper chaperone) a CTR1 (High affinity copper uptake protein 1), které slouží pro regulaci hladiny mědi v těle. Dále pak máme enzym označovaný zkratkou ZIP4 (Zinc transporter 4) nebo také zkratkou SLC39A4, který v těle slouží pro transport zinku (Rutherford et al 2009).

3.3.2 Detoxikační mechanismy parazita

V případě, že cizorodá látka vstupuje do těla jakéhokoliv živočicha, může dojít k jejímu vyloučení bez jakékoliv změny, případně dojde pouze ke změně neenzymatického charakteru, ve chvíli, kdy je v těle vystavena specifickým podmínkám, jako je nízké či vysoké pH.

V poslední řadě může u xenobiotika dojít k metabolizaci za pomoci enzymů, což může vést ke vzniku více či méně toxických derivátů. U zvířat dochází k metabolizaci rizikových prvků ve třech fázích. V první dochází ke střetu xenobiotika s redukčními, hydrolytickými a oxidačními enzymy. Následně dochází ke vzniku vazby mezi xenobiotikem a molekulou o nízké molekulární hmotnosti, jako jsou sacharidy, anorganické ionty (fosfáty, sírany), aminokyseliny, či organické ionty (acetáty, propionáty). Během poslední fáze dochází k metabolizaci a exkreci molekuly vzniklé v předchozí fázi (Barret 1997, Klaassen 2008).

Pro obratlovce a hmyz je nejběžnější během první fáze oxidace, která jako katalyzátor využívá cytochrom P450, který se podílí na oxidaci širokého spektra sloučenin exogenního i endogenního původu. Tato látka je v případě gastrointestinálních helmintů jedním z důvodů jejich zvýšené odolnosti proti působení xenobiotik. Nejedná se však o tak významnou odolnost jako je tomu u hmyzu (Barret 1997). Vysoká koncentrace cytochromu P450 byla zjištěna u jednoho z druhů kmene hlístic, a to konkrétně u háďátek obecných (*Caenorhabditis elegans*), jedná se však o neparazitující druh hlístic. V případě dospělých parazitických hlístic byla přítomnost cytochromu P450 zjištěna u následujících druhů: *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus*, *Heligmosomoides polygyrus* a *Onchocerca gutturosa*. Pokus o detekci cytochromu P450 byl proveden i na tasemnicích druhů *Monezia expansa* a *Hymenolepis diminuta*, ale stejně jako u motolic druhu *Fasciola hepatica* nebyla přítomnost cytochromu P450 dokázána (Barret 1998).

U gastrointestinálních helmintů, kteří se vyznačují absencí výše zmíněného enzymu mohou jeho funkci nahradit peroxidázy, případně další oxidační enzymy jako například flavinové monoxydázy. Rychlost reakce, které probíhají za využití těchto enzymů nejsou však tak rychlé, jako ty katalyzované za pomoci cytochromu P450. Důvodem nízkého využití cytochromu P450 u většiny parazitů trávicího traktu může být zejména jejich způsobem života. V mikroaerobním, nebo rovnou anaerobním prostředí, kde se tyto parazité vyskytují, se během první fáze metabolizace energeticky vyplatí využívat spíše redukční a hydrolytické reakce. Proto se v tělech těchto živočichů nachází celkové množství hydroláz, azo – a nitroreduktáz a enzymů schopných redukovat aldehydy a ketony (Barret 1997, Barret 1998, Solana et al. 2001).

Druhá fáze metabolizace cizorodých látek má u parazita následující průběh. Vazbu xenobiotika zprostředkovává glutathiontransferáza (GTS), která je aktivní zejména u skupin Cestoda a Digenea. U hlístic není aktivita GTS tak vysoká jako u dříve jmenovaných skupin. Hladina GTS se zároveň liší dle místa lokalizace parazita. Zatímco parazité GIT mají hladinu glutathiontransferázy vyšší, parazité napadající pokožku či krev, tak vysoké hladiny glutathiontransferázy v těle nedosahují. Roli na tom může hrát zřejmě tegument, který tasemnicím a motolicím z podtřídy Digenea umožňuje příjem živin z těla hostitele a činí je tím náchylnějším k druhotným metabolitům hostitele, které můžou tyto parazité přijímat právě spolu s živinami. Je nutné též dodat, že množství enzymu v těle tasemnice je shodné s obsahem glutathiontransferázy v játrech jejího savčího hostitele (Barret 1997). Roku 1996 dokázala svým pokusem přítomnost glutathiontransferázy v těle měchožila bublinatého (*Echinococcus multilocularis*) Liebauová et al., která zároveň potvrdila podobnost činnosti daného enzymu v těle parazitů a savců. Jako další se glutathiontransferázou v parazitickém organismu zabývala Salvatoreová et al., která roku 1995 dokázala dokonce přítomnost čtyř různých isoform GTS v tělech motolic jaterních (*Fasciola hepatica*), díky kterým jsou motolice schopny detoxikovat

své tělo od více typů xenobiotik, které přijímají díky tegumentu spolu s živinami z tráveniny z těla hostitele.

Jak již bylo zmíněno výše, glutathiontransferáza, se vyskytuje i v tělech hlístic, i když ne v takových hodnotách. Zde její přítomnost dokázala opět Liebauová et al. (1997) v zažívacím traktu škrkavek prasečích (*Ascris suum*). Kromě motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) jsou různé isoformy GTS schopni produkovat též svalovci druhů *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella nativa* a *Trichinella pseudospiralis*. U těchto druhů je GTS důležitá zejména jako pomoc proti volným radikálům a oxidačnímu stresu uvnitř tkání hostitele (Chiumiento et al. 2009).

Krom cytochromu P450 a GTS byly při pokusech s jedinci kmene hlístic nalezeny také metalothioneiny schopné vázat zejména olovo, kadmium a zinek. Velká afinita těchto prvků k MT je způsoben právě jeho strukturou, která obsahuje velký podíl aminokyseliny cysteinu (Nordberg 2009). MT se v tělech parazitů účastní velkého množství pochodů, a to zejména transportu, skladování, detoxikace a metabolizace esenciálních kovů. V těle zároveň vychytávají volné radikály. Díky komplexům MT-kov je organismus chráněn před akutními otravami těžkými kovy (Raudenská et al. 2012).

3.3.3 Bioakumulační potenciál RP v tělech parazitů vs. hostitele

Těla parazitů jsou schopna ve svých tkáních kumulovat rizikové prvky. Tuto schopnost můžeme pojmenovat jako bioakumulace. Tato schopnost může být mimo jiné využívána i pro hodnocení kvality životního prostředí, jelikož těla parazitů dokážou často kumulovat větší množství výše zmíněných prvků nežli tkáň hostitele (Yen Nhi et al. 2013).

Protože nejen toxikokinetika, ale též bioakumulace ovlivňují významným způsobem bioindikaci kvality životního prostředí, bylo v tomto směru vykonáno již mnoho pokusů. Ty využívali zejména drobné hlodavce, ryby, malé přežvýkavce, či plazy (Teimoorryy et al. 2014). Schopnosti bioakumulace RP u parazitů byly zkoumány i v laboratorním prostředí. Takové pokusy pak pro optimální výsledky využívají dvě skupiny jedinců stejného druhu, pohlaví, tělesných rozměrů a věku, přičemž pouze jedna skupina je inokulována helminty parazitujícími v GIT. Zda-li byla inokulace úspěšná ukáže pozdější koprologické vyšetření. Po úspěšném vpravení parazita do těla hostitele následuje expozice rizikovým prvkem. Další vyšetření probíhají již po usmrcení zvířat, kdy jsou během pitvy vyjmuty potřebné tkáňe a orgány, včetně parazitů jsou-li, které jsou následně podrobeny analýze zkoumající obsah prvků v tkáních hostitele a parazita.

Výše jmenovaný postup je vhodný pro hodnocení toxikokinetiky v paraziticko-hostitelském systému uvnitř laboratorního prostředí. Jedním takovým experimentem byl i pokus Čadkové et al. (2014), který zkoumal změny absorpce olova v těle laboratorních potkanů (*Rattus norvegicus*) v případě, že jsou jedinci nakaženi tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*). Těmto potkanům bylo podáváno olovo ve formě trihydrátu octanu olovnatého ($C_4H_{12}O_7Pb$). Tasemnice krysí, stejně jako ostatní druhy ze zástupců třídy Cestoda, mají tělo kryté tegumentem (Sures et al. 2002). Experiment proto vycházel z předpokladu, že budou schopny absorbovat více olova než tkáň jejich hostitele. Tento experiment Čadkové et al. (2014) prokázal změny v absorpci olova parazitem. Tasemnice krysí tedy má vyšší bioakumulační potenciál oproti svému hostiteli.

Zvířata vyskytující se v oblastech kontaminovaných rizikovými prvky jako je olovo, měď, kadmium, zinek a mangan kumulují ve svých játrech a ledvinách více těchto prvků v případě, že nejsou napadeny tasemnicemi, nebo v jejich GIT nalezneme pouze parazity z kmene hlístic (Jankovská et al. 2009), které nemají takový bioakumulační potenciál jako tasemnice.

Avšak v případě parazitů nemusí docházet pouze ke kumulaci RP v jejich tkáních. V případě volně žijících lišek obecných (*Vulpes vulpes*) došlo přímo k absenci parazitů gastrointestinálního traktu ve chvíli, kdy byla v těle naměřená koncentrace kadmia vyšší než 0,05 ml Cd/1 kg tělesné hmotnosti jedince (Borkovcová et al. 2019). Kadmium tedy patří mezi rizikové prvky, u nichž se parazit vykazuje vyšší citlivostí nežli hostitel samotný.

Ne všichni parazité trávicího traktu mají vyšší bioakumulační potenciál než jejich savší hostitelé. Tores et al. (2004) zkoumal bioakumulaci olova a kadmia u myšic křoviných (*Apodemus sylvaticus*) infikovaných tasemnicemi druhu *Gallegoides arfaai*. Tento experiment zjistil, že v případě obou prvků došlo k větší kumulaci v ledvinách hostitele oproti tkáním parazita. Zároveň byla zjištěna vyšší koncentrace olova v játrech a svalovině hostitele oproti tkáním parazita (Tores et al. 2004).

3.4 Kompetice o rizikové a esenciální prvky v paraziticko-hostitelském systému

V hostitelsko-parazitickém systému dochází zcela přirozeně ke kompetici o makro- (Ca, Na, P, K, Mg, Cl, S, ...) a mikro prvky (Mn, Fe, Co, Cu, I, F, Zn, Se, ...). K této kompetici dochází pro důležitost jednotlivých prvků pro zdraví a existenci obou organismů, tedy jak parazita, tak hostitele. Gastrointestinální helminté do přirozeného koloběhu esenciálních prvků zasahují a pozměňují ho ku svému prospěchu. Dojde-li však k expozici hostitele rizikovými prvky, koloběh živin je narušen nejen pro hostitele, ale i pro parazita, který se novým podmínkám musí přizpůsobit.

Kupříkladu působením olova na paraziticko-hostitelský systém se zabývala Jankovská et al. (2010). Její experiment byl zaměřen na ovce domácí (*Ovis aries*) a jejich parazita – tasemnici ovčí (*Moniezia expansa*). Pro experiment byly využity tři skupiny zvířat. První skupině bylo podáváno olovo a zároveň byl inokulována tasemnicemi. Dále pak druhá skupina byla intoxikovaná olovem, ale jedinci nebyli nakaženi tasemnicemi. Poslední, třetí a zároveň kontrolní skupina byla inokulována tasemnicemi, ale bez podávání olova. Po porážce zvířat a následné pitvě byly vybrané tkáně podrobeny optické spektrometrii, která měla za úkol určit koncentrace olova v tkáních. Konkrétní výsledky můžeme vidět na tabulce č. 1. Obecně můžeme říct, že ovce, u kterých došlo k inokulaci tasemnicí ovčí (*Moniezia expansa*), měly ve svých tkáních menší koncentraci olova vůči tělu parazita.

tab. 1 Koncentrace olova v krvi ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a v tkáních (svaly, játra, ledviny) u jedinců *Ovis aries* a *Moniezia expansa* (mg / kg sušiny; průměr \pm SD) po 1 týdnu expozice Pb (Jankovská et al. 2010)

	Ovce domácí (<i>Ovis aries</i>)				Tasemnice ovčí (<i>Moniezia expansa</i>)
	Krev	Svalovina	Játra	Ledviny	
1. skupina	1,310 \pm 0,640	0,186 \pm 0,007	16,300\pm0,700	19,900\pm2,500	85,200\pm39,300
2. skupina	2,900 \pm 0,145	0,179 \pm 0,010	22,300	39,100 \pm 1,600	-
3. skupin	0,080	0,169 \pm 0,010	0,518 \pm 0,066	0,652 \pm 0,145	0,145 \pm 0,039

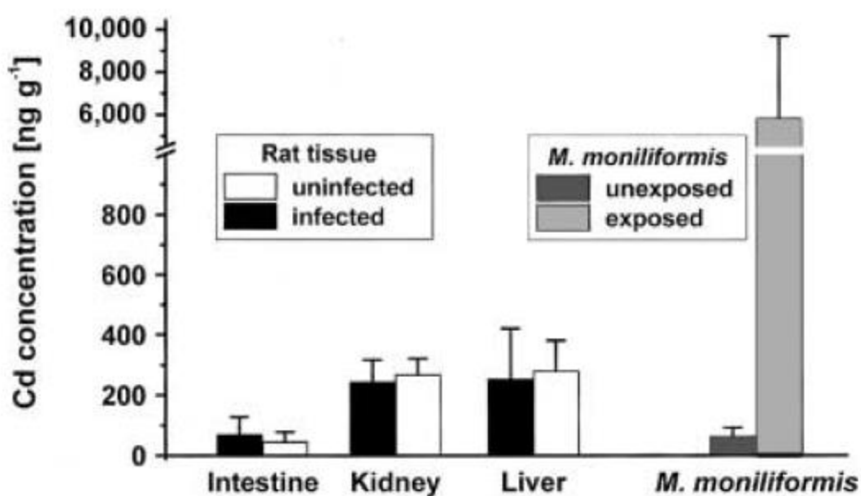
Pro svůj další experiment Jankovská et al. (2011) opět využila ovce domácí (*Ovis aries*) a jejich tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*). Tentokrát se zaměřila na působení kadmia na tento paraziticko-hostitelský systém. Kromě samotné toxikokinetiky kadmia též zkoumala kompetici mezi tasemnicí a hostitelem o esenciální prvky jako je zinek, mangan, železo a měď. Výsledky ukázaly, že při expozici hostitele kadmíem dochází k větší kumulaci kadmia v tkáních hostitele, nikoliv parazita. *Moniezia expansa* tedy není schopna redukovat koncentraci kadmia v těle svého hostitele stejně, jako to dokáže při intoxikaci hostitele olovem. Další změny v koncentracích výše zmíněných esenciálních prvků můžeme vidět v tabulce č. 2.

tab. 2 Porovnání akumulace esenciálních prvků a kadmia uvnitř tasemnice a ovčí tkáně (Jankovská et al. 2011)

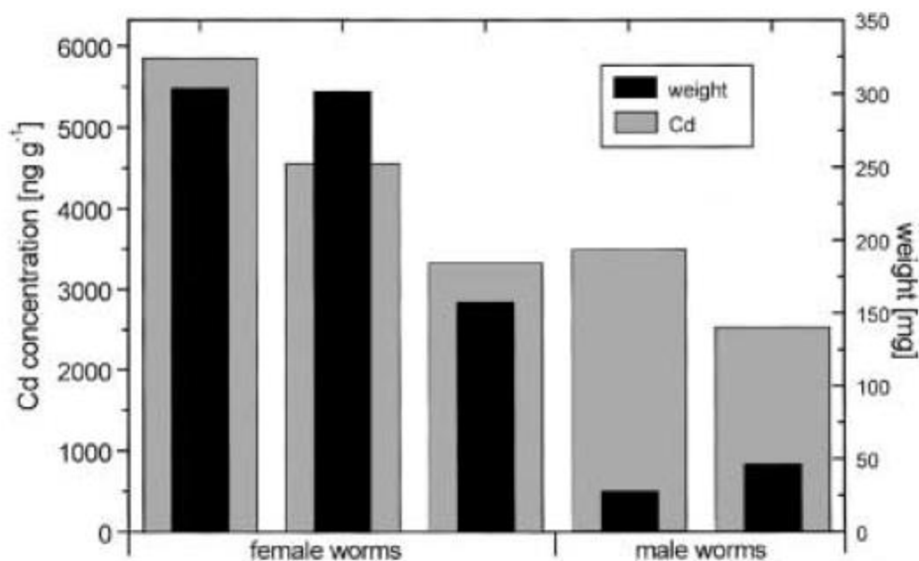
Skupina ovčí	Prvek	Svalovina	Játra	Ledviny	Tasemnice
		$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny
Bez expozice Pb	Kadmium	0,04	0,40	0,60	0,01
Exponované Pb		0,70	23,80	14,60	18,30
Bez expozice Pb	Měď	3,70	48,10	16,80	5,20
Exponované Pb		3,30	43,00	15,40	5,00
Bez expozice Pb	Mangan	1,20	9,00	3,50	6,60
Exponované Pb		0,60	15,10	0,80	10,00
Bez expozice Pb	Železo	35,30	237,10	156,20	8,90
Exponované Pb		125,70	515,60	245,90	8,00
Bez expozice Pb	Zinek	118,90	167,80	106,40	85,20
Exponované Pb		111,10	161,40	111,10	80,90

Toxikokinetiku RP v organismu infikovaným vrtejší zkoumal Scheef et al. (2000). Pro svůj výzkum si zvolil laboratorní potkany, které inokuloval vrtejší *Moniliformis moniliformis*. Hlodavcům bylo následně podáváno kadmium. Po jejich usmrcení byla za pomoci elektrotermické atomové absorpční spektrometrie zkoumána koncentrace kadmia v zažívacím traktu, ledvinách a játrech hostitele a samozřejmě též koncentrace Cd v tkáni parazita. Výsledky prokázaly, že vrtejší druhu *Moniliformis moniliformis* pojmu stovacetkrát větší koncentrace kadmia oproti GIT hostitele, což můžeme vidět na grafu v obr. 2. Koncentrace kadmia v tkáních parazita byla úzce spojena s jeho pohlavím. Samice druhu *Moniliformis moniliformis* ve svých tkáních kumulovaly větší množství olova oproti samcům. Tento jev je znázorněn grafem na obr. 3. Rozdíly ve velikosti vrtejšů v těle hostitele pak na kumulaci kadmia uvnitř jejich tkání neměly vliv (Scheef et al. 2000).

obr. 2 Graf porovnávající koncentraci kadmia ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) uvnitř tkání hostitele v případě infekcí vrtejší *Moniliformis moniliformis* oproti jedincům neinfikovaným dle experimentu Scheef et al. (2000)



obr. 3 Graf porovnávající koncentraci kadmia ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) uvnitř tkání vrtejšů *Moniliformis moniliformis* v závislosti na rozdílu pohlaví a váze helminta (Scheef et al. 2000)



Rozdíly toxikokinetiky RP při helmintóze tasemnicemi a škrkavkami zároveň zkoumala Jankovská et al. (2010). Vybraným hostitelem v tomto výzkumu byla liška obecná (*Vulpes vulpes*), jakožto nejrozšířenější šelma z čeledi psovitých na území České republiky. Z jejích parazitů byly pro výzkum vybrány škrkavka šelmí (*Toxocara leonina*) a tasemnice rodu *Mesocestoides* spp. K analýze koncentrací kadmia, chromu, mědi, olova, zinku, manganu a niklu byla využita emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Výsledky prokázaly větší hodnoty koncentrace prvků Mn, Cu, Pb, Zn a Ni v tělech parazitů oproti tkáním lišek. Zároveň však při porovnání tasemnic rodu *Mesocestoides* spp. a škrkavek šelmích (*Toxocara leonina*) byly naměřeny vyšší koncentrace prvků Ni, Mn, Cu a Pb v tkáních tasemnic vůči tkáním škrkavek (Jankovská et al. 2010). Rozdíly nastaly i u koncentrace olova v ledvinách mezi jedinci infikovanými a neinfikovanými parazity GIT. Zatímco ledviny lišek, které byly napadeny tasemnicemi obsahovaly olovo o koncentraci $0,457 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, tak ledviny lišek u nichž parazitovaly škrkavky obsahovaly olovo o koncentraci $0,878 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Jankovská et al. 2010). Při porovnání jater nedošlo k žádným významným rozdílům v akumulaci olova při napadení rozdílnými typy parazitů. Dále pak zjištěné hodnoty koncentrace Mn a Cu byly vyšší v játrech lišek, které byly infikovány parazity GIT oproti liškám neinfikovaným. Co se týče koncentrací Zn a Ni nedošlo k významným změnám toxikokinetiky v paraziticko-hostitelském systému ani u lišek, u nichž nedošlo k nakažení škrkavkami, či tasemnicemi (Jankovská et al. 2010).

Jak ukazují výše uvedené články, změny v toxikokinetice rizikových, ale i esenciálních prvků můžeme pozorovat nejen v tkáních parazita, ale též hostitele. Určitý trend můžeme sledovat u zástupců třídy tasemnice a motolice a zároveň u kmene vrtejšů, kteří ve svých tkáních dokážou kumulovat vyšší koncentrace rizikových prvků oproti svým hostitelům. Za vinu to můžeme dávat tegumentu.

I zástupci z kmene hlístic mají schopností do svých těl přijímat větší množství RP, nejedná se však o tak vysoké množství jako u předchozích skupin. Absence tegumentu může být z jednou příčin tohoto jevu. Těla hlístic jsou pokrytá pokožkou či kutikulou a jejich trávicí soustava nekončí slepě jako je tomu u tasemnic, motolic a vrtejšů. Místo toho trávicí trubice začíná ústním otvorem a končí otvorem řitním.

Kromě toho můžeme rozdíly ve schopnosti akumulace prvků i podle pohlaví u kmene vrtejšů, jak jasně dokazuje experiment Scheef et al. (2000). Konkrétní důvod toho, proč těla samic akumulují větší množství rizikových prvků neexistuje. Existují však domněnky, že je to způsobeno tím, že samičí buňky, oocyty, dokážou akumulovat větší množství rizikových prvků oproti samčím pohlavním buňkám, spermii. Avšak tyto domněnky nebyly doposud potvrzeny žádným experimentem.

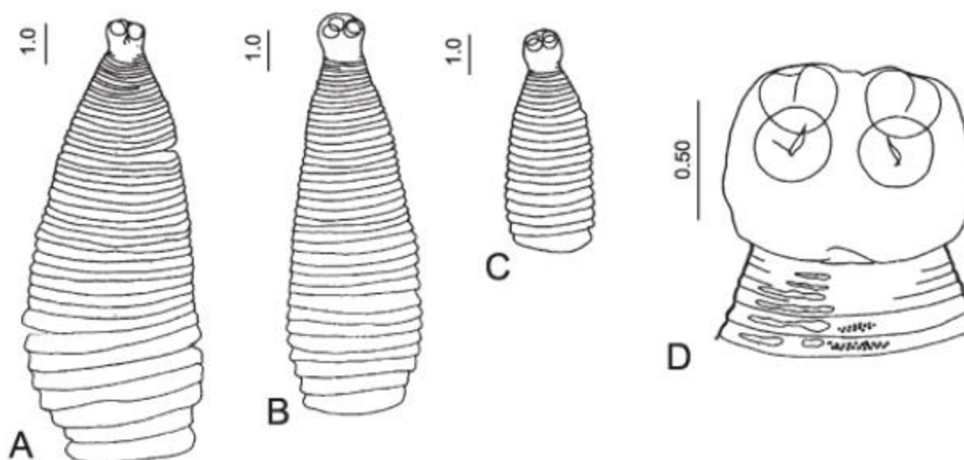
4 Metodika

4.1 Výběr tkání pro analýzu koncentrace RP

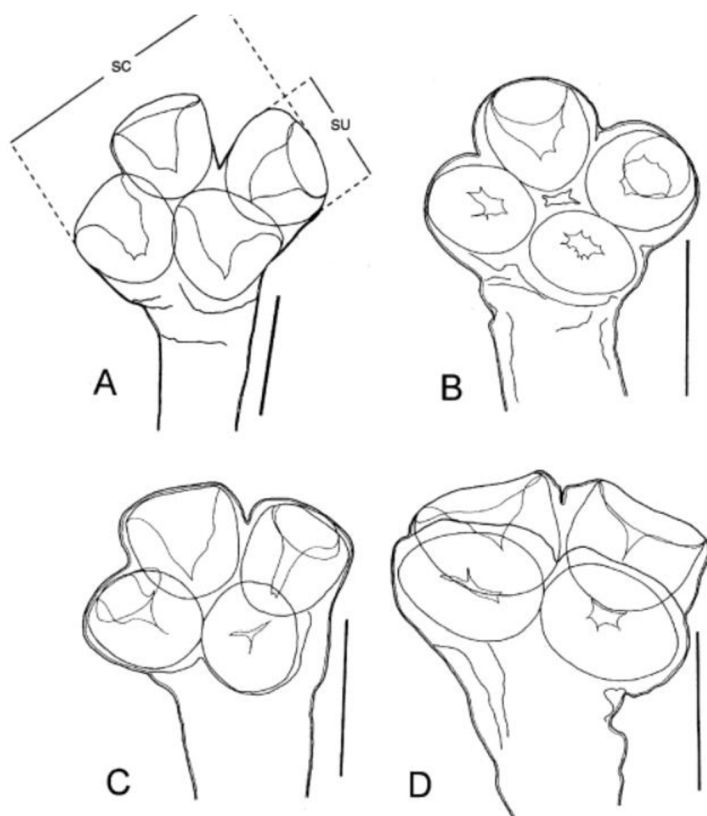
Během terénních odchytů drobných zemních savců, které probíhal v měsících duben, červenec, srpen a říjen 2021 byly pro experiment odchyceni jedinci hraboše polního (*Microtus arvalis*). Po usmrcení a následné autopsii byly z těl hostitů vybraná játra a z trávicího traktu přítomní parazité. Pro další výzkum byly vybrány pouze dva druhy tasemnic. Prvním z těchto druhů je *Anoplocephaloides dentata*. Tato tasemnice je častým parazitem hrabošů polních, stejně jako u dalších druhů spadajících do rodu *Microtus*, vyskytujících se v Holoarktické oblasti. V trávicím traktu parazituje v konci *ile*a, mezi *ileo-ceacal*ním spojením a dále pak v *caecum*. Od ostatních tasemnic se odlišuje absencí nesegmentované oblasti nacházející se hned za skolexem. Jelikož se jedná o krátkou tasemnicu je vývoj progloditů velmi rychlý (Haukisalmi et al. 2009).

Druhým důležitým druhem je *Paranoplocephala omphalodes*. Stejně jako předchozí druh patří do čeledi Anoplocephalidae. Typičtí hostitelé jsou hlodavci z rodu *Microtus* žijící v Holoarktické oblasti. Avšak na rozdíl od *Anoplocephaloides dentata* má delší tělo s větším množstvím progloditů (Haukisalmi et al. 2004). Morfologické rozdíly mezi druhy můžeme vidět na obr. 4 a obr 5.

obr. 4 *Anoplocephaloides dentata* nalezené při výzkumu Haukisalmi et al. 2009



obr. 5 Vzhled skolexu *Paranoplocephala omphalodes* u jedinců nalezených při výzkumu Haukisalmi et al. 2004 v měřítku 0,50 mm



4.2 Příprava vzorků

Po získání potřebných vzorků je potřeba jejich správné zpracování. Dalším krokem byla tedy lyofilizace, která způsobila vysušení živočišných tkání a parazitů za pomoci mrazu. Po úspěšné lyofilizaci vzorků následovala jejich navážka (100 - 200 mg). Po vložení potřebného množství materiálu do křemenné zkumavky, o objemu 30 ml byly k obsahu přidány 3 ml kyseliny dusičné (HNO_3 , Analpure®, Analytika, ČR) a 3 ml peroxidu vodíku (H_2O_2 , Rotipuran®, Německo) a magnetické míchátko. Po uzavření zkumavky víčkem a s výše zmíněným obsahem byly vzorky postupně vloženy do mikrovlnného rozkladného zařízení CEM microwave synthesizer discover SP viditelném na obr. 6, ve kterém proběhla jejich mineralizace při teplotě $180\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 7 minut a následném zvýšení teploty na $180\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Ukončením mineralizace a následném doředění vzorků ultračistou vodou z přístroje Milli-Q systém do objemu 30 ml. V závěru následoval finální krok, a to analýza pomocí hmotnostní spektrometrie.

obr. 6 Mikrovlnné rozkladné zařízení CEM discover SP



4.3 Hmotnostní spektrometrie ICP – MS

Pro určení koncentrace arsenu, kadmia a olova byla využita technika hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA). Konfigurace ICP-MS zahrnovala autosampler ASX-500, koncentrický zmlžovač MicroMist, dvouplášťovou Scottovu mlžnou komoru, oktapólovou kolizní/reakční celu a kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Izotopy ^{111}Cd a ^{206}Pb byly měřeny v režimu bez kolizního plynu (tzv. no gas mód), zatímco ^{75}As byl kvantifikován v heliovém módu, který snižuje úroveň spektrálních polyatomických interferencí, např. s částicemi $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Přístroj byl kalibrován metodou externí kalibrace v rozmezí koncentrací 0,01 – 100 $\mu\text{g/l}$ každého prvku pomocí naředění víceprvkového standardního roztoku (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR). Pro korekci vlivu matrice a driftu signálu analytů v čase byla použita metoda interního standardu s využitím víceprvkového roztoku obsahujícího 100 $\mu\text{g/l}$ Ge, Rh, In a Lu (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR), který byl kontinuálně přiváděn do zmlžovače spolu se vzorky. Naměřené hodnoty koncentrací byly přepočteny na navážku sušiny vzorku a ředění $\mu\text{g/l} \rightarrow \text{mg/kg}$. Správnost výsledků analýzy byla ověřena paralelní analýzou certifikovaného referenčního materiálu Bovine liver (BCR-185R).

4.4 Statistické metody

Jako první byly provávány vzorky jater infikovaných a neinfikovaných jedinců hrabošů. Pro to byl vybrán nemparametrický Mann-Whitneyův u-test. Jedná se o neparametrickou variantu nepárového t-testu. Tento test pracuje na principu sloučení souborů, udělení pořadí hodnotám a následném porovnání součtu pořadí obou souborů. Pro výpočet statistického porovnání souborů byl využit soubor STATISTICA, díky kterému zjistíme hodnotu p, jež následně porovnáme s naší hladinou významnosti α (5 %). Dojde-li k tomu, že p-hodnota souborů je menší než hladina významnosti α , je nutné zamítnout naši hypotézu mluvící o podobnosti souborů, a naopak musíme přijmout hypotézu alternativní, která pojednává o odlišnosti souborů.

Dalším bodem bylo porovnání koncentrací rizikových prvků v sušině jater infikovaných jedinců oproti jejich parazitům. Jako vhodný test byl vybrán Wilcoxonův párový test. Jedá se i neparametrickou obdobu párového t-testu závislých vorků. Tento test počítá se součtem pořadí absolutních rozdílů a jeho výsledek se porovnává s tabulkovou hodnotou. Tato práce však opět využila program STATISTICA a hodnocení tedy proběhlo na základě spočítané hodnoty p. V případě, že hodnota p je menší než hladina významnosti α (5 %), opět dojde k zamítnutí naší hypotézy o podobnosti souborů a je potřeba přijmout hypotézu alternativní.

5 Výsledky

5.1 Přehled vzorků

V praktické části jsme měli k dispozici 14 vzorků jater neinfikovaných jedinců, 16 vzorků jater infikovaných jedinců a 15 vzorků parazitů GIT. Pro přesnost výsledků se během výpočtů museli některé hodnoty odebrat. Pro lepší přehled zmíníme alespoň průměrnou koncentraci jednotlivých rizikových prvků ve vybraných tkáních. Játra neinfikovaných jedinců obsahovala arsen o koncentraci 0,07493 mg/kg, zatímco játra infikovaných jedinců 0,06143 mg/kg. Uvnitř tkání parazita pak byla naměřena koncentrace arsenu 0,21229 mg/kg zejména. Průměrná koncentrace kadmia byla 0,04442 mg/kg v játrech neinfikovaných jedinců, 0,02514 mg/kg v játrech infikovaných hrabošů a 0,05082 mg/kg v tkáních parazitů. Oproti tomu průměrná koncentrace olova v játrech zdravých hrabošů byla 0,05487 mg/kg, v játrech infikovaných jedinců 0,04604 mg/kg a v tkáních parazita 0,89189 mg/kg. Konkrétní seznam vzorků můžeme vidět na tabulce v příloze č. 1, kde zelenou barvou jsou značeni játra infikovaných jedinců, zatímco barvou modrou játra jedinců neinfikovaných.

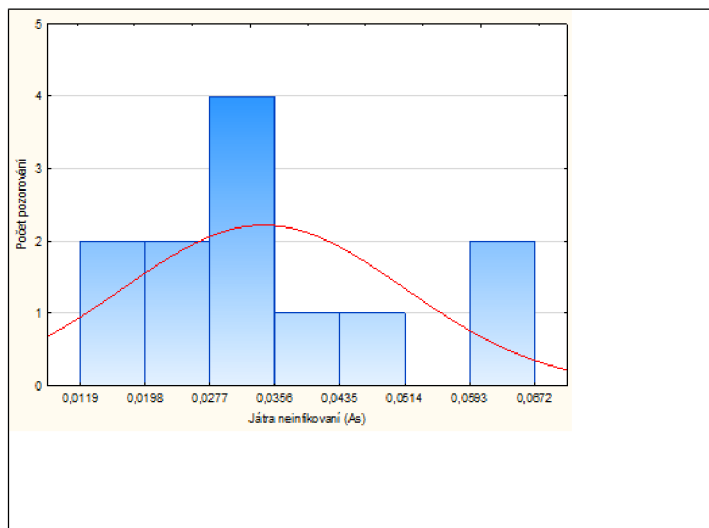
5.2 Přepočítání dat a ověření normálního rozdělení

Po úspěšném zpracování vzorků za pomoci hmotnostní spektrofotometrie ICP-MS jsme získali hodnoty koncentrací námi vybraných rizikových prvků v živočišných tkáních v jednotkách $\mu\text{g/l}$. Proto bylo potřeba hodnoty přepočítat za pomoci vzorce:

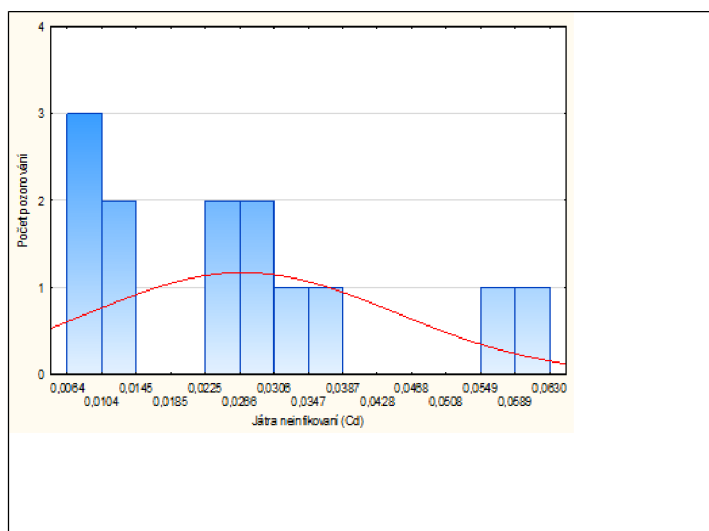
$C_{\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{l}}\right)} \frac{V_{(\text{ml})} * C_{\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{l}}\right)}}{m_{(\text{g})}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)$, kdy V je finální objem roztoku, c naměřenou koncentrací a m hmotnost navážky. Díky čemuž jsme převedli koncentrace měřených prvků na jednotky mg/kg.

Abychom dál mohli počítat se správnými hodnotami, bylo potřeba vzít v potaz i hodnoty naměřené ve slepém (Blank) vzorku, který prošel stejným procesem jako platné vzorky, avšak bez navážky sušiny. Hodnoty rizikových prvků, které v něm byly naměřeny, byly následně odečteny od vzorků obsahujících živočišné tkáně, abychom získali platné výsledky. S takto upravenými výsledky již bylo možné zahájit vlastní analýzu a vyhodnocení námi stanovených hypotéz.

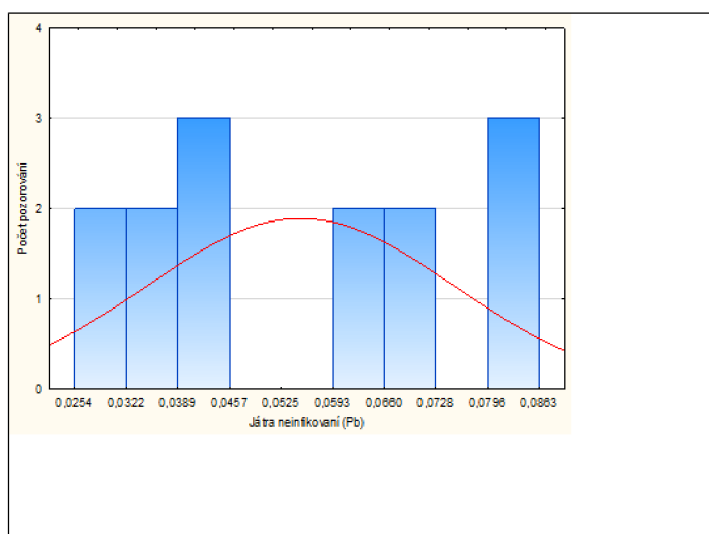
Dalším krokem pro úspěšné statistické zpracování dat bylo ověření jejich normality, tedy zda-li námi získané hodnoty koncentrací rizikových prvků mají normální rozdělení. Pro to byly použity histogramy pro každý zkoumaný prvek a tkáň, ze kterých byly vyřazeny extrémní hodnoty, které by mohly zkreslit náš odhad pro správný výběr statistického testu pro ověření hypotéz. Výše zmíněné histogramy můžeme vidět na grafech 1-9. Je zde patrné, že díky menšímu množství vzorků nedochází u dat k normálnímu rozdělení, a proto je potřeba dále vybrat vhodné neparametrické statistické testy.



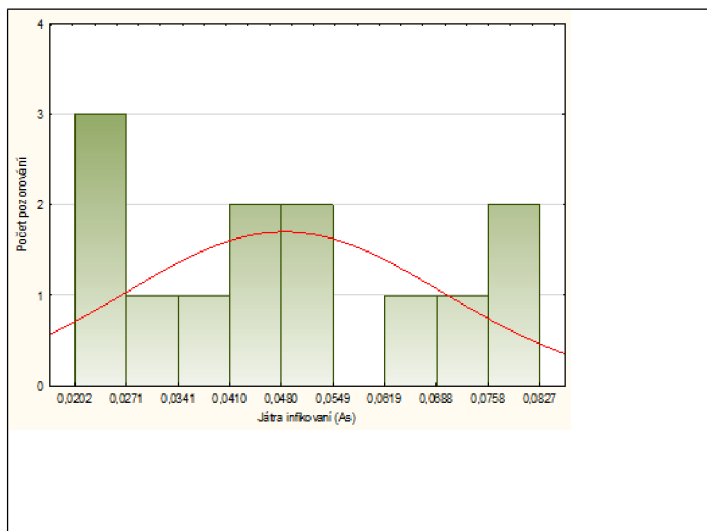
graf č.1 Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v sušně jater neinfikovaných jedinců



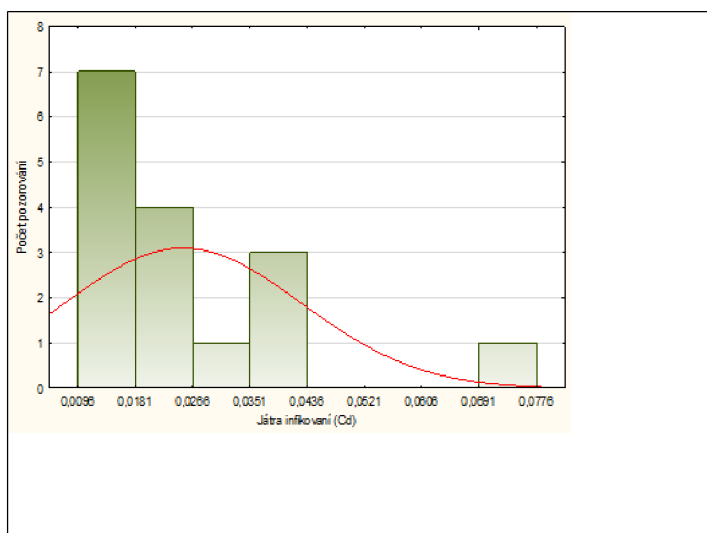
graf č.2 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v sušně jater neinfikovaných jedinců



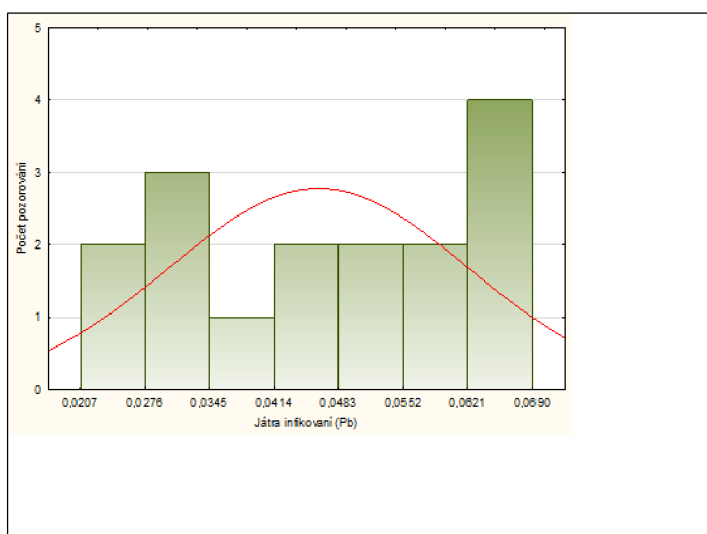
graf č.3 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v sušně jater neinfikovaných jedinců



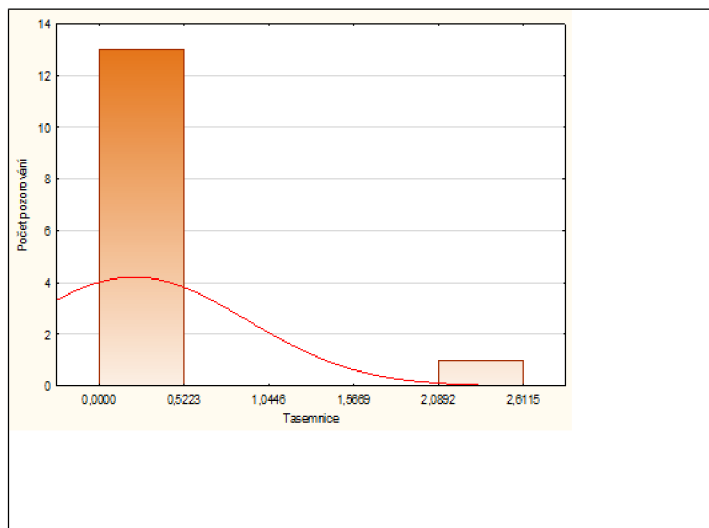
graf č.4 Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v sušině jater infikovaných jedinců



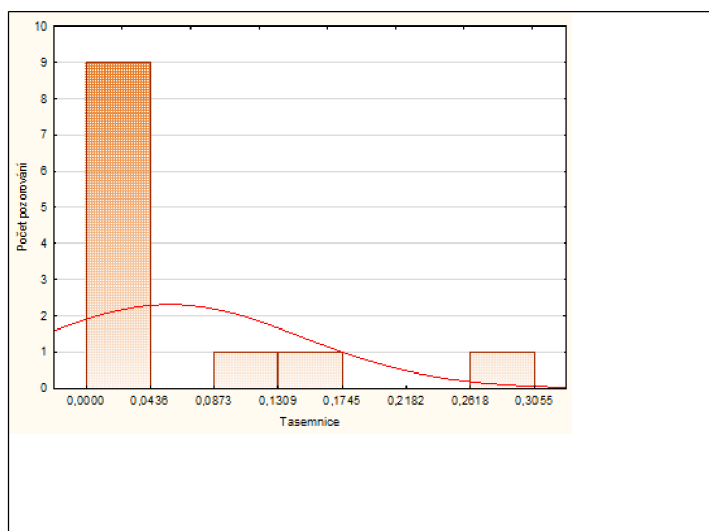
graf č.5 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v sušině jater infikovaných jedinců



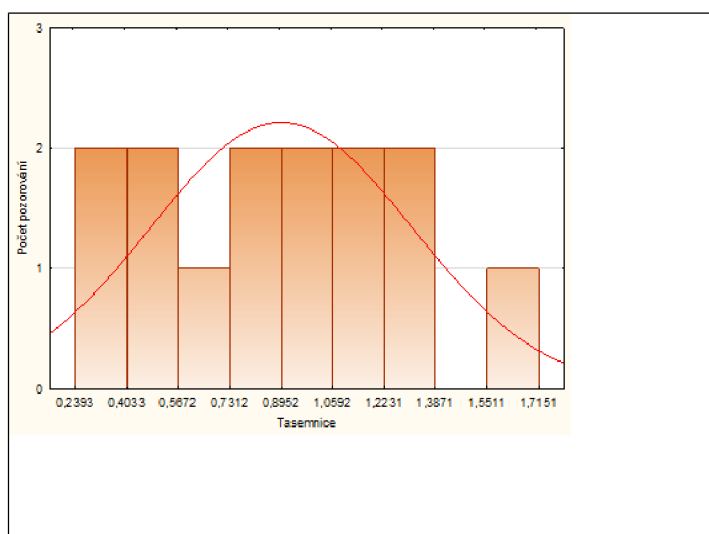
graf č.6 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v sušině jater infikovaných jedinců



graf č.7 Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v tkáních parazita



graf č.8 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v tkáních parazita



graf č.9 Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v tkáních parazita

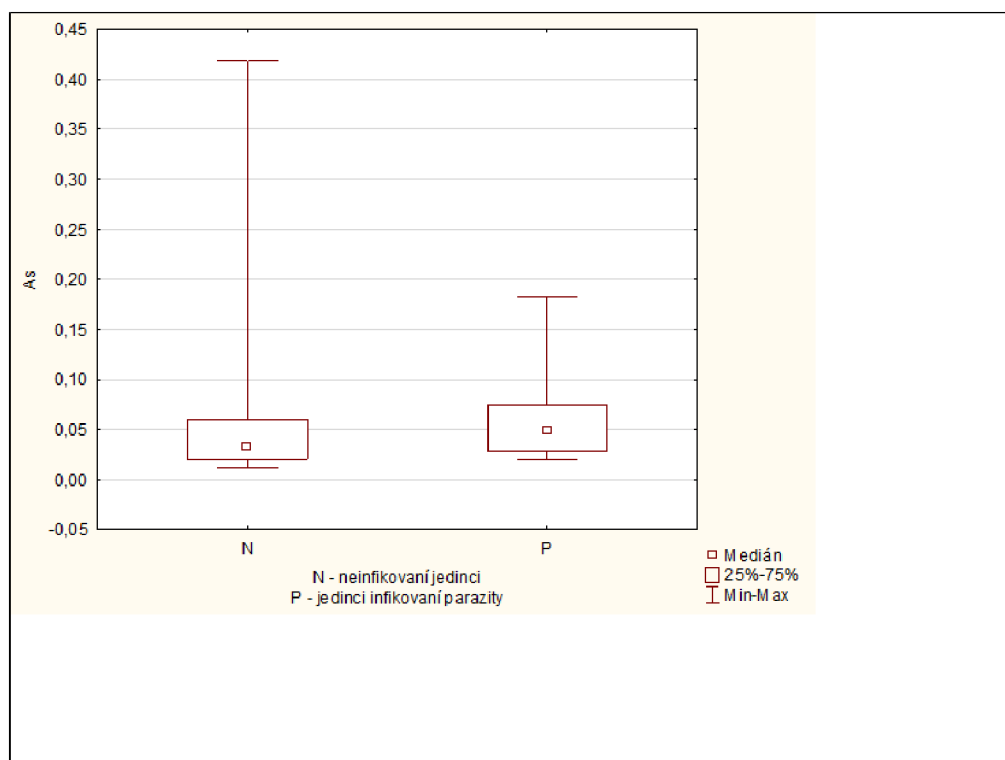
5.3 Porovnání jater infikovaných a neinfikovaných jedinců

Jelikož na výše zmíněných histogramech je vidět nenormalní rozdělení dat, pro porovnání koncentrací v játrech jedinců bez parazitů a jedinců, kteří v tělech parazity GIT měli být využit neparametrický test porovnávající dva nezávislé vzorky, konkrétně Mann-Whitneyův u-test. Ten je neparametrickou obdobou dvouvýběrového t-testu. Při tomto měření jsme hodnotili naši první hypotézu, tedy že parazit průkazně neovlivňuje toxikokinetiku v organismu hostitele, a tudíž mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci není signifikantní rozdíl v detekovaných koncentracích RP.

Při porovnání koncentrací arsenu v játrech parazitovaných a neparazitovaných můžeme v tabulce č. 3 vidět, že naměřená p-hodnota je větší než hladina významnosti α . Jelikož Mann-Whitneyův u-test měří podobnost rozptylů, může tedy říci, že soubory jsou si statisticky podobné právě na základě rozptylů. Podobnost souborů můžeme vidět zároveň na grafu č. 10, kde i střed grafu – medián hodnot – je v podobné pozici u obou souborů.

tab. 3 Mann – Whitneyův u-test (dle proměnné *Tasemnice*) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace As

	Sčet poř. N	Sčet poř. P	U	Z	p-hodn.	Z upravené	p-hodn.	N platn. N	N platn. P	2*1 str. přesné p
Játra	192,000	273,000	87,000	-1,018	0,308	-1,018	0,308	14	16	0,313



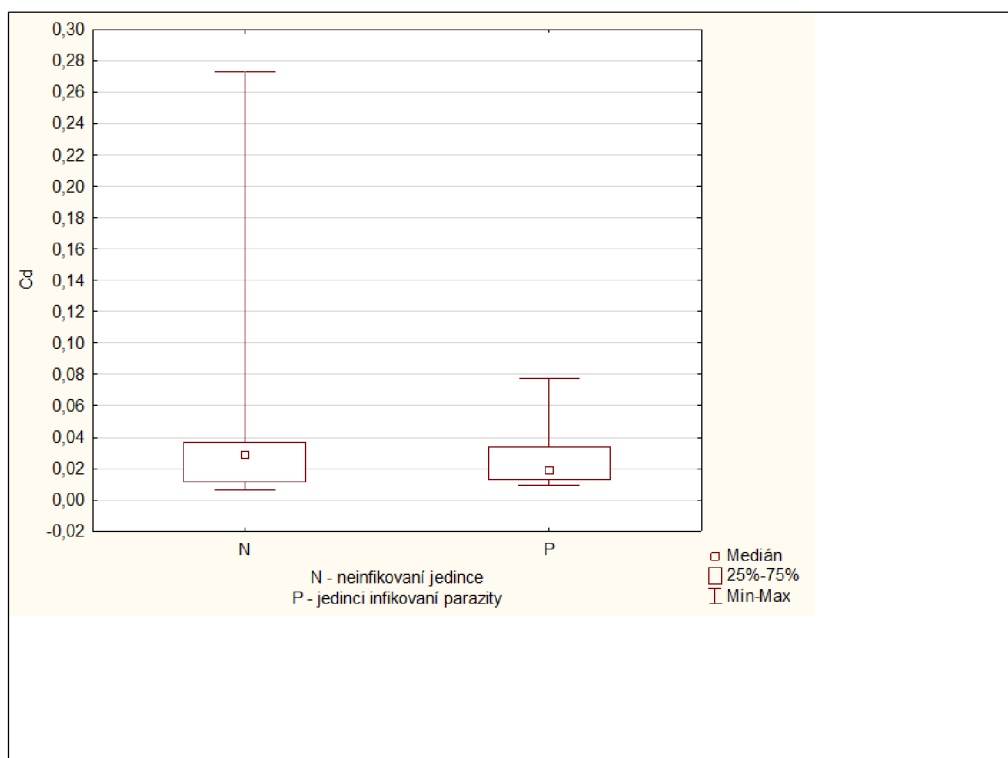
graf č.10 Krábiový graf porovnávající koncentrace As (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných

Pro porovnání koncentrací kadmia platí stejný výsledek jako pro arsen, což můžeme vidět v tabulce č. 4. Na krábiovém grafu č. 11 můžeme vidět, že koncentrace v játrech jedinců bez

parazitů GIT je vyšší oproti játrům infikovaných jedinců pouze díky extrémním hodnotám, které jsou velmi vzdálené průměru, ale rozptyl souborů se podobný. Medián obou souborů, jakožto střední hodnota se obět nachází u obou souborů na velmi podobné hodnotě.

tab. 4 Mann - Whitneyův u-test (dle proměnné *Tasemnice*) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace Cd

	Sčt poř. N	Sčt poř. P	U	Z	p-hodn.	Z upravené	p-hodn.	N platn. N	N platn. P	2*1str. přesné p
Játra	226,000	239,000	103,000	0,353	0,727	0,353	0,723	14	16	0,727

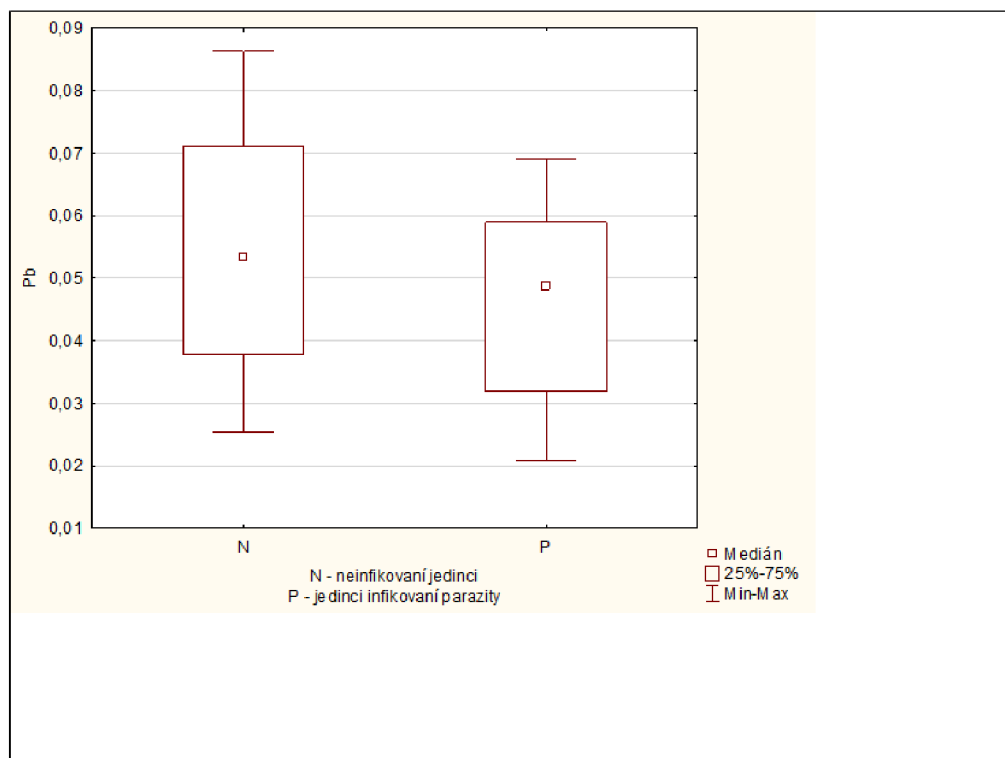


graf č.11 Krabicový graf porovnávající koncentrace Cd (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných

V případě porovnání koncentrace olova opět nebyl zjištěn rozdíl mezi rozptyly souborů, což ukazuje p-hodnota v tabulce č. 5, která je vyšší než hladina významnosti α . Podobnost souborů a střední hodnoty můžeme vidět i na grafu č. 12.

tab. 5 Mann - - Whitneyův u-test (dle proměnné *Tasemnice*) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace Pb

	Sčt poř. N	Sčt poř. P	U	Z	p-hodn.	Z upravené	p-hodn.	N platn. N	N platn. P	2*1str. přesné p
Játra	243,000	222,000	86,000	1,060	0,289	1,060	0,289	14	16	0,293



graf č.12 Krabicový graf porovnávající koncentrace Pb (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných

5.4 Porovnání jater infikovaných jedinců a jejich parazitů

Naše druhá hypotéza tvrdila, že parazit akumuluje stejně intenzivně jako hostitel, proto mezi koncentracemi RP v tkáních parazita a jeho hostitele nejsou významné rozdíly. Abychom tuto hypotézu ověřili, je třeba provést párový test, respektive jeho neparametrickou obdobu, tedy Wilcoxonův test, z důvodu nenormálního rozdělení dat.

Jako první jsme hodnotili rozdíly koncentrací arsenu. Jak je vidět v tabulce č. 6, p hodnota je vyšší než hladina významnosti α a naši hypotézu můžeme přijmout. V případě koncentrací arsenu není mezi játry infikovaného jedince a jeho parazity významný statistický rozdíl. Zároveň je však nutné zmínit, že u většiny parazitů, byly naměřené koncentrace pod mezí detekce použité analytické metody a proto na toto porovnání souborů nelze úplně brát zřetel.

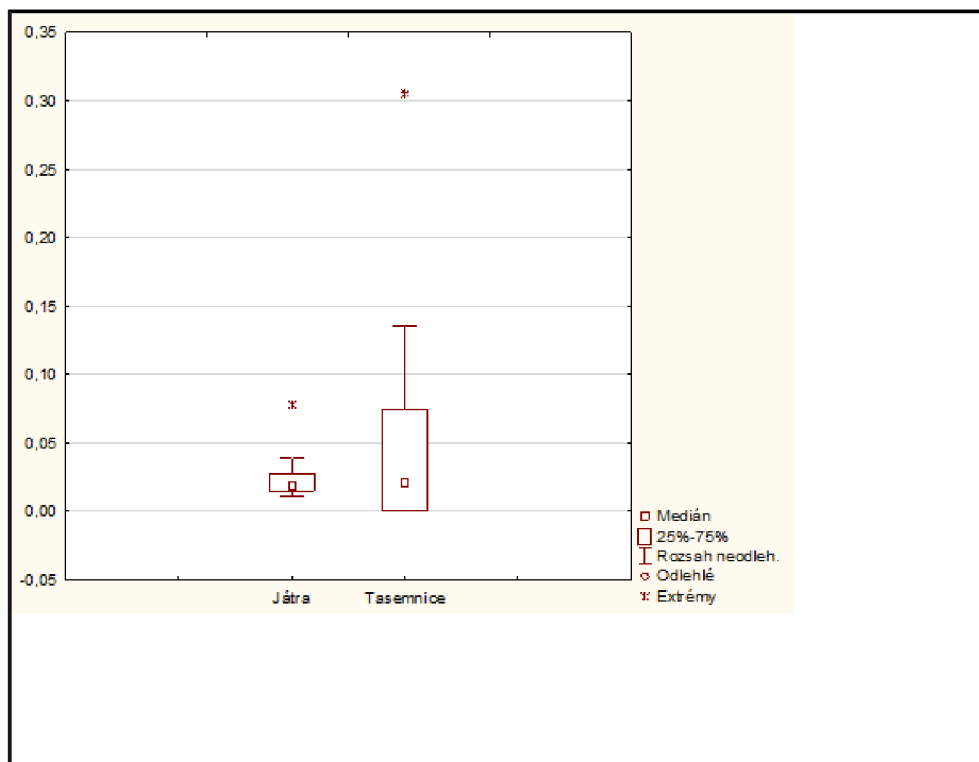
tab. 6 Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace As

Dvojice proměnných	Wilcoxonův párový test (Arsen)			
	Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$			
	Počet platných	T	Z	p-hodn.
Játra - infikovaní & Parazit	14	41,00000	0,721930	0,470338

Druhým zkoumaným prvkem bylo kadmium. I u něj můžeme na tabulce č. 7 vidět, že p hodnota je vyšší než hladina významnosti α a proto potvrzujeme naši hypotézu. Porovnání můžeme vidět též na grafu č. 13. Je zde dobře patrné, že měřená střední hodnota obou souborů je v téměř stejné pozici.

tab. 7 Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace Cd

Dvojice proměnných	Wilcoxonův párový test (Kadmium) Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$			
	Počet platných	T	Z	p-hodn.
Játra - infikovaní & Parazit	12	28,00000	0,862911	0,388187

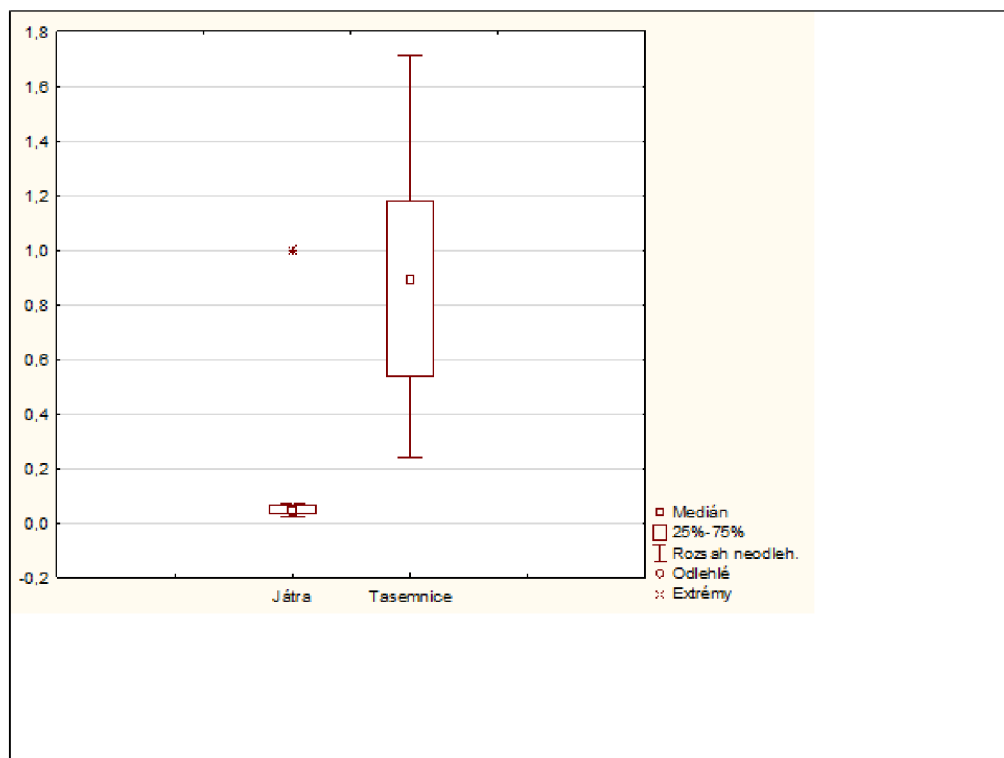


graf č.13 Krabicový graf porovnávající koncentraci Cd (mg/kg) v játrech infikovaných jedinců a jejich parazitů

Jako poslední byla hypotéza ověřována u olova. Zde jako u jediného prvku byla naše hypotéza vyvrácena. Jak je vidět v tabulce č. 8, hodnota p je menší než hladina významnosti α a je proto potřeba přijmout alternativní hypotézu. Díky grafu č. 14 můžeme zároveň říct, že tasemnice ve svých tělech akumulovali větší množství olova oproti játrům jejich hostitele.

tab. 8 Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace Pb

Dvojice proměnných	Wilcoxonův párový test (Olovo) Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$			
	Počet platných	T	Z	p-hodn.
Játra - infikovaní & Parazit	14	3,000000	3,107436	0,001887



graf č.14 Krabicový graf porovnávající koncentraci Pb (mg/kg) v játrech infikovaných jedinců a jejich parazitů

Kromě statistických testů můžeme u souboru jater infikovaných jedinců a jejich parazitů hodnotit biokoncentrační faktor (BCF). Tedy poměr koncentrací rizikového prvku v tkáních parazita vůči jeho vnějšímu prostředí, v našem případě v játrech. Toto ukázalo průměr $BCF_{(As)} = 1,69$, $BCF_{(Cd)} = 1,87$ a u $BCF_{(Pb)} = 19,78$ (mg/kg).

6 Diskuse

V oblasti toxikokinetiky rizikových prvků v paraziticko-hostitelském systému již byla provedena řada výzkumů. Ty zkoumaly vliv přítomnosti těžkých kovů v hostitelích jako jsou ryby, plazi, ptáci až po savce a jak je ovlivněn metabolismus těchto látek při přítomnosti gastrointestinálních helmintů. Obecně můžeme říct, že většina těchto experimentů došla k závěru, že přítomnost parazita je pro jejich hostitele téměř prospěšná, jelikož parazit do svého těla přijímá větší množství rizikových prvků oproti tkáním hostitele. Zároveň ale musíme brát v úvahu rozdílnost jednotlivých skupin parazitů jako je fylogenetické zařazení, přítomnost tegumentu, hermafroditismus či jeho opak gonochorismus. Toto jsou faktory, které ovlivňují parazita v tom, jak velké množství těžkých kovů do svého těla přijme. Specifická je i charakteristika konkrétního rizikového prvku. Chemické a fyzikální vlastnosti těchto látek určují kolik a zda vůbec parazit RP do svého těla přijme.

Praktická část této práce se zaměřila na toxikokinetiku rizikových prvků v savčím organismu infikovaném gastrointestinálními helminty. Jako hostitel byl vybrán druh hraboš polní (*Microtus arvalis*) se svými parazity z třídy tasemnice, konkrétně druhy *Anoplocephaloides dentata* a *Paranoplocephala omphalodes*. Oba tyto druhy tasemnice patří k typickým parazitům rodu *Microtus*. Sledovanými prvky v sušině vybraných tkání byly arsen, olova a kadmium.

Abychom mohli porovnávat vliv parazita na hostitele infikovaného vybranými těžkými kovy bylo potřeba prvně porovnat tkáně jedinců GIT helmintů prostých s tkáněmi jedinců infikovaných tasemnicemi. Pro tuto část byly vybrány játra, jako orgán důležitý pro detoxikaci organismu a zároveň časté místo kumulace rizikových prvků.

V případě arsenu a kadmia statistické porovnání vzorků neprokázalo statisticky významný rozdíl rozptylů obou souborů. Avšak podíváme-li se na krabicové grafy porovnávající koncentrace těžkých prvků pro arsen i kadmium můžeme vidět, že vidlička pro dvě směrodatné odchylky je vždy vyšší pro játra neinfikovaných hrabošů. Se současným souborem dat můžeme toto dát za následek ojedinělým extrémním hodnotám velice vzdálených od mediánu, který byl zvolen jako střední hodnota. Můžeme se však domnívat, že v případě větší velikosti souboru by tyto hodnoty nebyly tak ojedinělé. Potvrdit tuto domněnku může experiment Teimoori et al. (2014), jehož pokus prokázal větší koncentrace kadmia v játrech myši neinfikovaných oproti jedincům, kteří byli napadeni tasemnicí druhu *Hymenolepis diminuta*. Totéž potvrdil i Scheef et al. (2000), který však zkoumal vliv vrtejšů druhu *Moniliformis moniliformis*.

I u arsenu je běžné, že v případě expozice organismu vlivu tohoto prvku, mají výhodu infikovaní jedinci, jejichž tkáně obsahují menší koncentrace než tkáně neinfikovaných jedinců. K tomuto jevu dochází běžně i ve vodním prostředí, jak zjistily při svém pokusu Chunchuková a Kuzmanová (2017.). Při svém zkoumání se zaměřily na ouklej obecnou (*Alburnus alburnus*) a její parazity z kmene vrtejšů *Pomphorhynchus laevis*. Všechny zkoumané tkáně neinfikovaných jedinců, tedy játra, svalovina a kůže, obsahovaly větší množství arsenu oproti tkáním ouklejí, které ve svém trávicím traktu měly výše zmíněný druh vrtejšů.

Výrazný rozdíl mezi koncentracemi jater se neprojevil ani u olova. Zde však můžeme na grafu vidět velkou podobnost souboru bez přítomnosti jakýchkoliv extrémních hodnot.

Experiment Surese et al. (2002) došel k jiným závěrům. Avšak pro svůj výzkum zvolil tasemnici druhu *Hymenolepis diminuta*. Vliv tohoto parazita na hostitele exponovaného olova zkoumala i Čadková et al. (2014). Tento experiment sice prokázal, že parazit přijme větší množství olova než hostitel, ale při porovnání tělesných tkání infikovaných a neinfikovaných potkanů (hostitelů) nebyl prokázán statisticky významným rozdíl v koncentraci olova.

V případě porovnávání jater infikovaných jedinců a jejich parazitů byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl pouze u olova. Zde bylo jasně patrné, že parazit obsahuje vyšší koncentraci prvku oproti játrům hostitele. V případě arsenu a kadmia statistické testy neprokázaly výrazný rozdíl souborů. Avšak ve srovnání s výsledky Teimooriho et al. (2014) jsme došli k opačným závěrům. V jeho případě tasemnice *Hymenolepis diminuta* obsahoval větší množství kadmia oproti tkáním hostitele. Totožné ukázal i experiment Chunchukové a Kuzmanové (2017), který ukázal, že i ve vodním prostředí jsou tělesné tkáně parazita absorbovat větší množství arsenu z těla svého hostitele a díky tomu v závěru parazité obsahovali větší koncentrace arsenu oproti ostatním tkáním oukležej, v jejichž tělech parazitovali.

Opačné výsledky, tedy takové, kdy parazit obsahoval méně těžkého kovu, než jeho hostitel byly také zaznamenány. Gabrashanská et al. (2016) ke svému experimentu využila zástupce z kmene hlístice, konkrétně vlasovku slezovou (*Haemonchus contortus*) a jejího hostitele ovci domácí (*Ovis aries*). Zde kromě jiného byl zjišťován vliv arsenu na paraziticko-hostitelský cyklus a také možnost využití tohoto systému jako bioindikátor kvality životního prostředí. Avšak pokus došel k výsledku, že háďátka druhu *Haemonchus contortus* nejsou schopna kumulovat větší množství arsenu než tkáně jejich hostitele a podobně tomu bylo i u dalšího sledovaného prvku, molibdenu.

Zimmerman et al. (1999) poukázal na rozdíl ve schopnostech kumulovat rizikové prvky na příkladu dvou různých parazitů ve společném hostiteli. Jako hostitel zde tedy figuroval úhoř říční (*Anguilla anguilla*) a následovali parazité z kmene vrtejšů *Paratenuisentis ambiguus* a zároveň z kmene hlístic, druh *Anguillicola crassus*. Zatím co u vrtejšů *Paratenuisentis ambiguus* byla zjištěna vyšší koncentrace olova oproti tkání jejich hostitele, u hlístic druhu *Anguillicola crassus* tomu bylo přesně naopak. Při porovnání obou druhů bylo zjištěno, že vrtejši obsahovali ve svých tkáních 20 – 2 000krát vyšší koncentrace olova oproti hlísticím (Zimmerman et al. 1999). Můžeme si všimnout, že tasemnice zkoumané v této práci (*Anoplocephaloides dentata* a *Paranoplocephala omphalodes*), podobně jako jako vrtejši *Paratenuisentis ambiguus* v Zimmermanově experimentu (1996) vykazovaly podobné výsledky, co se týče schopnosti absorbce olova. Akumulovaly tedy ve svých tělech větší množství olova oproti tkáním jejich hostitele.

Při porovnání s předchozími příklady, kdy naopak byl parazit v těle hostiteli prospěšný, alespoň co se týče kumulace rizikových prvků, je potřeba si klást otázku, čím je tato změna v případě hlístic způsobena. Již v předchozích kapitolách byla zmíněna přítomnost tegumentu u následujících skupin – tasemnice, motolice, vrtejši. Přičemž všechny tyto skupiny opakovaně prokazovaly schopnost hromadit ve svých tělech větší množství rizikových prvků oproti svým hostitelům. Hlístice tuto schopnost neprokázaly. Zároveň se vyznačují přítomností plně průchozí trávicí soustavy počínající ústním otvorem a končící otvorem řitním. Jak již mnoho předchozích autorů i já se připojuji k domněnce, že právě absence tegumentu u hlístic způsobuje i jejich ochranu před vyšším příjmem rizikových prvků, které jsou přítomny v těle hostitele při expozici

působení těžkých kovů. Tegument sice umožňuje přísun živin, avšak nedisponuje jakýmkoliv mechanismem, jež by dokázal určit, které z přijímaných látek jsou pro organismus parazita prospěšné a které naopak nikoliv. Tudíž způsobuje vyšší příjem nebezpečných látek obecně a zároveň určitou ochranu tkání hostitele.

Vstřebatelnost různých rizikových prvků není určena pouze fyziologickými vlastnostmi tkání parazita či hostitele, vypovídající hodnotu mají samotné vlastnosti prvku, případně sloučeniny, ve které je prvek obsažen. Je potřeba si uvědomit, že anorganické sloučeniny mají od těch organických velmi odlišný charakter. Mimo jiné se prvky samozřejmě odlišují i tím, jakým způsobem je tělo distribuje, metabolizuje a vylučuje. V neposlední řadě to, kde a jak se bude prvek v těle ukládat určuje i způsob, jakým se dostane do těla, tedy orálně, perkutánně, intravenózně atd.

Pro porovnání schopnosti kumulovat v sobě rizikové prvky nemusíme vždy využívat pouze statistické porovnání. Jako jednoduchým ukazatel nám může posloužit i biokoncentrační faktor (BCF). Jedná se o poměr koncentrací rizikového prvku v tkáních parazita vůči jeho vnějšímu prostředí. V této práci se jedná konkrétně o poměr vůči játrům hostitele. Námi naměřené průměrné koeficienty byly následující: průměr $BCF_{(As)} = 1,69$, $BCF_{(Cd)} = 1,87$ a u $BCF_{(Pb)} = 19,78$ (mg/kg). Můžeme si všimnout, že biokoncentrační koeficient olova je téměř dvacetkrát vyšší oproti BCF arsenu a kadmia. Tyto výsledky potvrzují naše závěry získané za pomoci statistické analýzy.

7 Závěr

Cílem této práce bylo správně zhodnotit hypotézy týkající se toxikokinetiky rizikových prvků v paraziticko-hostitelském systému. Prvním úkolem bylo porovnat játra hrabošů polních, respektive dvou skupin jedinců, a to zdravých a pak infikovaných gastrointestinálními helminty a následně určit podobnost souborů. Mezi těmito dvěma skupinami se hodnotila koncentrace rizikových prvků, konkrétně arsenu, kadmia a olova. Naše hypotéza předpokládala, že mezi soubory se neprojeví žádný signifikantní statistický rozdíl, což bylo statistickým vyhodnocením potvrzeno u všech výše zmíněných prvků. Zároveň jsme však mohli na přiložených grafech vidět, že v případě jater neinfikovaných jedinců, se zde objevují extrémní hodnoty výrazně vyšších koncentrací arsenu a kadmia, než-li tomu bylo u jater infikovaných jedinců. Můžeme se tedy domnívat, že s rostoucí velikostí souboru by naše závěry byly potřeba předohodnotit.

Dalším cílem, který si tato práce kladla bylo porovnání jater infikovaných jedinců s jejich parazity. Zde jsme opět předpokládali, že mezi soubory nebude výrazný statistický rozdíl a koncentrace v obou druzích tkání si tedy budou podobné. Opět byly hodnoceny koncentrace prvků arsenu, olova a kadmia. Při statistickém vyhodnocení jsme došli k výsledkům, že pouze u olova můžeme vidět rozdíl v koncentracích mezi játry hostitele a tkáněmi parazita. Jak ukázaly grafy, parazit kumuluje ve svém těle větší množství rizikového prvku oproti zkoumaným tkáním hostitele. V případě arsenu a kadmia nebyly zjištěny žádné statistické rozdíly mezi soubory a můžeme tudíž tvrdit, že tkáně nakažených jedinců kumulují stejné množství arsenu a kadmia jako tkáně infikovaných jedinců.

Výsledky získané touto prací plně neodpovídají dosavadním poznatkům v oblasti toxikokinetiky rizikových prvků a je proto tudíž třeba zhodnotit opětovné provedení experimentu, avšak s větším množstvím vzorků. Zejménajsmo se zaměřili na prvky arsen a kadmium, u kterých sice nebylo dokázáno, že by významně ovlivnily toxikokinetiku RP v paraziticko-hostitelském systému, avšak při porovnání zjištěných dat dostupnou vědeckou literaturou zjistíme, že námi získané výsledky nemusí být plně relevantní.

8 Citace

- AKTER, K F, G OWENS a R NAIDU, 2005. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev Environ Contam Toxicol*. [online]. 1(184), 97-149. DOI:10.1007/0-387-27565-7_3.
- BARRETT, J, 1997. Helminth detoxification mechanisms. *Journal of Helminthology* [online]. 71(1), 85-89. DOI:10.1017/s0022149x0001573x.
- BARRET, J, 1998. Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology: Toxicology and Endocrinology* [online]. 121(1-3), 181-183. DOI:10.1016/S0742-8413(98)10039-7.
- BATES, N, P RAWSON-HARRIS a N EDWARDS, 2015. Common questions in veterinary toxicology. *Journal of small animal practice*. 5(56), 298-306. DOI: <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1111/jsap.12343>.
- BOGITS, BURTON J, CARTER C E a Thomas N OELTMANN. 2012. Chapter 12 - General Characteristics of the Cestoda. *Human Parasitology*. 4. © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved. USA. s. 217-235. ISBN: 978-0-12-415915-0.
- BORKOVCOVÁ, M, V FIŠER, M BEDNÁŘOVÁ, et al., 2019. Effect of Accumulation of Heavy Metals in the Red Fox Intestine on the Prevalence of Its Intestinal Parasites. In: MDPI: *Animal* (Basel) [online]. Švýcarsko: © 1996-2020 MDPI (Basel, Switzerland), s. 1-11. DOI:10.3390/ani10020343.
- ČADKOVÁ, Zuzana, Daniela MIHOLOVÁ, Jiřina SZÁKOVÁ, Petr VÁLEK, Ivana JANKOVSKÁ a Iva LANGROVÁ, 2014. Is the tapeworm able to affect tissue Pb-concentrations in white rat? In: *Parasitology*. 141:(6). Cambridge press, s. 826-36. DOI:10.1017/S0031182013002242.
- DESESSO, J M, C F JACOBSON, A R SCIALLI, C H FARR a J F HOLSON, 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol* [online]. 12(4), 385-433. DOI:10.1016/s0890-6238(98)00021-5.
- DIVERS, S. J., STAHL, S. J. 2019. 32 - Parasitology (Including Hemoparasites). *Divers, Stephan J a Scott J Stahl. Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. 3. © 2019 Elsevier. USA. s. 281-300. ISBN: 978-0-323-48253-0.
- FRAZER, Jennifer, 2020. Nematode Roundworms Own This Place. *Scientific american* [online]. USA: © 2020 Scientific american, a division of springer nature America, 9/20013. Available from: <https://blogs.scientificamerican.com/artful-amoeba/parasitic-roundworms-own-this-place/>.
- GABRASHANSKA, M., et al. 2016. Toxic elements in the Host/Parasite system Lamb/*Haemonchus contortus*. In: *Биогеохимия химических элементов и соединений в природных средах*. 143-147.
- GUERRANT, RICHARD L., DAVID H. WALKER a Peter F. WELLER. 2011. Part I: Nematode Infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*. 1. Saunders. USA. s. 729-812. ISBN: 978-0-7020-3935-5.
- GUPTA, RAMESH C., 2012. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. 2nd ed. Boston: Academic Press. ISBN 978-012-3859-266.

- HASCHEK, Wanda M., Colin George ROUSSEAU, Matthew A. WALLIG, Brad BOLON, Ricardo OCHOA a Beth W. MAHLER, 2013. Haschek and Rousseau's handbook of toxicologic pathology. Third edition. Boston: Academic Press. ISBN 978-012-4157-590.
- HAUKISALMI, V., WICKSTROM, L. M., HENTTONEN, H., HANTULA, J., & GUBANYI, A., 2004. Molecular and morphological evidence for multiple species within *Paranoplocephala omphalodes* (Cestoda, Anoplocephalidae) in *Microtus* voles (*Arvicolinae*). *Zoologica Scripta*, 33(3), 277–290. DOI:10.1111/j.0300-3256.2004.00148.x.
- HAUKISALMI, V., HARDMAN, L. M., HENTTONEN, H., LAAKKONEN, J., NIEMIMAA, J., HARDMAN, M., & GUBÁNYI, A., 2009. Molecular systematics and morphometrics of *Anoplocephaloides dentata* (Cestoda, Anoplocephalidae) and related species in voles and lemmings. *Zoologica Scripta*, 38(2), 199–220. DOI:10.1111/j.1463-6409.2008.00363.x.
- CHIUMIENTO, L a F BRUSCHI, 2009. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitol Res* [online]. 105(1), 593-603. DOI:10.1007/s00436-009-1483-0.
- CHUNCHUKOVA, Mariya; KUZMANOVA, Dimitrinka. 2017. Arsenic content in parasite-host system: *Alburnus alburnus*–*Pomphorhynchus laevis* and the impact of the acanthocephalan on his host. *Agricultural Sciences*. 9(22), 43-47.
- JANKOVSKÁ, Ivana, Iva LANGROVÁ, Vladimír BEJČEK, D MIHOLOVÁ, Jaroslav VADLEJCH a Miroslav PETRTÝL, 2009. Heavy metal accumulation in small terrestrial rodents infected by cestodes or nematodes. *Parasite*. 15(4), 581-8. DOI:10.1051/parasite/2008154581.
- JANKOVSKÁ, I., MIHOLOVÁ, D., BEJČEK, V., VADLEJCH, J., ŠULC, M., SZÁKOVÁ, J., LANGROVÁ, I. 2010. Influence of Parasitism on Trace Element Contents in Tissues of Red Fox (*Vulpes vulpes*) and Its Parasites *Mesocestoides* spp. (Cestoda) and *Toxascaris leonina* (Nematoda). *Arch Environ Contam Toxicol* [online]. 58 (1). 469–477. DOI: 10.1007/s00244-009-9355-2.
- JANKOVSKÁ, I., VADLEJCH, J., SZÁKOVÁ, J., KUNC, P., KNÍŽKOVÁ, I., LANGROVÁ, I. 2010. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Moniezia expansa* (Cestoda: Anoplocephalidae) and its final host (*Ovis aries*). *Ecotoxicology* [online]. 19 (1). 928–932. DOI: 10.1007/s10646-010-0474-3.
- JANKOVSKÁ, I., LUKEŠOVÁ, D., SZÁKOVÁ, J., LANGROVA, I., VADLEJCH, J., ČADKOVÁ, Z., VÁLEK, P., PETRTÝL, M., KUDRNÁČOVÁ, M. 2011. Competition for minerals (Zn, Mn, Fe, Cu) and Cd between sheep tapeworm (*Moniezia expansa*) and its definitive host sheep (*Ovis aries*). *HELMINTHOLOGIA* [online]. 48 (4). 237 – 243. [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.2478/s11687-011-0033-3.
- KLAASSEN, Curtis D, ed., 2008. Casarett and Doulls toxicology: The basic science of poisons [online]. 7. USA: The McGraw-Hill Companies. ISBN 0-07-147051-4.
- KRMENČÍK, Pavel, 2007. Toxikokinetika neboli cesta jedu organismem. *Biotox* [online]. ČR: Pavel Krménčík 2001-2007. Available from: http://www.biotox.cz/toxikon/toxikologie/j_kinetika.php.

- KUMARI, B, V KUMAR, A K SINHA, J AHSAN, A K GHOSH, H WANG a G DEBOECK, 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 1(15), 43–64. DOI:10.1007/s10311-016-0588-9.
- LANDRIGAN, P J, 1982. Occupational and Community Exposures to Toxic Metals: Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic. *The western journal of medicine* [online]. 137(6), 531-539.
- LIEBAU, E, V MULLER, R LUCIUS, R D WALTER a K HENKLE - DUHRSEN, 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. 77(1), 49-56. DOI:10.1016/0166-6851(96)02578-9.
- LIEBAU, E, V HECKELT, G WILDENBURG, P TEESDALE-SPITTLE, P M BROPHY, R D WALTER a K HENKLE-DÜHRSEN, 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem Journal*. 324(1), 659-666.
- LITTLEWOD, BRAY. 2000. Interrelationships of the Platyhelminthes: Systematics Association Special Volume. CRC Press. New York. ISBN: 0-7484-0903-3.
- LU, Y, N YEUNG a N SIERACKI, 2009. Design of functional metalloproteins. *Nature* [online]. (460), 855–862. DOI:10.1038/nature08304.
- MIYAZAKI, K, WATANABE, C, MORI, K, YOSHIDA, K a OHTSUKA, R, 2005. The effects of gestational arsenic exposure and dietary selenium deficiency on selenium and selenoenzymes in maternal and fetal tissues in mice. *Toxicology* [online]. 208(3), 357-365. DOI:10.1016/j.tox.2004.11.030.
- MOORE, D. 2018. Acanthocephala. *AccessScience* [online]. McGraw-Hill Global Education Holdings. USA. Available from: <https://www-accessscience-com.ezproxy.techlib.cz/content/001900>
- MORGAN, J M a H B BURCH, 1972. Comparative Tests for Diagnosis of Lead Poisoning. *Arch Intern Med*. [online]. 130(3), 335-340. DOI:10.1001/archinte.1972.03650030019005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. Arsenic in Drinking Water 2001. Update Washington, DC National Academy Press.
- NEEDLEMAN, H, 2003. Lead Poisoning. *Annual Review of Medicine* [online]. (55), 209-222. DOI:10.1146/annurev.med.55.091902.103653.
- NORDBERG, G F, 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238(3), 192–200. DOI:10.1016/j.taap.2009.03.015.
- NOMIYAMA, K, 1975. Toxicity of cadmium -Mechanism and diagnosis. *Heavy metals in the aquatic environment*. 1. New York: Pergamon Press, s. 15-25. ISBN 008018068x.
- PECHOVÁ, ALENA a JAROSLAVA VÁVROVÁ, 2019. Arsen. Datový standard MZ ČR DS 04.19.03: Národní číselník laboratorních položek MZ ČR 02.68.01 Národní zdravotnický informační systém (NZIS 202010) [online]. Praha: Národní centrum elektronického zdravotnictví Ministerstva zdravotnictví ČR. Available from: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJCDH.htm.
- PROZIALECK, W. C., & EDWARDS, J. R. (2012). Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and

- Therapeutic Interventions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(1), 2–12. DOI:10.1124/jpet.110.166769.
- RAUDENSKÁ, M, K ŠMERKOVÁ, V TANHAUSEROVÁ, et al., 2012. Metallothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám. *Praktický lékař*. 92(6), 322-326.
 - RATNAIKE, R N, 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J* [online]. 79, 391-396. DOI:10.1136/pmj.79.933.391.
 - ROHDE, K. 2018. Cestoda. AccessScience [online]. McGraw-Hill Global Education Holdings. USA. Available from: <https://www-accessscience-com.ezproxy.techlib.cz/content/122600>.
 - RUTHERFORD, J C, K J WALDRON, D FORD a N J ROBINSON, 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature*. 460(7257), 823-830. DOI:10.1038/nature08300.
 - SALVATORE, L, G WIJFFELS, J L SEXTON, M PANNACIO, S MAILER a T W SPITHILL, 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. 69(2), 281-288. DOI:10.1016/0166-6851(94)00205-2.
 - SANDERS, ALISSON, MATTHEW MAZZALLA, ASHLEY MALIN, GLEICY HAIR, STEFANIE BUSGANG, JEFFREY SALAND a PAUL CURTIN, 2008. Combined exposure to lead, cadmium, mercury, and arsenic and kidney health in adolescents age 12–19 in NHANES 2009–2014. *Research Gate* [online]. Germany. Available from: https://www.researchgate.net/publication/334737385_Combined_exposure_to_lead_cadmium_mercury_and_arsenic_and_kidney_health_in_adolescents_age_12-19_in_NHANES_2009-2014.
 - SCHEEF, G., SURES, B., TARASCHEWSKI, H. 2000. Cadmium accumulation in *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) from experimentally infected rats. *Parasitology Research* [online]. 86 (8). 688-691. DOI: 10.1007/pl00008553.
 - SEPPO, Saari. NÄREAHO, Anu a NIKANDER, Svem. 2019. Chapter 5 - Nematoda (Roundworms). 2019. *Canine Parasites and Parasitic Diseases*. 1. Academic Press. USA. s. 83-149. ISBN: 978-0-12-814112-0.
 - SOLANA, H D, J A RODRIGUES a C E LANUSSE, 2001. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitol Res* [online]. 87(1), 275-280. DOI:10.1007/pl00008578.
 - SURES, B, K GRUBE a H TARASCHEWSKI, 2002. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Hymenolepis diminuta* and its final host, *Rattus norvegicus*. *Ecotoxicology* 11, 365–368. *Ecotoxicology* [online]. 11(1), 365-368. DOI: 10.1023/A:1020561406624.
 - TEIMOORY, Salma, Aliakbar SABOUR YARAGHI, Mahsa Sadat MAKKI a Gholamreza MOWLAVI, 2014. Heavy Metal Bioabsorption Capacity of Intestinal Helminths in Urban Rats. *Iranian Journal of Public Health*. 43(3), 310-315.
 - TORRES, J., LAPUENTE, J., EIRA, C., NADAL, J. 2004. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoide sarfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus*

sylvaticus (Rodentia: Muridae) from Spain. Parasitol Res [online]. 94 (1). 468-470. DOI: 10.1007/s00436-004-1232-3.

- VAGHOLKAR, K., PAWANARKAR, A., VAGholkar, S., JAWANJAL, A., SUBUDHI, S., CHAUHAN, P., AGRAWAL, P. 2016. Surgical complications of round worm infestation. International Journal of Research in Medical Sciences [online]. 4 (6). 1838-1840. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20161460>.
- VÁVROVÁ, JAROSLAVA, 2019. Kadmium. Datový standard MZ ČR DS 04.19.03: Národní číselník laboratorních položek MZ ČR 02.68.01 Národní zdravotnický informační systém (NZIS 202010) [online]. Praha: Národní centrum elektronického zdravotnictví Ministerstva zdravotnictví ČR. Available from: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJCDE.htm.
- WANG, A, S D HOLLADAY, D C WOLF, S A AHMED a J L ROBERTSON, 2006. Reproductive and Developmental Toxicity of Arsenic in Rodents: A Review. International Journal of Toxicology [online]. 25(5), 319-331. DOI:10.1080/10915810600840776.
- WANI, Ab Latif, Anjur ARA a Jawed Ahmad USMANI, 2018. Lead toxicity: a review. National Center for Biotechnology Information Search database [online]. USA: U. S. National Library of Medicine, 6/2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961898/>.
- YEN NHI, Tran T, N. A MOHL SHAZILI a F SHAHAROM-HARRISON, 2013. Use of cestodes as indicator of heavy-metal pollution. Experimental Parasitology [online]. 113(1), 75-79.
- ZIMMERMANN S, SURES B, TARASCHEWSKI H. 1999. Experimental studies on lead accumulation in the eel-specific endoparasites *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala) as compared with their host, *Anguilla anguilla*. Arch Environ Contam Toxicol. 37(2):190-5. DOI: 10.1007/s002449900505. PMID: 10398769.

9 Seznam využitých obrázků, tabulek a grafů

9.1 Obrázky

obr. 1	Reakce MTF1 vůči působení kadmia in vivo.	12
obr. 2	Graf porovnávající koncentraci kadmia ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) uvnitř tkání hostitele v případě infikací vrtejší <i>Moniliformis moniliformis</i> oproti jedincům neinfikovaným dle experimentu Scheef et al. (2000)	17
obr. 3	Graf porovnávající koncentraci kadmia ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) uvnitř tkání vrtejšů <i>Moniliformis moniliformis</i> v závislosti na rozdílu pohlaví a váze helminta (Scheef et al. 2000).....	17
obr. 4	<i>Anoplocephaloides dentata</i> nalezené při výzkumu Haukisalmi et al. 2009.....	19
obr. 5	Vzhled skolexu <i>Paranoplocephala omphalodes</i> u jedinců nalezených při výzkumu Haukisalmi et al. 2004 v měřítku 0,50 mm.....	20
obr. 6	Mikrovlonné rozkladné zařízení CEM discover SP.....	21

9.2 Tabulky

tab. 1	Koncentrace olova v krvi ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a v tkáních (svaly, játra, ledviny) u jedinců <i>Ovis aries</i> a <i>Moniezia expansa</i> (mg / kg sušiny; průměr \pm SD) po 1 týdnu expozice Pb (Jankovská et al. 2010)	16
tab. 2	Porovnání akumulace esenciálních prvků a kadmia uvnitř tasemnice a ovčí tkáně (Jankovská et al. 2011)	16
tab. 3	Mann – Whitneyův u-test (dle proměnné Tasemnice) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace As	27
tab. 4	Mann - Whitneyův u-test (dle proměnné Tasemnice) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace Cd	28
tab. 5	Mann - - Whitneyův u-test (dle proměnné Tasemnice) porovnávající játra infikovaných a neinfikovaných jedinců – koncentrace Pb	28
tab. 6	Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace As.....	29
tab. 7	Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace Cd	30
tab. 8	Wilcoxonův párový test pro játra infikovaných jedinců a jejich parazitů – koncentrace Pb	31

9.3 Grafy

graf č.1	Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v sušině jater neinfikovaných jedinců	24
graf č.2	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v sušině jater neinfikovaných jedinců.....	24
graf č.3	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v sušině jater neinfikovaných jedinců	24

graf č.4	Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v sušině jater infikovaných jedinců.....	25
graf č.5	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v sušině jater infikovaných jedinců	25
graf č.6	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v sušině jater infikovaných jedinců.....	25
graf č.7	Histogram – Koncentrace (mg/kg) As v tkáních parazita	26
graf č.8	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Cd v tkáních parazita	26
graf č.9	Histogram – Koncentrace (mg/kg) Pb v tkáních parazita	26
graf č.10	Krabicový graf porovnávající koncentrace As (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných.....	27
graf č.11	Krabicový graf porovnávající koncentrace Cd (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných.....	28
graf č.12	Krabicový graf porovnávající koncentrace Pb (mg/kg) v játrech jedinců infikovaných a neinfikovaných.....	29
graf č.13	Krabicový graf porovnávající koncentraci Cd (mg/kg) v játrech infikovaných jedinců a jejich parazitů.....	30
graf č.14	Krabicový graf porovnávající koncentraci Pb (mg/kg) v játrech infikovaných jedinců a jejich parazitů	31

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

GIT – Gastrointestinální trakt

GTS – Glutathiontransferáza

MH - Mezihostitel

MT – Metalothionein

RP – Rizikový prvek

11 Přílohy

Příloha č. 1: Tabulka kompletních výsledků

Vzorek	Kód	Tkáň	Arsen (mg/kg)	Kadmium (mg/kg)	Olovo (mg/kg)
2V	S21/07/07	Játra	0,07173	0,01155	0,04829
4V	S21/07/20	Játra	0,41853	0,05538	0,04311
5V	S21/07/103	Játra	0,07716	0,01085	0,06239
7V	S21/07/108	Játra	0,02217	0,01936	0,06901
9V	S21/07/19	Játra	0,18308	0,01542	0,03203
11V	S21/08/07	Játra	0,04083	0,01154	0,05547
13V	S21/08/85	Játra	0,14565	0,01827	0,02111
15V	S21/10/26	Játra	0,02930	0,04143	0,06838
17V	S21/10/27	Játra	0,04221	0,03935	0,04936
19V	S21/10/39	Játra	0,02018	0,07763	0,03183
21V	S21/10/46	Játra	0,02383	0,02915	0,03930
23V	S21/10/55	Játra	0,06377	0,02551	0,06279
24V	S21/08/08	Játra	0,05472	0,01474	0,02956
25V	S21/08/09	Parazit	0,17015	0,04039	0,91986
26V	S21/08/40	Játra	0,04621	0,02191	0,04179
27V	S21/08/80	Játra	0,08273	0,03874	0,04921
28V	S21/08/83	Játra	0,05193	0,01723	0,02074
29V	S21/07/07	Parazit	0,00000	-0,00692	0,53739
30V	S21/07/103	Parazit	0,00000	0,00000	1,17984
31V	S21/07/108	Parazit	0,08083	0,03559	1,28509
32V	S21/07/20	Parazit	2,61154	0,13604	1,06809
33V	S21/08/07	Parazit	0,00000	0,00631	0,98189
34V	S21/08/08	Parazit	0,00000	0,00555	0,64369
35V	S21/08/40	Parazit	0,16657	0,04155	1,37921
36V	S21/08/80	Parazit	x	x	x
37V	S21/08/83	Parazit	0,11316	0,04132	0,52396
38V	S21/10/26	Parazit	0,00000	-0,01870	1,71505
39V	S21/08/85	Parazit	0,00000	0,00000	0,23930
40V	S21/10/27	Parazit	0,00000	0,10752	0,92320
41V	S21/10/39	Parazit	0,00000	0,30545	0,86163
42V	S21/10/46	Parazit	0,00000	0,00000	0,77810
43V	S21/10/56	Parazit	0,00000	0,00000	0,37006
44V	S21/07/10	Játra	0,04541	0,03047	0,06147
45V	S21/07/21	Játra	0,06017	0,03399	0,07100
46V	S21/07/25	Játra	0,03432	0,01130	0,02541
47V	S21/07/28	Játra	0,03026	0,01427	0,04142
48V	S21/07/29	Játra	0,02078	0,02650	0,06619
49V	S21/07/53	Játra	0,06722	0,00851	0,08014
50V	S21/07/104	Játra	0,22116	0,00637	0,08633
51V	S21/07/57	Játra	0,02735	0,00963	0,05536
52V	S21/07/23	Játra	0,03107	0,00697	0,07957

53V	S21/08/95	Játra	0,01535	0,06298	0,06275
54V	S21/10/20	Játra	0,03179	0,03677	0,03698
55V	S21/10/25	Játra	0,02003	0,02543	0,04526
56V	S21/10/45	Játra	0,04109	0,02731	0,03076
57V	S21/10/49	Játra	0,01190	0,02987	0,03772
58V	Blank		0,01000	0,00200	0,00400