

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



**Akumulace a transport olova v systému**  
**hostitel (*Rattus norvegicus*) / parazit (*Hymenolepis diminuta*)**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor. Ing. Zuzana Čadková, DiS.

Školitel: Prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

Školitel specialista: Doc. Ing. Ivana Jankovská, Ph.D.

Praha 2013

## Prohlášení

Prohlašuji, že předloženou disertační práci na téma „**Akumulace a transport olova v systému hostitel (*Rattus norvegicus*)/parazit (*Hymenolepis diminuta*)**“ jsem vypracovala samostatně a všechny zdroje informací použité při její tvorbě jsou uvedeny v kapitole Seznam použité literatury.

V Praze dne

.....

Ing. Zuzana Čadková, DiS.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Prof. Ing. Ivě Langrové, CSc. za odborné vedení během mého doktorského studia na Katedře zoologie a rybářství, ČZU v Praze. Za cenné rady a realizaci nezbytných chemických analýz velice děkuji také Prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc. a Ing. Daniele Miholové, CSc. Na tomto místě bych chtěla poděkovat i všem mým blízkým, kteří mě během celého studia podporovali. V neposlední řadě patří můj obrovský dík mému partnerovi Járovi za neutuchající trpělivost při zodpovídání stovek mých neustálých dotazů ohledně laboratorních potkanů, tasemnic, brouků, hlístic, epruvet, pipet, Petriho misek, formaldehydu, redestilované vody, mikroskopování, uchování vzorků, designu pokusu, odběrů krve inokulace a všeho ostatního možného i nemožného .....

# Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled.....	7
2.1	Hymenolepis diminuta (HD).....	7
2.1.1	Morfologie a fyziologie.....	8
2.1.2	Vývojový cyklus.....	10
2.1.3	Základní biologie.....	11
2.1.4	Experimentální inokulace.....	12
2.1.5	Vliv na fyziologii hostitele.....	14
2.2	Toxikokinetika Pb v organismu terestrických savců.....	16
2.2.1	Vstup do živočišného organismu / absorpce.....	16
2.2.2	Distribuce / akumulace v jednotlivých orgánech.....	20
2.2.3	Metabolismus / exkrece.....	23
2.2.4	Biodostupnost a toxikokinetika odlišných perorálně přijatých forem Pb.....	25
2.3	Toxikologie olova.....	26
2.3.1	Vliv na gastrointestinální trakt a játra.....	27
2.3.2	Vliv na nervový systém.....	27
2.3.3	Vliv na kardiovaskulární systém.....	28
2.3.4	Poruchy krvevotvorby.....	28
2.3.5	Vliv na renální systém.....	29
2.3.6	Ostatní vlivy expozice Pb.....	30
2.4	Akumulace rizikových prvků v GI helmintech.....	31
2.4.1	Mechanismy absorpce rizikových prvků v tkáni GI helmintů.....	31
2.4.2	Terénní studie.....	32
2.4.3	Experimentální studie.....	34
2.4.4	Využití GI parazitů pro biomonitoring kontaminace ŽP těžkými kovy.....	35
3	Vědecké hypotézy.....	38
4	Cíle práce.....	39
5	Materiál a metodika.....	40
5.1	Experimentální inokulace.....	40
5.1.1	Získání a chov pokusných zvířat.....	40
5.1.2	Experimentální inokulace.....	40
5.2	Příprava materiálů pro expozici Pb.....	41
5.3	Expozice Pb a bilanční fáze pokusu.....	41
5.4	Odběr, příprava a analýza vzorků.....	42
5.4.1	Orgány hostitele a tkáň parazitů.....	42
5.4.2	Moč a ve feaces hostitele.....	42
5.5	Statistické zpracování dat.....	43
6	Výsledky.....	44
6.1	Toxikokinetika sledovaných forem Pb v organismu potkana..... (octan olovnatý vs. Pistia stratiotes).....	45
6.2	Toxikokinetika Pb při nízké a zvýšené úrovni expozice.....	48
6.3	Ověření akumulační schopnosti H. diminuta pro Pb.....	52
6.4	Vliv H. diminuta na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele.....	57
6.5	Možnost příjmu Pb z enterohepatického cyklu u H. diminuta.....	59

7	Diskuse .....	60
7.1	Rozdílná toxikokinetika Pb z octanu olovnatého a z rostlinného hyperakumulátoru v organismu laboratorního potkana .....	60
7.2	Rozdílná toxikokinetika Pb při nízké a vysoké úrovni expozice.....	63
7.3	Ověření akumulační schopnosti H. diminuta pro obě sledované formy Pb a při nízké a vysoké expozici .....	64
7.4	Vliv H. diminuta na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele .....	67
7.5	Možnost příjmu Pb z enterohepatického cyklu u H. diminuta .....	71
8	Závěr.....	73
9	Seznam použitých zkratk.....	75
10	Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	76
11	Seznam použité literatury .....	77

# 1 Úvod

Enormní antropogenní emise olova (Pb) v minulém století a jeho persistence v životním prostředí způsobila, že dnes patří tento prvek mezi celosvětově nejrozšířenější polutanty. Spolu s ostatními těžkými kovy je tak již dlouhá léta zařazován mezi hlavní kontaminanty potravinového řetězce. Zpráva Environmentálního programu Spojených národů z roku 2010 udává, že intoxikací Pb je ohroženo 18-22 milionů lidí. Celkové počty organismů, vystavených zvýšenému množství tohoto prvku, však nelze vyčíslit. Je-li Pb uvolněno do životního prostředí, vstupuje ve formě znečištěného vzduchu, vody nebo půdy do biologických cyklů a může být přijímáno rostlinami i živočichy.

Toxické účinky (Pb) na živé organismy jsou přitom známy již od starověku a novodobé vědecké studie poznatky o jeho negativních vlivech neustále rozšiřují. Pb interaguje s funkčními skupinami některých životně důležitých enzymů. Tím ovlivňuje jejich působení a narušuje základní fyziologické funkce. Mezi nejzávažnější efekty expozice Pb u živočichů patří poruchy nervového systému, gastrointestinálního traktu, kardiovaskulárního systému, hypertenze, anemie, dysfunkce renálního systému, poruchy vývoje a reprodukce. Pb je však toxické i pro většinu rostlin.

Do živočišného organismu se Pb dostává především inhalací a ingescí. V případě perorální expozice Pb probíhá jeho nejintenzivnější absorpce v tenkém střevě. Tenké střevo je však zároveň predilekčním místem některých gastrointestinálních helmintů (GIH), včetně dospělců tasemnice *Hymenolepis diminuta*. Je tedy více než pravděpodobné, že v duodenu může docházet k interakcím mezi tímto kontaminantem a přítomnými parazity.

Toxikologicko/parazitologické studie z celého světa opakovaně prokazují zvýšené koncentrace různých těžkých kovů a rizikových prvků (včetně Pb) v tkáních gastrointestinálních helmintů. Ty často několikanásobně převyšují množství Pb v tkáních hostitele. Řada autorů se proto dnes zabývá potenciálním využitím těchto parazitů jako akumulujících indikátorů kontaminace životního prostředí. Vědecké databáze se tak rychle plní studiemi, popisujícími nové a nové druhy vhodných bioindikátorů z řad gastrointestinálních helmintů a to především z aquatického prostředí.

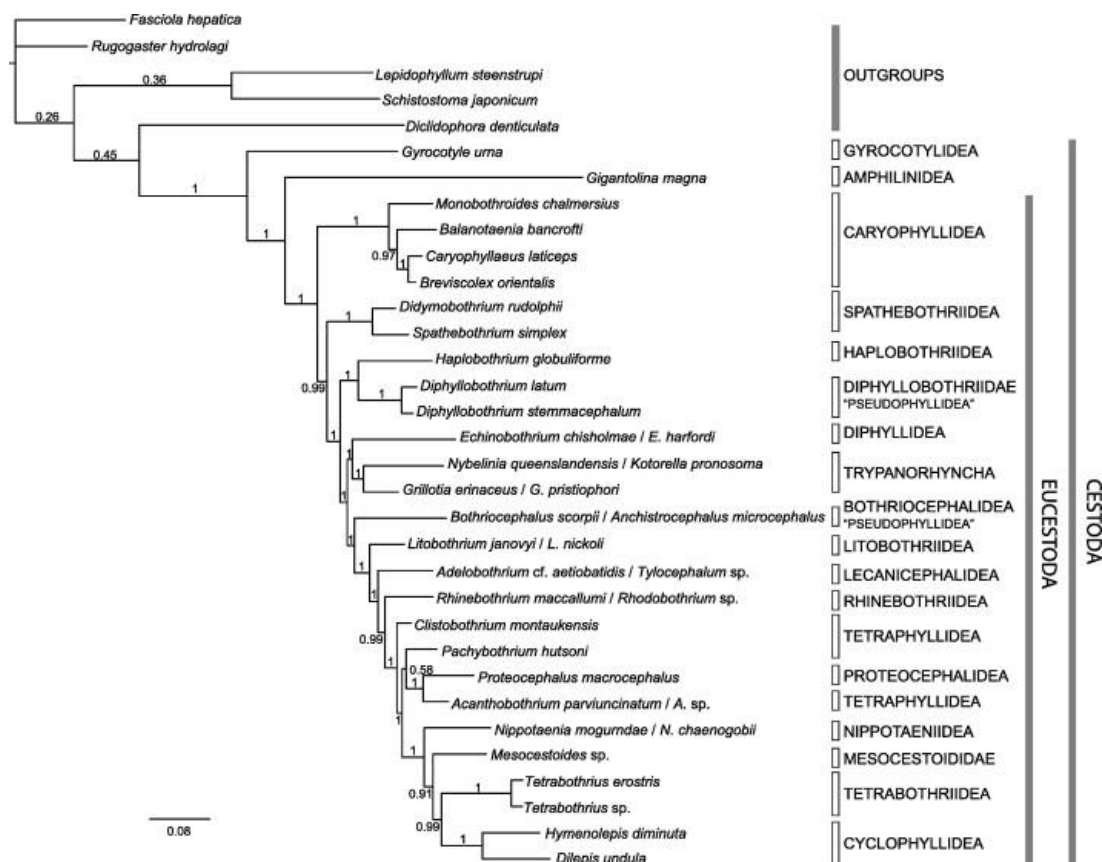
Tato myšlenka však skrývá některá úskalí, která je třeba před zavedením do praxe vyřešit. Například: Akumulují všechny skupiny GIH a jejich vývojová stadia kontaminanty stejně intenzivně? Jaké rizikové prvky GIH přijímají a které nikoli? Dělají v akumulaci rozdíly mezi jednotlivými formami daného prvku? Souvisí intenzita akumulace s intenzitou infekce či s celkovou biomasou parazitů v organismu hostitele? Je možné získat dostatečné množství tkáně parazitů k relevantním analýzám? Korelují koncentrace kontaminantu v tkáni parazita s jeho množstvím v životním prostředí? Některé z těchto otázek už své odpovědi mají, jiné je ještě potřeba vyřešit.

Tato disertační práce si proto klade za cíl objasnit základní interakce mezi hostitelem, parazitem a vybraným kontaminantem a stanovit vliv parazitace GIH na úroveň akumulace Pb v tkáních hostitele. Za účelem získání těchto poznatků byl realizován laboratorní experiment využívající standardní hostitelsko-parazitální model *Rattus norvegicus/Hymenolepis diminuta*.

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Hymenolepis diminuta* (HD)

Tasemnice krysí *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1981) Blanchard, 1891, syn. *H. flavopunctata*, *Taenia diminuta*, *T. leptcephala*, *T. minima*, *T. varesina* se vyskytuje geopolitně. Poprvé byla nalezena v duodenu druhu *Rattus norvegicus* (Berkenhout 1769), později však i u jiných rodů drobných terestrických savců z řádu Rodentia (Sciuridae, Gliridae, Dipodidae, Cricetidae, Muridae a Gerbillinae) jak uvádí Ryzhikov et al. (1978). HD má také zoonotický potenciál, což prokázaly nálezy Rohela et al. (2012) z oblasti Asie či Patamia et al. (2010) a Muñoz-Antolí (2012) z jižní Evropy. Nákaza tasemnicí krysí je ve většině případů asymptomatická, někdy se může vyskytnout anorexie, nevolnost, nespecifické bolesti břicha a průjem (Jíra, 1998). Taxonomicky náleží *H. diminuta* do kmene Plathelminthes, třídy Cestoda, čeledi Cyclophillidae a podčeledi Hymenolepididae. Od počátku 21. století je znám kompletní mitochondriální genom HD, který ve své studii popsali von Nickisch-Roseneck et al. (2001). V nedávné studii Haukisalmi et al. (2010) se autor přiklání k názoru, že současné označení *H. diminuta* zahrnuje komplex kryptických druhů. Fylogenetické vazby HD k ostatním zástupcům kmene Plathelminthes jsou zachyceny na obrázku č. 1.



Obrázek. 1. Aktuální přehled fylogenetických vztahů uvnitř třídy Cestoda založený na mtAt11AA + 18S + ssrDNA dle Waeschenbach et al. (2012)

### 2.1.1 Morfologie a fyziologie

Dospělá tasemnice HD je 20 - 60 mm dlouhá, v cervikální části široká 0,5 mm a v distální až 3,5 mm (Jíra, 1998). Skolex je opatřen čtyřmi přísavkami a rudimentálním rostelem bez háčků, čímž se morfologicky odlišuje od blízce příbuzné *H. nana*. V centrální části rostela je pak lokalizován apikální orgán, vznikající invaginací tegumentu. Strobila se skládá z 600 - 1000 kraspedotních článků, přičemž velikost terminálních segmentů je 0,75 x 3,5 mm (Jíra, 1998).

V každém článku se nachází set reprodukčních orgánů, nazývaný genitalium. Okolní prostor je označován jako proglotid (Roberts et Janovy, 1996). V horizontální ose článku jsou uložena tři kulovitá varlata, z nichž jedno se nachází poblíž genitálního otvoru a dvě na druhé straně proglotidu. Vaječník a Mehlisova žláza jsou umístěny mediálně. HD se dokáže rozmnožovat buď samooplozením (oplození mezi dvěma následujícími články jednoho jedince) nebo zkrříženou inseminací (mezi více jedinci uvnitř střeva hostitele) (Nollen, 1975). Dospělosti dosahuje HD okolo třináctého dne po nákaze finálního hostitele (v podmínkách *in vivo*) a přibližně o dva dny později při *in vitro* kultivaci (Berntzen, 1961). Pappas et al. (1999) však považují HD za dospělou až ve stáří 20 dnů.

Zralá vajíčka mají téměř kulovitý tvar (60 - 79 x 72 - 86  $\mu\text{m}$ ). Mezi vnějším a vnitřním vaječným obalem je bezbarvá želatinózní hmota, vnitřní membrána má dva polární hrboly bez filament. V onkosféře je 6 lancetovitých háčků (Jíra, 1998). Vajíčka se neuvolňují jednotlivě, ale teprve z rozpadlých článků - apolýza (Roberts et Janovy, 1996). Vajíčka HD jsou odolná vůči abiotickým vlivům vnějšího prostředí. Merwad et al. (2011) prokázali, že k poškození všech testovaných onkosfér dochází až při tlaku 300 - 600 MPa, působícím nejméně 60 vteřin.

Povrch těla tasemnice HD je tvořen komplexním syncytiálním tegumentem vzniklým fúzí jednotlivých buněk (Holy et al., 1991; Specian et Lumsden, 1980). Tegument se skládá ze dvou vrstev, vnější vrstvu tvoří souvislá cytoplasma (ektocytoplasma), pod níž se nachází vrstva jaderných buněčných těl (cytonů) zvaná perikarya. Tyto dvě vrstvy jsou odděleny tzv. plasmalemou a skrze ni pak propojeny můstky (tzv. internunciálními procesy), které umožňují transport molekul, např. polypeptidů z cytonů do spodní vrstvy tegumentu. Vnější cytoplasma je tvořena dvěma základními strukturami glykokalyxem a mikrotrichy (Holy et al., 1991).

Glykokalyx je filamentózní vrstva složená z uhlovodíků na povrchu jednotlivých mikrotrichů. Byla prokázána interakce glykokalyxu HD s některými molekulami uvnitř střeva hostitele, např. zvýšení aktivity amylázy hostitele a naopak snížení aktivity trypsinu, chromotrypsinu a pankreatické lipázy. Dále dokáže glykokalyx adsorbovat žlučové soli a absorbovat kationty. Výše zmíněné mechanismy se zřejmě uplatňují při absorpci živin, ochraně proti vlivu trávicích enzymů hostitele a zajišťují integritu povrchové membrány samotné tasemnice (Roberts et Janovy, 1996)

Mikrotrichy jsou struktury zvětšující absorpční povrch tegumentu. Celý tegument je metabolicky velice aktivní (Dalton et al., 2004), neboť zajišťuje příjem všech živin ze střeva hostitele. Tato absorpce je realizována několika způsoby, a to aktivním transportem, zprostředkovanou difuzí a



pasivní (jednoduchou) difuzí (Pappas et Read, 1975). Přičemž dle dle Pappase et al. (1999) převládá unikátní způsob zprostředkovaného přenosu. Mezi esenciální živiny u HD patří především glukóza (Starling, 1975), určité množství galaktózy (Oaks a Lumsden, 1971), malé množství aminokyselin (Wack et al., 1983), vitaminů (B<sub>6</sub>) (Robert et Mong, 1973) a tuků (Jacobsen et Fairbairn, 1967). Metabolismus aminokyselin je u HD velice limitován (Wack et al., 1983). Oproti tomu má HD vyvinut specifický transportní systém pro cholesterol (Johnson a Cain, 1988). Přední část tasemnice absorbuje více glukózy, než koncová část strobily a zároveň je zde glukóza intenzivněji zabudována do glykogenu. Anteriální oblast HD je proto považována za metabolicky neaktivnější (Pappas et al., 1999).

HD patří mezi organismy fakultativně anaerobní, neboť hlavní proces látkové přeměny u ní představuje fermentace (Dalton et al., 2004). Majoritním koncovým produktem energetického metabolismu jsou dle Robertse (1983) glukóza a laktóza, či acetát a sukcinát (Bennet et al., 1990; Watts a Fairbairn, 1974). Podle stejných autorů je hlavním exkrečním produktem u iniciálních stádií (6 dní staré tasemnice) kyselina mléčná, ovšem se vzrůstajícím věkem převažuje sukcinát. Bennet et al. (1993) uvádí jako hlavní koncový produkt u 6 dní staré HD laktát, vznikající cytosolickou glykolýzou, zatímco u 12 denní tasemnice se hlavními koncovými produkty metabolismu uhlovodíků stávají sukcinát a acetát. Gradient metabolismu závislý na věku byl u HD prokázán i pro mnoho jiných sloučenin.

Obrázek 2. Vývojová stádia *H. diminuta* – A. vajíčko; B. cysticerkoidy (Olympus BX51); C. dospělci



Foto: J. Vadlejch, Z. Čadková, P. Válek

### 2.1.2 Vývojový cyklus

Finálními hostiteli HD jsou většinou hlodavci (myši, krysy, potkani), především pak skladištní škůdci, u nichž jsou časté i vícečetné nákazy. HD však byla nalezena také u psů (Ehrenford, 1977) a sporadicky i u člověka. V těchto případech byla drtivá většina nákaz HD pozorována u dětí v rozvojových zemích (Jones, 1979; Patamina et al., 2010; Weisse a Raszka, 1996; Wiwanitkit, 2004). Naopak, ve vyspělých zemích je její výskyt u lidí ojedinělý (Edelman et al., 1965; Hamrick et al., 1990; Levi et al., 1987; Muñoz-Antolí, 2012).

Na rozdíl od blízké příbuzné *H. nana* zahrnuje vývojový cyklus *H. diminuta* vždy mezihostitele, kterými jsou různé druhy členovců, např. brouci rodů *Akis*, *Dermestes*, *Tenebrio*, *Tribolium*, blechy rodů *Nosopsyllus*, *Xenopsylla*, *Ctenocephalides*, nebo někteří motýli a mnohonožky. Ti přijímají vajíčka fekálně kontaminovanou potravou. Evans et al. (1998) i Pappas a Wardrop (1997) prokázali, že výkaly obsahující vajíčka HD jsou pro mezihostitele atraktivnější potravou, než faeces neinfikovaných jedinců. Při požívání vajíčka poškodí mezihostitel svými mandibulami mechanicky jeho vnější obaly, čím umožní uvolnění onkosféry. Pomocí penetračních žlázek a šesti háčků proniká onkosféra vybavená hexakantem ze střeva mezihostitele do hemocélu, kde dále dochází k růstu a diferenciaci skolexu (Read, 1972). Formování skolexu provází různé změny ve vývoji vnější stěny larvocysty. Při retrakci skolexu dochází k prohlubování mikrotrichů na vnější straně tegumentu, vzniku dutiny a vchlípení bazální membrány. Před finálním sevřením skolexu je pak ukončen také vývoj svalového systému (Richards a Arme, 1984a; b).

Invaginovaný skolex se nazývá metacestod a je obklopen ochranou cystou. Koncovou část tohoto vývojového stádia tvoří cercomer. Výsledkem celého procesu metamorfózy je larva (juvenilní stádium) zvaná cysticerkoid. Již tři dny po retrakci skolexu, i když ještě není ukončen vývoj stěny larvocysty, je metacestod infekční pro definitivního hostitele (Richardson a Arme, 1983). Celý vývoj v mezihostiteli přitom trvá od 5 do 15 dní v závislosti na okolní teplotě. Po uplynutí této doby zůstává cysticerkoid ve stavu pozastaveného vývoje až do doby, kdy se dostane do těla definitivního hostitele. Keymer a Anderson (1979) prokázali, že množství cysticerkoidů v mezihostiteli je závislé na jeho výživovém stavu a kondici. Dle Keymera (1980) není celková hustota larev v jednom mezihostiteli omezena, se vrůstajícím počtem však úměrně klesá jejich velikost.

Dojde-li k pozření mezihostitele finálním hostitelem, dostává se cysticerkoid do žaludku finálního hostitele, kde je stěna cysty částečně natrávena pepsinem. Poté se cysticerkoid postupuje do tenkého střeva, kde je vystaven působení žlučových solí a trypsinu, což vede ke kompletnímu rozkladu ochranné stěny larvocysty a aktivaci metacestodu (Rothman, 1959). Cysticerkoid pak napadá střevní epitel a vyvíjí se v dospělou tasemnici, která se fixuje na sliznici duodena nebo jejuna. Dle Reada (1959) poté nejméně 18 měsíců vykazuje stabilní denní přírůsteky (počet nově oddělených segmentů).

### 2.1.3 Základní biologie

Pozici v těle hostitele vnímá HD pomocí senzorických orgánů lokalizovaných podél celé strobily (Hopkins a Allen 1979). Podle potřeby se pak dokáže v lumenu střeva do jisté míry pohybovat (Read, 1970). Tato migrace přímo souvisí s příjmem potravy hostitelem. Sukhdeo a Kerr (1992) prokázali, že migraci vyvolá již příjem pouhého 1 g glukózy. Autoři dále uvádějí, že lokomoce HD je realizována vlněním celé strobily, přičemž každý proglotid vykazuje vlastní vnitřní pohybovou aktivitu.

Hostitel vysílá tasemnici informace o průběhu a načasování jeho denního stravovacího cyklu (Tanaka a MacInnis, 1975). Tasemnice na to reaguje změnou polohy uvnitř lumenu střeva. Jakmile hostitel začne přijímat potravu, posouvá se směrem k ústnímu otvoru. Studie prokázaly, že dokáže zaujmout výhodnější lokalizaci ještě dříve, než jsou živiny obsažené v nové dávce potravy uvolněny ze žaludku do tenkého střeva (Read, 1970; Chappell et al. 1970). Tímto chováním je schopna maximalizovat absorpci molekul živin uvolněných při trávicím procesu hostitele. Po skončení se tasemnice vrací do distální části tenkého střeva. Sukhdeo (1997) ovšem uvádí, že pohybovou aktivitu HD zapříčiňuje také fakt, že její přísavky jsou příliš slabé na to, aby udržely tasemnici na stejném místě v době silných peristaltických pohybů. Z tohoto důvodu adaptovala HD rytmy svého pohybu a synchronizovala je s posunem natráveniny. Kromě cirkadiálních přesunů realizuje dospělá HD také pohyby závislé na jejím věku a s postupem času se posouvá stále více dopředu tenkého střeva (Braten a Hopkins, 1969). Rozmístění tasemnice uvnitř tenkého střeva se detailně věnuje Dwinell et al. (2001).

Skupina tasemnic žijících ve střevě jednoho hostitele mezi sebou navzájem komunikuje. Tento signalizační systém popsali ve své práci poprvé Roberts a Insler (1982). Při vícečetných nákazách dochází například k rozrůznění doby dospívání jednotlivých individuí tak, aby ve střevě byly přítomni různě vyvinutí jedinci (Mead et al., 1986). Tasemnice také vylučují sloučeniny (Cook a Roberts, 1991), omezující celkovou biomasu parazita na úrovni zhruba 1 % hmotnosti hostitele. Biomasa tasemnic v těle potkana dosahuje maxima při infekci 5 - 10 jedinců (Hopkins a Andreassen, 1991). Jestliže počet tasemnic přítomných v tenkém střevě potkana výrazně překročí 10 jedinců, dochází k eliminaci infekce HD způsobené produkty samotných tasemnic. Tento jev se nazývá „crowding efekt“ a lze ho indukovat i uměle (Cook a Roberts, 1991). Při sekundárních a opakovaných infekcích je počet vypuzených a destrobilizovaných tasemnic vyšší, než při první naze (Andreassen a Hopkins, 1980; Featherston et al., 1992; Hindsbo et al., 1982).

Pokud je tasemnic méně než 10 mohou se udržet v hostiteli po celou dobu jeho života (Andreassen, 1991). U potkana chovaného v laboratorních podmínkách je přítom délka života až 3 roky. Oproti tomu infekce 50 cysticerkoidy byla z těla potkana kompletně vypuzena během 30 dní po infikaci (DPI) (Pike a Chappell, 1981). Zatím nejdelší dobu přežití HD zaznamenal Read (1967) a to 14 let. Tohoto věku však bylo dosaženo za pomoci periodických chirurgických zákroků a opakovaných reimplantací skolexu a krčku příslušné tasemnice do střeva dalšího potkana.

## 2.1.4 Experimentální inokulace

Potkan (*Rattus norvegicus*), jako běžné laboratorní zvíře představuje přirozeného definitivního hostitele *H. diminuta*. Z tohoto důvodu je HD již dlouhá desetiletí (Houser a Burns, 1968) využívána jako obecný model *in vivo* infekce tasemnicí v mnoha laboratořích po celém světě. *In vivo* i *in vitro* kultivační systémy HD patří díky mnohaletým zkušenostem a poznatkům mezi nejlépe pochopené a popsané mechanismy. Na rodu *Hymenolepis* byl proto kromě klasického medicínského výzkumu realizován také vývoj chemoterapeutik používaných v boji proti ostatním tasemnicím. Siles-Lucas a Hemphill (2002) uvádějí, že systémy kultivace HD jsou jedním z největších zdrojů informací o transportu různých substrátů a metabolismu dospělých helmintů. Experimentální infekce byla realizována kromě druhu *Hymenolepis diminuta* (přirozený definitivní hostitel potkan) také u *H. nana* (myš, člověk), *H. microstoma* (myš), *H. citelli* (křeček) a *H. pseudominuta* (myšice).

Mimo výzkumu zaměřeného na vývoj dospělců HD a její patologické a metabolické vlivy na definitivního hostitele byly zkoumány také larvální stádia v mezihostitelích, členovcích. Pro laboratorní inokulace jsou jako mezihostitelé nejčastěji využívány zástupci rodů *Tribolium* a *Tenebrio*. Inokulace u jednotlivých druhů a potažmo genetických variet mezihostitelů i finálních hostitelů má ovšem svá specifika. Například Yan a Norman (1995) prokázali variabilitu v citlivosti různých genetických typů rodu *Tribolium* k nákaze *Hymenolepis* spp. Keymer (1982) ani Shea (2005a; b) nezaznamenali rozdíly v intenzitě nákazy mezi samci a samicemi brouků, nicméně se vzrůstajícím věkem klesala jejich náchylnost k infekci. K naprosto opačným závěrům dospěl Shostak (2008), který zaznamenal větší prevalenci cysticerkidů u samic *T. confusum* a věk brouků u obou pohlaví v jeho studii neměl žádný vliv na úspěšnost inokulace. Vliv nákazy na biologii mezihostitele a mechanismy jeho odpovědi popsali již Heyneman a Voge (1971), Tan a Jones (1969), Lethbridge (1971) a Soltice et al. (1971).

Pozornost byla věnována také studiu obranyschopnosti, plodnosti, reprodukce a délky života brouků nakažených rodem *Hymenolepis*. V rámci své životní strategie - zvýšení šance na přenos infekce a dokončení vývojového cyklu, dokáže přítomnost cysticerkoidů HD ovlivňovat plodnost (Maema, 1986), reprodukci (Hurd, 1998; Webb a Hurd, 1995; Worden et al., 2000), snižovat produkci obraných sloučenin (Webster et al., 2000; Yan a Phillips, 1996) a prodloužit délku života mezihostitele (Hurd et al., 2001). Infekce však nemá vliv na váhové přírůstky mezihostitele (Shea, 2005b). Všechny tyto procesy usnadňují predaci brouků a tím i přenos vývojového stádia HD do finálního hostitele. Navíc vajíčka, která nepenetrují skrz stěnu trávicí soustavy a neprojdou úspěšně vývojem v tělní dutině mezihostitele, jsou opětovně vylučovány ve výkalech a mohou tak být znova pozřena (Pappas a Barley, 1999).

Nákaza cysticerkoidy HD ovlivňuje také ekologii společenstev infikovaných bezobratlých živočichů. Yan et al. (1998) popsali vliv tasemnice na kompetici mezi skupinami dvou mezihostitelů rodu *Tribolium castaneum/confusum*. V prostředí bez parazitů dominuje *T. castaneum*, je však také

náchylnější k infekci HD než *T. confusum*. Dalo by se tedy očekávat, že nákaza více zatíží a znevýhodní *T. castaneum*. Studie ovšem odhalila zvýšení pravděpodobnosti výhry tohoto druhu v kompetičním souboji, neboť infikovaná skupina vykazovala vyšší populační hustotu než skupina bez parazitů.

Mnoho studií bylo také zaměřeno na schopnost adaptace a přežívání dospělých HD v různých kmenech finálních hostitelů – potkanů. Ishih et al. (1992) porovnával citlivost 6 kmenů laboratorních potkanů k nákaze HD a šest týdnů po nákaze zaznamenal rozdíly v počtu přeživších parazitů i v jejich hmotnosti. Oproti tomu Chappell a Pike (1976), kteří porovnávali stejné parametry u dvou jiných kmenů potkanů, nezaznamenali u tasemnic žádné rozdíly. Dosud zjištěné výsledky zadávají předpoklad, že resistance k infekci HD má geneticky daný základ. Stradowski (2004) zdůrazňuje ve své studii vliv nejen kmene hostitele, ale také konkrétního kmene tasemnic, neboť výsledky zaměřené na citlivost k infekci HD různých kombinací parazit/hostitel se mohou diametrálně lišit. Kromě druhu a kmene finálního hostitele ovlivňuje biomasu a váhu jednotlivých tasemnic také jeho věk (Chappell a Pike, 1976; Pike a Chappell, 1981; Quinnell, 1988; Read, 1959). Chromanski (1981) zaznamenal výrazně nižší procento úspěšných experimentálních nálezů HD během zimního období roku (od prosince do března) a tuto skutečnost vysvětluje vlivem environmentálních podmínek jak na mezihostitele, tak na hostitele definitivního.

Metodika založení experimentální nákazy HD není striktně stanovena, a proto existuje mnoho modifikací, vycházejících z postupů různých výzkumných pracovišť a laboratoří. Jako nejběžnější mezihostitelé se od počátku používají příslušníci Coleoptera *Tenebrio molitor* (např. Blackburn et al., 1995; Dwinell et al., 1994) nebo *Tribolium confusum* (Movsesyan et al., 2008). Ovšem Stradowski (2004) využíval ve svém pokusu druh *Tribolium destructor*. Nákazu brouků provedli umístěním malého rozmělněného kousku gravidního proglotidu HD na filtrační papír, kde byli zástupci *Tribolium* ponecháni brouci po dobu 24 hodin při teplotě 28 °C bez jiného zdroje potravy. Stejně postupoval také Maema (1986), který ovšem inokuloval druh *Tribolium confusum*. Jiný způsob realizovali Yan et al. (1998), kteří druhům *Tribolium castaneum* a *Tribolium confusum* na filtrační papír podali vodou zředěné a rozetřené potkaní feaces, obsahující vajíčka HD, a opět je ponechali 24 hodin bez jiné potravy. Před samotnou inokulací navíc potkani neměli týden přístup k potravě. Shostak et al. (2008) použil pro nákazu pouze destilovanou vodu s přídatkem vajíček HD aplikovanou opět na filtrační papír. Sheiman et al. (2006) přimíchali vajíčka do jablečné šťávy. Po uplynutí tohoto počátečního období jsou inokulovaní brouci chováni ve standardních podmínkách s přístupem k potravě (celozrná mouka, ovesné vločky) *ad libitum*.

Inokulace potkanů může probíhat buď přirozenější cestou, kdy jedinci pozřou infekční cysticerkoidy jako součást krmiva, např. v uvařeném vaječném bílku (Stradowski, 2004), či ve fyziologickém roztoku (Starke a Oaks, 1999). Druhou variantou nákazy finálního hostitele je aplikace roztoku obsahujícího cysticerkoidy pomocí žaludeční sondy, kterou využívali např. Choromański (1981) a Ishih et al. (1992). Počty cysticerkoidů aplikovaných při nákaze potkanů se pohybují

v rozmezí od 2 (Choromański, 1981), 10 (Ishih et al., 1992; Movsesyan et al., 2008) až po 35 (Starke a Oaks, 1999). Liší se také stáří, ve kterém jsou metacestody tasemnic předkládány k perorální nákaze. Např. Ishih et al. (2003) i Stradowski (2004) využívali cysticerkoidy staré nejméně 4 týdny, ale Moczoń (2006) pracoval s cysticerkoidy mladšími (20 - 23 dní).

### 2.1.5 Vliv na fyziologii hostitele

*Hymenolepis diminuta* ovlivňuje fyziologii hostitele. Změnám některých fyziologických parametrů u potkanů vyvolaných přítomností HD se věnovali např. Dwinell et al. (1994, 1997, 1998) a Zimmerman et al. (2001), kteří signalizaci vysílanou od parazita k hostiteli nazývají „třetí drahou komunikace“. Tasemnice se své svrchní epidermis (tegumentu) uvolňují do lumenu střeva hostitele cyklické guanosin monofosfáty, např. 3',5'-cGMP (Kroening et al.; 2002; 2003). Tím dochází ke změně pohyblivosti střev a ke zpomalení transportu natráveniny do dalších částí zažívacího traktu (Dwinell et al., 1994, 1995; Zimmerman et al., 2008). Během hymenolepidóz je proto narušen především pasivní transportní systému uvnitř střeva definitivního hostitele.

Kyselé produkty z metabolismu glukózy uvnitř HD způsobují acidifikaci prostředí střeva hostitele (Mettrick, 1971a,b). Tento proces vede k redukcí mikrobiální fauny v infikovaném střevě (Burmakh, 1970), což následně způsobuje snížení schopnosti tasemnice absorbovat glukózu (Podesta a Mettrick, 1974). Snížení počtu aerobních bakterií je dále spojeno s redukcí pohybů střeva, což omezuje schopnost těla hostitele vypudit gastrointestinální parazity (Dwinell, 1997). Acidifikace je také příčinou inhibice aktivity trypsinu v tenkém střevě. Tento stav může chránit parazita před vlivem trávicích sloučenin hostitele (Uglen a Just, 1982). Movsesyan et al. (2008) zaznamenali zvýšené množství tukových buněk ve střevě potkanů, což bylo zřejmě následkem poruchy metabolismu tuků vyvolané přítomností HD. Poruchy trávicích a absorpčních procesů definitivního hostitele popisují také studie Meada a Robertse (1972), Mettricka (1971) a Novaka et al. (1993). Již 8 dní po infekci definitivního hostitele vyvolává přítomnost HD změny myoelektrických pochodů uvnitř střeva (Dwinell et al., 1995; 1998). Snížení reaktivity střevního svalstva chrání HD před vypuzením, usnadňuje její migraci a zvyšuje možnost absorbovat živiny. 26 DPI vyvolává HD mastocytózu ilea a způsobuje ztenčení jak mukózy tak *muscularis externa*. Toto poškození, stejně jako zpomalení normálního pohybu střev, přetrvává ještě 3 týdny poté, co je tasemnice z těla hostitele odstraněna (Starke a Oaks, 1999).

Během hymenolepidóz byly zaznamenány rozličné patologické, imunopatologické a fyziologické změny vnitřních orgánů hostitele (Arme et al., 1983; Arakcheeva, 1969; Raether a Hänel, 2003; Zubitskaya, 1974; Zubitskaya et al., 1972). U infikovaných potkanů a myší byly zaznamenány malformace na játrech, a to především léze v jaterním vaskulárním systému (Andearssen et al., 1978; Martin a Holland, 1984; McKay et al., 1990; Sanad 1991) a změny na žlučovodech (Evans et al., 1985). Všechny toxické produkty metabolismu parazita jsou neutralizovány v játrech (Arakcheeva,

1969; Rath a Walkey, 1987). Poškození jaterní tkáně je proto způsobeno současným působením látek, které produkuje parazit, a sloučenin, které vytváří na svou obranu samotný hostitel.

Movsesyan et al. (2008) zaznamenal 24 dní po nákaze HD změny ve střevní stěně hostitele zahrnující léze a zjizvení mukózy, dilataci apikálních částí a splývání klků, poškození vrstvy epitelu a její nahrazení plochými buňkami. Autoři zaznamenali také zeslabení kruhové vrstvy střevní svaloviny *tunica muscularis* i *tunica submucosa* a histopatologické změny v tkáni sleziny a nadledvinek. Výše uvedené změny ve střevní stěně hostitele mohou dle Huntera et al. (2007) a Movsesyana et al. (2008) vyvolat vznik kolitidy. Oproti tomu dnes existuje řada studií (Melon et al., 2010; McKay, 2006; Reardon et al., 2001), které uvádějí přítomnost HD jako preventivní prostředek proti vzniku střevní kolitidy u myši. Tento rozdílný efekt je způsoben tím, že u potkanů je HD často označována jako symbiont a nevyvolává silnou imunitní reakci, zatímco u myši indukuje tvorbu interleukinu-10, chránícího je před vznikem kolitidy (Hunter et al., 2005).

Nákaza helminty vyvolává obecně dramatické zvýšení počtu eosinofilů, které se stávají dominantním typem leukocytů a migrují do infikovaných tkání (Dent et al., 1990; Sanderson, 1991). Jejich přesná úloha při potlačování infekce HD však zatím nebyla objasněna. Tělo tasemnice jako celek obvykle není schopné vyvolat imunologickou reakci v lamina propria hostitele. Za jeden ze zdrojů antigenů v tenkém střevě považují Hopkins a Barr (1982) skolex. Dalším je pak dle Hoola et al. (1994) povrch tasemnice. Reakce imunitního systému na HD se však mohou u různých hostitelů výrazně lišit. Zvýšení počtu žírných buněk ve střevě hostitele dle Andreassena et al. (1990) způsobuje destrobilizaci a vypuzení HD z těla myši. Na druhou stranu u potkanů dochází dle Hindsboa et al. (1982) jen k malému zvýšení počtu těchto buněk i eosinofilů v mukóze infikovaných jedinců. U potkanů kmene Sprague-Dawley způsobuje infekce HD produkci protilátek typu IgE (Harris a Turton, 1973). Ovšem množství IgE se velice liší u různých kmenů potkanů (Andreassen et al. 1999). U myši jako definitivních hostitelů HD prokázali Van der Vorst et al. (1988) přítomnost IgA eozinofilů.

Dále byly v souvislosti s infekcí HD pozorovány poruchy hormonální regulace metabolismu tuků, které vedly ke snížení syntézy mastných kyselin v játrech a varlatech hostitele. Docházelo také ke snížení hladiny krevní glukózy (Claveria et al., 2005; Mangoud et al., 1991; Rath a Walkey, 1987). Isakk (1983) a Palmas et al. (1984, 1986) prokázaly ovlivnění obranyschopnosti hostitele, realizované protilátkami a T-lymfocyty. Dle Gabriele et al. (1986) tyto druhy imunitní odpovědi přímo korelují s intenzitou infekce. Při slabších infekcích (5 cysticeroidů) je dle Hindsboa et al. (1982) hlavním důvodem pro vypuzení tasemnic z těla hostitele reakce jeho imunitního systému. Při silnějších infekcích (25 - 30 cysticeroidů), je již eliminace parazitů způsobena především „crowding efektem“ samotných parazitů (Harris a Turton, 1973; Chappell a Pike, 1976).

Přítomnost HD způsobuje také změny v reprodukčním chování finálních hostitelů. Willis a Poulin (2000) zaznamenali, že samice potkana je schopná rozpoznat infekci HD ze stop v moči jejího potenciálního sexuálního partnera. S infikovaným samcem se proto nepáří.

## **2.2 Toxikokinetika Pb v organismu terestrických savců**

### **2.2.1 Vstup do živočišného organismu / absorpce**

Olovo vstupuje do živočišného organismu inhalací, ingescí a transkutánně (pouze organosloučeniny) (Sinicropi et al., 2010). V závislosti na mnoha faktorech (dávka, délka expozice, věk exponovaného jedince apod.) je obvykle po vdechnutí Pb prachu do krevního řečiště vstřebáno 30 - 40% Pb (Philip a Gerson, 1994). Jako rozhodující se v těchto případech jeví především velikost vdechovaných částic. Např. u submikronových částic Pb dosahuje absorpce z dýchacího traktu až 95% (Hursh et al., 1969; Wells et al., 1975). Anorganické sloučeniny Pb jsou jen minimálně vstřebávány pokožkou. Oproti tomu skrze ni dobře prostupují tetraetyl- nebo alkyl- olovo (Papanikolaou et al., 2005).

Vzhledem k tématu této práce je zbytek podkapitoly 2.2 zaměřen na chování Pb v organismu perorálně exponovaných jedinců.

#### **2.2.1.1 Lokalizace a mechanismus GI absorpce Pb**

Gastrointestinální (GI) absorpce anorganického (AN) olova probíhá především v tenkém střevě (Mushak, 1991). Experimentální studie na potkanech odhalily, že k nejvyšší absorpci dochází v duodenu (9,7% z orálně přijatého Pb). V dalších částech tenkého střeva již absorpce Pb výrazně klesá, přičemž v jejunu se pohybuje okolo 3,9 % a v ileu jen kolem 2,2 % z celkově přijatého množství. Castellino et al. (1995) uvádí, že absorpci Pb v ostatních partiích GI traktu (GIT) lze považovat za zanedbatelnou (0,88 % v žaludku a 0,14 % v tlustém střevě). Elsenhans et al. (2011) však prezentují myšlenku, že absorpce Pb v zadní části tenkého střeva (ileu) může být řádově vyšší než v duodenu, neboť natrávenina se zde zdrží až 20krát déle než v dvanáctníku. Samotný mechanismus vstřebávání Pb byl sledován také *in vitro* na modelových segmentech potkaního střeva, i *in situ* v prostředí myšního a kuřecího střeva (Aungst a Fung, 1981; Barton, 1984; Flanagan et al. 1979; Mykkaken a Wasserman, 1981), dosud však není plně objasněn.

Absorpce kovů ve střevě se obecně skládá ze dvou základních kroků: a) transport přes membránu z lumenu střeva do cytoplazmy buněk střevního epitelu, b) transport přes bazolaterální membránu do serózní tekutiny a dále do krevního řečiště. V interakci mezi buňkami střevního epitelu a Pb byly zatím zaznamenány dva základní procesy. Prvním z nich je aktivní transport kovu do tkáňových buněk následovaný sérií transepitelárních transportních mechanismů (Barton et al, 1984). Počátek tohoto procesu probíhá velice rychle a to již v prvních 10 minutách kontaktu Pb se střevní mukózou. Dekaney et al. (1996) uvádí, že k příjmu a transportu Pb do střevního epitelu mohou být využívány SH skupiny v buněčné membráně. Transepitelární transport následující po vstupu kationtů Pb do buněk je naopak výrazně pomalejší. Uvnitř střevních buněk dochází k reakci Pb s fosfátovou skupinou za vzniku kovalentní vazby. Tento jev lze označit jako protektivní, neboť imobilizované Pb



přestává být dostupné pro další epitelární transport. Díky tomu je dle Blaira et al. (1979) k povrchu serózy střevních buněk dopravena jen malá část přijatého Pb.

Druhý mechanismus transportu Pb ze střeva představuje pasivní difúze buňkami střevního epitelu, která probíhá paralelně s absorpcí vody (Blair et al., 1978). Pasivní difúze Pb je závislá na pH neboť při pH 4.4 probíhá až 2x intenzivněji než při standartních hodnotách intestinálního prostředí.

Ze střeva může být Pb absorbováno v ionizované podobě  $Pb^{+2}$  i ve formě AN a organických (OR) komplexů. *In vitro* studie Oomena et. al. (2003a) ukázala, že koncentrace absorbovaného ionizovaného  $Pb^{+2}$  jsou zanedbatelné oproti dominantním fosforečnanům olova a komplexům olova s kyselinou žlučovou. Komplexy s kyselinou cholovou či chenodeoxycholovou však mohou být labilní a tím zprostředkovat transport ionizovaného  $Pb^{+2}$  skrz buněčné membrány (Barton a Conrad, 1978).

Celková gastrointestinální absorpce také kolísá v závislosti na fyziologickém stavu (věk, lačnění, gravidita, dostatečný příjem minerálů) exponovaného organismu. Dalším neméně důležitým faktorem předurčujícím vstřebatelnost ANPb je pak fyzikálně-chemická charakteristika pozřené sloučeniny (velikost částic, rozpustnost, speciace) a jeho dávka. Následující část této podkapitoly je proto věnována stručnému popisu vlivu jednotlivých výše uvedených faktorů.

### **2.2.1.2 Vliv makro a mikroprvků na absorpci Pb z GI traktu**

Jak bylo uvedeno, mechanismus absorpce Pb z trávicího traktu zatím není přesně definován. Obecně se proto předpokládá, že pronikání Pb střevní mukózou a serózou i uvnitř buněk střevního epitelu je analogické s jinými bivalentními kationty, např. Fe a Ca. Pb zřejmě využívá shodné membránové přenašeče (Hammad et al., 1996; Yip et al. 1981); např. mechanismus označovaný jako transport bivalentních kationtů 1 (divalent metal transport 1 – DMT1 syn. DCT1 či NRAMP2), který je primárně určen pro transport esenciálních kovů, či kanálky pro transport Ca. Skutečnost, že DMT1 umožňuje kromě aktivního transportu esenciálních kovů jako Fe, Zn, Mn, Cu, Co, (Ni) i přenos kationtů Pb a Cd přes buněčné membrány potvrdil Gunshin et al. (1997). Mezi uvedenými prvky a Pb proto dochází k tzv. kompetitivní kinetice, při které má ovšem např. Fe 5x vyšší afinitu k DMT1 než Pb (Gunshin et al., 1997).

Již v roce 1978 prezentovali Ziegler et al. předpoklad, že dostatek Fe v potravě dokáže zabránit vstřebávání Pb ze střeva. Později potvrdily práce Bradmana et al. (2001) i Mahaffeye a Annesta (1986) spojitost mezi zvýšenými koncentracemi Pb v krvi (PbB) a deficitem železa v dietě. Bannon et al. (2002) dokonce uvádí, že Fe může příjem Pb kompletně zablokovat. U potkanů vyvolal nedostatek železa ve výživě zvýšený příjem Pb, což bylo zřejmě způsobeno navázáním Pb do proteinů, kam by se za normálních okolností ve střevě navázalo železo (Bannon et al., 2003; Barton et al., 1978b; Morrison a Quatermann, 1987). Na druhou stranu, práce Hershka et al. (1984), Lucase et al. (1996) a Serwinta et al. (1999) neprokázaly žádné korelace mezi příjmem Fe v potravě a množstvím Pb v organismu. Při absorpci Pb z GI traktu se tedy zřejmě kromě mechanismu DMT1, který je

dominantní v duodenu, uplatňuje také proces nezávislý na DMT1 probíhající v ileu, jak uvádí Elsenhans et al. (2011).

Absorbci Pb ze zažívacího traktu snižuje také dostatečný příjem vápníku (Bogden et al., 1992; 1995; Mahaffey et al., 1986). Mahaffey et al. (1986) a Ziegler et al., (1978) prokázali nepřímou úměru mezi množstvím přijatého vápníku a PbB u dětí a Blake a Mann (1983) i Heard a Chamberlain (1982) zdokumentovali nižší množství absorbovaného Pb, pokud je podáváno s uhlíčitanem vápenatým. Ke stejným závěrům dospěl také Barton et al. (1978a) při pokusu na potkanech. Naopak absence Ca v tenkém střevě, která způsobuje změny v elektrickém náboji a velikosti extracelulárních kanálků, zvyšuje více než dvojnásobně pasivní transport Pb skrz těsné spoje (zonulae occludens).

Podobně jako v případě Fe/Pb a Ca/Pb může docházet k interakcím s jinými bivalentními kationty: Cd, Co, K, Mg a Zn (ATSRD, 2007).

### **2.2.1.3 Vliv dalších sloučenin na absorpci Pb z GI traktu**

Mezi faktory redukující množství vstřebaného Pb patří zvýšený obsah fosfátů, alkoholu a tuku v potravě aj. (Blake et al., 1983; Blake a Mann, 1983; Barltrop a Meek, 1979; Barltrop a Khoo, 1975; Heard a Chamberlain, 1982). Také kyselina askorbová (vitamin C) omezuje absorpci Pb ze střeva a to tím, že v duodenu redukuje Fe<sup>III</sup> na Fe<sup>II</sup>, čímž zvýší jeho vstřebatelnost a usnadní kompetici s Pb (Suzuki a Yoshida, 1979a,b). Inhibici absorpce Pb ze střeva zprostředkovanou kyselinou askorbovou potvrzují také Dawson et al. (1999), kteří dále upřesňují, že vitamin C ovlivňuje entero-hepatickou recyklaci Pb díky katabolismu erytrocytů více, než zvyšováním množství Pb vyloučeného renálním systémem. Pokud je však kyselina askorbová přítomná ve střevě spolu s tyrosinem, argininem či aminokyselinami s SH skupinou (cystin, cystein, metionin) je intestinální absorpce Pb naopak zvýšena (Barton a Conrad, 1978; Garber a Wei, 1974). Uchikawa et al. (2009) a Beltcheva et al. (2012) poukázali na možnost, že absorpce Pb z GI traktu může být omezena při konzumaci některých potravinových doplňků, konkrétně pak řasy *Parachlorella beyerinckii* nebo zeolitů, které disponují vysokou sorpční kapacitou pro Pb. Navázané Pb, které není dostupné pro intestinální absorpci, je pak ve větší míře vylučováno z exponovaného organismu čímž se zefektivní proces detoxifikaci. Khotimchenko et al. (2006) popsali vysokou sorpční schopnost pro Pb u některých polysacharidů (pektin a alginát) a prokázali, že přítomnost těchto sloučenin v potravě omezuje absorpci Pb z GIT.

Žluč oproti tomu výrazně usnadňuje transport kationtů Pb přes mukózu epiteliálních buněk. V práci Bartona a Conrada (1978) vedlo podvázání žlučvodů u potkanů k redukcii absorpce Pb až o 50 % (z 9,7 na 5,96 %). Obdobných výsledků dosáhli také Cikrt a Tichý (1975), kteří předpokládají, že žluč obsahuje ligandy podporující absorpci Pb. Absorpci Pb z GI traktu rostla také v případech, kdy bylo Pb podáváno společně se sloučeninami snižující pH ve střevě např. citrátem sodným, kyselinou citronovou a ovocným džusem (Garber a Wei, 1974).

#### **2.2.1.4 Věk**

Bylo prokázáno, že gastrointestinální absorpce Pb je vyšší v dětství/u mláďat (až 50 %), zatímco dospělí jedinci vstřebávají jen 10 – 15 % přijatého množství (Heath et al., 2003; Markowitz, 2000a,b). Podobných výsledků dosáhli také Alexander et al. (1973, 1974) a Ziegler et al. (1978). Práce Hearda a Chamberlaina (1982), Jamese et al. (1985), Rabinowitze et al. (1980) a Watsona et al. (1986) uvádí pro dospělé dokonce pouze hodnotu 3-10% absorbovaného Pb při orálním podávání jeho vodného roztoku. Vysoké podíly absorbovaného perorálně přijímaného Pb vykazují naopak kojenní jedinci oproti těm po odstavu (Cory-Slechta, 1990; Kostial et al., 1971). Intoxikovaní mladí jedinci opic absorbovali při perorálním podávání octanu olovnatého 38% celkové dávky, zatímco dospělí jedinci pouze 26 % (Pounds et al, 1978) a mláďata potkanů vstřebala z potravy dokonce 40 – 50 krát více Pb než dospělá zvířata (Aungst et al., 1981; Forbes a Reina, 1972; Kostial et al., 1978). Tyto rozdíly mohou být dle Weise a La Vella (1991) způsobeny změnou potravy (z neonatální na dospělou) a postnatálním vývojem střev. Vysoké procento potenciálně absorbovaného Pb a současná vysoká frekvence specifického „hand-to-mouth“ chování u malých dětí, predisponuje tuto skupinu lidské populace k riziku zvýšené perorální expozice Pb.

#### **2.2.1.5 Délka expozice a lačnění**

Experimenty prokázaly, že při jednorázovém požití Pb přejde do krve pouze 6 % dávky, zatímco při pravidelné konzumaci kontaminantu se toto množství zvyšuje až na 60 – 80 % (ATSDR, 2007). Phillips et al. (2011) však ve svém 9 týdenním výživovém experimentu, realizovaném na ovčích, nezaznamenali změny v proporciální absorpci perorálně podávaného Pb. Příjem Pb z trávicího traktu závisí také na množství přítomné natráveniny. Čím více je střevo naplněné, tím méně Pb z trávicího traktu vstupuje do těla (Blake a Mann, 1983; Blake et al., 1983; Heard a Chamberlain, 1982, James et al., 1985, Maddaloni et al., 1998, Rabinowitz et al., 1980). James et al. (1985) prokázali, že pokud Pb pozře vyhladovělý jedinec, vstřebá se do jeho těla 63 % celkové dávky, ovšem pokud je Pb přijímáno jako součást běžné potravy, absorpce ze střeva klesá pouze na 3%. Také Heard a Chamberlain (1982) došli ve své studii k podobným závěrům. Na základě uvedených prací byl stanoven koeficient absorpce u krmených/lačnicích intoxikovaných jedinců na 0,04 – 0,2.

#### **2.2.1.6 Velikost dávky**

Beltcheva et al. (2012) stanovili ve své studii koeficient absorpce Pb střevní mukózou jako 15% z perorálně přijatého množství. Zdá se tedy, že celková GI absorpce Pb je závislá na požití dávce. Vztah mezi množstvím přijatého Pb a GI absorpcí však není zcela lineární (Conrad and Barton, 1978). Proces absorpce Pb má zřejmě limitovanou kapacitu a proto se může podíl Pb, které je absorbováno do těla se vzrůstající dávkou naopak snižovat. Na zvířecím modelu popsali tento jev Aungst et al. (1981), kdy po podání 1 mg Pb/kg absorbovali potkani 42 % dávky, zatímco při podání 100 mg Pb/kg pouze 1 %. O složitosti procesu absorpce Pb vypovídá také fakt, že zatímco závislost

dávka/množství Pb akumulovaného v tkáních (kost, játra, ledviny) je lineární, pro vztah dávka/koncentrace Pb v krvi (PbB) linearita neplatí (Casteel et al., 1997; Pocock et al., 1983; Sherlock a Quinn, 1986, Sherlock et al., 1984).

### 2.2.1.7 Forma Pb

Intenzita absorpce Pb patrně přímo souvisí s formou Pb, které vstupuje do exponovaného organismu. Nejčastěji jsou v této souvislosti zmiňovány 3 základní faktory: velikost částic, rozpustnost sloučeniny a speciace Pb. Fleming (1998) uvádí, že míra absorpce je nepřímo úměrná velikosti požitých částic Pb. Stejný autor také uvedl, že z rozpustných sloučenin je Pb v GI traktu absorbováno ve větší míře než z méně rozpustných. Jak uvádí tabulka 1 rozpustnost sloučenin Pb se ovšem značně liší v závislosti na tom, zda se jedná o vodu či simulované šťávy GI traktu.

Tabulka 1: Rozpustnost vybraných sloučenin Pb (%)

Sloučenina Pb	Uhličitan	Monoxid	Octan	Chlorát
H <sub>2</sub> O	0,8	0,5	99	97,4
Žaludeční šťáva; pH 1,5 (HCl, pepsin, H <sub>2</sub> O)	96,1	90,7	99,6	98,4
Střevní šťáva; pH 8,3 (NaHCO <sub>3</sub> ), pankreatin, H <sub>2</sub> O)	3,1	0,5	17,4	0,6

Již Barltrop (1975) ve své studii porovnal absorpci sloučenin Pb s různou rozpustností, přičemž hodnotu 100% dostupnosti (rozpustnosti) představoval octan olovnatý, s následujícími výsledky: Pb-kov (14%) < chroman olovnatý (44%) < naftenát olovnatý (64%) < octan olovnatý (100 %) < uhličitan olovnatý (164%). Vysokou hodnotu potenciální absorpce uhličitanu spojuje tento autor s jeho vysokou rozpustností v žaludeční šťávě. Absorbovatelnost podobnou octanu olovnatému prokázal Barltrop (1975) u ftalátu, zatímco vstřebatelnost naftenátu a oktoátu byla výrazně nižší. Freeman et al. (1994) došli na základě měření PbB k závěru, že celková biologická dostupnost perorálně přijatého octanu olovnatého je u potkanů 15 %.

Podrobněji se absorpci a následné toxikokinetice odlišných forem Pb v exponovaném organismu věnuje podkapitola 2.2.4.

## 2.2.2 Distribuce / akumulace v jednotlivých orgánech

Olovo, které vstoupí do organismu, je z 99 % zabudováno do stěn červených krvinek či hemoglobinu a je zde navázáno po dobu 30 - 40 dní u mužů a o něco déle u dětí a těhotných žen (Griffin et al., 1975; Chamberlain et al., 1978; Rabinowitz, 1991; Rabinowitz et al., 1976; O'Flaherty 1993). Proces navázání Pb do krevních buněk je velice rychlý neboť pouhých 5 minut po intravenózním podání Pb detekovali Hunder et al. (2000) v krvi 45 % administrovaného množství.

V erythrocytech je Pb vázáno několika intracelulárními proteiny, přičemž primárním vazebným ligandem je zde ALAD (dehydratáza kyseliny  $\delta$ -aminolevulinové) (Bergdahl et al., 1997a; 1998; Sakai et al., 1982, 2000; Xie et al., 1998). Zbylé 1 % absorbovaného Pb se nachází v krevní plasmě a séru, kde tvoří vazby hned s několika složkami a proto se zde existuje ve čtyřech formách. Dle Al-Modhefera et al. (1991) a Onga a Lee, (1980a,b,c) je 40 – 75 % Pb v krevním séru a plasmě vázáno na albumin nebo jiné proteiny s relativně nízkou afinitou k Pb, např. transferin (Brock, 1985). Dále se může Pb vyskytovat komplexované s ligandy s nízkou molekulární hmotností jakými jsou amino- nebo uhlovodíkové kyseliny či sulfhydrylové sloučeniny (např. cystein, homocystein); může být ovšem také pevně vázané na cirkulující metalloproteiny. Extrémně nízké procento celkového množství Pb v krevní plasmě pak tvoří volné (ionizované)  $Pb^{2+}$  (Al-Modhefer et al., 1991).

Cirkulaci krve uvnitř těla je Pb po dobu 4 – 6 týdnů distribuováno do měkkých tkání – jater, ledvin, aorty, mozku, plic, sleziny, ale také do kostí a zubů. U dospělých jedinců se přijaté Pb z 80 – 95 % ukládá do kostí (Hu et al., 2007; Rosin, 2009), u dětí je tato hodnota pouze kolem 70 % (Barry, 1981; O'Flaherty, 1995). Proto mají děti v porovnání s dospělými vyšší podíl akumulovaného Pb v měkkých tkáních (Patrick, 2006a). Hunder et al. (2000) prokázal, že již 5 minut po injekční aplikaci Pb je 15 % dávky uloženo v kostech a 10 dní po expozici je to až 95 %. Poločas odbourávání Pb v kostech je mnohem delší než v erythrocytech a dosahuje podle různých autorů od 5-10 let (Drash a Ott, 1988) až po 30 let (Rabinowitz, 1991). Ukládání Pb do kostí probíhá především v oblastech, které prochází nejintenzivnější kalcifikací (Aufderheime a Wittmers, 1992). Množství Pb v kostech vzrůstá s přibývajícím věkem (Wittmers et al., 1988) a v dospělosti je většina Pb v těle uložena v kortikálních kostech a zubech (Rabinowitz, 1991). Drasch et al. (1987) ale prokázali, že v určitých kostech (stehenní, pánevní) dosáhne akumulace maxima ve středním věku a poté postupně klesá.

Pb zabudované v kostech může být opětovně mobilizováno a uvolněno do krevního oběhu v procesu Gulsonem et al. (1996) nazývaném endogenní kontaminace. Proto během některých fyziologických stavů jakými jsou těhotenství, kojení, osteoporóza spojená s menopauzou nebo chemoterapie stoupá množství Pb v krvi (Beaney et al., 1990; Berkowitz et al., 2004; Bonithor-Kopp et al., 1986c; Hermandes-Avila et al., 2000; Symanski a Hertz-Picciotto, 1995; Klein et al., 1998; Markowitz a Weinberger, 1990; Nash et al., 2004; Silbergeld et al., 1988; Thompson et al., 1985). Během těhotenství může také Pb z kostí matky přecházet do kostry plodu (Gulson et al., 2003).

Mechanismus, díky kterému Pb vstupuje do měkkých tkání, dosud nebyl zcela objasněn (Bressler et al., 2005). I zde zřejmě, podobně jako v případě červených krvinek, funguje interakce Pb s transportními procesy Fe a Ca. Pb se v měkkých tkáních vyskytuje především navázáno na proteiny. DuVal a Fowler (1989) a Fowler (1989) identifikovali cytosolické proteiny s vysokou afinitou k Pb v ledvinách a mozku potkanů. Obdobné proteiny schopné vázat Pb izolovali Smith et al. (1998) také v lidských ledvinách. Přítomnost specifických proteinů pak způsobuje odlišnou toxicitu Pb pro různé orgány (Sinicropi et al., 2010). Pb se váže také na metallothionein, ovšem na rozdíl od kadmia či

zinku, není považováno za jednoznačný spouštěč tvorby takových proteinů (Eaton et al., 1980; Waalkes a Klaassen, 1985).

S ohledem na měkké tkáně se nejvíce Pb deponuje v játrech a ledvinách (Barry, 1975; Gerhardsson et al., 1986a; 1995b; Gross et al., 1975; Marques et al., 2006; Oldereid et al., 1993). Další podíly jsou lokalizované sestupně (pořadí dle koncentrace Pb) ve slinivce břišní, vaječnicích, slezině, prostatě, nadledvinkách, mozku, tělesném tuku, varlatech, srdci a kosterní svalovině. Schroeder a Tipton (1968) definovali pořadí jednotlivých orgánů s ohledem na podíl celkového Pb akumulovaného v těle následovně: játra (33 %), kosterní svalovina (18 %), pokožka (16 %), pojivová tkáň (11 %), tělesný tuk (6,4 %), ledviny (4 %), plíce (4 %), aorta (2 %), mozek (2 %) a jedno procento ve zbytku tkání. Orgány běžně testované na obsah Pb jsou svalovina, játra, střevo, reprodukční orgány a ledviny u savců případně žábry u ryb a peří u ptáků (de Buron et al., 2009). Projevem chronické expozice Pb je zvýšení jeho koncentrace v celé řadě tělních struktur (Wachs, 1982). Naopak dočasná expozice vyšším dávkám Pb či dlouhodobé působení velice nízkých koncentrací, vede ke zvýšení jeho množství především v játrech a preferovaných orgánech akumulace těžkých kovů (Hofer a Lackner, 1995). Poločas setrvání Pb v měkkých tkáních je dle Sinicorpi et al. (2010) několik týdnů.

Poměr Pb akumulovaného v jednotlivých orgánech je pro různé živočišné druhy odlišný. Např. ledviny volně žijících rejsků (*Sorex araneus*) v práci Tomáškové et al. (2003) obsahovaly 10 krát více Pb, než játra, zatímco Ieradi et al. (2003) zaznamenali jen dvou – trojnásobně vyšší koncentrace Pb v ledvinách v porovnání s játry volně žijících hlodavců (*Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*). Torres et al. (2006) definovali hladiny Pb v jednotlivých orgánech volně žijících myšic v následujícím pořadí: ledviny > játra > svalovina. Tersago et al. (2004) navíc upozorňují, že proces expozice a akumulace Pb v laboratorních podmínkách se může lišit od přirozeného životního prostředí.

Koncentrace Pb v měkkých tkáních jsou dle Barryho (1975) i Trebla a Thompsona (1997) relativně konstantní po celou dobu života. Nicméně Marques et al. (2005) detekoval nižší koncentrace Pb v kostech a ledvinách u starších zvířat, zatímco hodnoty Pb v játrech byly vyšší, než u mladších jedinců. To může vést k názoru, že distribuce Pb do jednotlivých orgánů a tkání se v průběhu života mění. Závislost akumulace Pb na vývojovém stádiu jedince potvrzuje Kostial et al. (1978), když zjistil, že u kojených potkanů se v porovnání s dospělými ukládá větší podíl administrovaného Pb do mozku, než do ledvin.

Množství Pb v těle obecně vzrůstá úměrně době expozice. Myši, kterým bylo Pb podáváno v pitné vodě v množství 1 g.l<sup>-1</sup> vykazovaly v játrech po 15 dnech expozice koncentraci 4 µg/g sušiny a po 90 dnech už dvojnásobné množství, tedy 8 µg/g (Marques et al., 2006). Topashka-Ancheva et al. (2002) však zaznamenali během laboratorní expozice myši (*Mus musculus*) trvající 120 dní vzrůstající jasný trend akumulace Pb pouze v kostech, zatímco koncentrace Pb v játrech, ledvinách a slezině začaly po 60 dnech expozice výrazně klesat.

### 2.2.3 Metabolismus / exkrece

Metabolismus anorganického Pb (ANPb) se skládá především z reverzibilních reakcí ligandů zahrnujících vznik komplexů s aminokyselinami a thioley neproteinové povahy, či vazbu s rozličnými proteiny (DeSilva, 1981; Everson a Petterson, 1980; Goering a Fowler, 1987; Goering et al, 1986; Ong a Lee 1980a; b; c; Raghavan a Gonick, 1977). Patrick (2006b) ovšem uvádí, že ANPb není uvnitř těla metabolizováno, ale je vylučováno v nezměněné podobě a to převážně v moči. Organické nebo alkyl-olovo prochází dle Bolanowské (1968) a Khoe a Thamanna (1931) v játrech oxidativní dealkylací na metabolity s vysokou neurotoxicitou (triethyl- a trimethyl- Pb). Může však probíhat i kompletní oxidace až na ANPb (Bolanowska, 1968).

Bez ohledu na způsob intoxikace je u dospělých jedinců během několika týdnů vyloučeno z těla 99 % přijatého Pb zatímco u dětí je v těle zadrženo kolem 70 % Pb (ATSDR, 2007). Intravenózně přijaté (i.v.p.) Pb je z těla vyloučeno především v moči a výkalech, přičemž poměr fekální/urinální exkrece je dle Chamberlaina et al. (1978) 0,5. Mechanismus fekální exkrece i. v. p. Pb není dle Patricka (2006a) zatím zcela objasněn. Hunder et al. (2000) uvádí, že může být způsobena např. deskvamací intestinálních enterocytů. Každopádně je ve výkalech z těla vyloučena asi 1/3 - 1/5 i.v.p. Pb (Robinowitz, 1976; Hunder et al., 2000). Samotné fekální exkreci zřejmě předchází sekrece Pb do žluče (v játrech), žaludečních šťáv a slin. Exkrece Pb žlučí byla prokázána kromě lidí také u psů, potkanů a králíků (Klaassen a Shoeman, 1974; O'Flaherty, 1993). Část i.v.p. Pb je z organismu eliminována glomerulární filtrací a následně vyloučena močí (Tsuchiya, 1986; Schramel et al., 1988). Dle Hundera et al. (2000) jsou během 10 dní po i.v.p. renální exkrecí vyloučena více než 3 % Pb.

Po perorální expozici Pb (300 µg/den) je však jeho vylučování dosti odlišné, neboť ve výkalech odchází z organismu přibližně 90 % denního příjmu a močí je odstraněno 12 % přijatého prvku. Ostatní gastrointestinální sekrece Pb zahrnující např. sliny, žaludeční šťávy, žluč a produkty pankreatu pak obsahují asi 2,4 % denní dávky Pb (Robinowitz et al., 1976). Při desetinásobně vyšších dávkách Pb (3 mg/den) však zaznamenal (Kehoe, 1987) pokles urinální exkrece na pouhých 5 %. Podobně jako u fekální exkrece, není ještě kompletně zdokumentován ani proces, kterým je ANPb vylučováno z organismu močí. Problém představuje především správné měření poměru glomerulární filtrace (ATSRD, 2007). Olovo může být v menší míře z těla vylučováno i nehty, slinami, potem nebo v mateřském mléce (Hohnadel et al., 1973; Omokhodion a Cockford, 1991).

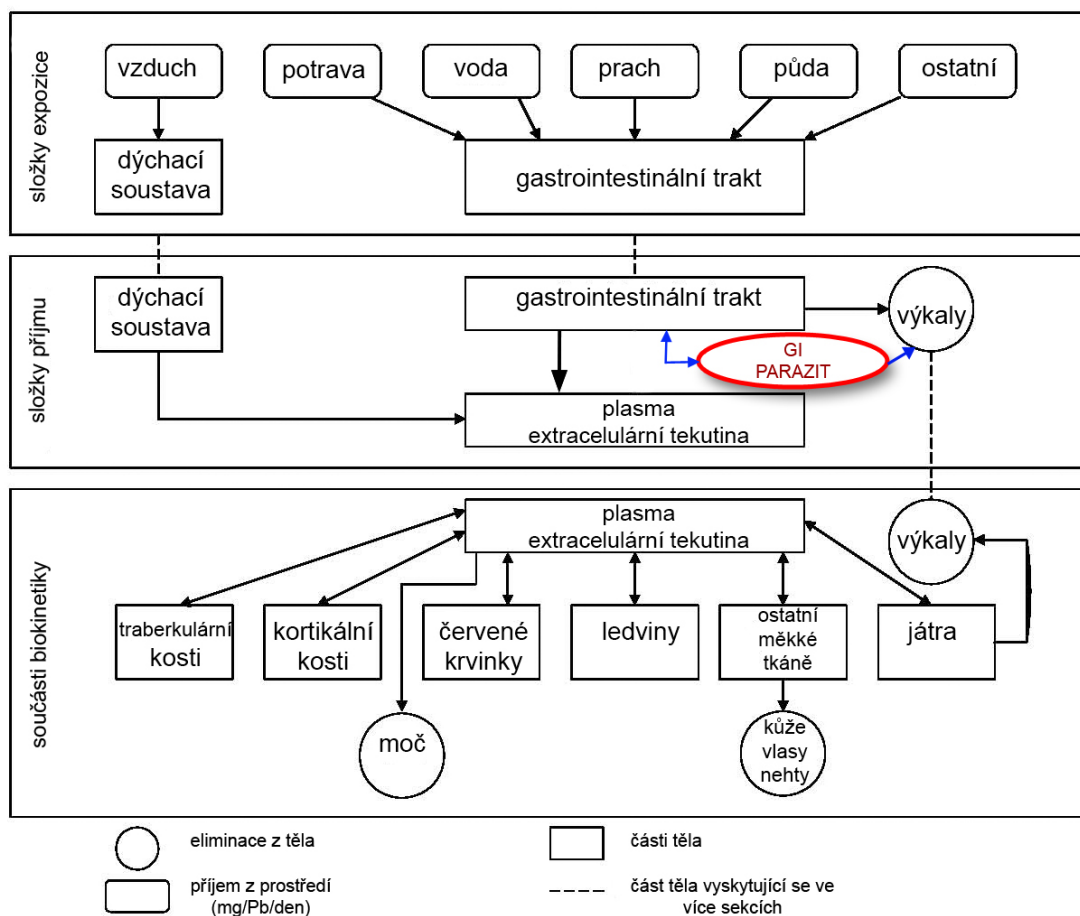
Za účelem schematického popisu procesů absorpce, distribuce, akumulace a exkrece Pb u intoxikovaného jedince byla vypracována celá řada fyziologických, farmakokinetických a farmakodynamických modelů. Farmakokinetické modely zahrnují matematické vyjádření příjmu a dispozice prvku v organismu, čímž kvantitativně popisují vztah mezi základními biologickými procesy (Krishnan et al., 1994). Na jejich základě je možné odhadnout koncentraci Pb v cílových orgánech v závislosti na různých cestách příjmu kontaminantu, jeho dávce a druhu testovaného organismu (Clewel a Andersen, 1985). Farmakodynamické modely používají matematický popis procesu

dávka/odpověď, za účelem kvantitativního popisu vztahu dávky, která dorazí do cílového orgánu a reakce, kterou prvek vyvolá, včetně jeho následné přeměny na metabolity.

Mnoho autorů sestavilo schémata příjmu Pb do organismu, jeho distribuce v těle a s tím souvisejících fyziologických procesů, drah metabolismu i způsobů vylučování z těla (Krishnan et al., 1994; Rabinowitz et al., 1976; O'Flaherty, 1987; 1991b; 1993; 1995a; Legget, 1993; EPA, 1994 a; b; Marcus, 1985a; b; c;). Zatím však neexistuje relevantní model biokinetiky či biodynamiky Pb v organismu zahrnující přítomnost a působení gastrointestinálních parazitů. Pro účely této práce bylo upraveno schéma US Environmental Protection Agency uveřejněné v roce 1994. Z obr. 3 je patrné, že GI parazit může velice významně ovlivnit chování Pb v intoxikovaném organismu tím, že zachytí ve své tkáni určité množství kontaminantu, které by za normálních okolností zasáhlo do následné biokinetiky prvku, potenciálně by se ve větší míře akumulovalo v orgánech hostitele a případně zvýšilo intenzitu toxického efektu Pb na organismus. Není dosud známo, zda parazit absorbovaný těžký kov také vylučuje z těla. Pokud ano, dostával by se tento podíl nepochybně do výkalů hostitele a navýšil by tak podíl fekální exkrece Pb.

Obrázek 3: Schéma integrovaného modelu expozice/příjem/biokinetika Pb v organismu

(upraveno dle EPA, 1994)





## 2.2.4 Biodostupnost a toxikokinetika odlišných perorálně přijatých forem

### Pb

Při hodnocení potenciálního množství kontaminantu, který se může dostat do tkání exponovaného organismu, se setkáváme se dvěma ukazateli. Prvním z nich je tzv. biodosažitelné (bioaccessible - BAC) množství, udávající podíl, který je organismu teoreticky přístupný po reakci s médií zažívacího traktu (Ruby et al., 1993). Biodosažitelnost se dnes hodnotí nejčastěji *in vitro* GI metodami (IVG) na základě Physiologically Based Extraction Testu (PBET) (Ruby et al., 1996). Při něm jsou sloučeniny sledovaného prvku rozkládány simulovanými šťávami zažívacího traktu (žaludeční, pankreatické a intestinální šťávy, žlučové kyseliny, sliny apod.) a sleduje se podíl prvku uvolněný do vzniklého roztoku. Předpokládá se, že do exponovaného organismu může být reálně absorbováno pouze zjištěné rozpuštěné množství prvku. GI šťávy mohou na sloučeniny sledovaného prvku působit odděleně, či v kontinuálním procesu simulujícím co nejpřesněji postupné střídání různých úrovní pH či různé délky zdržení v jednotlivých částech GI traktu. Data získaná oběma postupy se proto mohou i u stejných sloučenin daného prvku poměrně výrazně lišit.

Druhým obecně užívaným ukazatelem je pak přímo biodostupnost (bioavailability – BAV) sledovaného prvku. Relativní biodostupnost, je experimentálně stanovována *in vivo*, neboť udává konkrétní podíl prvku, absorbovaný do tkání exponovaného organismu. Kromě samotné rozpustnosti v médiích zažívacího traktu, je BAV ovlivněna schopností absorpce prvku skrz intestinální epitel. Ellickson et al. (2001) uvádí, že intestinální absorpce je přímo limitována motilitou GI traktu a speciací prvku (vazebné struktury – volné ionty vs. komplexy s exogenními sloučeninami z potravy či se sloučeninami GI traktu). Hodnoty BAC jsou proto vyšší než BAV (Ellickson et al., 2001).

Biodostupnost Pb je v porovnání s jinými rizikovými prvky hodnocena jako velmi nízká (Phillips et al., 2011). To je patrně jeden z hlavních důvodů, proč drtivá většina dosud publikovaných vědeckých studií hodnotila především biodostupnost Pb přímo z kontaminované půdy. S ohledem na zaměření této disertační práce však toto téma nebude dále podrobněji řešeno. Jen ojediněle se setkáme s informacemi o BAC nebo BAV z běžných složek potravy (např. rostlinných a živočišných tkání). Intawongse a Dean (2008) zdokumentoval za využití PBET biodosažitelnost Pb z různých druhů zeleniny (salát, špenát, mrkev a ředkvička). Působením simulovaných žaludečních šťáv byl v rámci jejich studie uvolněn menší podíl (11 – 27 %) z celkového obsahu Pb v rostlinném materiálu než působením intestinálních šťáv (20 - 61 %). Biodosažitelnosti Pb z živočišných tkání se věnovali Mateo et al. (2011), kteří došli k závěru, že BAC podíl Pb se výrazně zvýší, pokud kontaminované tkáně projdou tepelnou úpravou. Navíc podíl BAC Pb roste přímo úměrně hodnotě pH varného roztoku. Regoli a Orlando (1994) v experimentu na myších prokázali, že se liší BAV i úroveň exkrece Pb pocházejícího z živočišných tkání (mušlí) a z octanu olovnatého. Tyto rozdíly autoři přičítají odlišnosti administrovaných chemických forem Pb. Konkrétní specifikaci forem Pb přítomného v mušlích se však tito autoři dále nezabývali.

## 2.3 Toxikologie olova

Existují četné vědecké důkazy o tom, že Pb způsobuje celou řadu zdravotních problémů. Za hlavní cílový orgán toxicity se dnes považuje nervový systém. Systémové účinky Pb zahrnují gastrointestinální poruchy, anemii, encefalopatii, hypertenzi, renální selhání, poškození sluchu, neuropatie, poruchy metabolismu vitamínu D, zpomalení růstu, poruchy imunitního systému, dysfunkce nervového systému, behaviorální a kognitivní změny, pokles inteligenčního kvocientu u dětí. Dále se toxicita Pb projevuje také poruchami vývoje, nežádoucími účinky na reprodukční systém a poruchami vedení nervového vzruchu (ATSDR, 2007). Hromadění Pb v organismu ovlivňuje většinu žláz s vnitřní sekrecí, oddaluje nástup puberty a snižuje plodnost u žen (Doumouchtsis et al., 2009). Pb je specifické v tom, že u něho jako u jednoho z mála prvků panuje mezi zainteresovanými institucemi (CDC, ATSDR, EPA) shoda o tom, že jeho toxické účinky musí být považovány za bezprahové (Patrick, 2006b).

Patogeneze toxicity Pb zahrnuje mnoho faktorů. Pb přímo narušuje aktivaci enzymů, kompetitivně potlačuje absorpci některých důležitých stopových prvků, váže se na thiolové proteiny a porušuje tak syntézu strukturálních proteinů, ovlivňuje homeostázu vápníku a snižuje hladinu dostupných rezerv thiolových antioxidantů uvnitř těla (Ercal et al., 2001). Stejně jako jiné toxické kovy má Pb tendenci katalyzovat oxidativní reakce a vytvářet reaktivní formy kyslíku (hydroperoxydy, peroxid vodíku a singletní kyslík). Tím přispívá k produkci volných radikálů. Ničivé účinky volných radikálů na tkáň a buněčné složky jsou považovány za nejzávažnější faktor patologických změn vyvolaných intoxikací Pb (Patrick, 2006b), přičemž citlivost k vyvolanému oxidačnímu stresu je závislá na stáří jedince (Tandon et al., 2002). Těmto změnám lze předcházet zvýšením dostupnosti antioxidantů na buněčné úrovni. Mezi takové sloučeniny patří dle Gurera a Ercala (2000) např. N-acetylcystein (Ercal, 1996; Neal, 1997), zinek (Batra et al., 1998; Flora et al., 1982), vitamin B<sub>6</sub> (Mc Gowan, 1989; Tandon et al., 1987), vitamin C (Dalley et al., 1990; Patra et al., 2001) a E (Levander et al., 1977, Chaurasia a Kar, 1997; Packer, 1991), selen (Flora et al., 1982; Othman a Missiry, 1988), taurin (Selvaraj et al., 2006), methionin (Jurzus et al., 2006; Patra et al., 2001) a alfa-lipoová kyselina (Pande a Flora, 1982; Packer a Witt, 1995; Sivaprasad et al., 2002;). Tyto látky potlačují ničivé účinky Pb a zvyšují efektivitu chelátů, využívaných při odstraňování následků intoxikace Pb (Flora et al., 1994; 2003; 2004; Sivaprasad et al., 2004). Dle studie Hofmanna a Segewitze (1975) však chelátové terapie není vhodná při řešení akutních intoxikací Pb. Tandon et al. (2001) prokázal, že negativní účinky působení Pb byly u myši redukovány konzumací čerstvého česneku, který podněcuje tvorbu glutathionu, biosyntézu metalothioneinů a podobných proteinů a má antioxidační vlastnosti.

Kvalita řady vědeckých zjištění však dnes ještě není dostatečná k tomu, aby bylo možné provést relevantní odhady pro všechny známé účinky olova. Dostatečný objem informací, pro seriózní posouzení vztah dávka/odpověď byl získán a popsán pro následující vlivy Pb: neurotoxické účinky (pokles inteligenčního kvocientu), vzestup krevního tlaku, gastrointestinální účinky a anemie. Bylo

však prokázáno, že vztah dávka/účinek není lineární, ale spíše kvadratický, neboť při nižších hodnotách PbB je nárůst projevů silnější než při vysokých hladinách PbB (ATSRD, 2007).

### 2.3.1 Vliv na gastrointestinální trakt a játra

Expozice vysokým dávkám Pb vyvolává koliky GIT (ATSRD, 2007). Mezi další symptomy patří bolesti břicha, nevolnost, zvracení, zácpa, paralýza střev, poruchy příjmu potravy a úbytky váhy. Tyto příznaky se dle Mudipallho (2007) projevují při PbB 30 – 80 µg/dl zatímco dle studie ATSRD (2007) při PbB 100 – 200 µg/dl. Pozření Pb je dle Mudipallho (2007) jednou z hlavních příčin jeho toxického vlivu na játra. Během intoxikace Pb se v játrech zvyšuje hladina metalothioneinů (Maitani et al., 1986), což představuje ochranný mechanismus proti toxickým vlivům Pb (Rosenman, 2000).

Pro testování funkce jater jsou monitorovány hladiny AST (asparat aminotrasferázy) a ALT (alanin aminotrasferázy) v séru či jaterním homogenizátu. Singh et al. (1994) sledovali pokles obou zmíněných faktorů v jaterním homogenizátu u potkanů intoxikovaných po dobu čtyř týdnů octanem olovnatým. Phillips et al. (2011) prokázali negativní vliv Pb na proces trávení u přežvýkavců projevující se sníženou schopností stravitelnosti dlouhých částic potravy. Vysoké dávky Pb pak mají přímý patologický účinek na GI systém projevující se např. dilatací mikrocirkulace v žaludeční sliznici doprovázené odlupováním povrchových buněk sliznice (Verschoyle a Little, 1981) či porušením vrstvy glykokalixu doprovázené výskytem degenerativních lézí na povrchu střevních klků, jejich deformacemi až úplnou absencí (Tomczok et al., 1988).

### 2.3.2 Vliv na nervový systém

Dle WHO (1996) jsou dnes neurotoxické účinky Pb z veřejně zdravotního hlediska považovány za nejvýznamnější. Neurologický efekt Pb je vysvětlován schopností napodobovat nebo inhibovat procesy, které jsou závislé na přítomnosti vápníku a také schopnosti Pb interagovat s buněčnými proteiny. S největší pravděpodobností sehraává zásadní úlohu substituce vápníku olovem, resp. touto cestou zprostředkovaná interference Pb s rolí Ca jako druhého posla v neuronech (Needleman, 2004). Cheong et al. (2003) v *in vitro* experimentu prokázali, že transport Pb do potkaních astrocytů probíhá nejméně dvěma různými mechanismy. Při pH 5,5 vstupuje Pb do astrocytů za využití DMT1a jeho příjem je proto výrazně inhibován zvýšeným množstvím extracelulárního železa. Druhý mechanismus transportu, probíhající při pH 7,4 nebyl zatím jasně definován, může však být inhibován specifickými přenašeči aniontů. Pb inhibuje synaptickou transmisí tím, že blokuje napětím regulovaný kalciový kanál, čímž inhibuje vstup kalcia do buňky a uvolnění neurotransmiterů. Nejzávažnější neurologický efekt Pb je encefalopatie vznikající při akutních intoxikacích (Needleman, 2004). K encefalopatii dochází při hodnotách plumbémie kolem 90 µg/dl (u dětí) a 140 µg/dl (u dospělých).

Mezi prvotní neurologické příznaky intoxikace Pb patří neklid, podrážděnost, bolest hlavy, snížená reakční rychlost, ztráta paměti a porucha kognitivních funkcí. Dále jsou široce zdokumentované poklesy IQ u dětí a behaviorální problémy vyvolané expozicí Pb. Poruchy učení byly potvrzeny i studii na potkanech (Cory-Slechta, 1997). Tyto poruchy jsou zřejmě způsobené změnami transmitterů v mozku (dopamin, cholin, glutamin), které expozice Pb vyvolává (Davis a Svendsgaard, 1990). Nejvíce neurotoxických efektů v porovnání s vyššími hodnotami plumbémie vzniká při PbB do 10 µg/dl. Důvodem může být to, že nízké dávky Pb v těle nevyvolají obranné mechanismy (indukce metalotioneinu a glutationu), eliminující vlivy Pb (Bae et al., 2001; Cranfield, 2003).

### 2.3.3 Vliv na kardiovaskulární systém

Pb způsobuje rozličné kardiovaskulární změny u lidí i zvířat (Vaziri a Sica, 2004). Studie na zvířatech prokázaly, že dlouhodobá expozice Pb může vyvolat zvýšení krevního tlaku u potkanů s nedostatky ve výživě (Carmignani et al., 1988; Iannaccone et al. 1981; Khalil-Manesh et al., 1993; Victory et al., 1982a;b) a umožnili identifikovat případné mechanismy tohoto vlivu (Carmignani et al., 2000; Ding et al., 1998; Gonig et al., 1997; Purdy et al. 1997; Vaziri a Ding, 2001; Vaziri et al., 1999a;b; 2001) Schwartzem (1995) provedená meta-analýza 15 prací odhalila signifikantní asociaci mezi expozicí Pb a zvýšením krevního tlaku u mužské části lidské populace. Dle tohoto autora pokles plumbémie z 10 na 5 µg/dl koreluje s poklesem systolického tlaku o 1,25 mm Hg. Podobné výsledky ve své práci prezentují i Nawrot et al. (2002), Pirkle et al., (1998), Schwartz (1988), Staessen et al. (1994) i analýzy dat získaných v rámci National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II). Asociace mezi krevním tlakem a expozicí Pb u žen není dokumentován tak dobře. Nicméně dle Nawrota et al. (2002) vyvolá zdvojnásobení koncentrace Pb v krvi u žen vzestup systolického krevního tlaku o 0,8 mm Hg.

Zvýšené hladiny Pb v krvi (20-29 µg/dl) významně korelují se všemi oběhovými poruchami a úmrtím na kardiovaskulární choroby (Lustberg a Silbergeld, 2002). Kishimoto et al. (1995) v *in vitro* experimentu prokázal, že Pb inhibuje samotnou tvorbu krevních kapilár. Expozice Pb způsobuje změny v metabolismu tuků a to především zvýšení peroxidace tuků a snížení aktivity krevní superoxid dismutázy (Adonaylo a Oteiza, 1999). Tím může dojít k narušení tkáňových membrán, což následně vede ke zvýšenému riziku vaskulárních onemocnění. Skoczynska et al. (1993) zaznamenala u potkanů po podávání malých dávek Pb atrofii elastických vláken v aortě.

### 2.3.4 Poruchy krvetvorby

Olovo, jako dvojmocný kationt ovlivňuje díky své vysoké vazebné kapacitě pro thiolproteiny enzymy a strukturální proteiny. Prostřednictvím inhibice enzymů, účastnících se na biosyntéze hemu vede expozice Pb ke vzniku anémie. Vznik anémie při intoxikaci Pb je způsobován kombinací dvou

faktorů. Jednak poklesem syntézy hemoglobinu (v důsledku poruchy syntézy hemu a globulinu), za druhé pak zkrácením doby přežívání erytrocytů (ATSDR, 2007; National Research Council, 1995). Mezní hodnota plumbémie pro iniciaci nepříznivých vlivů na krvetvorbu je udávána kolem 50 µg/dl u dospělých a o 10 µg/dl méně u dětí. Schwartz et al. (1990) však posouvá hranici pro hematologické účinky na hodnotu 20 µg/dl a naopak studie institutu ATSDR (2007) pracuje v souvislosti s anemií s hodnotou několikanásobně vyšší, 70 µg/dl u dětí a 80 µg/dl u dospělých.

Mezi dobře zdokumentované změny krevních parametrů vyvolané expozicí Pb patří např. snížení počtu červených krvinek, hematokritu, a MCH (střední korpuskulární hemoglobin) (Marques et al., 2006; Rice, 1996). Ve studii Topashka-Ancheva et al. (2002) byl po expozici Pb zaznamenán pokles hemoglobinu, a celkového počtu bílých krvinek, zatímco hodnoty červených krvinek a hematokritu během 120 dní expozice naopak stouply. Během uvedené expozice se také snížila tělesná teplota pokusných zvířat a jejich tělesná váha. Oproti tomu Mahaffey et al. (1981) nezaznamenali během administrace Pb žádné úbytky na váze ani snížený příjem krmiva. Z hlediska hematologických parametrů uvádí tyto autoři v důsledku Pb zvýšení počtu červených krvinek a pokles hladiny hematokritu i hemoglobinu. U potkanů perorálně exponovaných extrémně znečištěné půdě zaznamenali Száková et al. (2012) obranou reakci manifestovanou nárůstem počtu leukocytů.

### **2.3.5 Vliv na renální systém**

Intoxikace Pb způsobuje poškození proximálních tubulů, glomerulární sklerózu a intersticiální fibrózu. Příznaky zahrnují enzymurii, proteinurii (při PbB > 30 µg/dl), poruchy transportu glukózy a organických aniontů a snížený poměr glomerulární filtrace (při PbB < 10 µg/dl) (Diamond, 2005; Goyer, 1989; Loghman-Adham, 1997). Chronická expozice nízkým dávkám Pb je spojena s rozvojem chronické renální nedostatečnosti (při PbB > 50 µg/dl) (Pollock a Ibels, 1988). Riziko chronické poruchy renálního systému spojené s poklesem glomerulární filtrace však nastává již při PbB < 6 µg/dl (ATSRD, 2007). Hodnoty PbB nad 50 µg/dl vedly u pokusných zvířat až ke glomerulární skleróze (Aviv et al., 1980, Khalil-Manesh et al. 1992a; 1992b). Až k 50% poklesu glomerulární filtrace navíc dochází bez jakýchkoliv měřitelných změn exkrece kreatininu do krevního séra (Brady et al., 2000). Oproti tomu nárůst glomerulární filtrace byl Khalil-Maneshem et al. (1992a) pozorován při počáteční fázi chronického poškození ledvin u potkanů.

Jako důsledek intoxikace Pb jsou poté při histologickém vyšetření tkáně ledvin často pozorovatelné patomorfologické změny, např. tělíska intranukleárních inkluzí, tmavé otoky a zduření mitochondrií (Biagini et al., 1977; Cramer et al., 1974; Mahaffey et al., 1981; Wedeen et al., 1975; 1979). U pokusných hlodavců vyvolala expozice Pb dokonce nádory renálního systému (ATSRD, 2007)

### 2.3.6 Ostatní vlivy expozice Pb

Pb interferuje s přeměnou vitamínu D na 1,25-dihydroxyvitamin D – jeho aktivní hormonální formu (Mahaffey, 1982) a zvýšené hodnoty Pb v krvi (nad 62 µg/dl) souvisí se snížením vápníku v krevním séru. Nicméně vliv Pb na vitamin D se neprojeví, pokud strava obsahuje dostatek Ca, vitamínu D a fosforu a pokud jsou hodnoty PbB pod 20 µg/dl (Koo et al., 1991). Olovo je dle Agency for Research on Cancer považováno za potenciální lidský karcinogen – třída 2B (Rousseau et al., 2005) a jeho anorganické sloučeniny za karcinogen pravděpodobný – třída 2A (Garcia-Leston et al., 2010). Expozice Pb snižuje u potkanů příjem potravy (O'Flaherty et al., 1986). Ztrátu chuti k jídlu u intoxikovaných jedinců potvrzuje také Ma (1996).

Octan olovnatý je důležitý imunotoxický faktor pro aktivitu fagocytů, stejně jako humorální a buněčnou imunitu (Bunn et al., 2001; Bishayi a Sengupta, Dietert et al., 2004; 2006; Institoris et al., 1999). Pb způsobuje změny v subpopulaci T-buněk a zvýšené hladiny PbB jsou spojeny se zvýšenou hladinou IgE v krevním séru. Studie ATSRD (2007) uvádí, že vliv na buněčné komponenty imunity je významnější, zatímco humorální imunitní systém není Pb příliš ovlivněn. Výzkumy prováděné na zvířatech však potvrzují změny jak v buněčné, tak v humorální imunitě exponovaných jedinců, přičemž k ovlivnění může docházet také v situacích, kdy je vlivu Pb vystaven organismus matky při samotném těhotenství, či při následném kojení. Oba zmíněné případy vedou k poklesu protilátek, poklesu IgG v krevním séru, snížení aktivitě lymfocytů, poklesu hmotnosti brzlíku a jiným alternacím imunitního systému mláďat (Bunn et al., 2001a; Faith et al., 1979, Luster t al., 1978; McCabe et al., 1999; Talcott a Koller, 1983; Snyder et al., 2000). Výsledky získané v pokusech se zvířaty však samozřejmě nelze zcela bez omezení extrapolovat na lidskou populaci, neboť imunitní funkce závisí na druhu zvířete, pohlaví i vývojovém stádiu jedince (ATSRD, 2007).

Změněný imunitní status jedince může také souviset s následným napadením parazity. Během expozice Pb prokázali Tersago et al. (2004) sníženou rezistenci myšice lesní (*Apodemus sylvaticus*) k GI hlístici *Heligmosomoides polygyrus*, ovšem výskyt jiných podobných parazitů *Syphacia stroma* či ektoparazitických roztočů (larvy klíšťat) se se vzrůstajícím množstvím kontaminace životního prostředí Pb nijak neměnil.

Americká Agency for Toxic Substances an Disease Registry uveřejnila naposledy v roce 2007 souhrn doposud publikovaných studií, věnujících se vlivům Pb na zdraví jak u lidí, tak u zvířat v závislosti na různých způsobech příjmu Pb (inhalace/ingescce/perkutánní vstup) viz obr 4.

## 2.4 Akumulace rizikových prvků v GI helmintech

### 2.4.1 Mechanismy absorpce rizikových prvků v tkáni GI helmintů

Ionty Pb mohou procházet paracelulární difuzí přes epitelární membránu GI traktu hostitele a vstupovat do jeho krevního oběhu. Tím jsou distribuovány do různých orgánů v celém těle. Portálním oběhem se dostávají i do jater. Zde je většina Pb z krve odstraněna a vylučována žlučí zpět do trávicího traktu (střeva) hostitele. Pb vázané v žluči poté může být opětovně resorbováno střevní stěnou, vyloučeno z těla ve výkalech anebo v případě přítomnosti gastrointestinálního parazita absorbováno jím. Tento proces je proto základem potenciální akumulace těžkých kovů (nejen Pb) v tkáni gastrointestinálních parazitů, ve kterém hraje dle Surese a Sidalla (1999) významnou úlohu právě žluč.

Prvotní studie zabývající se obsahem těžkých kovů v parazitech vznikaly v polovině 19. století, ovšem týkali se především jednobuněčných parazitů. Z 80. let minulého století pochází první práce týkající se výskytu rizikových prvků (i Pb) v helmintech, konkrétně ve škrkavkách *Ascaris suum* (Greichus a Greichus, 1980; Ince, 1976). O několik let později se pak Riggs et al. (1987) věnuje dospělým tasemnicím *Bothriocephalus acheilognathi*. Za základní práce v oboru akumulace těžkých kovů gastrointestinálními parazity (helminty) dnes můžeme považovat studie Surese et al. (1994a; b; c; 1999), Surese a Taraschewského (1995) a Zimmermana et al. (1999).

Během uplynulých dvou dekád pak bylo publikovaných mnoho výsledků, které prokazují, že gastrointestinální parazité (tasemnice, hlístice, vrtejši) jsou schopni akumulovat ve svých tkáních některé těžké kovy a rizikové prvky (Baruš et al., 2001; 2007; Genc et al., 2008; Jankovská et al. 2007; 2008; 2010; Landsberg et al. 1998; Retief et al., 2006; Schludermann et al., 2003; Sures 2003, 2004; Sures a Sinddall, 2003; Thielen et al., 2004; Tekin-Özan a Kir, 2005, 2008; Tenora et al., 2000; Torres et al., 2004, 2006; Turčeková et al., 2002). Helminty však nelze považovat za univerzální akumulátory všech sloučenin. GI parazité mají ve své tkáni jen velmi nízké procento tuků, a proto nejsou schopni koncentrovat například organické látky a polutanty, které jsou převážně lipofilní, ve větší míře, než orgány hostitelů (Heinonen et al., 1999). Z těchto důvodů dle Evanse et al. (2001) ovlivňuje přítomnost parazitů především hostitelův příjem hydrofilních sloučenin a některých kovů.

V návaznosti na tato zjištění, stanovili Sures et al. (1999) tzv. bioakumulační faktor, vypovídající o poměru prvku akumulovaného v parazitovi ku množství v tkáni jeho hostitele:

$$BF = C_{(\text{prvek}) \text{ v parazitovi}} / C_{(\text{prvek}) \text{ v tkáni hostitele}}$$

Tento faktor se dnes hojně používá ve studiích, které se věnují akumulaci prvků (těžkých kovů) v parazito/hostitelském systému. V souvislosti s tím, je také nutné zmínit faktor biokoncepční (BF), který udává poměr mezi prvkem akumulovaným v tkáni živočicha ku množství prvku v okolním prostředí, ale nemá přímý vztah k systému hostitel/parazit.

Byly prokázány také rozdíly ve schopnosti jednotlivých skupin gastrointestinálních parazitů v úrovni bioakumulace kovů (Baruš et al., 2003; Jankovská et al., 2010a; Sures et al., 1997; Tenora et al., 2000 Vidal-Martínez et al. 2009). Dle Surese et al. (1995, 1997) byly největší koncentrace kovů odhaleny u vrtejšů a tasemnic (dospělců, uvnitř střeva hostitele). Nižší množství rizikových prvků dokáží akumulovat vývojová stadia tasemnic, žijící v tělní dutině mezihostitele (Gabrishanska a Nevada, 1996; Pascoe a Cram, 1997). Úrovně akumulace těžkých kovů u hlístic se velice liší mezi jednotlivými studii a nelze je zatím příliš zobecňovat. V přehledu de Burona et al. (2009) se setkáváme s názorem, že tasemnice a vrtejší akumulují těžké kovy efektivněji než hlístice a motolic a Sures et al. (1999) upřesňuje, že vrtejší akumulují více těžkých kovů než tasemnice. Toto tvrzení však nelze brát jako jednoznačnou pravdu, neboť samotná akumulční schopnost parazita je ovlivněna mnoha činiteli.

Mezi faktory, které hrají roli v množství Pb akumulovaného v GI parazitovi (tasemnici) patří např. věk a velikost. Zatímco Woelfl et al. (2008) uvádí, že poměr obsahu Pb průkazně klesá s přibývajícím velikostí těla tasemnice (uvažovaná hmotnost sušiny) a menší jedinci tak akumulují až 80 krát více Pb než ti velcí, Sures et al. (1997) zaznamenal přímou pozitivní úměrnost mezi velikostí těla tasemnice a množstvím Pb v ní naakumulovaného. Woelfl et al. (2008) si své výsledky obhajuje tím, že menší jedinci mají v poměru k celkovému objemu těla větší plochu tegumentu, přes který dochází k absorpci všech sloučenin. Oproti tomu Sures et al. (2003) uvádějí, že menší rozměry vykazují mladší jedinci, u kterých je také kratší doba dosavadní expozice a tedy i potenciálně menší možnost akumulace příslušného prvku. Riggs et al. (1987) a Sures et al. (1997) prokázali, že nejvíce Pb se u tasemnic koncentruje v gravidních proglotidech, a proto je pro standardizaci stanovení obsahu tohoto prvku nutná dokonalá homogenizace strobily tasemnice. V těle vrtejšů je Pb distribuováno následovně cementové žlázy > testes > lemnisky > vajíčka = tegument (Sures et al., 2000b).

## 2.4.2 Terénní studie

Prvotní zájem byl v této problematice věnován parazito/hostitelským společenstvům ve vodním prostředí. I když se celá řada studií věnuje marinním ekosystémům (MacKenzie et al., 1995), mnoho prací dokumentuje hostitele ze sladkovodních biotopů a pochází přímo od českých autorů.

Pokud jsou parazité přítomni volně v tělní dutině (mezi)hostitele jako např. plerocerkoidy tasemnice *Ligula intestinalis* nebo hlístice *Philometra ovata*, byly v nich zdokumentovány 15 krát, respektive 106 krát vyšší koncentrace Pb než ve svalovině jejich hostitele (Tenora et al. 2000). Jirsa et al. (2008) analyzoval obsah Pb v tasemnici *Caryophyllaeus laticeps* a orgánech jejího finálního hostitele ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus*). V jeho studii byly koncentrace Pb v tasemnici 9,7 krát vyšší než v játrech ostroretky, které obsahovaly nejvíce Pb ze všech sledovaných orgánů. Jedním z recentních zdokumentovaných výsledků je 11 násobná akumulční schopnost pro Pb u



vrtejšů (*Acanthocephalus lucii*) parazitujících ve střevech okounů (*Perca fluviatilis*) (Jankovská et al., 2011).

Četné práce, dokládající bioakumulační schopnosti GI parazitů u volně žijících zvířat, se zaměřila na ptáky, jako finální hostitele tasemnic. Baruš et al. (2000) zdokumentoval vyšší koncentrace Pb v tkáni dospělce *Liguli intestinalis* v porovnání se svalovinou a játry jejího definitivního hostitele kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*). Práce Kračmára et al. (2000) a Tenory (2000) potvrzují tyto zjištění i u jiných dvou druhů tasemnic (*Confluarina capillarioides*, *Mesocestoides perlatus*) a jejich finálních ptačích hostitelů (*Podiceps cristatus*, *Accipiter gentilis*). Další podobné závěry přináší také studie Torrese et al. (2010). I oni detekovali vyšší množství Pb, akumulovaného v tasemnici (*Raillietina micracantha*), než v měkkých tkáních holubů (*Columba livia*). Při srovnání několika druhů ptačích tasemnic zjistil Baruš (2000) nejvyšší koncentraci Pb ve strobile *Cladotaenia globitera* parazitující u káněte lesního (*Buteo buteo*).

Jako třetí oblast zájmu výzkumných pracovníků lze označit terestrické prostředí, na které se jejich pozornost upírá teprve několik posledních let. Jankovská et al. (2010) sledovali obsahy rizikových prvků v orgánech lišky obecné (*Vulpes vulpes*) a jejich parazitů *Mesocestoides* spp. (Cestoda) a *Toxascaris leonina* (Nematoda). U zvířat, kde byli přítomni oba tyto parazité, vykazovaly tasemnice 52 krát (hlístice 8 krát) vyšší koncentraci Pb než játra a ledviny parazitovaných zvířat. U napadených hostitelů se v souvislosti s výskytem parazitů dle autorů 2 – 3 krát snížil obsah Pb v ledvinách. Baruš et al. (2003) oproti tomu odhalili vyšší obsahy Pb v hlísticích (*Protospirura muricola*) než v tasemnicích (*Inermicapsifer arvicanthidis*) rypoše stříbřitého (*Heliophobius argenteocinereus*). I přesto byly koncentrace Pb v parazitech větší než ve svalovině a játrech definitivního hostitele.

Studie týkající se akumulace těžkých kovů GI parazitů v suchozemském prostředí jsou z velké části věnovány drobným, volně žijícím hlodavcům (Jankovská, 2008, 2009, Sures et al., 2003; Torres et al., 2004, 2006). Sures et al. (2003) a Torres et al. (2004) zdokumentovali vysokou akumulační schopnost pro Pb u tasemnice *Gallegoide sarfaai* a o dva roky později pro tasemnici *Skrjabinoteania lobata* v jeho přirozeném definitivním hostiteli, myšici lesní (*Apodemus sylvaticus*). Bioakumulační faktor byl u těchto dvou druhů 6 a 8,5 pro ledviny, 20 a 53,2 pro játra a konečně 24 a 81,4 pro svalovinu. O několik let později publikovali podobná zjištění Jankovská et al. (2008, 2009), jejichž práce potvrzuje vysoké pro játra (37 a 36) i ledviny (7,3 a 4,7) u tasemnice *Paranoplocephala dentata* u drobných hrabošů (*Microtus agrestis*) a norníků (*Clethrionomys glareolus*). Je vhodné podotknout, že ve studii Jankovské et al. z roku 2008 nebyl prokázán typický pokles obsahu Pb v orgánech parazitovaných zvířat oproti jedincům neparazitovaným. Tento rozdíl se však projevil u zinku.

### 2.4.3 Experimentální studie

Dle Vidal-Martíneze et al. (2009) je pro pochopení vztahů mezi parazitismem a expozicí hostitele specifickým kontaminantem nezbytné experimentální ověření poznatků získaných z polních studií. Proto v posledních letech dochází ke spojení toxikologických a parazitologických experimentů. Výsledkem těchto pokusů jsou změny fyziologických parametrů, vyvolané současným působením parazita a expozice kontaminantem při definovaných podmínkách.

Celá řada prací se věnuje změnám imunologických reakcí a zvýšené citlivosti k infekci gastrointestinálními parazity vyvolané působením rizikovými prvky a těžkými kovy. Borošková et al. (1993) sledovali vliv průmyslových emisí obsahujících Hg, Cu, Pb a Zn na T- a B- lymfocyty a peritoneální makrofágy prasat nakažených škrkavkou *Ascaris suum*. Již pátý den expozice došlo k průkaznému snížení počtu T- i B-lymfocytů ve slezině a byla narušena aktivita makrofágů v porovnání s infikovanými jedinci, kteří ovšem nebyli vystaveni vlivu emisí. To značně ulehčilo migraci larev škrkavek do plic hostitele, kde pak byla indikována jejich zvýšená hustota. Nejvíce překvapivý byl však významný pokles imunitních odpovědí u jedinců, kteří byly exponovány emisím, ale nebyli infikováni. Na základě výše uvedených zjištění, o schopnosti škrkavek akumulovat část hostitelem přijatých rizikových prvků, bychom mohli usuzovat, že i v tomto případě mohlo dojít k pohlcení jistého podílu kontaminantu parazitem, a jeho snížené množství poté nevyvolalo tak silný pokles T- a B-lymfocytů. Nicméně v této studii nebyly koncentrace prvků v orgánech hostitele a tkáni parazita sledovány, a proto nelze tuto domněnku s jistotou potvrdit. Sníženou odolnost infekci manifestovanou zvýšeným počtem larev *Ascaris suum* v plicích při perorální expozici Pb potvrzují také Pistl et al. (2008), kteří jako alternativní hostitele využívali laboratorní potkany kmene Whistar. Během migrace larev do plic, kdy za normálních okolností dochází k nastartování obranného systému hostitele (zvýšení metabolické aktivity fagocytů), nebylo tato imunologická reakce u potkanů exponovaných Pb zaregistrována. Imunosupresivní efekt emisí obsahující těžké kovy, konkrétně Hg, potvrzují také Krupicer et al. (1996), který ho popsal u jehňat infikovaných motolicí *Fasciola hepatica*. Expozice mědi zapříčinila také zvýšenou prevalenci gastrointestinálních hlístic u jehňat (Borošková et al., 1995; Pistl et al., 1995) i u ovcí (Krupicer, 1995; Krupicer a Peško, 1992).

Jako další hledisko současného působení parazita a expozice těžkými kovy, byly sledovány změny v hladinách stresových hormonů u pokusných zvířat. Oba tyto vlivy, přítomnost parazita (Barnard et al., 1998) i perorální podávání kontaminantu (Cd), způsobují snížení hladiny kortisolu u laboratorních potkanů, přičemž nejvyšší pokles jeho úrovně byl zaznamenán při současném působení obou faktorů (Klar a Sures, 2004), čím zpomaluje reakci organismu hostitele na stres.

Jen několik málo vědeckých prací se věnovalo přímo analýze obsahu kontaminantu v orgánech hostitele a jeho gastrointestinálních parazitech při definovaném množství dávky, které byl hostitel vystaven nebo která mu byla přímo podána. Jednou z takových studií je publikace Surese et al. (2002). Autoři sledovali množství Pb ve svalovině, játrech, ledvinách, střevní stěně potkana a tkáni

tasemnice *Hymenolepis diminuta* po pětítýdenním perorálním podávání octanu olovnatého. Jediným orgánem hostitele, kde bylo Pb detekováno, byly ledviny. Koncentrace v ostatních orgánech byla pod detekčními limity (60 ng/ml) použité metody stanovení. Oproti tomu parazit akumuloval 17 krát více olova než ledviny hostitele. Množství Pb nahromaděného v ledvinách bylo přitom nižší u infikovaných pokusných zvířat. Jankovská et al. (2010) podávali octan olovnatý ovcím (*Ovis aries*) infikovaným tasemnicí *Moniezia expansa*. Expozice v jejich studii trvala pouze týden. I přes to byly pozorovány obdobné výsledky jako u Surese et al. (2002), když koncentrace Pb byly 458, 5 a 4 krát vyšší v tkáni tasemnice než ve svalovině, játrech a ledvinách hostitele. I v tomto případě byly nejvíce zatíženým orgánem ledviny a parazitovaná zvířata měla v tkáních (ledviny, játra, krev) nižší obsahy Pb než ta bez parazitů. V práci Jankovské et al., (2010) je poprvé definován podíl dávky Pb absorbovaný tasemnicí a to cca 3%. S dalším experimentálním modelem vrtejš (*Moniliformis moniliformis*)/ potkan (*Ratus norvegicus*) se setkáváme v práci Surese et al. (2000), u kterých trvala expozice pokusných zvířat olovem 3 týdny. Po této době autoři odhalili rozdílné koncentrace Pb v jedincích příslušným k jednotlivým pohlavím parazita. Samice vrtejšů vykazovaly vyšší koncentrace Pb než samci, přičemž nejvíce kovu bylo akumulováno v jejich vajíčkách. Koncentrace v samcích byly obdobné jako v ledvinách hostitele. Absorpce Pb do těla vrtejše byla parazita byla prokázána také rozdílnými koncentracemi Pb ve výkalech infikovaných a neinfikovaných zvířat, jelikož parazitovaná pokusná zvířata vykazovala nižší množství Pb vylučovaného z těla.

#### **2.4.4 Využití GI parazitů pro biomonitoring kontaminace ŽP těžkými kovy**

Interakce (synergistické či antagonistické) mezi parazity a kontaminanty životního prostředí byly až na výjimky (Brown a Pascoe, 1989; Pascoe a Cram, 1977) dlouhou dobu ignorovány. Na výskyt polutantů bylo nahlíženo buď jako na faktor zvyšující náchylnost hostitele k infekci parazitem (Arkoosh et al., 1998; Zelikoff, 1993) nebo jako činitel ovlivňující biodiverzitu parazitického společenstva (Dusek et al., 1998; Šebelová, 1998). Teprve postupem času začala být vnímána komplexnost této problematiky a parazitismus byl zahrnut při hodnocení environmentálních stresorů (Hudson et al., 2006; Lafferty a Kuris, 1999; Moller, 1987; Schludermann et al., 2003; Sures, 2006; Sures a Siddall, 1999; Vidal-Martínez et al., 2009).

Analýzy živočišných a potažmo i rostlinných tkání mají v monitoringu kontaminace ŽP nezastupitelné místo, neboť přináší informace o podílu kontaminantu, který je dostupný pro živé organismy. Proto již Phillips (1977) doporučuje kromě analýz abiotických složek prostředí, provádět také rozborů příslušných organismů. Díky své schopnosti akumulovat těžké kovy představují tasemnice užitečný indikátor biologicky dostupných kovů ve vodním prostředí, jejichž měření ve vodě či sedimentech není dostatečně přesné (Galli et al. 1998). Vhodnost tasemnic jako ukazatelů kontaminace životního prostředí potvrzují také Azmat et al. (2008). Dle Surese et al. (1997b, 1999b)

jsou např. vrtejší díky své extrémní schopnosti akumulovat Pb, lepšími indikátory znečištění vody než slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*), používaná běžně k těmto účelům.

Významným zjištěním bylo, že tkáň parazitovaných živočichů, vykazují ve stejném prostředí a tedy při shodně působících abiotických faktorech, nižší obsahy kontaminantů než orgány a tkáň neparazitovaných jedinců (Dural et al., 2011; Eira et al., 2009; Jankovská et al., 2008, 2009, 2010; Malek et al., 2007; Sures a Siddall, 1999; Turčková et al., 2002). Tento fakt může významně zkreslit data získaná pouhou analýzou tkání živočicha, pokud není zohledněna případná přítomnost parazitů v jeho těle. Údaje, které mají vypovídat o úrovni kontaminantu v prostředí, pak mohou být výrazně podhodnoceny (Evans et al., 2001; Jankovská et al., 2009; Moller, 1987), neboť větší část přijatého prvku je akumulována v tkáni parazita a nedostane se do orgánů hostitele. Případně je jeho transport do běžných cílových orgánů výrazně opožděn, protože parazité mohou ovlivnit reakci hostitele na expozici kontaminantu změnou jeho fyziologie a tolerance ke znečištění (Sures et al., 2002, 2003a; Sures 2006, Sures a Radszuweit, 2007; Turčková et al., 2002). Souhrn o vztazích mezi parazitismem, kontaminanty a jinými environmentálními stresory přináší Vidal-Martínez et al. (2009), který ve své práci přináší také doporučení pro realizaci dalších výzkumů v oblasti parazit/hostitel/kontaminant tak, aby byla zvýšena efektivnost monitoringu ŽP.

Nezbytné podmínky, které musí organismus (potažmo parazit) splňovat, aby mohl sloužit jako vhodný akumulační indikátor znečištění, uvádí Kennedy (1997). Populace hostitele musí být dostatečně početná, rozšířená v monitorovaných oblastech a jedinci by měli být lehce získatelní (odlov). Parazit oproti tomu musí být distribuován v dostatečně velké části populace, mít vysokou prevalenci i abundanci.

Tekin-Özan a Kir (2005) prokázali v plerocerkoidech *Ligula intestinalis* 1,6 - 37,4 krát vyšší obsahy Cu, Fe, Zn a Mn než ve vodě, sedimentech i v tkáních (svaly, játra, žábry) samotných ryb. Autoři sledovali také hodnoty Pb a Cd, ty však byly u všech vzorků pod detekčními limity. Na základě svých výsledků proto uvádí, že tasemnice jsou vhodný organismus pro biomonitoring kontaminace vodního prostředí těžkými kovy, především proto, že citlivěji odráží jejich množství v sedimentech. Tekin-Özan a Barlas (2008) ovšem s tímto názorem nesouhlasí a tvrdí, že vývojová stádia tasemnic, která nejsou lokalizovaná přímo ve střevě hostitele, nejsou vhodné pro posouzení znečištění vodního prostředí. Retief et al. (2006) prokázal, že tkáň tasemnic, konkrétně *Botriocephalus acheilognathi* obsahují dokonce více Pb (i některých jiných rizikových prvků) než voda, ve které žijí jejich definitivní rybí hostitelé. Olovo patřilo mezi 8 z 23 měřených prvků, jejichž nejvyšší koncentrace byla naměřena právě v tkáni parazita. V navazující práci se pak stejní autoři věnují bioindikačnímu potenciálu tohoto druhu GI parazita.

K monitoringu ŽP prostředí se ve velké míře používají holuby (Hutton a Goodman, 1980; Nam a Lee, 2006; Schilderman et al., 1997). Torres et al. (2010) přichází s názorem, že jejich gastrointestinální parazité, tasemnice, přináší užitečné a relevantní informace především v oblastech, kde je celkové znečištění nízké na to, aby se projevilo přímo v tkáních ptáků, zatímco tkáň tasemnic

ve stejných případech dosahují mnohem vyšších koncentrací, které je pak možné přesně stanovit. Stejných poznatků, i když ve vodním prostředí dosáhli Woelfl et al. (2008), kteří analyzovali svalovinu, játra a střeva u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) i v tkáni tasemnic z jeho GI traktu. Zatímco úroveň Pb ve výše uvedených tkáních byly pod detekčními limity, koncentrace v tasemnicích byly bez problémů stanovitelné.

Sures et al. (2003b) a Torres et al., (2006) využívali k monitoringu znečištění příměstských oblastí systém tasemnice/hlodavec. V práci Surese et al. (2003b) byly analyzovány orgány potkanů a tkáně jejich parazitů (*Hymenolepis diminuta* - dospělci, *Teaenia taeniaeformis* - larvy) ze dvou různě kontaminovaných oblastí v okolí města Káhiry. Na obou sledovaných plochách byly zaznamenány vyšší koncentrace Pb v dospělých tasemnicích poté v ledvinách hostitele a pak teprve v larvách tasemnic, což odpovídá výše prezentovaným zjištěním o akumulacím potenciálu jednotlivých vývojových stádií tasemnic (Gabrishanska a Nevada, 1996; Pascoe a Cram, 1997). Na méně kontaminovaných lokalitách dosahovaly tasemnice více než dvojnásobného při porovnání s tkání střeva, jater i ledvin než na plochách více kontaminovaných olovem.

U systému hlodavec/tasemnice byl opakovaně prokázán velký bioindikační potenciál pro monitoring znečištění životního prostředí těžkými kovy a to konkrétně pro případy *Apodemus sylvaticus*/*Gallaegoides arfaai* (Torres et al., 2004), *Apodemus sylvaticus*/*Skrjabinotaenia lobata* (Torres et al., 2006), *Microtus agrestis*/*Paranoplocephala dentata* a *Clethrionomys glareolus*/*Paranoplocephala dentata* (Jankovská et al., 2009). Naopak jako nepříliš vhodný bioindikační model se dle Eira et al. (2005) jeví systém králík divoký (*Oryctolagus cuniculus*)/ tasemnice (*Mosgovoyia ctenoides*) neboť tento parazit má nízký.

### 3 Vědecké hypotézy

Na základě výše uvedené literární rešerše obsahující souhrn dosavadních poznatků v rámci studované problematiky byly stanoveny následující vědecké hypotézy:

- H<sub>1</sub>: Toxikokinetika sledovaných forem Pb (octan olovnatý vs. *P. stratiotes*) v organismu laboratorního potkana je odlišná
- H<sub>2</sub>: Toxikokinetika sledovaných forem Pb je odlišná mezi zvířaty s nízkou a vysokou úrovní expozice
- H<sub>3</sub>: *H. diminuta* vykazuje akumulární schopnosti pro obě sledované formy Pb a akumuluje Pb ve větší míře než tkáň hostitele
- H<sub>4</sub>: Parazitace *H. diminuta* ovlivní toxikokinetiku Pb v organismu finálního hostitele
- H<sub>5</sub>: Tasemnice *H. diminuta* přijímá především Pb, které prošlo enterohepatickým cyklem

## 4 Cíle práce

Hlavními cíli předložené disertační práce bylo:

1. experimentální stanovení vlivu parazitace *H. diminuta* na akumulaci Pb v těle lab. potkana a
2. analýza toxikokinetiky různých forem Pb v tomto hostitelsko/parazitickém systému

Za účelem ověření jednotlivých výše uvedených hypotéz byly vytyčeny následující dílčí cíle práce:

- C<sub>1</sub>: Na základě stanovení koncentrací Pb v jednotlivých tkáních, faeces a moči u neparazitovaných jedinců exponovaných octanu olovnatému nebo *P. stratiotes* bude definován případný rozdíl v akumulaci a exkreci těchto forem Pb v/z organismu laboratorního potkana
- C<sub>2</sub>: U neparazitovaných potkanů bude na základě zjištěných koncentrací Pb porovnána úroveň akumulace a exkrece jednotlivých forem Pb při nízké a vysoké expozici
- C<sub>3</sub>: Na základě zjištěných koncentrací Pb v tkáních tasemnic a jejich hostitelů bude definován bioakumulační potenciál a biokoncentrační faktory *H. diminuta* pro obě administrované formy Pb a tyto ukazatele budou následně porovnány
- C<sub>4</sub>: Na základě stanovení koncentrací Pb v jednotlivých tkáních parazitovaných a neparazitovaných potkanů bude stanoven případný vliv *H. diminuta* na ukládání Pb v organismu hostitelů
- C<sub>5</sub>: Na základě stanovení koncentrací Pb ve faeces potkanů 24 a 72 hod po podání dávky budou stanoveny rozdíly v dynamice vylučování Pb mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci, čímž bude ověřen předpoklad, že tasemnice nepřijímají Pb přímo z primárního chymu, ale absorbují především Pb vylučované do tenkého střeva společně se žlučí

## 5 Materiál a metodika

Pro účely této disertační práce byl využit *in vivo* experimentální model parazit/hostitel - *Hymenolepis diminuta/Rattus norvegicus*. Základní metodika pokusu vychází ze studie Surese et al. z roku 2002.

### 5.1 Experimentální inokulace

#### 5.1.1 Získání a chov pokusných zvířat

V pokusu byli použiti samci potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (celkem 36 jedinců) získaní z komerčního chovu Fyziologického ústavu AV, ČR v Praze, při hmotnosti min. 200 g. Tabulka 2 Design pokusu uvádí konkrétní počty zvířat pro jednotlivé varianty. Pro ověření absence intestinálních parazitů bylo u všech neprodleně provedeno koprologické vyšetření. Zvířata byla chována v prostorách Pokusné stáje FAPPZ (Praha-Suchdol) a to jednotlivě ve standardních boxech typu E4 (1730 cm<sup>2</sup>) při teplotě 22±2°C a napájena a krmena *ad libitum* komerčně vyráběným krmivem (ST-1, Velaz, ČR). Obsahy vybraných prvků v krmné směsi jsou uvedeny v tabulce 3.

#### 5.1.2 Experimentální inokulace

Pro inokulaci 18 potkanů tasemnicí krysí (*H. diminuta*) byl využit přirozená mezihostitel - potěmník skladištní (*Tribolium confusum*, Coleoptera) pocházející z experimentálního chovu KZR. Brouci (cca 60 jedinců) byli nakaženi pozřením vajíček tasemnice, získaných separací z faeces potkanů z experimentálního chovu KZR (Pokusná stáj FAPPZ) a aplikovaných spolu s cukernatým roztokem na filtrační papír v Petriho misce. Vývoj cysticerkoidů v těle mezihostitelů probíhal v inkubátoru při konstantní teplotě 29°C 12 dní. Po uplynutí této doby byl proveden test přítomnosti a zralosti cysticerkoidů u 3 náhodně vybraných jedinců. Následně byli zbylí brouci zkrmeni pokusnými potkany (3 ks na 1 potkana). Úspěšnost inokulace finálních hostitelů byla ověřena koprologickým vyšetřením 5 týdnů po inokulaci. Přítomnost *H. diminuta* byla detekována nálezem vajíček ve faeces hostitele.

Tabulka 2: Design pokusu

Varianta	Počet zvířat	Přítomnost parazita (T)	Expozice C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> PbO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O (Mt)	Expozice Pb z rostlinného materiálu (PI)
OO	6	-	-	-
OT	6	+	-	-
OMt	6	-	+	-
OPI	6	-	-	+
TMt	6	+	+	-
TPI	6	+	-	+



## 5.2 Příprava materiálů pro expozici Pb

Mladé odnože bábelky řezanolisté (*Pistia stratiotes*, L., 1753, Araceae) byly získány z Botanické zahrady (PřF UK, Praha) a byli kultivovány v pokusném skleníku ČZU v Praze v 60 litrových PE nádobách s roztokem obohaceným o  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic). Vypěstované rostliny byly usušeny. Vzniklý rostlinný materiál byl homogenizován a metodou Optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) v něm byla stanovena celková koncentrace Pb, která dosahovala  $41475 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$  (průměrná hodnota ze tří samostatných měření). Příslušné dávky obou forem Pb byly administrovány v podobě homogenátu se syrovým masem (5 g), jehož koncentrace Pb dosahovala  $0,021 \pm 0,003 \text{ mg/kg č.h.}$  (stanoveno metodou ICP-OES).

## 5.3 Expozice Pb a bilanční fáze pokusu

Po ověření nákazy tasemnicí *H. diminuta* byli potkani rozděleni do předem definovaných skupin (viz. tab. 2 Design pokusu) a přesunuti do metabolických klecí v prostorách Pokusné stáje FAPPZ. Bilanční fáze experimentu zahrnující expozici Pb probíhala 6 týdnů. Tato délka expozice byla zvolena především proto, že během by v ní m+lo docházet k nejintenzivnější akumulaci Pb jak v tkáních hostitele (Teodorova et al., 2003) tak v tkáni parazitů (Sures and Siddall, 2003). Expozice Pb byla realizována perorálním podáním 12 dávek vodného roztoku octanu olovnatého-trihydrátu  $\text{C}_4\text{H}_6\text{PbO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Analytika Ltd., CR) či ekvivalentního množství sušené biomasy rostlinného hyperakumulátoru *P. stratiotes* v množství  $7 \mu\text{g Pb}$  na 1 g živé hmotnosti potkana. Za účelem přesného stanovení aktuálních dávek byli potkani pravidelně 2x týdně váženi. Pro zjištění dynamiky exkrece Pb byly pravidelně odebírány vzorky moči a feaces a to vždy 24 a 72 hod po dávce. Mimo perorálního příjmu administrovaných dávek Pb byla zvířata v průběhu bilanční fáze pokusu krmena a napájena *ad libitum*, stejně jako v období navykání a inokulace.

Tabulka 3: Obsahy vybraných prvků v krmné směsi ST-1 a biomase *P. stratiotes* stanovené metodou ICP-OES (uvedená hodnota reprezentuje průměr třech jednotlivých měření)

	Al	As	Ba	Cd	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
Směs ST-1												
Průměr	154	1,69	17,3	0,14	23,0	344	113	1,38	3,28	1,87	32,6	79,2
SmOD	1,10	0,19	1,01	0,02	5,28	24,3	0,44	0,17	0,55	0,40	0,86	6,50
<i>Pistia stratiotes</i>												
Průměr	1287	6,01	42,1	0,43	25,2	991	295	25,1	5,11	14349	91,2	73,2
SmOD	93,6	0,68	4,46	0,03	0,59	78,7	25,4	3,62	0,56	1720	8,50	10,9

## 5.4 Odběr, příprava a analýza vzorků

### 5.4.1 Orgány hostitele a tkáň parazitů

Po ukončení bilanční fáze experimentu byla pokusná zvířata euthanisována (intraperitoneální aplikace kombinace sedativ a analgetik – komerční název výrobku T61). Za účelem získání vybraných tkání, ve kterých byly následně stanoveny koncentrace Pb, byla v laboratoři Katedry zoologie a rybářství, FAPPZ, ČZU v Praze provedena pitva experimentálních zvířat. Teflonovým náčiním (pinzety, nůžky), důkladně očištěným redestilovanou vodou, byly při pitvě odebrány následující orgány: játra, ledviny, svalovina, kost, varlata a stěna tenkého střeva. U inokulovaných jedinců byly z tenkého střeva vyjmuty přítomné tasemnice, Všechny získané tkáně hostitelů a tasemnic byly 3x omyty redestilovanou vodou, ponechány na filtračním papíru za účelem osušení, zváženy, uloženy v plastových Petriho miskách a zamrazeny (-20°C) až do chemických analýz.

Před vlastní analýzou byly vzorky tkání lyofilizovány a mineralizovány dle Madera a Čurdové (1997) za pomoci následujícího vybavení: mikrovlnná pec Ethos 1 (Milestone, Německo) a mineralizátor Apion (Česká republika). Analýza obsahu Pb proběhla v laboratořích Katedry chemie, FAPPZ za využití metody Atomové absorpční spektroskopie s elektrotermickou atomizací (GF-AAS) pomocí přístroje VARIAN AA280Z, (Varian, Austrálie), vybaveným kyvetovou hlavou (grafitovým plamenovým atomizérem) GTA-110Z. Tkáně s vysokými koncentracemi Pb (všechny tasemnice, a kosti spolu s játry a ledvinami exponovaných skupin) byly analyzovány v laboratoři Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin (FAPPZ) metodou ICP-OES na přístroji Varian-VistaPro s automatickým dávkovačem SPS-5 (Austrálie). Správnost výsledků byla ověřena současnou analýzou certifikovaných referenčních materiálů (BCR 194-196, GBW 9133-9134). Údaje o kvalitě obou analytických procesů jsou uvedeny v tabulce 4. Všechny používané chemikálie byly získány z komerčních zdrojů a dosahovali stupně čistoty p.p. pro analýzy a p.a. pro louhování a čištění laboratorního skla a náčiní.

### 5.4.2 Moč a ve feaces hostitele

Vzorky výkalů byly před analýzou obsahu Pb vysušeny standardním operačním postupem (Anonymus, 2005) a následně v laboratořích Katedry chemie (FAPPZ) mineralizovány na suché cestě dle modifikované metody Madera et al. (1998). Celkem bylo zpracováno 864 vzorků. Každý dvanáctý mineralizát představoval slepý vzorek (celkem 79), připravený za shodných podmínek jako reálné vzorky. Slepé vzorky sloužily k monitoringu požadové hodnoty Pb ve stopové laboratoři a na základě koncentrací Pb naměřených v tomto souboru byl kalkulován detekční limit stanovení (trojnásobek směrodatné odchylky). Kvůli velkému počtu vzorků faeces, byla analýza rozdělena do čtyř etap.

Vzorky moči (celkem 864) byly analyzovány přímo, bez předchozích úprav. Koncentrace Pb ve vzorcích moči a feaces byly stanoveny v laboratoři Katedry agroenvironmentální chemie a výživy

rostlin (FAPPZ) metodou ICP-OES na přístroji Varian-VistaPro s automatickým dávkovačem SPS-5 (Austrálie). Správnost výsledků byla ověřena současnou analýzou certifikovaného referenčního materiálu (Seronorm, batch 904). Vzorky s obsahem Pb pod a na hranici detekčních limitů metody ICP-OES ( $30 \text{ mg Pb.l}^{-1}$ ) byly proměřeny výše zmíněnou citlivější metodou GF-AAS.

Tabulka 4: Hodnocení kvality analytického procesu

	Detekční limit ( $\text{ng.ml}^{-1}$ ) (průměr $\pm$ 3x směr. odch. slepých vzorků)	Stanovená hodnota ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) CRM – BCR 12-02-01 (průměr $\pm$ směr. odch.)	Certifikovaná hodnota ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) CRM – BCR 12-02-01 (průměr $\pm$ směr. odch.)
Pb	0.21 (AAS) 1.9 (ICP-OES)	$0.746 \pm 0.088$	$0.710 \pm 0.08$

## 5.5 Statistické zpracování dat

Získaná data byla zpracována za pomoci statistických softwarů STATISTICA v. 9.0 (data týkající se akumulace jednotlivých forem Pb v organismu laboratorního potkana, tkáni *H. diminuta* a vlivu parazitace na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele) a IBM SPSS Statistics v. 19 (data týkající se exkrece jednotlivých forem Pb při nízké i vysoké expozici).

Základní metodou pro vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými variantami byly různé podoby t-testů, analýza rozptylů a její neparametrické obdoby. Metod lineární regrese a korelace pak bylo využito pro popis vztahu mezi změnami množství Pb v tkáni tasemnice a v tkáních hostitele.

Před každou analýzou byly příslušné soubory dat podrobeny testům normality rozdělení a homogenity rozptylů, jejichž pozitivní výsledek byl nezbytnou podmínkou pro použití parametrických metod statistického vyhodnocení. Pokud analyzovaná data tyto parametry nespĺňovala (nenormální rozdělení či nehomogenní rozptyly), bylo pro vyhodnocení rozdílů mezi variantami použito neparametrických obdoby analýzy rozptylů a to Mann-Whitney U-testu či Kruskal-Wallisova testu. Použité statistické metody jsou uvedeny u jednotlivých výsledků v kapitole Výsledky.

Rozdíly mezi sledovanými veličinami a vliv sledovaných faktorů byly považovány za signifikantní, pokud hladina významnosti přesáhla 95 % ( $p < 0,05$ ). V závislosti na charakteru použité metody stat. zpracování byla data vyjadřována buď jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba, nebo jako medián  $\pm$  směrodatná odchylka. Dále byly u některých dat uvedeny 95% pravděpodobnostní intervaly.

Pro vizualizaci dat bylo využito grafů z tabulkového procesoru Microsoft Excel 2010 či statistického softwaru STATISTICA v. 9.0. Při využití Box-Plotů byly nejčastěji pomocí bodů zachyceny střední hodnoty (mediány) jednotlivých skupin, pomocí boxů jejich interkvartilové rozpětí (Q2-Q3, 25-75%), pomocí svorek neodlehle hodnoty ( $\pm$  1,5 interkvartilového rozpětí) a kroužky odlehle hodnoty, přesahující podmínky pro neodlehle hodnoty. Případné extrémní hodnoty byly před započítáním samotného hodnocení identifikovány pomocí Grubbsova testu, jednotlivě posouzeny a z následných analýz nejčastěji vyřazeny, proto nejsou v grafech zachyceny.

## 6 Výsledky

V rámci paraziticko/toxikologického experimentu bylo pro stanovení koncentrace Pb získáno celkem 234 vzorků tkání laboratorních potkanů a jejich parazitů *H. diminuta*. V průběhu bilanční fáze pokusu bylo pro analýzy Pb odebráno a zpracováno celkem 864 vzorků faeces a stejné množství vzorků moči.

Tři ze šesti úspěšně infikovaných potkanů, kteří měli být zařazeni ve skupině TPt, na začátku experimentu spontánně vyloučili tasemnice přítomné v jejich žaživacím traktu. Oproti původnímu designu pokusu se proto změnila finální počty jedinců ve skupinách OPt na 9 a TPt na 3. Biomasa *H. diminuta* v jednom z potkanů skupiny TPt navíc nedosahovala potřebného množství pro relevantní stanovení obsahu Pb, proto nebyla zahrnuta do většiny vyhodnocovacích analýz.

Neboť dávky Pb přímo závisely na aktuální hmotnosti jedinců, lišila se mírně úroveň expozice jednotlivých zvířat. Pro zvýšení vypovídací schopnosti získaných výsledků nebyla proto data vyjadřována pouze v koncentracích, ale byla přepočtena také na reálné podíly z přijaté dávky Pb. Tato forma interpretace hodnot umožnila objektivní porovnání výsledků mezi jednotlivými potkany napříč testovanými variantami.

Pro výpočet podílů přijatého Pb akumulovaného v tkáních hostitele byly použity hodnoty koncentrací Pb vyjádřené v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti. Tyto hodnoty byly následně vynásobeny koeficientem publikovaným Hunderem et al., (2000) udávající hmotnost jednotlivých orgánů jako definovaný podíl celkové hmotnosti zvířete. V rámci zachování objektivity výsledků byly tyto koeficienty použity i u orgánů, které byly při pitvách odebrány kompletní (játra, ledviny, varlata) a jejíž reálná hmotnost byla tedy známá. Tomuto kroku předcházelo porovnání reálně naměřených hmotností s těmi, které byly stanoveny pomocí uvedeného koeficientu, ve které byla mezi hmotností reálně zjištěnou a stanovenou pomocí koeficientu odhalena velmi silná korelace ( $r^2 = 0,93$ ).

## 6.1 Toxikokinetika sledovaných forem Pb v organismu potkana (octan olovnatý vs. *Pistia stratiotes*)

### a) akumulace

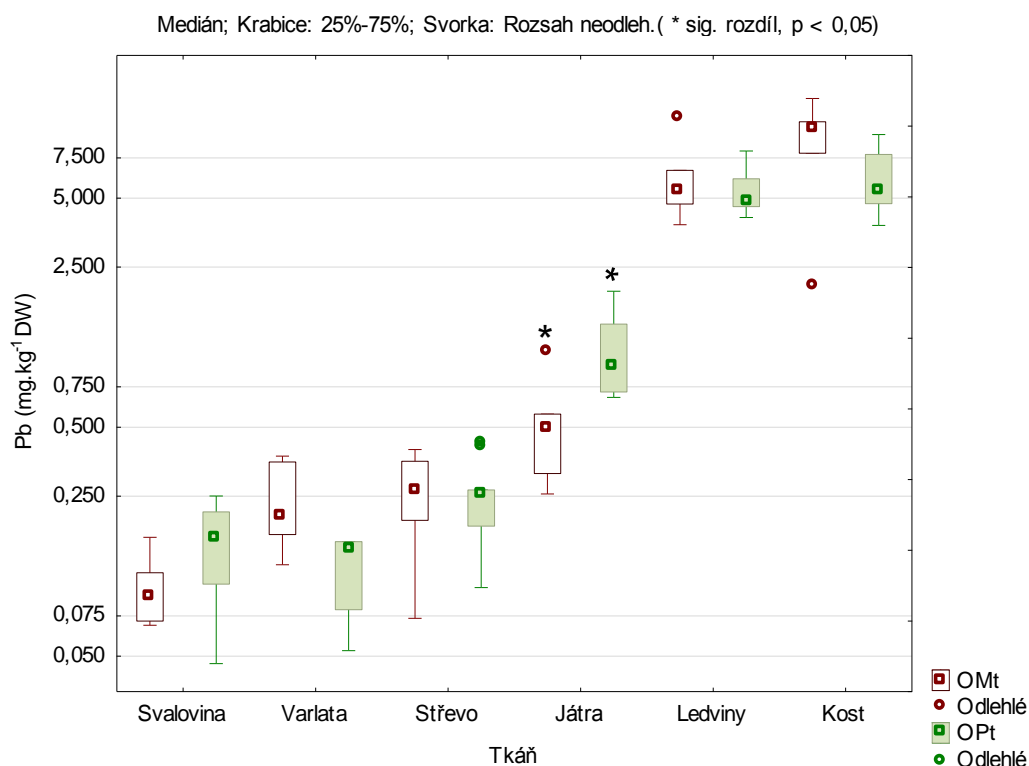
Pro toto hodnocení byly porovnány koncentrace Pb a % dávky akumulované v jednotlivých orgánech neparazitovaných potkanů exponovaných buď octanu olovnatému nebo biomase *P. stratiotes*.

Tabulka 5: Koncentrace Pb ( $\text{mg.kg}^{-1}$  sušiny) v tkáních laboratorních potkanů – základní výsledky

Tkáň	N OMt	N OPt	Průměr OMt		Průměr OPt	t	sv	SD OMt	SD OPt	F	p
játra	6	9	<b>0,535</b>	< *	<b>1,062</b>	2,56	13	0,288	0,444	2,378	<b>0,024</b>
ledviny	6	9	<b>6,228</b>	=	<b>6,338</b>	-0,07	13	2,686	3,431	1,631	0,612
svalovina	6	9	<b>0,100</b>	=	<b>0,157</b>	-1,79	12	0,036	0,070	3,781	0,162
kost	6	9	<b>9,046</b>	=	<b>7,100</b>	0,90	13	3,907	4,206	1,159	0,911
střevo	6	9	<b>0,258</b>	=	<b>0,251</b>	0,11	13	0,116	0,109	1,145	0,821
varlata	6	9	<b>0,238</b>	=	<b>0,176</b>	0,75	13	0,101	0,184	3,280	0,207

\* – signifikantní rozdíl mezi skupinami OMt a OPt (t-test,  $p < 0,05$ )

Graf 1: Koncentrace Pb v tkáni laboratorních potkanů - octan olovnatý vs. *P. stratiotes*



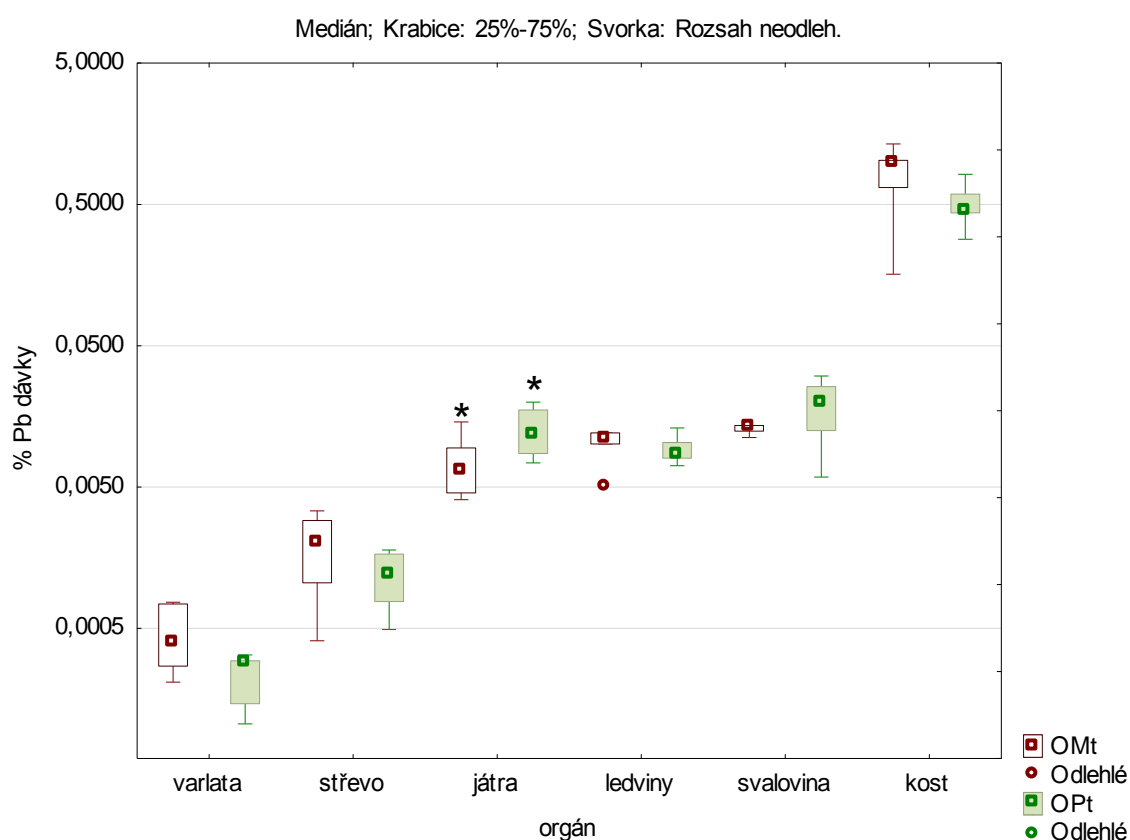
Nejvyšší koncentrace Pb ( $\text{mg.kg}^{-1}$  sušiny) vykazovaly po expozici obou formám Pb kosti (9,1 a 7,1) a ledviny (6,2 a 6,3) potkanů (viz. tab 5 a graf 1). Hladiny Pb v tkáních potkanů exponovaných octanu olovnatému byly obecně vyšší než po expozici *P. stratiotes*. Opačný trend byl ovšem zaznamenán u jater, kdy signifikantně vyšší ( $p = 0,024$ ) koncentrace dosahovala játra potkanů ze skupiny OPt.

Tabulka 6: Podíl dávky Pb (%) akumulovaný v tkáních laboratorního potkana – základní výsledky

Tkáň	N OMt	N OPt	Průměr OMt		Průměr OPt	t	sv	SD OMt	SD OPt	F	p
<b>játra</b>	6	9	<b>0,008</b>	<*	<b>0,013</b>	-2,262	13	0,004	0,005	1,562	<b>0,041</b>
<b>ledviny</b>	6	9	<b>0,012</b>	=	<b>0,011</b>	0,185	13	0,006	0,007	1,352	0,856
<b>varlata</b>	6	9	<b>0,000</b>	=	<b>0,000</b>	0,776	13	0,000	0,000	2,274	0,452
<b>svalovina</b>	6	8	<b>0,015</b>	=	<b>0,017</b>	-0,521	12	0,004	0,010	5,534	0,611
<b>kost</b>	6	9	<b>0,855</b>	=	<b>0,610</b>	1,172	13	0,404	0,391	1,072	0,262
<b>střevo</b>	6	9	<b>0,002</b>	=	<b>0,001</b>	1,857	13	0,001	0,000	5,763	0,086

\* – signifikantní rozdíl mezi skupinami OMt a OPt (t-test,  $p < 0,05$ )

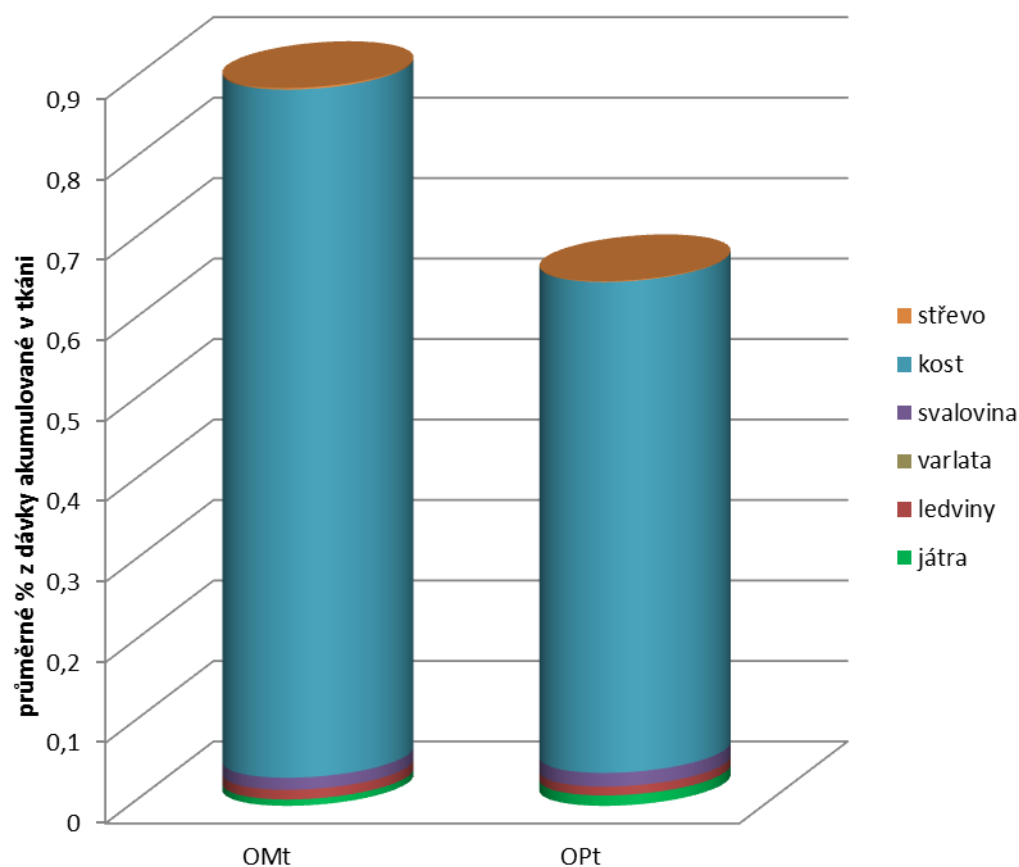
Graf 2: Podíl dávky Pb akumulovaný v tkáni laboratorního potkana - Octan olovnatý vs. *P. stratiotes*



\* - signifikantní rozdíl (t-test;  $p < 0,05$ )

Největší podíl dávky z obou administrovaných forem Pb byl akumulován v kostech laboratorních potkanů a to průměrně 0,6 % v případě *P. stratiotes* a 0,9 % z dávky octanu olovnatého. Všechny ostatní sledované měkké tkáně na konci experimentu obsahovaly zanedbatelný podíl přijatého Pb (játra, ledviny a svalovina okolo 0,01 %; varlata a střevo jen okolo tisícin procenta, viz. tabulka 6 a grafy 2 a 3). Signifikantní rozdíl v úrovni akumulace Pb z octanu olovnatého nebo z rostlinného hyperakumulátoru byl opět zaznamenán pouze u jater (t-test;  $p = 0,04$ ).

Graf 3: Rozdělení dávky Pb akumulované v jednotlivých tkáních laboratorních potkanů



## b) exkrece

V tomto hodnocení byly porovnány celkové podíly dávek sledovaných forem Pb vyloučené z organismu laboratorního potkana močí a výkaly.

Tabulka 7: Podíl dávky jednotlivých forem Pb vyloučený ve výkalech a moči (mediany skupin)

Varianta	Výkaly	n	Moč	n	Celkem	n
OMt	72,993**	67	0,156*	69	73,201**	68
OPt	53,165**	104	0,090*	103	53,327**	101

\* - signifikantní rozdíl v exkreci sledovaných forem Pb (Kruskal-Wallis test, \*; \*\* =  $p < 0,05$ ;  $0,01$ )

Majoritní podíl obou forem Pb byl z exponovaného organismu vyloučen ve výkalech (73 % Pb z octanu olovnatého a 53 % v případě Pb vázaného v *P.stratiotes*. Močí bylo eliminováno zanedbatelné procento Pb (0,2 % u skupiny OMt a jen 0,1 % u OPt). Pb z octanu olovnatého bylo z organismu vylučováno signifikantně více než Pb z rostlinného hyperakumulátoru (tabulka 7).

## 6.2 Toxikokinetika Pb při nízké a zvýšené úrovni expozice

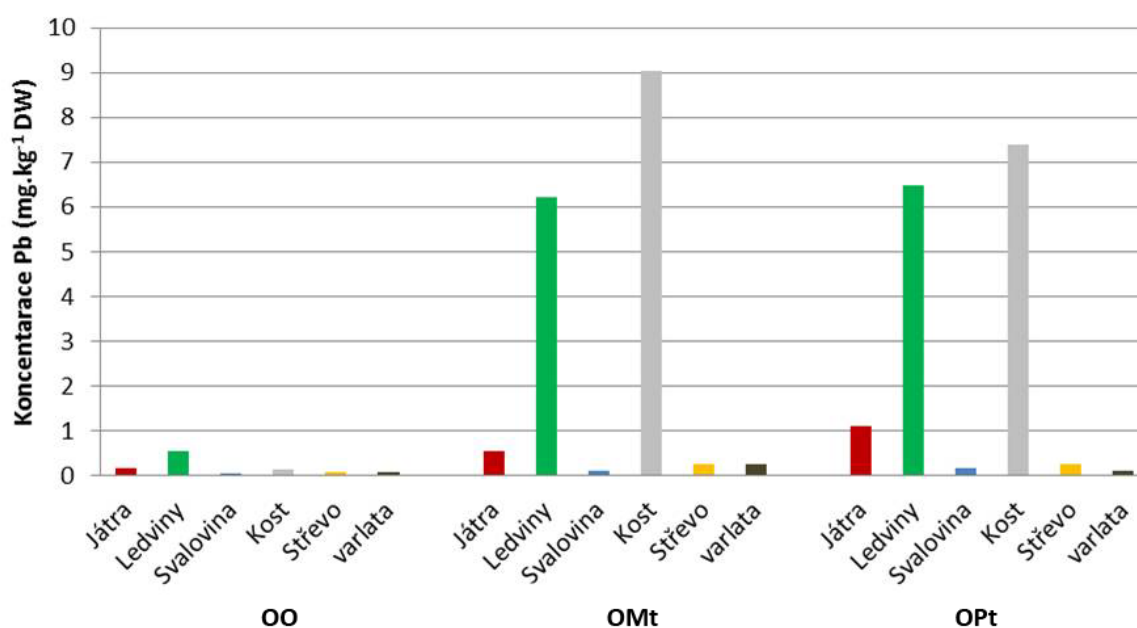
### a) akumulace

Pro toto hodnocení byl porovnán podíl z dávky Pb v jednotlivých tkácích neparazitovaných potkanů, kterým nebyly podávány dávky Pb (OO) s těmi, kteří dávky Pb v obou formách přijímali (skupiny OMT a OPt byly v rámci této analýzy sloučeny, neboť v akumulaci vykazovaly podobný trend, graf 4).

Tabulka 8: Popisné statistiky - koncentrace Pb ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  sušiny) v orgánech potkana

Varianta	Tkáň	N platných	Průměr	- 95 %	+ 95 %	Sm. chyba
Nízká expozice (OO)	Játra	6	<b>0,171</b>	-0,122	0,464	0,139
	Ledviny	6	<b>0,551</b>	-1,846	2,948	1,136
	Svalovina	6	<b>0,052</b>	0,007	0,098	0,022
	Kost	6	<b>0,139</b>	-2,898	3,176	1,439
	Střevo	6	<b>0,066</b>	-0,018	0,151	0,040
	varlata	6	<b>0,085</b>	0,027	0,143	0,028
Vysoká expozice Octan olovnatý (OMt)	Játra	6	<b>0,535</b>	0,185	0,884	0,161
	Ledviny	6	<b>6,228</b>	3,311	9,145	1,339
	Svalovina	6	<b>0,100</b>	0,048	0,153	0,024
	Kost	6	<b>9,046</b>	5,313	12,779	1,713
	Střevo	6	<b>0,258</b>	0,155	0,361	0,047
	varlata	6	<b>0,238</b>	0,172	0,304	0,030
Vysoká expozice <i>P. stratiotes</i> (OPt)	Játra	9	<b>1,106</b>	0,803	1,408	0,139
	Ledviny	9	<b>6,465</b>	3,938	8,992	1,160
	Svalovina	8	<b>0,157</b>	0,112	0,202	0,021
	Kost	9	<b>7,400</b>	4,168	10,633	1,484
	Střevo	9	<b>0,256</b>	0,041	0,167	0,041
	varlata	9	<b>0,117</b>	0,060	0,174	0,026

Graf 4: Koncentrace Pb ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  sušiny) v orgánech potkana – varianty OO,OMt a OPt

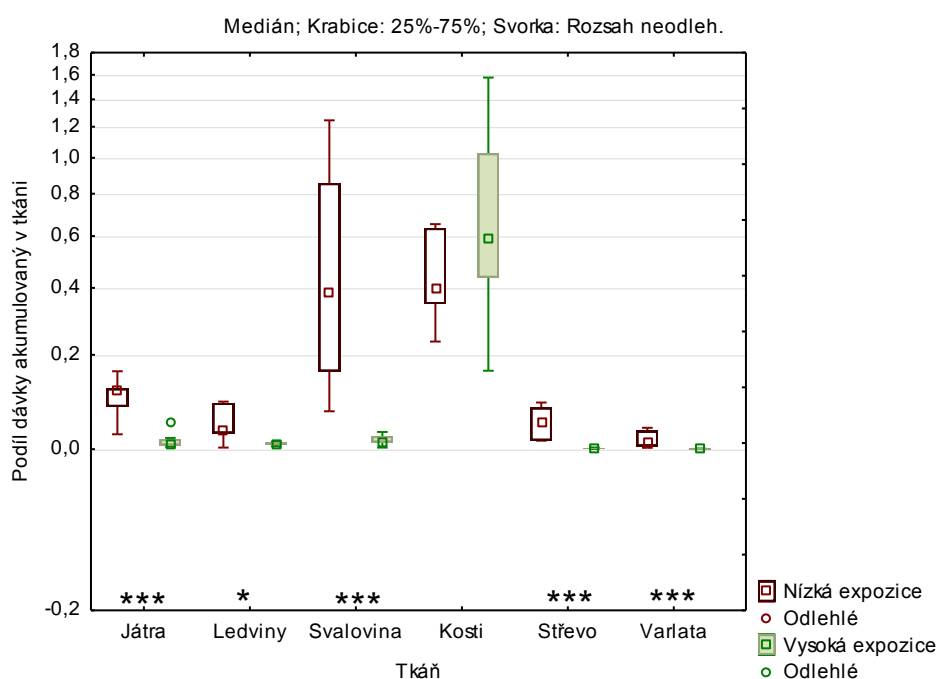




Tabulka 9: Podíl dávky Pb akumulovaný v tkáních lab. potkana při nízké a zvýšené úrovni expozice

Expozice		Nízká		Vysoká	P
N		6		15	
<b>játra</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,102</b>	>	<b>0,013</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	Sm.Ch.	0,010		0,006	
	-95,00%	0,081		0,000	
	95,00%	0,124		0,026	
<b>ledviny</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,046</b>	>	<b>0,016</b>	<b>0,036</b>
	Sm.Ch.	0,010		0,006	
	-95,00%	0,025		0,002	
	95,00%	0,067		0,029	
<b>svalovina</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,517</b>	>	<b>0,021</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	Sm.Ch.	0,094		0,060	
	-95,00%	0,320		-0,104	
	95,00%	0,714		0,145	
<b>kosti</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,444</b>	=	<b>0,733</b>	<b>0,102</b>
	Sm.Ch.	0,148		0,093	
	-95,00%	0,135		0,537	
	95,00%	0,753		0,928	
<b>střevo</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,049</b>	>	<b>0,002</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	Sm.Ch.	0,008		0,005	
	-95,00%	0,033		-0,008	
	95,00%	0,064		0,012	
<b>varlata</b>	<b>Průměr</b>	<b>0,017</b>	>	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	Sm.Ch.	0,003		0,002	
	-95,00%	0,010		-0,003	
	95,00%	0,024		0,005	

Graf 5: Porovnání podílů dávky Pb akumulovaných v tkáních lab. potkana při nízké a vysoké expozici



\*: signifikantní rozdíl nízká/vysoká expozice (Kruskal-Wallis test, \*, \*\*, \*\*\* =  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ )

## b) exkrece

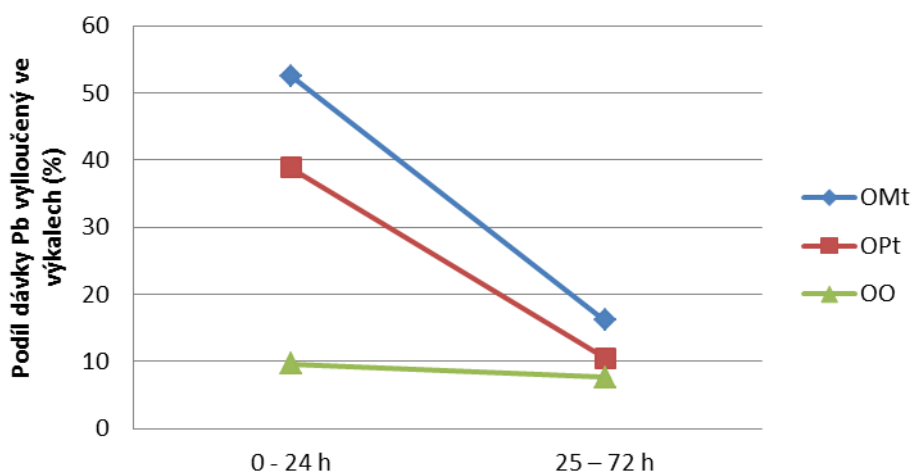
V tomto hodnocení byla porovnána dynamika fekální a urinární exkrece mezi exponovanými a neexponovanými zvířaty. Množství Pb ve výkalech a moči bylo u všech skupin vyjádřeno jako podíl z přijaté dávky.

Tabulka 10: Porovnání dynamiky vylučování Pb mezi exponovanými zvířaty a kontrolní skupinou

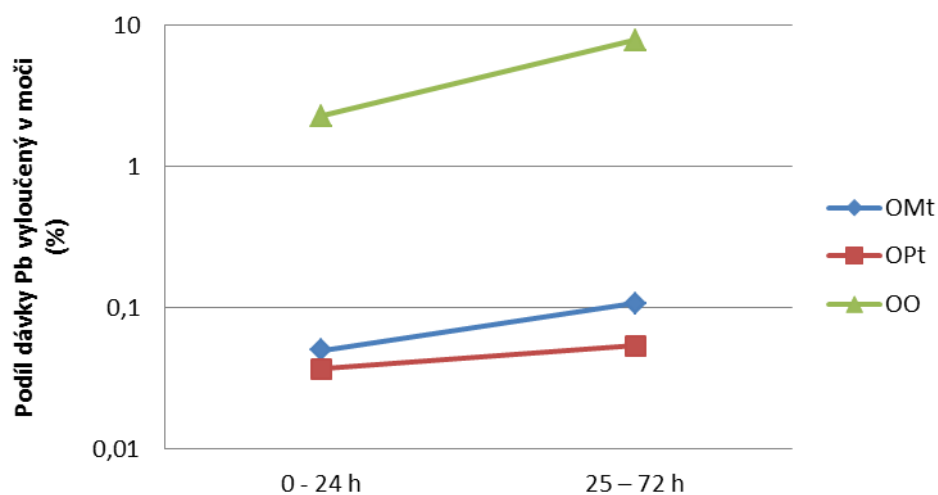
Varianta	Výkaly			Moč			Výkaly + moč dohromady		
	0 - 24 h	25 - 72 h	Celkem	0 - 24 h	25 - 72 h	Celkem	0 - 24 h	25 - 72 h	Celkem
OMt	52,549***	16,072*	72,993***	0,050***	0,108***	0,156***	53,075***	16,166	73,201***
OPt	38,821***	10,439	53,165***	0,037***	0,054***	0,090***	38,604***	10,599*	53,327***
OO	9,585	7,618	17,312	2,292	7,884	12,173	12,139	15,43	27,512

\* - signifikantní rozdíl vůči kontrolní skupině (Kruskal-Wallis test, \*, \*\*, \*\*\* =  $p < 0,05$ ; 0,01; 0,001)

Graf 6: Porovnání dynamiky fekální exkrece Pb u exponovaných a kontrolních zvířat



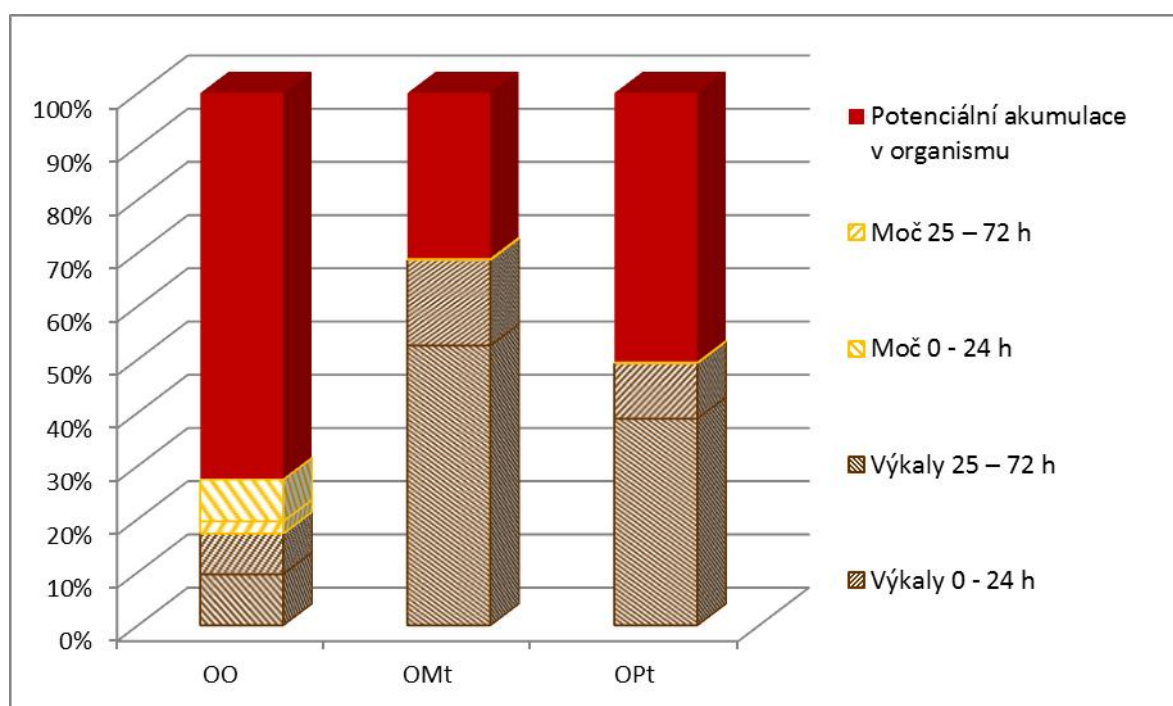
Graf 7: Porovnání dynamiky urinární exkrece Pb u exponovaných a kontrolních zvířat



Dynamika fekální exkrece přijatého Pb se významně liší mezi exponovanými a neexponovanými zvířaty. Zvířata exponovaná obou sledovaným formám Pb vyloučí během prvních 24 hod po administraci více než 3x vyšší podíl dávky než v následujících dvou dnech. Kontrolní skupina (OO) oproti tomu vykazovala vyrovnanou úroveň fekální exkrece, neboť přijímala stabilní a velmi nízké množství Pb pouze z komerčního krmiva. Celkově vyloučila kontrolní skupina ve výkalech významně nižší podíl z přijatého Pb než obě exponované skupiny.

V případě urinární exkrece byl zaznamenán obdobný trend mezi všemi 3 sledovanými skupinami. Podíl dávky vyloučený mezi 2 a 3 dnem představoval dvojnásobek množství vyloučeného v prvních 24 hodinách. Z toho lze usuzovat, že urinární exkrece je během prvních 3 dní po přijetí Pb stabilní.

Graf 8: Porovnání jednotlivých složek exkrece Pb mezi skupinami OO, OMt a OPt



Vysoká expozice Pb vyvolává u obou exponovaných skupin jeho výraznou eliminaci z organismu (1/2 až 3/4 přijatého množství). Oproti obou exponovaným skupinám vyloučila kontrolní skupina necelou pětinu dávky Pb. I když reálně přijímala kontrolní skupina jen nepatrné množství Pb a koncentrace Pb ve výkalech i moči jsou výrazně nižší než u exponovaných skupin, vyjádříme-li toto množství v procentech, existuje při nízkém příjmu Pb riziko akumulace většího podílu dávky v organismu.

### 6.3 Ověření akumulční schopnosti *H. diminuta* pro Pb

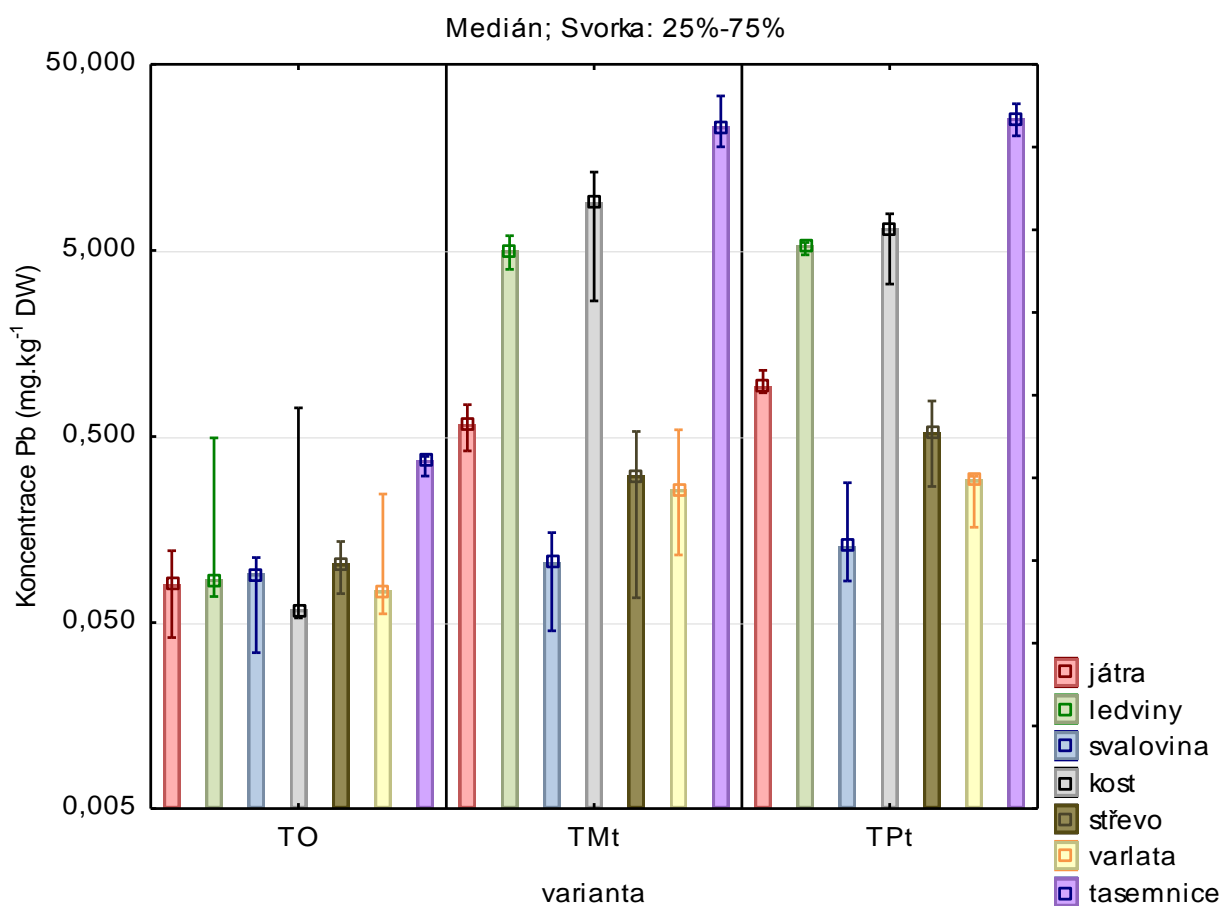
#### a) akumulace Pb - tasemnice vs. tkáně hostitele

Tabulka 11: Koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> DW) v tkáních *H. diminuta* a lab. potkanů (průměr ± SD)

Varianta	N	Tasemnice	Játra	Ledviny	Svalovina	Kost	Střevo	Varlata
TO	5	0,35 ± 0,06	0,08 ± 0,05	0,26 ± 0,31	0,08 ± 0,04	0,19 ± 0,30	0,11 ± 0,06	0,12 ± 0,10
TMt	6	24,1 ± 11,9	0,63 ± 0,26	4,86 ± 1,36	0,11 ± 0,06	8,41 ± 5,48	0,31 ± 0,24	0,41 ± 0,42
TPt	2/3 <sup>+</sup>	25,7 ± 7,10	1,03 ± 0,14	5,43 ± 0,13	0,11 ± 0,03	4,94 ± 2,32	0,52 ± 0,36	0,23 ± 0,10

<sup>+</sup> N = 3 v případě tkání hostitele, N = 2 v případě tasemnic

Graf 9: Průměrné koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> DW) v tkáních *H. diminuta* a lab. potkanů



Tkáně tasemnice *H. diminuta* vykazují signifikantně vyšší koncentrace Pb než tkáně hostitele a to jak po nízké tak po vysoké úrovni perorální expozice u jejich hostitelů – laboratorních potkanů (viz. tab 11 a graf 9). Výjimku představují pouze kosti a ledviny skupiny TO, kde rozdíly nebyly stat. průkazné.

Tabulka 12: Porovnání koncentrace Pb v tkáních tasemnice a hostitele (t- test pro závislé vzorky)

Varianta	Porovnání	Průměr	Sm.odch.	N	t	sv	p	Int. spolehl. -95%	Int. spolehl. +95%
TO	játra tasemnice	0,074 0,348	0,054 0,061	5	-8,895	4	0,001	-0,361	-0,189
	ledviny tasemnice	0,156 0,348	0,189 0,061	5	-2,511	4	0,066	-0,406	0,020
	svalovina tasemnice	0,086 0,348	0,041 0,061	5	-7,816	4	0,001	-0,356	-0,169
	kost tasemnice	0,338 0,348	0,635 0,061	5	-0,039	4	0,971	-0,773	0,751
	střevo tasemnice	0,113 0,348	0,062 0,061	5	-4,593	4	0,010	-0,378	-0,093
	varlata tasemnice	0,099 0,348	0,083 0,061	5	-6,385	4	0,003	-0,358	-0,141
	TMt	játra tasemnice	0,633 24,099	0,260 11,890	6	-4,866	5	0,005	-35,864
ledviny tasemnice		4,858 24,099	1,365 11,890	6	-3,761	5	0,013	-32,391	-6,091
svalovina tasemnice		0,105 24,099	0,061 11,890	6	-4,934	5	0,004	-36,496	-11,492
kost tasemnice		8,414 24,099	5,477 11,890	6	-2,667	5	0,045	-30,805	-0,567
střevo tasemnice		0,313 24,099	0,235 11,890	6	-4,921	5	0,004	-36,212	-11,362
varlata tasemnice		0,406 24,099	0,423 11,890	6	-4,953	5	0,004	-35,991	-11,396
TPt		játra tasemnice	0,975 25,461	0,142 5,064	3	-8,558	2	0,013	-36,797
	ledviny tasemnice	5,200 25,461	0,407 5,064	3	-7,077	2	0,019	-32,579	-7,943
	svalovina tasemnice	0,165 25,461	0,104 5,064	3	-8,675	2	0,013	-37,842	-12,750
	kost tasemnice	5,916 25,461	2,357 5,064	3	-4,831	2	0,040	-36,954	-2,136
	střevo tasemnice	0,523 25,461	0,253 5,064	3	-8,124	2	0,015	-38,145	-11,730
	varlata tasemnice	0,253 25,461	0,079 5,064	3	-8,498	2	0,014	-37,971	-12,444

Tabulka 13: Biokoncentrační faktory *H. diminuta* v porovnání s jednotlivými tkáněmi hostitele

Skupina	Tkáň hostitele					
	Ledviny	Játra	Svalovina	Střevo	Kost	Varlata
TO	4,1	3,5 <sup>aa</sup>	7,5 <sup>b</sup>	4,4 <sup>c</sup>	5,3	4,3 <sup>d</sup>
TMt	5,8	40 <sup>aa</sup>	352 <sup>b</sup>	181 <sup>c</sup>	4,9	133 <sup>d</sup>
TPt	4,7	25	243	70	6,2	128

<sup>a, b, c, d</sup> – statisticky významné rozdíly mezi variantami (Kruskal-Wallis test, a:  $p < 0,05$ ; aa:  $p < 0,01$ )

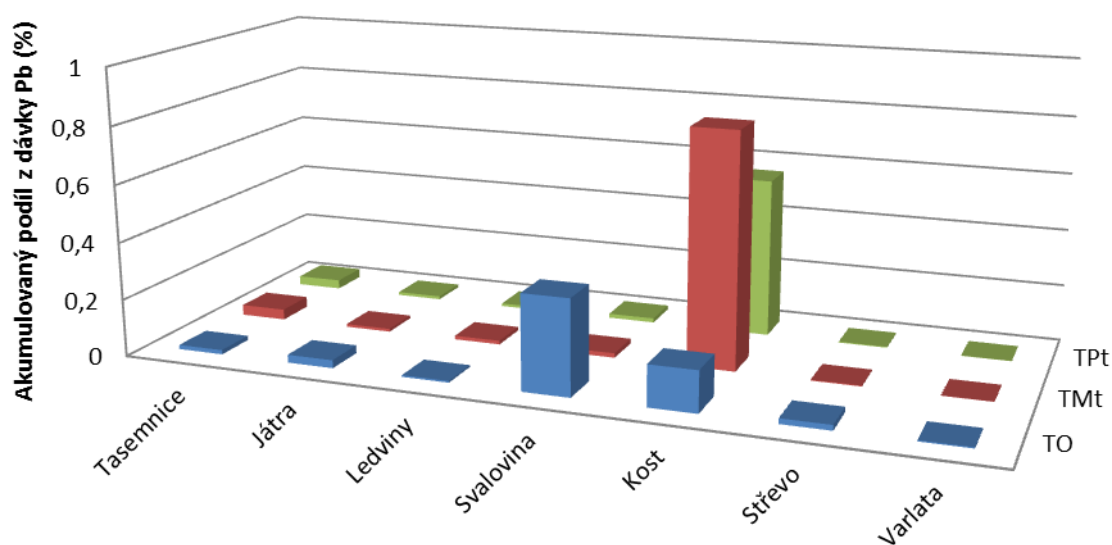
Při nízkém příjmu Pb vykazuje tasemnice jen 3,5x – 7,5x vyšší koncentrace Pb než tkáň jejího hostitele. Při vysoké úrovni expozice biokoncentrační faktory výrazně rostou a to především u střeva (až 181), varlat (až 133) a svaloviny (až 352). V případě BF *H. diminuta* v porovnání s játry, svalovinou, střevní stěnou a varlaty hostitele exponovaného octanu olovnatému byl mezi nízkou a zvýšenou úrovní expozice prokázán statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). I když u skupiny TPt byl zaznamenán obdobný nárůst BF u těchto tkání, rozdíly nebyly statisticky průkazné (patrně díky nízkému počtu reprezentativních vzorků v této variantě).

Tabulka 14: % z dávky Pb akumulované v tkáních *H. diminuta* a laboratorních potkanů (průměr ± SD)

Varianta	N	Tasemnice	Játra	Ledviny	Svalovina	Kost	Střevo	Varlata
TO	5	0,015 ± 0,03	0,028 ± 0,02	0,006 ± 0,02	0,333 ± 0,14	0,144 ± 1,43	0,019 ± 0,01	0,004 ± 0,01
TMt	6	0,037 ± 0,03	0,010 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,016 ± 0,01	0,822 ± 0,57	0,003 ± 0,00	0,001 ± 0,00
TPt	3/2*	0,032 ± 0,01	0,011 ± 0,00	0,010 ± 0,01	0,015 ± 0,01	0,559 ± 0,20	0,003 ± 0,00	0,001 ± 0,00

\* N = 3 v případě tkání hostitele, N = 2 v případě tasemnic

Graf 10: Porovnání % z dávky Pb akumulované v tkáních *H. diminuta* a laboratorních potkanů

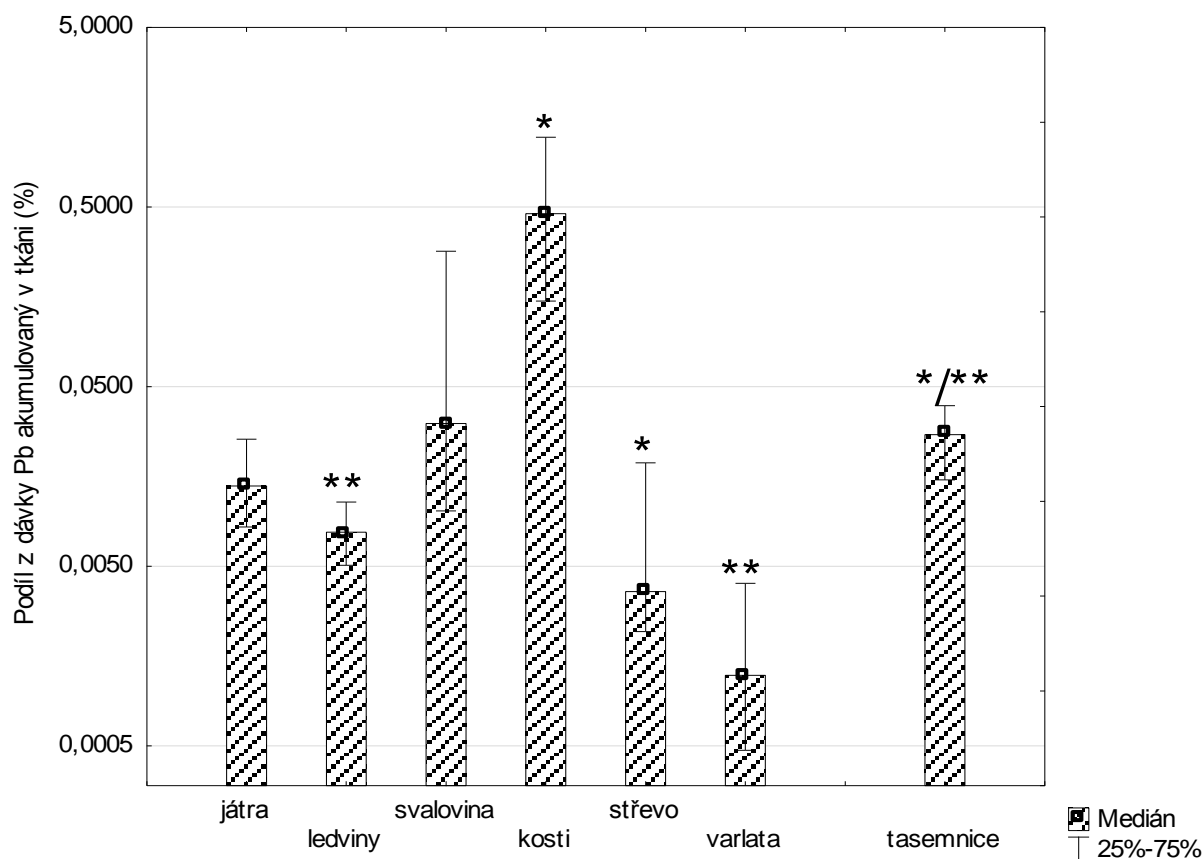


Tabulka 15: Podíl z dávky Pb akumulovaný v tkáni hostitele/tasemnice (t-test pro závislé vzorky)

	Průměr	Sm.odch.	N	t	sv	p	Int. spolehl. -95%	Int. spolehl. +95%
% Pb játra	<b>0,018</b>	0,014						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	-1,669	11	<b>0,123</b>	-0,033	0,005
% Pb ledviny	<b>0,009</b>	0,006						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	-3,330	11	<b>0,007</b>	-0,039	-0,008
% Pb svalovina	<b>0,142</b>	0,181						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	1,943	11	<b>0,078</b>	-0,015	0,235
% Pb kosti	<b>0,712</b>	0,995						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	2,360	11	<b>0,038</b>	0,046	1,313
% Pb střevo	<b>0,010</b>	0,011						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	-2,514	11	<b>0,029</b>	-0,042	-0,003
% Pb varlata	<b>0,003</b>	0,004						
% Pb tasemnice	<b>0,032</b>	0,023	12	-4,003	11	<b>0,002</b>	-0,045	-0,013

Graf 11: Podíl z dávky Pb akumulovaný v tkáni hostitele/tasemnice (společně pro sk. TO, TMt a TPt)

\*/\*\* - signifikantní rozdíl oproti tkáni tasemnice (\*;\*\* - p < 0,05; 0,01)



*H. diminuta* akumuluje průkazně vyšší podíl perorálně přijatého Pb než ledviny, varlata a střevní stěna exponovaného laboratorního potkana, zároveň ale také průkazně méně než jeho kosti.

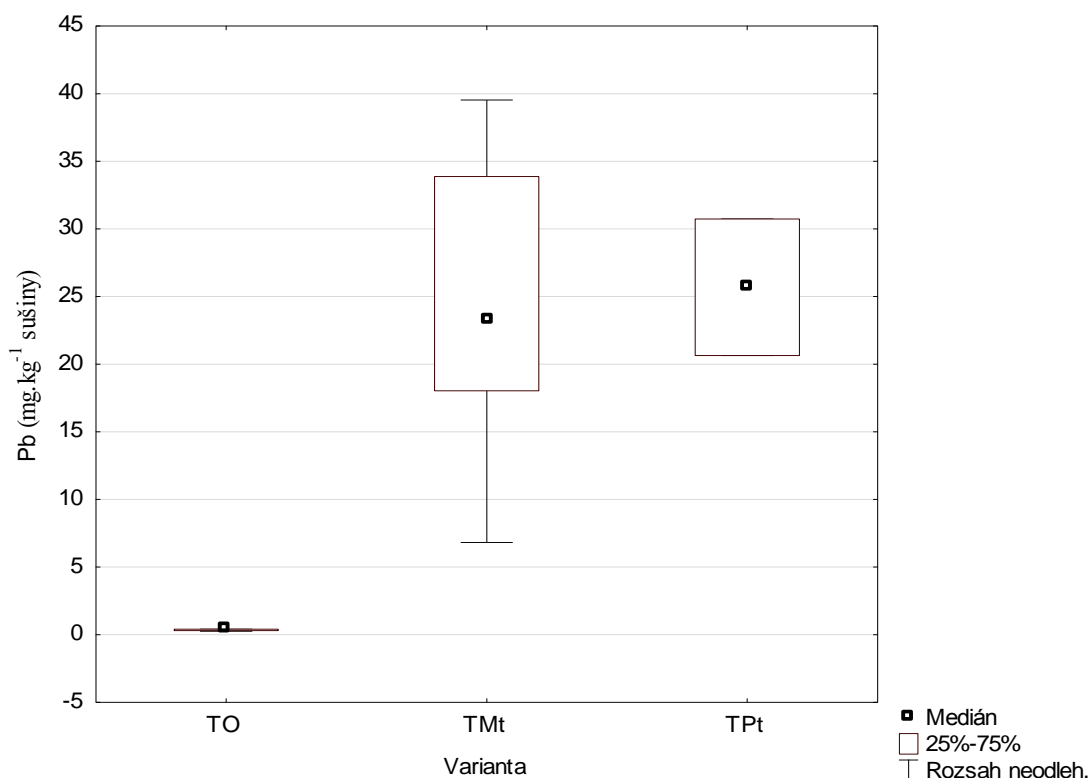
Tabulka 16: Porovnání akumulačního potenciálu *H. diminuta* a ledvin hostitele (průměr ± SD)

Varianta	Dávka Pb (ug.g <sup>-1</sup> )	Počet tasemnic	Hmotnost (g)		Koncentrace Pb (ug.g <sup>-1</sup> FW)		Celkové množství Pb (ug)		Podíl dávky akumulovaný v tkáni (%)	
			Tasemnice	Ledviny	Tasemnice	Ledviny	Tasemnice	Ledviny	Tasemnice	Ledviny
TO	1200	5,5 ± 2,9	2,49 ± 0,77	3,23 ± 0,25	0,08 ± 0,14	0,02 ± 0,08	0,18 ± 0,39	0,08 ± 0,24	<b>0,015</b> ± 0,03	<b>0,006</b> ± 0,02
TMt	32011	6,8 ± 4,1	3,34 ± 1,54	3,51 ± 0,27	4,04 ± 1,69	1,24 ± 0,38	13,00 ± 9,50	4,18 ± 1,30	<b>0,037</b> ± 0,03	<b>0,013</b> ± 0,00
TPt	35951	5,5 ± 2,1	2,66 ± 0,86	2,99 ± 0,43	4,38 ± 0,24	1,26 ± 0,19	11,59 ± 3,04	3,69 ± 0,20	<b>0,032</b> ± 0,01	<b>0,010</b> ± 0,01

Pro detailní porovnání akumulačního potenciálu *H. diminuta* byla vybrána tkáň ledvin a to z následujících důvodů: i. ledviny vykazovaly nejvyšší koncentrace Pb ze všech měkkých tkání hostitele; ii. čerstvá hmotnost ledvin byla velmi podobná čerstvé hmotnosti *H. diminuta* v jednom hostiteli. Při srovnatelné čerstvé hmotnosti akumuluje tkáň *H. diminuta* cca 3x vyšší podíl administrované dávky Pb než ledviny hostitele (pro obě sledované formy Pb).

### **b) akumulace Pb v tkáni *H. diminuta* – octan olovnatý vs. *P. stratiotes***

Graf 12: Koncentrace Pb v tkáních tasemnic ze skupiny TO, TMt a TPt



Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentracích Pb v tkáni tasemnic po expozici octanem olovnatým a *P. stratiotes*. Lze tedy usuzovat, že akumulační potenciál *H. diminuta* je pro obě sledované formy Pb shodný. Výsledek však mohl být významně ovlivněn nízkým počtem relevantních vzorků ve skupině TPt a bude nutné ho ještě ověřit.



## 6.4 Vliv *H. diminuta* na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele

Pro toto porovnání byly použity výsledky skupin OO vs. TO a OMt vs. TMt. Skupiny OPt a TPt nebyly do podrobného hodnocení zařazeny z důvodu nízkého počtu reprezentativních vzorků sk. TPt.

Tabulka 17: Koncentrace Pb ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) v tkáni tasemnic a potkanů (median  $\pm$  SE pro jednotlivé sk.)

Varianta	Játra	Ledviny	Svalovina	Kosti	Střevo	Varlata	Tasemnice
N	21	21	22	21	23	21	11
<b>OO</b>	<b>0,08</b> $\pm$ 0,01 <sup>TMt</sup>	<b>0,13</b> $\pm$ 0,03 <sup>OMt</sup>	<b>0,04</b> $\pm$ 0,03	<b>0,09</b> $\pm$ 0,01 <sup>OMt, TMt</sup>	<b>0,07</b> $\pm$ 0,02	<b>0,06</b> $\pm$ 0,02	<b>X</b>
<b>TO</b>	<b>0,06</b> $\pm$ 0,03 <sup>OMt, TMt</sup>	<b>0,07</b> $\pm$ 0,02 <sup>OMt, TMt</sup>	<b>0,11</b> $\pm$ 0,02	<b>0,05</b> $\pm$ 0,01 <sup>OMt, TMt</sup>	<b>0,12</b> $\pm$ 0,04	<b>0,06</b> $\pm$ 0,01	<b>0,37</b> $\pm$ 0,05 <sup>TMt</sup>
<b>OMt</b>	<b>0,48</b> $\pm$ 0,12 <sup>TO</sup>	<b>5,26</b> $\pm$ 0,92 <sup>OO, TO</sup>	<b>0,09</b> $\pm$ 0,03	<b>10,56</b> $\pm$ 1,90 <sup>OO, TO</sup>	<b>0,26</b> $\pm$ 0,11	<b>0,20</b> $\pm$ 0,09	<b>X</b>
<b>TMt</b>	<b>0,58</b> $\pm$ 0,24 <sup>OO, TO</sup>	<b>4,98</b> $\pm$ 1,25 <sup>TO</sup>	<b>0,11</b> $\pm$ 0,06	<b>9,01</b> $\pm$ 5,00 <sup>OO, TO</sup>	<b>0,31</b> $\pm$ 0,21	<b>0,23</b> $\pm$ 0,11	<b>23,16</b> $\pm$ 10,85 <sup>TO</sup>

<sup>OO-TMt</sup> – signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) v porovnání se skupinou v indexu (Kruskal-Wallis test)

Tabulka 18: Korelace mezi množstvím Pb v tkáních hostitele a tasemnic, jejich abundancí a biomasou

Úroveň expozice	Sledovaný vztah		$r^2$	t-test
Nízká	Podíl dávky akumulovaný v tkáni <i>H. diminuta</i>	- Počet tasemnic v 1 hostiteli	<b>0,98</b>	<b>p &lt; 0,001</b>
		- Čerstvá hmotnost tasemnic	<b>0,83</b>	<b>p &lt; 0,05</b>
	Podíl dávky akumulovaný v ledvinách hostitele	- Počet tasemnic v 1 hostiteli	0,0004	p = 0,97
		- Čerstvá hmotnost tasemnic	0,09	p = 0,63
	Tasemnice $C_{Pb}$	- Játra hostitele $C_{Pb}$	0,08	p = 0,65
		- Ledviny hostitele $C_{Pb}$	0,18	p = 0,47
		- Svalovina hostitele $C_{Pb}$	0,002	p = 0,94
		- Kosti hostitele $C_{Pb}$	0,15	p = 0,52
- Střevo hostitele $C_{Pb}$		0,53	p = 0,17	
- Varlata hostitele $C_{Pb}$		0,09	p = 0,63	
Zvýšená	Podíl dávky akumulovaný v tkáni <i>H. diminuta</i>	- Počet tasemnic v 1 hostiteli	0,21	p = 0,36
		- Čerstvá hmotnost tasemnic	0,04	p = 0,28
	Podíl dávky akumulovaný v ledvinách hostitele	- Počet tasemnic v 1 hostiteli	0,004	p = 0,90
		- Čerstvá hmotnost tasemnic	0,31	p = 0,33
	Tasemnice $C_{Pb}$	- Játra hostitele $C_{Pb}$	0,09	p = 0,56
		- Ledviny hostitele $C_{Pb}$	0,18	p = 0,42
		- Svalovina hostitele $C_{Pb}$	0,13	p = 0,47
		- Kosti hostitele $C_{Pb}$	0,08	p = 0,59
- Střevo hostitele $C_{Pb}$		0,05	p = 0,67	
- Varlata hostitele $C_{Pb}$		0,18	p = 0,40	

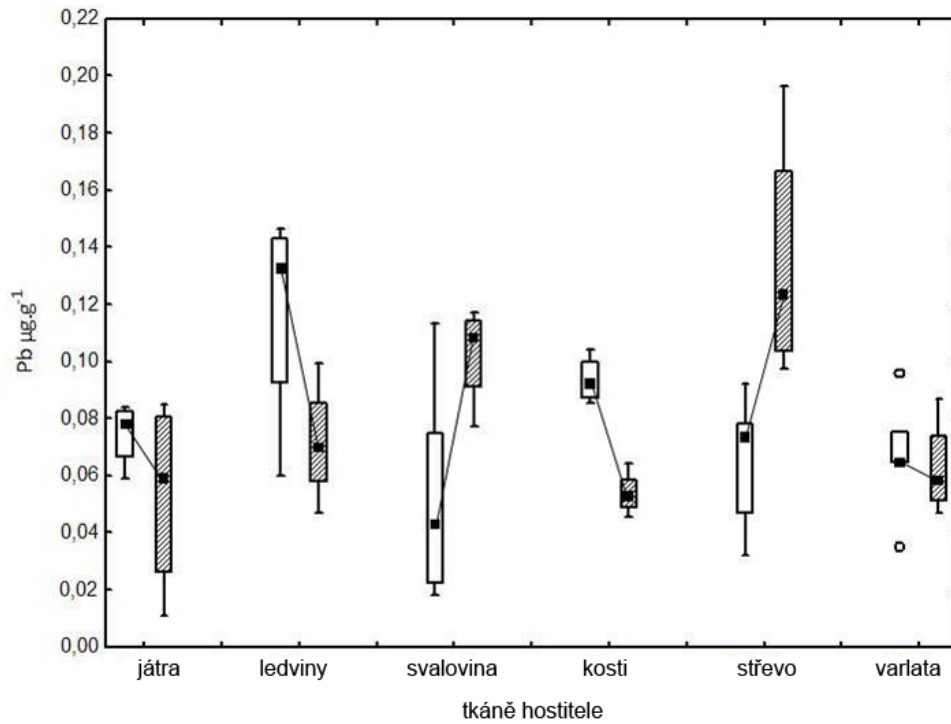
$C_{Pb}$  – koncentrace Pb v tkáni ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  v sušině),

- statisticky významné korelace uvedeny tučným písmem

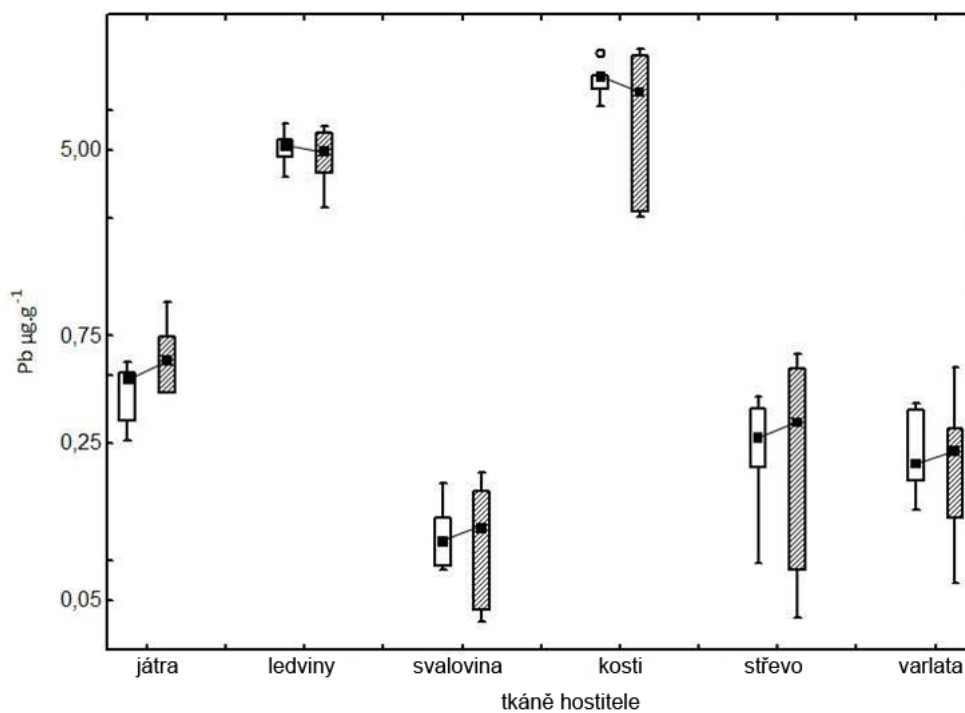
Při stejné úrovni expozice nebyl u žádného orgánu prokázán statisticky významný rozdíl v koncentracích Pb mezi parazitovanými a neparazitovanými zvířaty (viz. grafy 13 a 14). Nárůst

množství Pb v tkáni tasemnice nekoreloval se změnou množství Pb v žádné tkáni hostitele (viz. tab. 18) Při nízké úrovni expozice parazitace mírně ovlivní toxikokinetiku Pb v těle hostitele, když u parazitovaných zvířat vzrostly koncentrace Pb ve svalovině a střevní stěně. Podíl Pb akumulovaný v tkáni tasemnice pozitivně koreluje s množstvím jedinců v jednom hostiteli a jejich biomasou.

Graf 13: Koncentrace Pb v tkáních hostitelů a *H. diminuta* po nízké úrovni expozice



Graf 14: Koncentrace Pb v tkáních hostitelů a *H. diminuta* po zvýšené úrovni expozice



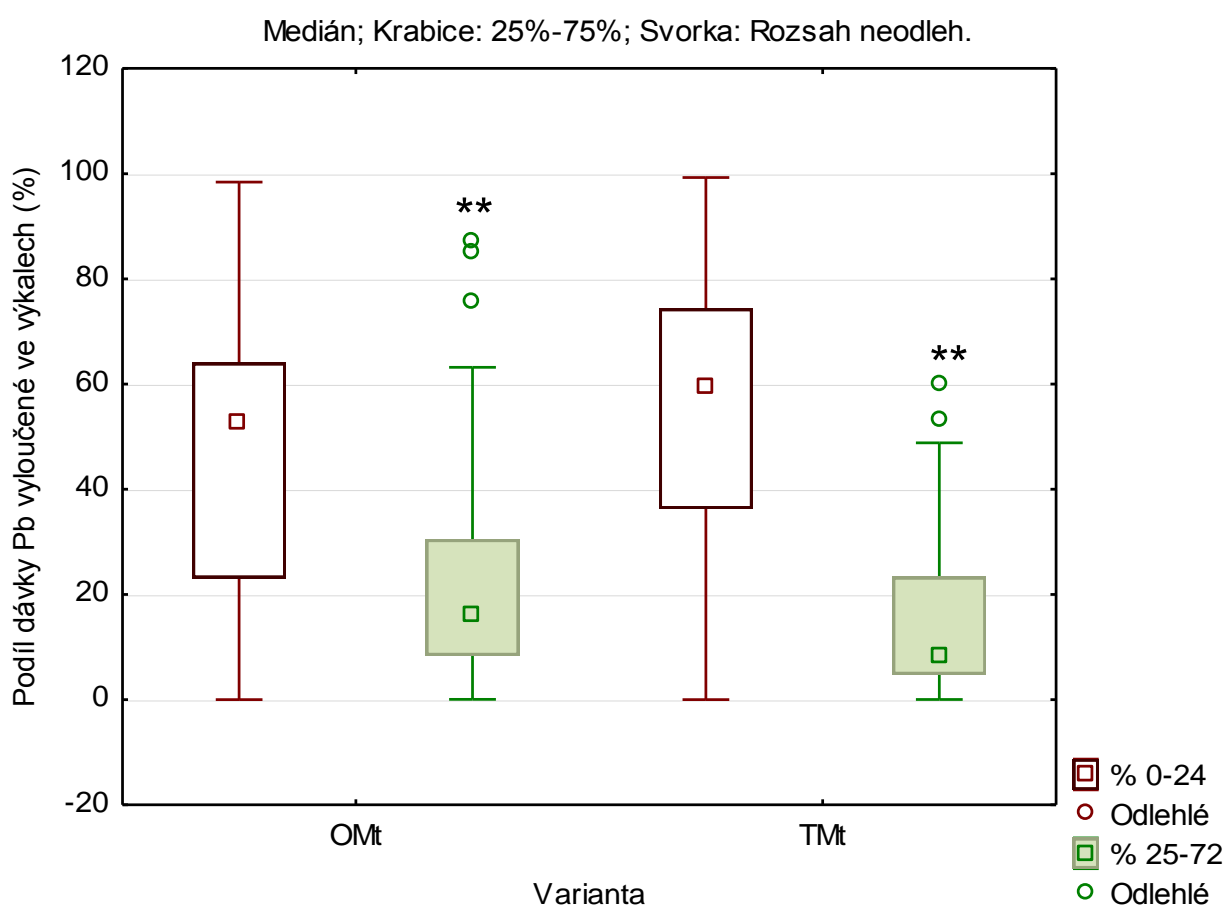
## 6.5 Možnost příjmu Pb z enterohepatického cyklu u *H. diminuta*

Pro potvrzení tohoto předpokladu byly porovnány podíly Pb vyloučeného ve výkalech mezi parazitovanými a neparazitovanými zvířaty v různých odběrových intervalech

Tabulka 19: Podíl Pb vyloučený parazitovanými a neparazitovanými zvířaty v obou intervalech (t-test)

Interval	Průměr OMt	Průměr TMt	t	sv	p	Poč.plat OMt	Poč.plat. TMt	Sm.odch. OMt	Sm.odch. TMt
0-24 hod	44,795	53,024	-1,812	134	<b>0,072</b>	68	68	24,906	27,947
25-72 hod	22,848	14,718	2,668	139	<b>0,009</b>	71	70	20,999	14,547

Graf 15: Porovnání podílu vyloučeného Pb mezi skupinou OMt a TMt



\*\* - statisticky významný rozdíl ( $p < 0,01$ )

Zatímco podíly Pb vyloučené během prvních 24 hodin po přijetí dávky se mezi parazitovanými a neparazitovanými zvířaty neliší, v následujících dvou dnech se podíl Pb vyloučeného ve výkalech signifikantně liší (viz. tab. 19 a graf 15). Na základě tohoto výsledku lze proto usuzovat, že *H. diminuta* přijímá především Pb, které bylo primárně absorbováno do organismu, prošlo enterohepatickým cyklem a do střeva bylo uvolněno společně se žlučí.

## 7 Diskuse

### 7.1 Rozdílná toxikokinetika Pb z octanu olovnatého a z rostlinného hyperakumulátoru v organismu laboratorního potkana

Jak hospodářská, tak volně žijící zvířata mohou v potravě přijímat zvýšené množství kontaminantů. Například Wilkinson et al. (2003) uvádějí, že píce pocházející z oblastí kontaminovaných Pb může obsahovat až 40 mg tohoto prvku na kilogram sušiny. Takové množství několikanásobně přesahuje normy Evropské Unie (Anonymus 2002), stanovující maximální přípustnou koncentraci Pb v krmivech na  $10 \text{ mg/kg}^{-1}$ . Přitom dlouhodobá konzumace krmiv s vysokým obsahem Pb prokazatelně negativně působí na zdravotní stav exponovaných zvířat (Faix et al., 2005; Liu, 2003).

V provedeném experimentu bylo laboratorním potkanům po dobu 6 týdnů perorálně podáno 12 dávek obou sledovaných forem Pb v celkovém množství  $35 \pm 1 \text{ mg Pb}$  (průměr na 1 potkana). Tuto dobu expozice lze vzhledem k celkové délce života laboratorního potkana považovat za sub-chronickou. Design provedeného experimentu tak simuluje podmínky krátkodobé konzumace diety kontaminované Pb a na základě získaných výsledků nelze přesně modelovat vliv dlouhodobé konzumace krmiva s variabilním poměrem různých kontaminantů, který byl již popsán řadou předchozích prací (Angelova et al., 2010; Liu, 2003; Skalická et al., 2002; Wilkinson et al., 2003).

Cílem toxikologické části pokusu bylo detailní srovnání toxikokinetiky odlišných forem Pb, zahrnující popis jejich akumulace v organismu a způsob a dynamiku jejich vylučování. Testovanou formou Pb byla sušená biomasa *P. stratiotes*, neboť o toxikokinetice Pb vázaného v rostlinných hyperakumulátorech v dosavadní vědecké literatuře chybí informace. Ayodae et al. (1982) navrhovali využití *P. stratiotes* jako krmiva pro hospodářská zvířata. Řada novějších studií (Espinoza-Quinones et al., 2009; Odjegba at Fasidi, 2004; Veselý at al., 2011) však jasně prokázala, že pletiva této rostliny dokáží akumulovat enormní množství Pb. Pokud by tedy byla pěstována v prostředí kontaminovaném Pb, může být její využití v krmivech značně problematické. Pro porovnání byla zvolena standartní forma olovnaté soli (octan olovnatý), jehož chování v organismu bylo již poměrně zevrubně popsáno předchozími studiemi. Jako standard je octan olovnatý v toxikologických studiích používán především díky vysoké rozpustnosti, která umožňuje jeho vysokou biodostupnost (Smith et al., 2008). Oproti tomu, o osudu Pb vázaného v rostlinném materiálu v těle exponovaných jedinců zatím existuje mnohem méně relevantních informací.

Dosud publikované studie nejčastěji hodnotily odděleně buď akumulaci Pb z rostlinných krmiv v tkáních a orgánech nebo naopak jeho vylučování z těla (Farmer et Farmer, 2000; Skalická et al., 2002; Wilkinson et al., 2003). Výjimku představuje např. práce Parkera a Hamra (2001), kteří zdokumentovali koncentrace kontaminantů jak v krmivu rostlinného původu (listí stromů a traviny), tak v tkáních a výkalech volně žijících přežvýkavců. Tito autoři uvádějí, že koncentrace Pb v měkkých

tkáních jelenů jsou velmi podobné průměrné koncentraci Pb v rostlinné potravě, kterou zvířata konzumují. Naopak koncentrace Pb ve výkalech je více než 3x vyšší než jeho koncentrace v přijímané potravě. Výsledky provedeného experimentu však nevykazují tento trend, neboť koncentrace Pb v krmivu (+ patřičné dávky Pb) byly vyšší než koncentrace ve výkalech, moči i tkáních potkanů.

Absorbce, distribuce a detoxifikace Pb do/v pletiv/ech hyperakumulujících rostlin probíhá jinak, než do/v těch, pro které je vysoký příjem Pb toxický. Zatímco v klasických rostlinách probíhá detoxifikace přijatého Pb jeho navázáním do ligandů s vysokou molekulovou hmotností (např. fytochelatinů) a kontaminanty mohou být následně imobilizovány zabudováním do buněčných struktur či vakuol, hyperakumulující rostliny disponují ve svých pletivech velkým množstvím malých organických molekul, a divalentní kationty ( $Pb^{2+}$ ) se mohou navázat na volné aminokyseliny, jakými jsou například histidin nebo nikotinamin (Callahan et al., 2006). V rostlinných hyperakumulátorech tak zůstává absorbované Pb značně mobilní a může být transportováno z kořenů do stonků, listů apod. Visioli et Marmioli (2013). Proto je nezbytné ověřit hypotézu, že Pb z hyperakumulujících rostlin bude v organismu reagovat odlišně oproti Pb z anorganických sloučenin, izolovaných organických solí, či z klasických rostlin.

Analýzy Sharmy et al., (2004) či Saretta et al., (2001) odhalily, že Pb se v rostlinných hyperakumulátorech vyskytuje nejčastěji ve formě octanů, sulfátů a sulfidů (v druhu *Sesbania drumondii*, Fabaceae) či jako uhličitany (v druhu *Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). U druhu *P. stratiotes* sice obdobné analýzy zatím nebyly provedeny, ovšem na základě nízkých hodnot celkové exkrece Pb u zvířat exponovaných této formě Pb v provedeném experimentu lze předpokládat, že i v jeho pletivech se Pb vyskytuje v podobných sloučeninách, především pak v uhličitanech. Absorbce uhličitnanu olovnatého z trávicího traktu je totiž ještě vyšší než u octanu olovnatého (Barltrop et Khoo, 1975). Absorbce Pb může být také podpořena přítomností aminokyselin např. cysteinu (Garber et Wei, 1974), jehož zvýšené koncentrace v rostlinných akumulujících Pb zaznamenali Gupta et al. (2010).

Smith et al., (2008) prokázal, že čím vyšší je perorální příjem Pb, tím vyšší jsou jeho koncentrace ve výkalech, což je plně v souladu s primárními výsledky provedeného experimentu (data v kapitole Výsledky jsou již přepočítána a vyjádřena pouze v % z přijaté dávky). Předchozí práce zabývající se exkrecí Pb uvádějí, že ve výkalech může být vyloučeno až 90 % perorálně přijatého Pb (Hunder et al., 2000). Fekální exkrece zjištěná v naší studii však nedosahovala této úrovně ani u jedné ze sledovaných forem Pb. Expozice použitá v našem experimentu měla za následek vyloučení  $\frac{3}{4}$  (u skupiny OMT) a  $\frac{1}{2}$  přijatého množství (u skupiny OPT). Celková fekální exkrece jedinců ze skupiny OMT (73 %) je velice blízká hodnotám exkrece Cd (75 %) zjištěných Reevesem a Vanderpoolem (1998) a Phillipsem et al. (2005), kteří provedli experimentální výživové studie s Cd vázaným ve slunečnicových semenech (u potkanů) a v rostlinném krmivu (u ovcí). Ovšem hodnoty fekální exkrece Pb vázaného v *P. stratiotes* (jen 53 %) byla výrazně nižší než ve všech výše uvedených pracích. Důvodem pro takto nízkou úroveň exkrece může být jednak výše zmíněná odlišná forma Pb vázaného v hyperakumulátorech, nepatrně delší sběrné období použité v předchozích studiích a rozdíly v úrovni

intestinální absorpce mezi Pb a Cd. Nicméně celkově jsou získaná data velmi podobná výsledkům Phillipse et al., (2005), kteří prokázali, že exkrece anorganických forem Cd je výrazně vyšší než těch z rostlinného materiálu. Relevantní informace obdobného charakteru týkající se přímo exkrece Pb však zatím ve vědecké literatuře chybí. Experiment provedený v této disertační práci tak přináší prvotní data o celkové toxikokinetice Pb pocházejícího z rostlinného hyperakumulátoru v savčím organismu.

Kromě celkového množství Pb eliminovaného z organismu laboratorních potkanů byla v rámci provedeného experimentu sledována i dynamika jeho vylučování ve výkalech a moči. Dle předchozích střednědobých studií, popisujících dynamiku fekální exkrece těžkých kovů po perorálním příjmu dusičnanu olovnatého, Pb-cysteinu či Cd, je během prvních 5 dní po expozici ve výkalech vyloučeno až 84 % přijatého těžkého kovu a v následujících dnech pak tato exkrece rapidně klesá (pod 5 %) (Aungst et al., 1981; Phillips et al., 2005; Rabinowitz et al., 1980). Dynamika fekální exkrece obou sledovaných forem Pb determinovaná v provedeném experimentu se s těmito údaji plně shoduje. Oproti studii Rabinowitz et al., (1980), která zachycovala vylučování v delších časových intervalech, v prezentovaném experimentu byly vzorky odebírány po 24 a 72 hodinách. Díky tomu bylo možné odhalit, že exkrece obou sledovaných forem vykazuje shodné schéma, ve kterém je majoritní podíl z organismu eliminován již během prvních 24 hodin po expozici Pb. V následujících dvou dnech je pak celkové množství vyloučeného Pb (u obou forem) cca 3x nižší než první den a exkrece Pb vázaného původně v rostlinném hyperakumulátoru je dokonce podobně nízká jako u neexponovaných zvířat.

Na základě průkazně rozdílných úrovní celkové exkrece mezi sledovanými formami Pb by se dalo očekávat, že Pb z *P. stratiotes* bude v tkáních potkanů akumulováno ve větší míře než to z octanu olovnatého. Tento předpoklad však analýzy obsahu Pb ve vybraných tkáních nepotvrdily. Celkově lze říci, že podíly přijatého Pb determinované v jednotlivých tkáních byly velmi nízké. Vysvětlením tohoto stavu může být to, že analýzám obsahu Pb nebyla podrobena krev, ve které je významné množství Pb po absorpci do organismu navázáno. Obsahy Pb v krvi by se tedy velice pravděpodobně po expozici jednotlivých sledovaných forem Pb významně lišily. Měly by se proto stát nedílnou součástí dalšího podobného experimentu.

Existuje také možnost, že příčinou nastalé situace, kdy byly v porovnání s jinými pracemi současně vyloučeny i akumulovány nečekaně nízké podíly Pb pocházejícího z rostlinného hyperakumulátoru, může být nedokonale provedená příprava vzorku před analýzou obsahu Pb. Použité metody stanovení (jak ICP-OES tak GF-AAS) jsou dnes velice přesné a jejich relevantnost je ověřována současnou analýzou referenčního materiálu. Případná odchylka samotného měření je tak zanedbatelná. Zvolený způsob mineralizace (suchý rozklad v případě výkalů a mikrovlnný rozklad v případě tkání) sice vycházel z dříve ověřených a publikovaných metodik (viz. kapitola Materiál a metodika), ale zpětně bohužel není možné ověřit, že veškeré formy Pb, které vzorky po expozici *P. stratiotes* obsahovaly, přešly 100% do anorganické podoby. Relevantnost těchto kroků vedoucí k získání požadovaných výsledků by proto bylo vhodné ověřit v samostatném experimentu.

Zajímavým zjištěním vyplývajícím z provedeného experimentu byla průkazně intenzivnější akumulace Pb z rostlinného hyperakumulátoru v potkanních játrech, zatímco všechny ostatní tkáně vykazovaly vyšší koncentrace Pb po expozici octanu olovnatému. Sabbioni et Marafante (1976) zjistili, že nejvyšší podíl Pb akumulovaného v játrech na subcelulární úrovni, je vázaný v proteinech jaderných membrán. Játra živočichů exponovaných rizikovým prvkům totiž produkují za účelem ochrany a detoxifikace organismu specifické formy proteinů a enzymů (Gonick, 2011). Ty jsou poté schopné ionty polutantů absorbované do organismu pevně navázat, imobilizovat a tím eliminovat jejich další toxické účinky. Nejvýznamější z nich představuje v případě Pb dehydratasa kyseliny delta-aminolevulové (ALAD). Je tedy pravděpodobné, že formy Pb vyskytující se v *P. stratiotes* mohou zvýšit produkci těchto ochranných a detoxifikačních sloučenin a v jaterní tkáni se poté ukládá větší podíl přijatého Pb.

## **7.2 Rozdílná toxikokinetika Pb při nízké a vysoké úrovni expozice**

Provedený experiment jednoznačně prokázal rozdíly v úrovni exkrece Pb během nízké a zvýšené expozice tomuto prvku. Obě skupiny, kterým byly administrovány dávky Pb vyloučily ve výkalech 3x – 4x větší podíl přijatého Pb než jedinci z kontrolní skupiny. Tato skutečnost je patrně způsobená tím, že intestinální absorbce Pb má pouze limitovanou kapacitu. Přesto že tedy vystavíme organismus potkana nadměrným dávkám Pb, dokáže ze střeva absorbovat jen jeho omezené množství a zbytek kontaminantu odchází neprodleně z těla společně s výkaly, jak potvrzuje i porovnání dynamiky fekální exkrece mezi exponovanými a neexponovanými potkany. Výsledky získané v rámci tohoto pokusu jsou proto shodné s Aungstem et al. (1981), O'Flahertym et al. (1996) i Rabinowitzem et al. (1976), kteří v této souvislosti uvádějí, že procento Pb absorbovaného ze střeva do intoxikovaného organismu se se zvyšující se dávkou snižuje. Tento jev funguje jako primární ochrana organismu před nebezpečně vysokým příjmem Pb. Hladinu absorbce, při které je už transportní kapacita skrz intestinální epitel nasycena, se však zatím nepodařilo přesně stanovit. Proto je při toxikologických studiích vždy nezbytné uvádět úroveň expozice, při které byla absorbce či exkrece Pb sledována.

Zatímco dynamika fekální exkrece se mezi exponovanými a neexponovanými jedinci výrazně lišila, průběh urinární exkrece byl během 72 hodin po podání dávky stabilní u všech třech porovnávaných skupin. Celkově velmi nízké procento přijatého Pb vyloučeného v moči u exponovaných skupin přímo vyplývá ze skutečností uvedených v předchozím odstavci – To jest, že při perorální expozici přechází do organismu jen omezené množství Pb. Takto absorbované Pb je navázáno v krevních buňkách a transportováno do cílových orgánů akumulace. Pouze Pb, které se v organismu nezachytí, přichází poté spolu s krví do ledvin, kde je jeho část díky procesu glomerulární filtrace vyloučena z těla spolu s močí. Nicméně finálně vyloučené množství je už významně redukováno o podíly zachycené v tkáních hostitele (včetně samotných ledvin).

Také při porovnání podílů dávek Pb akumulovaných v tkáních exponovaných a neexponovaných jedinců se potvrzuje fakt, že při vysokém příjmu kontaminantu, klesá jeho podíl zachycený v organismu. Přestože se tedy po expozici Pb výrazně zvýšily jeho koncentrace v potkaních tkáních (nejvýrazněji u jater, ledvin a kostí), vztáhneme-li toto množství k celkově přijaté dávce Pb zjišťujeme, že podíly akumulované v jednotlivých tkáních jsou (s výjimkou kostí) průkazně nižší než u kontrolní skupiny.

### **7.3 Ověření akumulční schopnosti *H. diminuta* pro obě sledované formy Pb a při nízké a vysoké expozici**

Přestože celá řada vědeckých studií prokázala, že gastrointestinální helminté, především tasemnice a vrtejši, akumulují některé rizikové prvky a těžké kovy v několikanásobně vyšším množství než tkáň jejich hostitelů, zatím se v žádné z publikovaných prací nesetkáváme s jejich zařazením mezi hyperakumulující organismy. Označení hyperakumulátor je dnes striktně používáno pouze v rostlinné říši. Aby byla rostlina, dle stupnice navržené Bakerem a Brooksem v roce 1989, označena jako hyperakumulující, musí koncentrace olovnatých iontů v jejích stoncích a listech dosahovat nejméně 1000 mg.kg<sup>-1</sup>, a nejevit přitom známky toxicity. Ačkoli byla tyto hodnota stanovena bez obecné diskuze, je přibližně o jeden řád vyšší než ty, které se uvádí pro běžné druhy rostlin.

Koncentrace Pb stanovené u *H. diminuta* v tomto experimentu se pohybovaly pouze v desítkách mg.kg<sup>-1</sup>, a stejného řádu dosahují i koncentrace zjištěné mnoha jinými autory jak u tasemnic z volně žijících hostitelů (Jankovská et al., 2010), tak ty získané v experimentálních studiích (Sures et al., 2002;). Nicméně stabilně bývají minimálně o jeden řád vyšší než nejvíce zatížené tkáň jejich hostitelů. To je ovšem zatím jediná skutečnost, díky které by mohly být tasemnice mezi hyperakumulující organismy zařazeny, neboť není zcela objasněn ani vliv kontaminantů, které akumulují, na jejich fyziologii. Brázdová a Hanzelová (2012) v této souvislosti zachytily zvýšený výskyt morfologických abnormalit u tasemnic z kontaminovaných oblastí, ve srovnání s jedinci z referenčních (neznečištěných) lokalit. Tyto změny zahrnovaly např. deformace pohlavních soustav (především vaječnic), zdvojení počtu pohlavních orgánů a poruchy strobilizace (nedokonalé oddělení dvou po sobě následujících článků). I přesto však zástupci třídy Cestoda dokáží v silně kontaminovaných oblastech přežít a úspěšně se rozmnožovat. Samotné fungování jejich fyziologických procesů tak zřejmě toxickými vlivy prostředí není významně ovlivněno (Hoole et al., 2010).

Výsledky provedeného experimentu neodhalily rozdíl v akumulčním potenciálu *H. diminuta* pro sledované formy Pb, které jejich hostitel perorálně přijímal. Toto zjištění všeobecně dobře koreluje s daty potvrzujícími akumulující vlastnosti tasemnic v nejrůznějších typech prostředí (jak vodní, tak terestrické), kde se kontaminanty běžně vyskytují v různých formách, speciích a



sloučeninách. Je tedy pravděpodobné, že pokud se rizikové prvky či těžké kovy dostanou do organismu hostitele a zapojí se do jeho metabolických procesů, jsou tasemnice schopné přijímat dané prvky ze širokého spektra jejich sloučenin.

Je ale nutné zdůraznit, že počet jedinců zahrnutých pro finální hodnocení ve skupině exponované rostlinnému hyperakumulátoru byl extrémně nízký a pro jednoznačné ověření uvedených předpokladů bude nutné tuto část experimentu zopakovat v podmínkách *in vivo* nebo *in vitro* s relevantním počtem tasemnic.

Na druhou stranu získané výsledky jasně potvrdily vysoký potenciál druhu *H. diminuta* akumulovat Pb, prezentovaný již Suresem et al. (2002; 2003). Koncentrace naměřené v tkáni tasemnic byly při obou úrovních expozice signifikantně nejvyšší v celém hostitelsko/parazitickém systému. Tato skutečnost je plně ve shodě s řadou dosud publikovaných prací, ve kterých dospělé tasemnice vykazovaly i několikanásobně vyšší akumulaci Pb než tkáň jejich hostitelů (Baruš et al., 2000, Sures et al., 2002; 2003; Torres et al., 2004; Malek et al., 2007).

V rámci realizovaného experimentu však byla získána i některá unikátní data. Díky tomu, že experiment probíhal v kontrolovaných laboratorních podmínkách a byla přesně známá dávka Pb, kterou potkani přijali, mohl být přesně vyjádřen podíl této dávky zachycený v tkáni tasemnic. Tyto informace by např. ve volném prostředí nebylo možné získat, neboť nelze jednoznačně definovat množství kontaminantu vstupujícího do těla hostitele. Design provedeného pokusu to však umožnil. Bylo tak zjištěno, že při srovnatelné čerstvé hmotnosti s ledvinami hostitele akumuluje *H. diminuta* až 3x větší podíl přijatého Pb než nejvíce zatížená měkká tkáň hostitele a to jak při nízké tak při zvýšené expozici. Podíl dávky akumulovaný tasemnicí při nízké úrovni expozice navíc silně pozitivně koreloval s celkovou biomasou (čerstvou hmotností i počtem) parazitů v těle jednoho hostitele. Obdobný vztah mezi intenzitou infekce tasemnicemi (*Oochoristica tuberculata*) a koncentracemi Pb v nich popsal Soliman (2012) u ještěřů, zatímco Nachev et al., (2010) zastávají názor, že úroveň akumulace těžkých kovů v tkáních vrtejšů nijak nesouvisí s velikostí jejich infropopulace v rybách. Woelfl et al. (2008), kteří sledovali akumulaci Pb u larvárních stádií tasemnice *Diphyllobotrium latum* uvedli, že množství zachyceného Pb se se vzrůstající biomasou parazita snižuje a že menší jedinci akumuluji až 80x více Pb než ti velcí. Toto tvrzení se ale neshoduje s dříve prezentovanými názory Baruše et al., (2001) a Surese et al., (2003), kteří předpokládali, že menší a tedy zároveň i mladší jedinci byli kontaminantu vystaveni po kratší dobu a stihli proto akumulovat méně Pb než ti s větší biomasou (starší). V provedeném experimentu ovšem nebyly hodnoceny korelace mezi exaktní velikostí každé tasemnice, ale vzorek byl vždy reprezentován celkovou biomasou všech jedinců *H. diminuta* v daném hostiteli. Přímé srovnání s výsledky těchto autorů by proto nebylo zcela objektivní. Odlišnost výsledků Woelfla et al., (2008) je ovšem velmi pravděpodobně způsobena také tím, že nedospělá stadia tasemnic osídlují v hostiteli jiná predilekční místa než dospělci (svalovina / tenké střevo), čímž se podstatně liší i jejich přístup k různým formám a dávkám kontaminantů.

Enormní schopnost přijímat Pb, dělá z hymenolepidních tasemnic ideální nástroje bioindikace znečištění životního prostředí, což prezentovali již Sures et al. v roce 2003 či Torres et al. v roce 2011. Jako vhodné akumulující bioindikátoři znečištění těžkými kovy byly ovšem doporučeny i další druhy tasemnic parazitující u hlodavců např. *Gallegoides arfaai* či *Skrjabinotaenia lobata* u *Apodemus sylvaticus* v práci Torres et al. (2004, 2006) a *Paranoplocephala dentata* u *Clethrionomys glareolus* a *Microtus agrestis* v práci Jankovské et al. (2009).

Efektivita akumulace příslušného prvku mezi tkání hostitele a parazita se dnes rutinně udává v podobě biokoncentrační faktoru. Proto bylo toto vyjádření použito i v prezentovaném experimentu. Při nízké úrovni expozice byly BF mezi tasemnicí a všemi sledovanými tkáněmi hostitele přibližně vyrovnané a pohybovaly se v poměrně úzkém rozpětí (3,5 pro játra – 7,5 pro svalovinu). Tzn., že při běžné úrovni příjmu Pb (pouze z komerčního krmiva) nalezneme v tkáni tasemnice cca 4x větší koncentrace Pb než u jejího hostitele. Při zvýšeném příjmu Pb jsou však rozdíly v koncentracích Pb mnohem markantnější a dosahují až hodnot 181 pro stěnu střeva, 133 pro varlata a 352 pro svalovinu. Výjimkou v tomto schématu jsou kosti a ledviny hostitele. U těchto tkání BF při zvýšené expozici zůstává přibližně stejný jako při nízké úrovni. Z toho vyplývá, že tempo nárůstu koncentrace Pb v tkáni tasemnic a v těchto dvou tkáních hostitele je při subchronické expozici přibližně shodné. Nejprůkaznější rozdíl mezi BF při nízké a vysoké expozici pak statistická analýza odhalila u jater. I když zde byl nárůst jen cca desetinásobný, naměřené hodnoty byly velmi konzistentní a průkaznost rozdílů proto vysoká.

V případě srovnání získaných výsledků s již publikovanými daty, musíme vycházet ze studií, které také hodnotily BF při nízké a zvýšené úrovni expozice hostitele. Ty realizovali Sures et al., (2003) nebo Torres et al. (2006) u volně žijících hlodavců z kontaminovaných a referenčních oblastí nebo Jankovská et al. (2010) u ovcí experimentálně intoxikovaných octanem olovnatým. Ve všech výše zmíněných pracích byl analyzován menší počet tkání hostitelů, proto lze prezentovaný experiment opět označit za nejkompexnější. Detailní srovnání získaných výsledků z výše uvedenými pracemi přináší následující tabulka (tabulka 20).

Tabulka 20: Porovnání BF tasemnic u terestrických hostitelů při nízké a vysoké úrovni expozice Pb

Autor studie	Hostitel/Parazit	Expozice	BF <i>H. diminuta</i> v porovnání s tkáněmi hostitele					
			Ledviny	Játra	Svalovina	Střevo	Kosti	Varlata
<b>Tento experiment</b>	<i>Rattus norvegicus</i> / <i>Hymenolepis diminuta</i>	Nízká	4,1	3,5	7,5	4,4	5,3	4,3
		Vysoká	5,8	40	352	181	4,9	133
<b>Sures et al. (2003)</b>	<i>Rattus norvegicus</i> / <i>Hymenolepis diminuta</i>	Nízká	6	29		36		
		Vysoká	11	87		87		
<b>Torres et al. (2006)</b>	<i>Apodemus sylvaticus</i> / <i>Skrjabinotaenia lobata</i>	Nízká	5,6	33,1	52,4			
		Vysoká	8,5	53,2	81,4			
<b>Jankovská et al. (2010)</b>	<i>Ovis aries</i> / <i>Moniezia expanza</i>	Nízká	0,2	0,3	0,9			
		Vysoká	4	5	458			

Stejně jako v těchto třech porovnávaných studiích, zvýšená úroveň expozice vždy vedla k nárůstu BF. Je-li expozice dlouhodobá, jsou rozdíly v BF jen 2-3 násobné (Sures et al., 2003; Torres et al., 2006). Naopak krátkodobý příjem velmi vysoké dávky kontaminantu jako v případě studie Jankovské et al. (2010) vede extrémnímu rozdílu mezi BF exponovaných a neexponovaných zvířat (20-500i násobný). V prezentovaném experimentu se koeficient mezi BF při nízké a zvýšené expozici pohyboval od 11 (pro játra) až po 47 (u svaloviny). Z tabulky 11 lze vysledovat, že zatímco koncentrace Pb ve střevu, varlatech a svalovině se při rozdílných úrovních expozice příliš nezměnily (dvoj - trojnásobný nárůst), koncentrace Pb v tkáni tasemnice vzrostly více než 70x. Z toho jasně vyplývá, že tasemnice akumuluje Pb velice rychle. Tato zjištění je shodné s názorem Surese et al., (2003) i Oyoo-Okoth et al., (2012), kteří uvedli, že GIH akumuluje rizikové prvky rychleji než měkké tkáně hostilů. Autoři dále tvrdí, že koncentrace kontaminantů v tkáních GIH rostou velmi rychle během prvních týdnů expozice, cca po 4 týdnech se ustálí a následně se rozdíly v koncentracích mezi tkání hostitele a parazitita opět postupně snižují. Velice podobné tvrzení prezentoval Sures et al., již v roce 1999, když uvedl, že poměr mezi koncentrací Pb v parazitovi a ve svalovině hostilů může určovat délku expozice, přičemž nižší BF by měly indikovat delší expozici tomuto prvku.

Při porovnání výsledků provedeného subchronického experimentu s daty získanými jednak při akutní (a vysoké), tak chronické (a poměrně nízké) době expozice je tento trend poměrně patrný. Nicméně pro jednoznačné potvrzení závislosti BF na délce a úrovni expozice by bylo nutné provést podrobnější experiment, ve kterém by byl využit postupný gradient obou těchto faktorů.

#### **7.4 Vliv *H. diminuta* na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele**

Tenké střevo je současně jak predilekčním místem *H. diminuta*, tak místem nejintenzivnější absorpce Pb z gastrointestinálního traktu. Proto lze předpokládat, že tasemnice může s Pb v duodenu interagovat a ovlivnit tím jeho osud ve střevě i jeho absorpci do organismu hostitele. Proto se jedním z hlavních cílů provedeného parazitologicko/toxikologického experimentu stalo zdokumentování potenciálního vlivu parazitace *H. diminuta* na toxikokinetiku Pb v těle hostitele.

Design pokusu přímo vychází ze studie Surese et al., (2002), významně však rozšiřuje jimi prezentovaná data, neboť jejich výsledky poskytly informace pouze o koncentracích Pb v tasemnici a ledvinách hostitele. Množství Pb ve všech ostatních tkáních bylo v jejich práci pod mezí detekce použité analytické metody. Díky využití citlivější analytické metody (srovnatelná princip stanovení, ovšem s nižšími detekčními limity) a mírnému navýšení administrovaného množství Pb (12 dávek místo 10i) byly v rámci provedeného experimentu determinovány obsahy Pb v šesti různých tkáních hostitelů a samozřejmě také v přítomných tasemnicích. Navíc byly současně stanoveny i obsahy Pb v

exkrementech exponovaných jedinců. V tomto ohledu poskytuje provedený experiment dosud jednoznačně nejkompexnější obraz osudu Pb v terestrickém hostitelsko/parazitickém systému.

Za standartních podmínek je většina perorálně přijatého Pb ukládána v kostech exponovaných jedinců a vysoké koncentrace Pb bývají detekovány také v ledvinách. Ovšem tento stav je platný u neparazitovaných jedinců. Zahrneme-li do celkového toxikologického modelu také přítomné GIH, predominantní místa ukládání Pb v organismu se mohou změnit. Výsledky naší studie potvrzují tuto hypotézu pouze při nízké úrovni expozice. Při zvýšeném příjmu Pb vykazují parazitovaná i neparazitovaná zvířata shodný model ukládání Pb (svalovina < varlata < střevní stěna < játra < ledviny < kosti), který se dobře shoduje s údaji prezentovanými v řadě toxikologických studií (Topaska-Ancheva et al., 2003; Gregus et Klaassen, 1986; Hayashi et al., 1993; Hunder et al., 2000; Sadykov et al., 2009).

Ovšem při nízké úrovni expozice vykazovaly tuto standartní posloupnost s nejvyššími koncentracemi Pb v ledvinách a kostech pouze tkáň neparazitovaných zvířat. Oproti tomu u parazitovaných zvířat byly nejvyšší koncentrace Pb nečekaně detekovány ve svalovině a střevní stěně. Tyto změny v toxikokinetice Pb v organismu hostitele mohou být způsobeny právě přítomností tasemnice. Parazitace GIH totiž narušuje homeostázu vnitřního prostředí, moduluje imunologickou regulaci hostitelského organismu a snižuje produkci ochranných sloučenin, jakými jsou např. metalothioneiny (Baudrimont et Montaudouin, 2007; Oyoo-Okoth et al., 2012). Celkově však byly změny v místech akumulace Pb mezi parazitovnými a neparazitovnými jedinci jen velmi malé a proto nelze rozdíly zaznamenané v provedeném experimentu zobecnit na všechny GIH pozitivní hostitele.

Již delší dobu se setkáváme se studii, ve kterých autoři zaznamenali potenciální vliv parazitace GIH na koncentrace kontaminantů (především těžkých kovů) v tkáních živočichů používaných k biomonitoringu znečištění vodního (Sures et al., 1997, 1999; Sures and Siddall, 2001; Azmat et al., 2008) či terestrické (Jankovská et al., 2009; Sures et al., 2003; Torres et al., 2004; 2006) prostředí. Většina těchto autorů předpokládá, že pokud je hostitel vystaven působení kontaminantu a jeho část je zachycena v tkáni GIH, sniží se množství prvku, které by mohlo být absorbováno do organismu hostitele. Pokud by tedy byly provedeny analýzy obsahu prvků v orgánech parazitovaných zvířat, byly by detekovány snížené koncentrace kontaminantů, čímž by mohla být zkreslena data, vypovídající o zátěži okolního prostředí. V práci některých autorů (Azmat et al., 2008; Jankovská et al., 2012, Sures et al., 2003) se dokonce můžeme setkat přímo s názorem, že přítomnost GIH může ochránit hostitele před zvýšenou akumulací kontaminantů v jeho organismu. Tyto předpoklady také vychází z výsledků, ve kterých byly v tkáních parazitovaných zvířat z volného prostředí detekovány nižší koncentrace kontaminantů než u neparazitovaných jedinců.

Jedním z hlavních cílů provedeného experimentu proto bylo jednoznačně zdokumentovat vliv samotné parazitace tasemnicí *H. diminuta* na výsledné koncentrace Pb v tkáních hostitele. Proto byl pokus realizován v kontrolovaných podmínkách, v rámci kterých byly minimalizovány všechny ostatní faktory ovlivňující akumulaci Pb v organismu hostitele (zvířata stejně stará, stejného pohlaví,

držena ve standartizovaných podmínkách s identickým přístupem k vodě i krmivu, prostá nákazy jinými GIH). V tomto prostředí však nebyl vliv přítomnosti tasemnice na výsledné koncentrace Pb v tkáních hostitele jednoznačně průkazný. Lze se tedy domnívat, že rozdíly popsané ve výše uvedených pracích mohly být způsobeny i jinými vlivy, které ve volném prostředí na hostitele i parazity působí a které autoři ve svých výsledcích nezohlednili. Na základě našich výsledků proto parazitace GIH nemusí jednoznačně představovat významný faktor zkreslující informace o zátěži životního prostředí. Je ale nutné připustit, že výsledky experimentu nebyly tak průkazné, jak bylo původně očekáváno. Pro získání jednoznačných výsledků by patrně bylo nutné provést experiment s větším počtem pokusných zvířat a v každém z nich zajistit stejnou intenzitu infekce.

Výsledky získané v provedeném experimentu pro jednotlivé tkáně parazitovaných a neparazitovaných zvířat byly během obou úrovní expozice velice různorodé a nelze v nich vysledovat jasný trend. Případný vliv parazitace na toxikokinetiku Pb v organismu hostitele se tedy jeví jako velice komplexní problematika a nelze ho zřejmě jednoduše interpretovat. Přesto, že mezi parazitovanými a neparazitovanými zvířaty byly zaznamenány rozdíly ve středních hodnotách koncentrací Pb v jednotlivých tkáních, žádný z těchto rozdílů nebyl při shodné úrovni expozice statisticky průkazný a různé tkáně se při odlišné dávce přijímaného Pb chovaly odlišně. Pouze kosti a ledviny, místa nejintenzivnější akumulace Pb, vykazovaly shodný trend při nízké i vysoké expozici a střední hodnoty koncentrací Pb v nich byly vždy nižší u parazitovaných zvířat. Patrně díky souhrě vysokého rozptylu získaných hodnot a poměrně nízkému počtu pokusných zvířat v jednotlivých skupinách, však ani tyto rozdíly nedosahovaly hladiny statistické průkaznosti.

S podobně různorodými výsledky se můžeme setkat i v celé řadě dříve publikovaných studií. Nesignifikantně nižší koncentrace Pb v ledvinách parazitovaných zvířat jsou shodné se zjištěním Surese et al., (2002), ten však ve své práci nepřinesl data týkající se žádné jiné tkáně hostitele. Výsledky ledvin a jater potkanů exponovaných Pb jsou velmi podobné datům ze studie Jankovské et al., (2010), ve které parazitované lišky z kontaminovaných oblastí vykazovaly vyšší koncentrace v játrech a nižší v ledvinách než ty neparazitované. Na druhou stranu tasemnicí nakažení hlodavci ze stejných oblastí vykazovali dle stejné autorky (Jankovská et al., 2008) nižší koncentrace Pb v ledvinách i játrech. Ovšem stejně jako v provedeném experimentu, rozdíly mezi koncentracemi v tkáních parazitovaných a neparazitovaných zvířat v žádné z výše uvedených prací nebyly statisticky průkazné. Takové rozdíly přinesl zatím pouze jediný experiment provedený na terestrických hostitelích a to studie Jankovské et al., (2010), ve které byl ovcím po dobu jednoho týdne podáván octan olovnatý ve vodném roztoku. Výsledky získané během provedeného experimentu zahrnující sub-chronickou 6i-týdenní expozici však nepotvrdila, že by parazitace GIH mohla vést k redukci množství Pb v tkáních hostitele, neboť v některých tkáních parazitovaných zvířat byly detekovány dokonce vyšší obsahy Pb než u těch neparazitovaných podobně jako ve studiích Khaleghzadeh-Ahangara et al., (2011) nebo Jankovské et al., (2010 a,b).

V souvislosti s diskutovanou problematikou je třeba poznamenat, že v současné době existuje celá řada studií, popisujících rozdílné úrovně akumulace rizikových prvků v tkáních parazitovaných a neparazitovaných ryb. Ovšem toxikokinetika Pb v aquatických a terestrických organismech se poměrně výrazně liší, a proto by nebylo srovnání výsledků provedeného experimentu s daty získanými na vodních hostitelsko/parazitických systémech zcela objektivní.

Přestože tkáň tasemnice akumuluje velké množství Pb, může její přítomnost v tenkém střevě hostitele paradoxně usnadnit či dokonce zvýšit absorpci Pb do organismu hostitele. To může být způsobeno např. tím, že kyselé produkty metabolismu glukózy u *H. diminuta*, které vylučuje do svého okolí, snižují pH střeva až na hodnoty menší než 6 (Mettrick, 1971). V kyselém prostředí pak potenciálně vzrůstá biodostupnost Pb. Samotná strobila tasemnice navíc dle Dwinella et al., (1997) částečně ucpává lumen střeva. Tím zpomaluje transport natráveniny dále do trávicího traktu a prodlužuje tak dobu zdržení natráveniny v oblasti nejvyšší absorpce rizikových prvků. V neposlední řadě tasemnice z potravy hostitele odčerpává pro vlastní výživu některé esenciální prvky, především Ca, Mg a Fe. Snížené množství těchto prvků v primárním chymu pak může uvolnit kapacitu v transportních kanálcích, které za normálních okolností slouží k jejich vstřebávání ze střeva do těla hostitele. Absorbce Pb se tak může ještě zvýšit, neboť Pb využívá dle Bartona et al., (1987a,b) i Morrisona a Quatermanna, (1987) stejné cesty přenosu skrz intestinální epitel jako výše zmíněné prvky. Oyoo-Okoth et al., (2012) navíc ve své práci poukázali na to, že paraziti mohou ovlivnit metabolismus kontaminantů v těle hostitelů tím, že naruší jejich ochranné procesy. Z tohoto důvodu infikovaní hostitelé nevyklučují polutanty z těla dostatečně efektivně a v jejich tkáních můžeme detekovat zvýšené množství rizikových prvků.

Během zvýšené expozice Pb v provedeném experimentu byla hypotéza o možné vyšší absorpci Pb u parazitovaných zvířat částečně potvrzena, a to překvapivě u orgánů s nízkými koncentracemi Pb (méně než  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DW}$ ), jakými byly játra, svalovina, stěna střeva a varlata. Stěna duodena, skrze kterou Pb při absorpci do těla prochází, vykazovala při obou úrovních expozice vyšší koncentrace Pb u parazitovaných zvířat. I tento fakt může být považován za nepřímý důkaz, že přítomnost tasemnice ve střevě potenciálně zvyšuje absorpci Pb do organismu hostitele.

Po vzoru studie Nacheva et al., (2013) byla testována závislost změny koncentrace Pb v tkáni parazita a hostitele. Zvyšování množství Pb v tkáni *H. diminuta* však nijak nekorelovalo s případným snižováním jeho množství v jakékoli tkáni hostitele, zatímco právě Nachev ve své studii demonstroval závislost mezi množstvím Pb v organismu hostitelských ryb a v larvách parazitických hlístic (*Eustrogylydes* sp.). Rozdíly ve výsledcích obou pokusů mohou být ovšem způsobeny celou řadou faktorů, např. rozdílnou lokalizací a metabolismem larev hlístic a dospělých tasemnic či rozdílnou toxikokinetikou prvků v rybím a savčím organismu. Obdobně jako v pracích Nacheva et al., (2013) a Oyoo-Okoth et al., (2010), kterým se nepodařilo prokázat souvislost mezi množstvím Pb v těle hostitele a intenzitou infekce larvami tasemnic či dospělci vrtejšů, byla v rámci provedeného experimentu testována také závislost množství Pb akumulovaného v ledvinách hostitele na celkové

biomase parazita (počet jedinců a čerstvá hmotnost tasemnic v jednom hostiteli). Ani zde však nebyl žádný významný vztah prokázán.

Celkově vzato, získané výsledky indikují, že *H. diminuta* není schopná aktivně ochránit svého hostitele před nadměrnou akumulací Pb. Lze tedy předpokládat, že tasemnice přijímá především Pb, které se nenachází v primárním chymu, ale teprve to, které bylo do střeva vyloučeno sekundárně, poté co bylo absorbováno do organismu (blíže diskutováno v následující podkapitole 7.5).

Sures et al., (2000) zaznamenali u potkanů experimentálně infikovaných vrtejšem *Moniliformis moniliformis* nižší koncentrace Pb ve výkalech než u neparazitovaných jedinců. V rámci poskytnutí komplexních informací o vlivu tasemnice na celkovou toxikokinetiku Pb v hostitelském organismu bylo proto i v tomto experimentu provedeno srovnání koncentrací Pb v exkrementech mezi parazitovanými a neparazitovanými zvířaty. Na rozdíl od vrtejšů, u kterých je největší podíl Pb akumulován v přední části těla (prosoma) (Sures et al., 2000), a kteří do výkalů hostitele uvoňují pouze samotná vajíčka (ze zadní části těla, tedy metasoma), vykazuje tasemnice *H. diminuta* odlišné charakteristiky. Jedná se o apolytický druh tasemnice, což znamená, že spolu s výkaly hostitele odchází z jeho těla i celé skupinky terminálních proglotidů se zralými vajíčky, a k jejich rozpadu dochází až ve volném prostředí. Tato tkáň (oddělené terminální proglotidy a zralá vajíčka) přitom vykazuje dle studií Khalila et al., 2009; Riggse et al., (1987) i Surese et al., (1999) vysoké koncentrace Pb a může tak podstatně navýšit celkové obsahy Pb ve výkalech hostitele.

V rámci provedeného pokusu se bohužel nepodařilo tyto části z výkalů efektivně a beze zbytku separovat. Celkové množství Pb vyloučeného ve výkalech parazitovaných a neparazitovaných zvířat se za těchto okolností významně nelišilo, když skupina bez parazitů vyloučila cca 65 % a jedinci parazitovaní *H. diminuta* cca 67 % přijatého Pb. Je ovšem pravděpodobné, že pokud by se podařilo zmiňované části tkání tasemnic, které „uměle“ navyšují celkový obsah Pb ve výkalech, odstranit, mohlo by být dosaženo výsledků podobných těm ze studie Surese et al., (2000).

## **7.5 Možnost příjmu Pb z enterohepatického cyklu u *H. diminuta***

Impulsem pro ověření této teorie byla práce Surese et Siddalla (1999), ve které v podmínkách *in vitro* prokázali, že dospělí jedinci vrtejšů ryb akumulují Pb efektivněji, pokud je do kultivačního roztoku přidána kyselina žlučová. Dále lze v tomto ohledu vycházet ze studie Surese et al., (1998), popisující vysoké koncentrace Pb v motolici (*Fasciola hepatica*, Digenea), vyskytující se ve žlučovodech skotu. Jedinci tohoto druhu nepřichází do přímého kontaktu s obsahem střeva (primární chymus) a tak jediný zdroj Pb pro ně představuje olovo, které již bylo absorbováno do těla a je enterohepatickým cyklem vylučováno zpět do tenkého střeva. U dospělých tasemnic z terestrických hostitelů však zatím nikdo obdobné experimenty neprovedl. Přitom je tato možnost vysoce pravděpodobná, neboť tasemnice běžně přijímají živiny ve sloučeninách se žlučí (Tkachuck et

MacInnis, 1971). Je-li tedy Pb navázáno v komplexech se žlučovými kyselinami (lipofilní forma), může být skrz tegument tasemnice náhodně absorbováno během procesu příjmu ostatních základních živin.

Dosud jedinou prací, ve které se nepřímo setkáváme s možností, že by dospělé tasemnice terestrických hostitelů přijímaly Pb v komplexech s kyselinou žlučovou, je studie Torres et al., (2011). Tito autoři zdokumentovali zvýšenou akumulaci Pb u druhu blízce příbuzného *H. diminuta*, a to *H. microstoma*, která může být v těle hostitele lokalizována jak v tenkém střevě, tak ve žlučovodech. Pokud by data prezentovaná v jejich práci pocházela právě z tasemnic žijících ve žlučovodech, platily by zde stejné předpoklady jako u *F. hepatica* ze studie Surese et al., (1998). Torres et al. (2011) však ve své práci neuvedli, odkud analyzované tasemnice přesně pochází. Proto ani jejich výsledky jasně nedokazují, že tasemnice přijímají Pb společně ze žlučí.

V rámci experimentu byl potenciál *H. diminuta* akumulovat Pb, které bylo do střeva sekundárně vyloučeno společně se žlučí, ověřen pouze nepřímo (a v podmínkách *in vivo*). Byly porovnány koncentrace Pb ve výkalech mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci a to ve dvou odběrových intervalech. Dvacetičtyřhodinový interval představoval období, kdy je z exponovaného organismu převážně eliminováno pouze Pb, které nebylo v trávicím traktu absorbováno. V následujícím sběrném období (25-72 hod po podání dávky) pak podstatnou část Pb ve výkalech tvoří olovo, které bylo do střeva vyloučeno spolu se žlučí. Je ovšem nutné znova upozornit na to, že u parazitovaných zvířat bylo množství Pb v exkrementech ještě navýšeno přítomnými propagačními útvary tasemnic (viz. podkapitola 7.4.).

I přes tento fakt, získané výsledky indikují, že *H. diminuta* přijímá především Pb sekundárně vyloučené z organismu. V prvních 24 hodinách se totiž množství Pb vyloučeného ve výkalech mezi parazitovanými a neparazitovanými jedinci výrazně neliší. Výkaly parazitovaných zvířat dokonce vykazují o něco vyšší koncentrace než u neparazitovaných zvířat. To je patrně způsobeno právě přítomností tkáně *H. diminuta*. Oproti tomu, mezi druhým a třetím dnem, kdy ve výkalech převažuje Pb vyloučené společně se žlučí, již parazitovaní jedinci eliminují méně Pb než ti neparazitovaní (i přes to, že se ve výkalech stále vyskytují části terminálních proglotid). Dá se předpokládat, že pokud by se tyto části tkáně podařilo separovat a změřit koncentrace Pb v samotných výkalech, byly by rozdíly ještě markantnější. Za těchto podmínek lze však získané výsledky považovat pouze za předběžné a bylo by vhodné ověřit je experimentálně podobným způsobem jako ve výše uvedené práci Surese et Siddalla (1999).



## 8 Závěr

V rámci této disertační práce byly získány nové poznatky týkající se hned dvou problematik a to za A) toxikokinetiky dvou odlišných forem Pb v organismu laboratorního potkana a za B) akumulace a transportu těchto forem Pb v hostitelsko/parazitickém systému

ad. A)

V bilanční fázi toxikologické studie byly získány unikátní poznatky o toxikokinetice Pb pocházejícího z biomasy rostlinného hyperakumulátoru *P. stratiotes*. Byly stanoveny podíly administrovaného Pb, které dokáží exponovaní jedinci z těla eliminovat ve výkalech a moči i ty, které naopak zůstávají akumulovány v intoxikovaném organismu. Chování této formy Pb v organismu laboratorního potkana bylo porovnáváno se standartní sloučeninou (octanem olovnatým) a bylo zjištěno, že:

- ✓ Úroveň akumulace obou sledovaných forem Pb v tkáních laboratorního potkana se neliší (s výjimkou jater, které akumulují průkazně větší podíly Pb z *P. stratiotes*)
- ✓ Majoritní podíl obou forem Pb je z organismu vyloučen ve výkalech, přičemž Pb z octanu olovnatého je eliminováno cca o 20 % efektivněji
- ✓ Fekální exkrece je nejintenzivnější během prvních 24 hodin po příjmu a pak u obou forem klesá
- ✓ Po expozici obou formám Pb je v moči vyloučen jen nepatrný podíl přijaté dávky Pb
- ✓ Při nízké úrovni expozice je v tkáních potkana akumulován větší podíl přijatého Pb, klesá jeho podíl ve výkalech a naopak se zvyšuje jeho množství v moči

Výsledky týkající se dynamiky fekální exkrece obou sledovaných forem Pb byly již publikovány ve vědeckém časopise s IF (Biological Trace Element Research). Jako další krok se předpokládá sepsání manuskriptu týkajícího se biodostupnosti Pb z rostlinného hyperakumulátoru. V souvislosti s realizovaným experimentem byly totiž stanoveny také podíly Pb z *P. stratiotes* extrahovatelné žaludečními a pankreatickými šťávami v podmínkách *in vitro* (data nejsou v rámci této disertační práce prezentována). Spolu s výsledky akumulace Pb v orgánech potkana, tak bude možné porovnat potenciální a reálnou biodostupnost této formy Pb.

ad. B)

Za využití biologického modelu laboratorní potkan/tasemnice krysí byly získány nové poznatky o osudu Pb v terestrickém hostitelsko/parazitickém systému. Byl stanoven bioakumulační potenciál *H. diminuta* pro obě sledované formy Pb a zaznamenán vliv parazitace na akumulaci Pb v tkáních hostitele. Design experimentu umožnil stanovit přesné podíly Pb akumulovaného v tkáních tasemnice a jeho porovnání s nejvíce zatíženými tkáněmi hostitele. Celkově lze získané poznatky shrnout takto:

- ✓ *H. diminuta* akumuluje obě sledované formy Pb ve větší míře než tkáň hostitele a jeví se proto jako vhodný akumulující indikátor znečištění životního prostředí Pb
- ✓ Tkáň *H. diminuta* v jednom hostiteli dokáže při shodné čerstvé hmotnosti akumulovat 3x vyšší podíl přijatého Pb než nejvíce zatížená měkká tkáň hostitele (ledviny)
- ✓ Množství Pb akumulované tasemnicemi je přímo úměrné celkové biomase (čerstvé hmotnosti a počtu) parazitů v jednom hostiteli
- ✓ Přítomnost tasemnice nemá průkazný vliv na finální koncentrace Pb v tkáních hostitele a vzrůstající koncentrace Pb v tkáni tasemnice není spojena s poklesem jeho koncentrací v tkáních hostitele
- ✓ Parazitace dospělými tasemnicemi proto patrně nepředstavuje významný faktor zkreslující data získaná v rámci biomonitoringu znečištění životního prostředí
- ✓ *H. diminuta* pravděpodobně přijímá především Pb, které prošlo enterohepatickým cyklem

Na základě výsledků této části pokusu byl sepsán manuskript, který byl odeslán k posouzení do vědeckého časopisu s IF (Parasitology) a v době odevzdání této DSP je v oponentním řízení.

Na začátku této disertační práce stálo mnoho otázek. Některé z nich byly díky realizovanému experimentu zodpovězeny, čímž byly splněny základní stanovené cíle práce. Výzkum však nepřinesl natolik jednoznačné výsledky, které by bylo možno jednoduše interpretovat. S přibývajícím množstvím získaných dat naopak začínaly vyvstávat další a další hypotézy, a to jak o charakteristikách forem Pb vyskytujících se v rostliném hyperakumulátoru, tak o možných interakcích polutantu v systému hostitel/parazit.

V dalších výzkumech proto bude nutné zabývat se následujícími tématy:

- a) V jakých konkrétních formách se nachází Pb vázané v *P. stratiotes*?
- b) Jaká je potenciální a reálná biodostupnost Pb vázaného v rostlinných hyperakumulátorech pro živočišný organismus?
- c) V jakých částech proglotidů akumuluji tasemnice rizikové prvky a dokáží aktivně ovlivnit proces jejich akumulace či detoxifikace ve své tkáni?
- d) Je proces absorpce rizikových prvků do tkáně tasemnic vázán na přítomnost žluči?
- e) Existují rozdíly v akumulčním potenciálu tasemnic mezi jednotlivými formami stejného prvku a závisí zachycené množství na jeho koncentraci v potravě hostitele?

Objasnění těchto otázek však vyžaduje komplexní a interdisciplinární přístup. Proto na jejich řešení Katedra zoologie a rybářství spolupracuje v rámci probíhajících grantových projektů s dalšími specializovanými pracovišti a vědeckými institucemi v České republice.

## 9 Seznam použitých zkratek

AN – anorganické

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA

BAC – biodosažitelnost

BAV – biodostupnost

BF – bioakumulační faktor

CMR-BCR (12-02-01) – certifikovaný referenční materiál (hovězí játra)

C<sub>Pb</sub> – koncentrace Pb

DMT1 - transport bivalentních kationtů 1 (divalent metal transport 1)

DPI - day post infection (doba od nákazy)

DW - dry weigh (hmotnost sušeného materiálu)

FW – fresh weigh (čerstvá hmotnost)

GI - gastrointestinální

GIH – gastrointestinální helmint

GIT – gastrointestinální trakt

HD – *Hymenolepis diminuta*

OO – označení varianty potkanů bez tasemnice a bez expozice Pb

OMt – označení varianty potkanů bez tasemnice exponovaným Pb ve formě octanu olovnatého

OPt - označení varianty potkanů bez tasemnice exponovaným Pb ve formě *P. stratiotes*

OR - organický

OT – označení varianty potkanů parazitovaných tasemnicí bez expozice Pb

PbB - Pb vázané v krvi

PBET - Physiologically Based Extraction Test

TMt - označení varianty potkanů parazitovaných tasemnicí a exponovaným Pb ve formě octanu olovnatého

TPt - označení varianty potkanů parazitovaných tasemnicí a exponovaným Pb ve formě octanu olovnatého

## 10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

### Obrázky

1. Aktuální přehled fylogenetických vztahů uvnitř třídy Cestoda založený na mtAllAA + lsr + ssrDNA
2. Vývojová stádia *H. diminuta* – A. vajíčko; B. cysticerkoidy; C. dospělci
3. Schéma integrovaného modelu expozice/příjem/biokinetika Pb v organismu
4. Přehled zveřejněných informací o zdravotních vlivech Pb na organismus

### Tabulky

1. Rozpustnost vybraných sloučenin Pb (%)
2. Design pokusu
3. Obsahy vybraných prvků v krmné směsi ST-1 a biomase *P. stratiotes*
4. Hodnocení kvality analytického procesu
5. Koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) v tkáních laboratorních potkanů – základní výsledky
6. Podíl dávky Pb (%) akumulovaný v tkáních laboratorního potkana – základní výsledky
7. Podíl dávky jednotlivých forem Pb vyloučený ve výkalech a moči (mediány skupin)
8. Popisné statistiky - koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) v orgánech potkana
9. Podíl dávky Pb akumulovaný v tkáních lab. potkana při nízké a zvýšené úrovni expozice
10. Porovnání dynamiky vylučování Pb mezi exponovanými zvířaty a kontrolní skupinou
11. Koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> DW) v tkáních *H.diminuta* a lab. potkanů (průměr ± SD)
12. Porovnání koncentrace Pb v tkáních tasemnice a hostitele (t- test pro závislé vzorky)
13. Biokoncentrační faktory *H. diminuta* v porovnání s jednotlivými tkáněmi hostitele
14. % z dávky Pb akumulované v tkáních *H.diminuta* a laboratorních potkanů (průměr ± SD)
15. Podíl z dávky Pb akumulovaný v tkáni hostitele/tasemnice (t-test pro závislé vzorky)
16. Porovnání akumulčního potenciálu *H.diminuta* a ledvin hostitele (průměr ± SD)
17. Koncentrace Pb (μg.g<sup>-1</sup> DW) v tkáni tasemnic a potkanů (median ± SE pro jednotlivé sk.)
18. Korelace mezi množstvím Pb v tkáních hostitele a tasemnic, jejich abundancí a biomasou
19. Podíl Pb vyloučený parazitovanými a neparazitovanými zvířaty v obou intervalech (t-test)
20. Porovnání BF tasemnic u terestrických hostitelů při nízké a vysoké úrovni expozice Pb

### Grafy

1. Koncentrace Pb v tkáni laboratorních potkanů - octan olovnatý vs. *P. stratiotes*
2. Podíl dávky Pb akumulovaný v tkáni laboratorního potkana - Octan olovnatý vs. *P. stratiotes*
3. Rozdělení dávky Pb akumulované v jednotlivých tkáních laboratorních potkanů
4. Koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) v orgánech potkana – varianty OO,OMt a OPt
5. Porovnání podílů dávky Pb akumulovaných v tkáních lab. potkana při nízké a vysoké expozici
6. Porovnání dynamiky fekální exkrece Pb u exponovaných a kontrolních zvířat
7. Porovnání dynamiky urinární exkrece Pb u exponovaných a kontrolních zvířat
8. Porovnání jednotlivých složek exkrece Pb mezi skupinami OO, OMt a OPt
9. Průměrné koncentrace Pb (mg.kg<sup>-1</sup> DW) v tkáních *H.diminuta* a lab. potkanů
10. Porovnání % z dávky Pb akumulované v tkáních *H.diminuta* a laboratorních potkanů
11. Podíl z dávky Pb akumulovaný v tkáni hostitele/tasemnice (společně pro sk. TO, TMt a TPt)
12. Koncentrace Pb v tkáních tasemnic ze skuiny TO, TMt a TPt
13. Koncentrace Pb v tkáních hostitelů a *H. diminuta* po nízké úrovni expozice
14. Koncentrace Pb v tkáních hostitelů a *H. diminuta* po zvýšené úrovni expozice
15. Porovnání podílu vyloučeného Pb mezi skupinou OMt a TMt

## 11 Seznam použité literatury

- Adonaylo, V. N., Oteiza, P. I. 1999. Pb<sup>2+</sup> promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology*. 132 (1). 19-32.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 528 p.
- Alexander, F. W., Clayton, B. E., Delves, H. T. 1974. Mineral and trace-metal balances in children receiving normal and synthetic diets. *QJ Med.* 43. 89-111.
- Alexander, F. W., Delves, H. T., Clayton, B. E. 1973. The uptake and excretion by children of lead and other contaminants. In: Barth, D., Berlin, A., Engel, R., Recht, P., Smeets, J. (eds.) *Environmental health aspects of lead: proceedings, international symposium; October 1972; Amsterdam, The Netherlands*. Luxembourg: Commission of the European Communities. 319-331.
- Al-Modhefer, A. J. A., Bradbury, M. W. B., Simmons, T. J. B. 1991. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin Sci.* 81.823-829.
- Andreassen, J., Bennet-Jenkins, E. M., Bryant, C. 1999. Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. In: Baker, J. R., Muller, R., Rollinson, D. (eds.) *Advantage in Parasitology* 42. Academic Press. London. 223-275. ISBN: 0-12-031742-7.
- Andreassen, J., Hoole, D., Befus, D. 1990. Complement-Mediated Leukocyte Adherence to Newly Excysted and 4-Day-Old *Hymenolepis diminuta*. *International Journal for Parasitology*. 20 (7). 905-911.
- Andreassen, J., Hopkins, C. A. 1980 Immunologically Mediated Rejection of *Hymenolepis diminuta* by its Normal Host, the Rat. *Journal of Parasitology*. 66 (6). 898-903
- Andreassen, J., Jespersen, S., Roepstorff, A. 1978. Tapeworm (*Hymenolepis-diminuta*) Infection in Rats and Mice. *Parasitology*. 77 (DEC). R25-R26
- Angelova, V.R., Ivanova, R.V., Todorov, J.M., Ivanov, K I., 2010. Lead, Cadmium, Zinc, and Copper Bioavailability in the Soil-Plant-Animal System in a Polluted Area. *ScientificWorldJournal*. 10, 273-285
- Anonymus, 2002. 2002/32/EC: Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed.
- Anonymus. 2005. Věstník Ústředního Kontrolního a Zkušebního Ústavu Zemědělského. IV. Národní referenční laboratoř, 1 (3/3). 229 s.
- Arakcheeva, C. G. 1969. Histochemical studies of nuclei acids, carbohydrates and fatty substances in organs of white mice infected with dwarfish tapeworm. *Materials of Scientific Conference on Problems of Medical Parasitology, Tashkent*. Publishing House 'Medicine', Uzbek SSR, 81-83
- Arkoosh, M. R., Casillas, E., Huffman, P., et al. 1998. Increased susceptibility of juvenile chinook salmon from a contaminated estuary to *Vibrio anguillarum*. *Transaction of The American Fisheries Society*. 127. (3). 360-374.
- Arme, C., Bridges, J. F., Hoole, D. 1983. Pathology of cestode infections in the vertebrate host. In: Arme C., Pappas P. W. (eds.) *Biology of the Eucestoda*. 2. Academic Press, London, 449-538.
- Aufderheide, A. C., Wittmers, L. E. 1992. Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. *Neurotoxicology*. 13. 809-820.
- Aungst, B. J., Doice, J. A., Fung, H.-L. 1981. The effect of dose on the disposition of lead in rats after intravenous and oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 61. 48-57.
- Aungst, B. J., Fung, H. L. 1981. Kinetic characterization of an *in vitro* lead transport across the rat small intestine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 61. 38-47.
- Aviv, A., John, E., Bernstein, J., et al. 1980. Lead intoxication during development: Its late effect on kidney function and blood pressure. *Kidney Int*. 17. 430-437.

- Awad El Karim, M. A., Hamed, A. S., Elhaimi, Y. A. A., et al. 1986. Effects of exposure to lead among lead-acid battery factory workers in Sudan. *Arch Environ Health*. 41. 261-265.
- Ayoade, G.O., Sharma, B.H., Sridhar, M.K.C., 1982. Trials of Pistia-Stratiotes L. as Animal Feed. *J. Aquat. Plant. Manage.* 20 (1), 56-57.
- Azmat, R., Fayyaz, S., Kazi, N., Mahmood, S. J., Uddin, F. 2008. Natural bioremediation of heavy metals through nematode parasite of fish. *Biotechnology*, 7 (1). 139–143.
- Bae, D-S., Gennings, C., Carter, Jr. W. H., Yang, R.S. H., Campain, J. A. 2001. Toxicological Interactions among Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead in Human Keratinocytes. *Toxicological Sciences*. 63. 132–142
- Bannon, D. I., Abounader, R., Lees, P. S. J., et al. 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284. C44-C50.
- Barbosa, F. Jr., Heloisa, M., Rodrigues C., et al. 2006. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. *Archives of Toxicology*. 80 (10). 633-637.
- Barbosa, F., Tanus-Santos, J. E., Gerlach, R. F., et al. 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs. *Environmental Health Perspectives*. 113 (12). 1669-1674.
- Barltrop, D., Khoo, H. E. 1975. The influence of nutritional factors on lead absorption. *Postgrad Med J*. 51. 795-800.
- Barltrop, D., Meek, F. 1979. Effect of particle size on lead absorption from the gut. *Arch Environ Health*. 34. 280-285.
- Barnard, C. J., Behnke, J. M., Gage, A. R., et al. 1998. The role of parasite-induced immunodepression, rank and social environment in the modulation of behaviour and hormone concentration in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*. 265 (1397). 693-701.
- Barry, P. S. I. 1975. A comparison of concentrations of lead in human tissue. *Br J Ind Med*. 32. 119-139.
- Barry, P. S. I. 1981. Concentrations of lead in the tissues of children. *Br J Ind Med*. 38. 61-71.
- Barton, J. C. 1984. Active transport of lead-210 by everted segments of rat duodenum. *Am J Physiol*. 247. G193-G198
- Barton, J. C., Conrad, M. E., Harrison, L., et al. 1978a. Effects of calcium on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med*. 91. 66-376.
- Barton, J. C., Conrad, M. E., Nuby, S., et al. 1978b. Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med*. 92. 536-547.
- Barus, V., Jarkovsky, J., Prokes. M. 2007. *Philometra ovata* (Nematoda: Philometroidea): a potential sentinel species of heavy metal accumulation. *Parasitology Research*. 100 (5). 929-933.
- Barus, V., Tenora, F., Kracmar, S. 2000. Heavy metal (Pb, Cd) concentrations in adult tapeworms (Cestoda) parasitizing birds (Aves). *Helminthologia*. 37 (3). 131-136.
- Barus, V., Tenora, F., Sumbera, R. 2003. Relative concentrations of four heavy metals in the parasites *Protospirura muricola* (Nematoda) and *Inermicapsifer arvicanthidis* (Cestoda) in their definitive host silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*: Rodentia). *Helminthologia*. 40 (4). 227-232.
- Baruš, V., Tenora, F., Kračmár, S., Prokeš, M. 2001. Accumulation of heavy metals in the *Ligula intestinalis* plerocercoids (Pseudophyllidae) of different age, *Helminthologia*. 38 (1). 29–33.
- Batra, N., Nehru, B., Bansal, M. P. 1998. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reproductive Toxicology*. 12 (5). 535-540.

- Baudrimont, M.; De Montaudouin, X. 2007. Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). *Parasitology*. 134. 237-245.
- Beaney, R. P., Buxton, E. J., Elsharkawi, A. M., Todd, A. C., Brathwaite, R. A., Somerville, L. J., Chettle, D. R., Scott, M. C., Jones, S. J., Hainsworth, I. R., Evetts, I., Morgan, W. D., Evans, C. J. 1990. Cisplatin Invoked Lead Mobilization Studies. *British Journal of Cancer*. 61 (1). 169-170.
- Beltcheva, M., Metcheva, R., Popov, N., Teodorova, S.E., Heredia-Rojas, J.A., Rodríguez-de la Fuente, A.O., Rodríguez-Flores, L.E., Topashka-Ancheva, M. 2012. Modified natural clinoptilolite detoxifies small mammal's organism loaded with lead I. Lead disposition and kinetic model for lead bioaccumulation. *Biological Trace Element Research*. 147 (1-3). 180-8.
- Bennet, E. M., Behm, C. A., Bryant, C. 1990. The Role of the Host in the Regulation of End-Product Formation in 2 Strains of the Rat Tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *International Journal for Parasitology*. 20 (7). 841-848.
- Bennet, E. M., Behm, C. A., Bryant, C. 1993. The Effect of Changes in the Definitive Host Environment on the Metabolism of *Hymenolepis diminuta* during growth and maturation. *International Journal for Parasitology*. 23 (1). 57-68
- Bergdahl, I. A., Grubb, A., Schutz, A., et al. 1997a. Lead binding to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol*. 81. 153-158.
- Bergdahl, I. A., Sheveleva, M., Schutz, A., et al. 1998. Plasma and blood lead in humans: Capacity-limited binding to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicol Sci*. 46. 247253.
- Berkowitz, G. S., Wolff, M. S., Lapinski, R. H., et al. 2004. Prospective study of blood and tibia lead in women undergoing surgical menopause. *Environ Health Perspect*. 112 (17). 1673-1678.
- Berntzen, A. K. 1961. The In vitro Cultivation of Tapeworms. I. Growth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Journal of Parasitology*. 47 (3). 351-355.
- Biagini, G., Caudarella, R., Vangelista, A.. 1977. Renal morphological and functional modification in chronic lead poisoning. In: Brown, S. S. (ed.) *Clinical chemistry and chemical toxicology of metals*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 123-126. ISBN: 978-0444416018.
- Bishayi, B., Sengupta, M. 2006. Synergism in immunotoxicological effects due to repeated combined administration of arsenic and lead in mice. *International Immunopharmacology*. 6 (3). 454-464.
- Blackburn, B. J., Modha, A., Novak, M. 1995. Phosphate Metabolites of *Tenebrio monitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) Infected with Metacestodes of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Medical Entomology*. 32 (3). 223-228.
- Blake, K. C. H., Barbezat, G. O., Mann, M. 1983. Effect of dietary constituents on the gastrointestinal absorption of  $^{203}\text{Pb}$  in man. *Environ Res*. 30. 182-187.
- Blake, K. C. H., Mann, M. 1983. Effect of calcium and phosphorus on the gastrointestinal absorption of  $^{203}\text{Pb}$  in man. *Environ Res*. 30. 188-194.
- Bogden, J. D., Gertner, S. B., Christakos, S., et al. 1992. Dietary Calcium Modifies Concentrations of other Metals and Renal Calbindin in Rats. *Journal of Nutrition*. 122 (7). 1351-1360.
- Bogden, J. D., Kemp, F. W., Han, S., et al. 1995. Dietary calcium and lead interact to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation. *J Nutr*. 125. 990-1002.
- Bolanowska, W. 1968. Distribution and excretion of triethyllead in rats. *Br J Ind Med*. 25. 203-208.
- Bonithon-Kopp, C., Huel, G., Grasmick, C., et al. 1986c. Effects of pregnancy on the inter-individual variations in blood lead levels of lead, cadmium and mercury. *Biol Res Preg*. 7. 37-42.

- Borošková, Z., Benková, M., Šoltýs, J., Krupicer, I., Simo, K. 1993. Effects of heavy metals imission on the cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariosis. *Veterinary Parasitology*. 47. 245–254.
- Borošková, Z., Šoltýs, J., Krupicer, I., Šiška, F. 1995. Effect of glucan immunomodulator on the immune response and mean helminths infection in lambs on pasture contaminated with heavy metal emissions. *Helminthologia*. 40. 187–192.
- Bradman, A., Eskenazi, B., Sutton, P., et al. 2001. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect*. 109 (10). 1079-1084.
- Brady, H. R., Brenner, B. M., Clarkson, M. R., et al. 2000. Acute renal failure. In: Brenner, B. M. (ed.) *The kidney*. W. B. Saunders Co. New York. 1202 p. ISBN: 978-0721679983.
- Braten, T., Hopkins, C. A. 1969. Migration of *Hymenolepis diminuta* in Rats Intestine during Normal development and Following Surgical Transplantation. *Parasitology*. 59. Part 4. 891-905.
- Brázová, T., Hanzelová, V. 2012. Morfologické anomálie pásomnic *Proteocephalus percae* (Cestoda) parazitujúcich u ostrieža z ekotoxikologicky zaťaženej lokality. In: Hodová, I., Prikrylová, I. Sborník z konferencie X. české a slovenské parazitologické dny. Masarykova univerzita, Brno. P. 132. ISBN: 978-80-210-5862-0
- Bressler, J. P., Olivi, L., Kim, Y., et al. 2005. Plasma membrane transporters for lead and cadmium. *J Appl Pharmacol*. 13 (1). 1-6.
- Brown, A. F., Pascoe, D., 1989. Parasitism and Host Sensitivity to Cadmium – An Acanthocephalan Infection of the Fresh-Water Amphipod *Grammarus- Pulex*. *Journal of Applied Ecology*. 26 (2). 473-487.
- Bunn, T. L., Parsons, P. J., Kao, E., et al. 2001. Gender-based profiles of developmental immunotoxicity to lead in the rat: Assessment in juveniles and adults. *Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A*. 64 (3). 223-240.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D., Wedd, A.G., 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J.Biol. Inorg. Chem.*. 11 (1), 2-12.
- Carmignani, M., Boscolo, P., Preziosi, P. 1988. Cardiovascular actions of lead in rats as related to the level of chronic exposure. *Arch Toxicol Supp*. 12. 326-329.
- Carmignani, M., Volpe, A. R., Boscolo, P., et al. 2000. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci*. 68. 401-415.
- Casteel, S.W., Cowart, R.P., Weis, C.P. et al. 1997. Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the Smuggler Mountain NPL site of Aspen, Colorado. *Fundamental and Applied Toxicology*. 36 (2). 177-187
- Casteel, W. S., Cowart, R. P., Weis, C. P., et al. 1997. Bioavailability of lead to juvenile swain dosed with soil from the Smuggler Mountain NLP site of Aspen, Colorado. *Fundam Appl Toxicol*. 36. 177-187.
- Castellino, P., Castellino, P., Sannolo, N. 1995. *Inorganic Lead Exposure: Metabolism and Intoxication*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 516 pp.
- Cikrt., M., Tichy, M. 1975. Role of Bile in Intestinal-Absorption of Pb-203 in Rats. *Experientia*. 31 (11). 1320-1321
- Claveria, F. G., Causapin, S, de Guzman, M. A., Saliba, C. 2005. Parasite biodiversity in *Rattus* spp. caught in wet markets. *Southeastern Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 36 Suppl. 4. 146–148.
- Clewell, H. J., Andersen, M. E. 1985. Risk assessment extrapolations and physiological modeling. *Toxicol Ind Health* 1(4):111-131.
- Cook, R. L., Roberts, L. S. 1991. In vivo Effects of Putative Crowding Factors on Development of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*. 77 (1). 21-25



- Cory-Slechta, D. A. 1990. Lead exposure during advanced age: Alterations in kinetics and biochemical effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 104. 67-78.
- Cory-Slechta, D. A. 1997. Relationships between Pb-induced changes in neurotransmitter system function and behavioral toxicity. *Neurotoxicology.* 18 (3). 673-688.
- Cramer, K., Goyer, R. A., Jagenburg, R., et al. 1974. Renal ultrastructure, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br J Ind Med.* 31. 113-127.
- Cranfield. 2003. IPCS Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead. 1995. 152–191.
- Dalley, J. W., Gupta, P. K., Hung, C. T. 1990. A Physiological Pharmacokinetic Model Describing the Disposition of Lead in the Absence and Presence of L-Ascorbic-Acid in Rats. *Toxicology Letters.* 50 (2-3). 337-348.
- Dalton, J. P., Skelly, P., Halton, D. W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic. *Canadian Journal of Zoology – Revue Canadienne de Zoologie.* 82 (2). 211-232.
- Davis, J. M., Svendsgaard, D. J. 1990. Nerve conduction velocity and lead: A critical review and metaanalysis. In: Johnson, B. L., Anger, W. K., Durao, A., et al., (eds.) *Advances in neurobehavioral toxicology.* Lewis Publishers. Chelsea. 353-376.
- Dawson, E. B., Evans, D.R., Harris, W. A., Teter M. C., McGanity, W.J. 1999. The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers. *J Am Coll Nutr.* 18. 166-170.
- de Buron, I., James, E., Riggs-Gelasco, P., Ringwood, A. H., Rolando, E., Richardson, D. 2009. Overview of the status of heavy metal accumulation by helminths with a note on the use of in vitro culture of adult acanthocephalans to study the mechanisms of bioaccumulation. *Neotropical Helminthology.* 3 (2). 101-110.
- Dekaney, C.M., Harris, E.D., Bratton, G.R., Jaeger, L.A., 1996. Lead transport in IEC-6 intestinal epithelial cells. *Biological Trace Element Research.* 58 (1-2). 13-24
- Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L., Sanderson, C. J. 1990. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J. Exp. Med.* 172. 1425.
- DeSilva, P. E. 1981. Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes. *Br J Ind Med.* 38. 209-217.
- Diamond, G. L. 2005. Risk assessment of nephrotoxic metals. In: Tarloff, J. B., Lash, L. H. (eds.) *The toxicology of the kidney.* CRC Press. London. 1099-1132. ISBN: 978-0-415-24864-8
- Dietert, R. R., Lee, J. E., Hussain, I., et al. 2004. Developmental immunotoxicology of lead. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 198 (2). 86-94.
- Ding, Y., Vaziri, N. D., Gonick, H. C. 1998. Lead-induced hypertension: II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res.* 76 (2). 107-113.
- Doumouchtsis K. K., Doumouchtsis S. K., Doumouchtsis E. K., et al. 2009. The effect of lead intoxication on endocrine functions. *Journal of Endocrinological Investigation.* 32 (2). 175-183.
- Drasch, G., Bohm, J., Baur, C. 1987. Lead in human bones: Investigation of an occupationally nonexposed population in southern Bavaria (F. R. G.): I. Adults. *Sci Total Environ.* 64. 303-315.
- Dural, M., Genc, E., Sangun, M. K., et al. 2011. Accumulation of some heavy metals in *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda) and its host sea bream, *Sparus aurata* (Sparidae) from North-Eastern Mediterranean Sea (Iskenderun Bay). *Environmental Monitoring and Assessment.* 174 (1-4). 147-155.
- Dušek, L., Gelnar, M., Šebelová, Š. 1998. Biodiversity of parasites in freshwater environment with respect to pollution. II. Indicative value of Monogenea as a model for comparative statistical evaluations. *International Journal of Parasitology.* 28 (1). 1555-1571.

- DuVal, G. E., Fowler, B. A. 1989. Preliminary purification and characterization studies of a low molecular weight, high affinity cytosolic lead-binding protein in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 159. 77-184.
- Dwinell, K. L., Bass, P., Telford, G. L., et al. 2001. Effect of surgical alteration of the rat gastrointestinal tract on the growth and development of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology.* 87 (4). 721-724.
- Dwinell, M. B., Bass, P., Oaks, J. A. 1994. Intestinal Myoelectric Alternation in Rats Chronically Infected with the Tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 267 (5). G851-G858
- Dwinell, M. B., Bass, P., Oaks, J. A. 1995. Praziquantel treatment normalizes intestinal myoelectric alterations associated with *Hymenolepis diminuta*-infected rats. *Journal of Parasitology.* 81 (6). 979-984
- Dwinell, M. B., Bass, P., Oaks, J. A. 1998. *Hymenolepis diminuta* fractions but not previous tapeworm infection stimulate intestinal myoelectric alterations in vivo in the rat. *Journal of Parasitology.* 84 (4). 673-680.
- Dwinell, M. B., Bass, P., Schaefer, D. M., et al. 1997. Tapeworm infection decreases intestinal transit and enteric aerobic bacterial populations. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 273 (2).G480-G485
- Dwinell, M. B., Wise, R. M., Bass, P., et al. 1998. *Hymenolepis diminuta*: Mucosal mastocytosis and intestinal smooth muscle hypertrophy occur in tapeworm-infected rats. *Experimental Parasitology.* 89 (1). 92-102
- Eaton, D. L., Stacey, N. H., Wong, K. L., et al. 1980. Dose response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 55. 393-402.
- Edelman, M. H., Spingarn, C. L., Nauenber, W. G., et al. 1965. *Hymenolepis diminuta* (Rat Tapeworm) infection in man. *American Journal of Medicine.* 38 (6). 951-953.
- Ehrenford, F.A. 1977. True Parasitism of Dogs by *Hymenolepis diminuta*. *Canine Practice.* 4 (5). 31-34.
- Eira, C., Torres, J., Miquel, J., Vaqueiro, J., Soares, A. M. V. M., Vingada, J. 2009. Trace element concentrations in *Proteocephalus macrocephalus* (Cestoda) and *Anguillicola crassus* (Nematoda) in comparison to their fish host, *Anguilla anguilla* in Ria de Aveiro, Portugal. *Science of The Total Environment.* 407 (2). 991-998.
- Eira, C., Torres, J., Vingada, J., et al. 2005. Concentration of some toxic elements in *Oryctolagus cuniculus* and in its intestinal cestode *Mosgovoyia ctenoides*, in Dunas de Mira (Portugal). *Science of the Total Environment.* 346 (1-3). 81-86.
- Ellickson, K.M., Meeker, R.J., Gallo, M.A., Buckley, B.T., Liroy, P.J. 2001. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Archives of Environmental Contamination and Technology.* 40 (1). 128-135
- Elsenhans, B., Janser, H., Windisch, W., Schumann, K., 2011. Does lead use the intestinal absorptive pathways of iron? Impact of iron status on murine Pb-210 and Fe-59 absorption in duodenum and ileum in vivo. *Toxicology.* 284 (1-3). 7-11.
- EPA. 1994a. Guidance manual for the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children. U.S. Environmental Protection Agency. EPA540R93081, PB93963510.
- EPA. 1994b. Technical support document: Parameters and equations used in integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children (v0.99d). U.S. Environmental Protection Agency. EPA540R94040, PB94963505
- Ercal, N., Aykin-Burns, N., Gurer-Orhan, H. 2001. Assessment of lead toxicity in PC-12 cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 31 Supplement 1. S116-S116

- Ercal, N., Treeratphan, P., Hammond, T. C., et al. 1996. In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine*. 21 (2). 157-161.
- Espinoza-Quiñones, F., Módenes, A., Costa, I., Palácio, S., Szymanski, N., Trigueros, D., Kroumov, A., Silva E., 2009. Kinetics of lead bioaccumulation from a hydroponic medium by aquatic macrophytes *Pistia stratiotes*. *Water Air Soil Pollut.* 203, 29–37.
- Evans, D. W., Irwin, S. W. B., Fitzpatrick, S. 2001. The effect of digenean (Platyhelminthes) infections on heavy metal concentrations in *Littorina littorea*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*. 81. (2). 349-350.
- Evans, W. S., Novak, M., Basilevsky, A. 1985. Effect of Environment-Temperature, Sex, and Infection with *Hymenolepis-microstoma* on the Liver and Bile Duct Weight of Mice. *Journal of Parasitology*. 71 (1). 106-109.
- Evans, W. S., Wong, A., Hardy, M., et al. 1998. Evidence that the factor used by the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, to direct the foraging of its intermediate host, *Tribolium confusum*, is a volatile attractant. *Journal of Parasitology*. 84 (6). 1098-1101
- Everson, J., Patterson, C. C. 1980. “Ultra-clean” isotope dilution/mass spectrometric analyses for lead in human blood plasma indicate that most reported values are artificially high. *Clin Chem*. 26. 1603-1607.
- Faith, R. E., Luster, M. I., Kimmel, C. A. 1979. Effect of Chronic Developmental Lead-Exposure on Cell-Mediated Immune Functions. *Clinical and Experimental Immunology*. 35 (3). 413-420.
- Faix, S., Faixova, Z., Boldizarova, K. Javorsky, P., 2005. The effect of long-term high heavy metal intake on lipid peroxidation of gastrointestinal tissue in sheep. *Vet. Med.-Czech*. 50 (9), 401-405.
- Farmer, A.A., Farmer, U.M. 2000. Concentrations of cadmium, lead and zinc in livestock feed and organs around a metal production centre in eastern Kazakhstan. *The Science of the Total Environment*. 257, 53-60.
- Featherston D. W., Wakelihn, D., Lamma D. A. 1992. Inflammatory Response in the Intestine during Tapeworm Infection – Mucosal Mast-Cell and Mucosal Mast-cell Proteases in Sprague-Dawley Rats infected with *Hymenolepis-diminuta*. *International Journal for Parasitology*. 22 (7). 961-966.
- Flanagan, P. R., Hamilton, D. L., Haist, J., et al. 1979. Inter-relationships between iron and absorption in iron-deficient mice. *Gastroenterology*. 77. 1074-1081.
- Flora, S. J. S., Jain, V. K., Behari, J. R., et al. 1982. Protective Role of trace-Metal in Lead-Intoxication. *Toxicology Letters*. 13 (1-2). 51-56.
- Flora, S. J., Bhattacharya, R., Sachan, S. R. 1994. Dosedependant effects of zinc supplementation during chelation of lead in rats. *Pharmacol Toxicol*. 74. 330-333.
- Flora, S. J., Pande, M., Mehta, A. 2003. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact*. 145. 267- 280.
- Flora. S. J., Pande, M., Kannan, G.M., Mehta, A. 2004. Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50. OL543-OL551
- Forbes, G. B., Reina, J. C. 1972. Effect of age on gastrointestinal absorption (Fe, Sr, Pb) in the rat. *J Nutr*. 102. 647-652.
- Fowler, B. A. 1989. Biological roles of high affinity metal-binding proteins in mediating cell injury. *Comments Toxicol*. 3. 27-46.
- Freeman, G. B., Johnson, J. D., Liao, S. C., et al. 1994. Absolute bioavailability of lead acetate and mining waste lead in rats. *Toxicology*. 91. 151-163.

- Gabriele, F., Ecça A. R., Wakelin, D., et al. 1986. Blast-Cell- Activity in Mice Infected with *Hymenolepis nana* and *Trichinella-spiralis* – Invivo Uptake of I-125 UDR in Lymphoid-Tissues and Gut. *Journal of Helminthology*. 60 (4). 313-321
- Gabrishanska, M., Nedeva, I. 1996. Content of heavy metals in the system fish cestodes. *Parasitologia*. 38. 58.
- Galli, P., Crosa, G., Ambrogi, A. O. 1998. Heavy metals concentrations in acanthocephalans parasites compared to their fish host. *Chemosphere*. 37 (14-15). 2983-2988.
- Garber, B., Wei, E. 1974. Lead toxicity in mice with genetically different levels of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Bull Environ Contam Toxicol*. 9 (2). 80-3
- Garber, B.T., Wei, E., 1974. Influence of dietary factors on gastrointestinal absorption of lead. *Toxicol. Appl. Pharm.*. 27 (3), 685-691.
- Garcia-Leston, J., Mendez, J., Pasaro, E., et al. 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International*. 36 (6). 623-636.
- Genc, E., Sangun, M. K., Dural, M., et al. 2008. Element concentrations in the swimbladder parasite *Anguillicola crassus* (Nematoda) and its host the European eel, *Anguilla anguilla* from Asi River (Hatay-Turkey). *Environmental Monitorig and Assesment*. 141 (1-3). 59-65.
- Gerhardsson, L., Brune, D., Nordberg, G. F., et al. 1986a. Distribution of cadmium, lead, and zinc in lung, liver, and kidney in long-term exposed smelter workers. *Sci Total Environ*. 50. 65-85.
- Gerhardsson, L., Endlyst, V., Lundstrom, N. G., et al. 1995b. Lead in tissues of deceased lead smelter workers. *J Trace Elem Med Biol*. 9. 136-143.
- Gerr, F., Letz, R., Stokes, L., et al. 2002. Association between bone lead concentration and blood pressure among young adults. *Am J Ind Med*. 42. 98-106.
- Goering, P. L., Fowler, B. A. 1987. Metal constitution of metallothionein influences inhibition of deltaaminolevulinic acid dehydratase (porphobiligen synthase) by lead. *Biochem J*. 245.339-345.
- Goering, P. L., Mistry, P., Fowler, B. A. 1986. A high affinity lead binding protein attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase: Comparison with a renal lead-binding protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 237. 220-225.
- Gonick, H. C., Ding, Y., Bondy, S. C., et al. 1997. Lead-induced hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension*. 30. 1487-1492.
- Gonick, H.C. 2011. Lead-Binding Proteins: A rewiev. *Journal of Toxicology*. 2011. doi:10.1155/2011/686050
- Goyer, R. A. 1989. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicology Letteers*. 46. 153-162.
- Gregus, Z., Klaassen, C.D., 1986. Disposition of metals in rats: a comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of 18 Metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 85, 24–38.
- Greichus, A., Greichus, Y. A. 1980. Identification and Quantification of Some Elements in the Hog Roundworms, *Ascaris-Lumbricoides-Suum*, and Certain Tissues of its Host. *International Journal for Parasitology*. 10 (2). 89-91.
- Griffin, T. B., Coulston, F., Wills, H. 1975. Biological and clinical effects of continuous exposure to airborne particulate lead. *Arh Hig Toksikol*. 26. 191-208.
- Gross, S. B., Pfitzer, E. A., Yeager, D. W., et al. 1975. Lead in human tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*. 32. 638651.
- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., et al. 1996. Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull Environ Contam Toxicol*. 56. 543-550.

- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., et al. 2003. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation - a summary of long-term research. *Sci Total Environ.* 303. 79-104.
- Gunshin, H., MacKanzie, B., Berger, U.V., Gushin, Y., Romero, M.F., Borow, W.F. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature (London)*. 388, 482-488
- Gupta, D.K., Huang, H.G., Yang, X.E., Razafindrabe, B.H.N., Inouhe, M. 2010. The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione: *Journal of Hazardous Materials*. 177. 1-3.
- Gurer, H., Ercal, N. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. Source. 29 (10). 927-945
- Hamrick, H. J., Bowdre, J. H., Church, S. M. 1990. Rat Tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) Infection in a Child. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 9 (3). 216-219.
- Harris, W. G., Turton, J. A. 1973. Antibody-Response to Tapeworm *Hymenolepis diminuta* in Rat. *Nature*. 246 (5434). 521-522.
- Haukisalmi, V., Hardman, L.M., Foronda, P., Feliu, C., Laakkonen, J., Niemimaa, J., Lehtonen, J.T., Henttonen, H. 2010. Systematic relationships of hymenolepidid cestodes of rodents and shrews inferred from sequences of 28S ribosomal RNA. *Zoologica Scripta*. 39 (6). 631-641.
- Hayashi, M., Yamamoto, K., Yoshimura, M., Kishimoto, T., Shitara A., 1993. Effects of fasting on distribution and excretion of lead following long-term lead exposure in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 201-205.
- Heard, M. J., Chamberlain, A. C. 1982. Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. *Hum Toxicol.* 1. 411-416.
- Heard, M.J., Chamberlain, A.C. 1982. Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. *Hum Toxicol.* 1 (4). 411-5.
- Heath, L. M., Soole, K. L., McLaughlin, M. L., McEwan, G. T. A., Edwards, J. W. 2003. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children. *Reviews on Environmental Health*. 18, (4). 231-250. ISSN (Online) 2191-0308, ISSN (Print) 0048-7554.
- Heinonen, J., Kukkonen, J. V. K., Holopainen, I. J. 1999. The effects of parasites and temperature on the accumulation of xenobiotics in a freshwater clam. *Ecological Applications*. 9 (2). 475-481.
- Hernandez-Avila, M., Villalpano, C. G., Palazuelos, E., et al. 2000. Determinants of blood lead levels across the menopausal transition. *Arch Environ Health*. 53. 355-360.
- Hershko, C., Konijn, A.M., Moreb, J., Link, G., Grauer, F., Weissenberg, E. 1984. Iron depletion and blood lead levels in a population with endemic lead poisoning. *Isr J Med Sci*. 20 (11).1039-43.
- Heyneman, D., Voge, M. 1971. Host Response of Flour Beetle, *Tribolium-confusum*, to Infection with *Hymenolepis-diminuta*, *H-microstoma*, *H-citelli* (Cestoda-Hymenolepididae). *Journal of Parasitology*. 57 (4). 881-886.
- Hindsbo, O., Andreassen, J., Ruitenber, J. 1982. Immunological and Histopathological Reactions of the Rat Against the Tapeworm *Hymenolepis diminuta* and the Effect of Anti-Thymocyte Serum. *Parasite Immunology*. 4 (1). 59-76
- Hofer, R., Lackner, R. *Fischtoxikologie – Theorie und Praxis*. Fischer Verlag, Jena, 1995.
- Hofmann, U., Segewitz, G. 1975. Influence of Chelation Therapy on Acute Lead-Intoxication in Rats. *Archives of Toxicology*. 34 (3). 213-225.
- Hohnadel, D. C., Sunderma, F. W., Nechay, M. W., et al. 1973. Excretion of Nickel, Copper, Zinc and Lead in Sweat of Healthy Subjects during Sauna Bathing. *Clinical Chemistry*. 19 (6). 642-642.
- Holy, J. M., Oaks, J. A., Mikagrieve, M., et al. 1991. Developmental and Dynamics of Regional Specialization within the Syncytial Epidermis of the Rat Tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology Research*. 77 (2). 161-172.

- Hoole, D., Andreassen, J., Birklund, D. 1994. Microscopic Observation on Immune Precipitates Formed In-Vitro on the Surface of Hymenolepid Tapeworms. *Parasitology*. 109 Part 2. 243-248.
- Hoole, D.; Carter, V.; Dufour, S. 2010. *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea): an ideal fish-metazoan parasite model? *Parasitology*. 137 (3). 425-438.
- Hopkins, C. A., Allen, L. M. 1979. *Hymenolepis diminuta* – Role of the Tail in Determining the Position of the Worm in the Intestine of the Rat. *Parasitology*. 79 (DEC). 401-409.
- Hopkins, C. A., Andreassen, J. 1991. Inhibition of Growth of a Tapeworm *Hymenolepis diminuta* in its Normal Host (Rat). *International Journal for Parasitology*. 21 (1). 47-55
- Hopkins, C. A., Barr, I. F. 1982. The Source of Antigen in an Adult Tapeworm. *International Journal for Parasitology*. 12 (4). 327-333
- Houser, B. B., Burns, W. C. 1968. Experimental Infection of Gnotobiotic *Tenebrio Molitor* and White Rats with *Hymenolepis diminuta* (Cestoda - Cyclophyllidea). *Journal of Parasitology*. 54 (1). Pages: 69-73
- Hu, H., Aro, A., Payton, M., et al. 1996a. The relationship of bone and blood lead to hypertension. The normative study. *JAMA*. 275. 1171-1176.
- Hu, H., Rabinowitz, M., Smith, D. 1998. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: Conceptual paradigms. *Environ Health Perspect*. 106 (1). 1-8.
- Hu, H., Shih, R., Rothenberg, S., et al. 2007. The epidemiology of lead toxicity in adults: Measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environmental Health Perspectives*. 15 (3). 455-462.
- Hu, H., Watanabe, H., Payton, M., et al. 1994. The relationship between bone lead and hemoglobin. *JAMA*. 272 (19). 1512-1517.
- Hudson, P. J., Lafferty, K. D., Dobson, A. P. 2006. Parasites and ecological systems: Is a healthy ecosystem an infected one? *Tree*. 21. 381-385.
- Hunder G; Javdani J; Elsenhans B; Schumann, K. 2000. Use of gamma-spectrometry for simultaneous determination of Pb-210, As-73, Cd-109, Hg-203 and Fe-59 distribution and excretion in rats. *Toxicology*. 150 (1-3), 69-82.
- Hunter, M. M., Wang, A., Hirota, C. L., et al. 2005. Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *Journal of Immunology*. 174 (11). 7368-7375
- Hunter, M. M., Wang, A., McKay D. M. 2007. Helminth infection enhances disease in a murine TH2 model of colitis. *Gastroenterology*. 132 (4). 1320-1330.
- Hurd, H. 1998. Parasite manipulation of insect reproduction: who benefits? *Parasitology*. 116. Supplement: S. S13-S21.
- Hurd, H., Warr, E., Polwart, A. 2001. A parasite that increases host lifespan. *Proceedings of The Royal Society of London Series B – Biological Science*. 268 (1477). 1749-1753
- Hursh, J. B., Schraub, A., Sattler, E. L., et al. 1969. Fate of <sup>212</sup>Pb inhaled by human subjects. *Health Physics*. 16. 257-267.
- Hutton, M., Goodman, G. T. 1980. Metal contamination of feral pigeons *Columba livia* from the London area: Part 1 - tissue accumulation of lead, cadmium and zinc. *Environmental Pollution Series A – Ecological and Biological*. 22 (3). 207-217.
- Chamberlain, A., Heard, C., Little, M. J., et al. 1978. Investigations into lead from motor vehicles. Harwell, United Kingdom: United Kingdom Atomic Energy Authority. Report no. AERE-9198. 1979. The dispersion of lead from motor exhausts. *Philos Trans R Soc Lond A*. 290. 557-589.
- Chappell L. H., Arai, H. P., Dike, S. C., et al. 1970. Circadian Migration of *Hymenolepis* (Cestoda) in Intestine 1. Observation on *Hymenolepis diminuta* in Rat. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 34 (1). 31-46

- Chappell, L. H., Pike, A. W. 1976. Loss of *Hymenolepis diminuta* from rat. *International Journal for Parasitology*. 6 (4). 333-339.
- Chappell, L. H., Pike, A. W. 1977. Interactions between *Hymenolepis diminuta* and the rat. In: Van den Bossche, H. *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships* (ed.) Elsevier North Holland. Amsterdam. 379-384.
- Chaurasia, S. S., Kar, A. 1997. Protective effects of vitamin E against lead-induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase (5' D-I) activity in male mice. *Toxicology*. 124 (3). 203-209.
- Cheng, Y., Schwartz, J., Sparrow, D., et al. 2001. Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension. *Am J Epidemiol*. 153 (2). 164-171.
- Chromanski, L. 1981. The influence of the Year Season on the Experimental-Infection of Mice and Rats with *Hymenolepis diminuta*. Source: *Zwierzeta Laboratoryjne*. 18 (2). 81-84.
- Iannaccone, A., Carmignani, M. and Boscolo, P., 1981. Neurogenic and humoral mechanisms in arterial hypertension of chronically lead-exposed rats. *Med. Lav.* 1. 13-21.
- Ieradi, L. A., Zima, J., Allegra, F., et al. 2003. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zoologica*. 52 (1). 57-66.
- Ince, A. J. 1976. Some Elements and Their Relationship in *Ascaris-Suum*. *International Journal for Parasitology*. 6 (2). 127-128.
- Institoris, L., Siroki, O., Undeger, U., et al. 1999. Immunotoxicological effects of repeated combined exposure by cypermethrin and the heavy metals lead and cadmium in rats. *International Journal of Immunopharmacology*. 21 (11). 735-743.
- Intawongse, M., Dean, J. R. 2008. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollutin*. 152 (1). 60-72.
- Isakk, D. D. 1983. In vitro Tapeworm Extract-Induced Proliferative Response of Gut-Associated Lymphoid-Cell from *Hymenolepis diminuta* Infected Mice. Source: *Journal of Helminthology*. 57 (1). 43-50.
- Ishih, A., Nishimura, M., Sano, M. 1992. Different Establishment and Survival of *Hymenolepis diminuta* in Syngeneic and Outbred Rat Strains. *Journal of Helminthology*. 66 (2). 132-136.
- Ishih, A., Sekijima, T., Asakawa, M., et al. 2003. *Hymenolepis pseudodiminuta* Tenora et al. 1994 from *Apodemus speciosus* and *H-diminuta*: a comparison of experimental infections in rats. *Parasitology Research*. 89 (4). 297-301.
- Jacobsen, N. S., Fairbair, D. 1967. Lipid Metabolism in Helminth Parasites 3. Biosynthesis and Interconversion of Fatty Acids by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Journal of Parasitology*. 53 (2) 355-361.
- James, H. M., Hilburn, M. E., Blair, J. A. 1985. Effects of meals and meal times on uptake of lead from the gastrointestinal tract of humans. *Hum Toxicol*. 4. 401-407.
- Jankovská, I., Langrová, I., Bejček, V., Miholová, D., Vadlejch, J., Petrtýl, M. 2008. Heavy Metal Accumulation in Small Terrestrial Rodents Infected by Cestodes or Nematodes. *Parasite - Journal de la Societe Francaise de Parasitologie*. 15. (4). 581 - 588. ISSN: 1252-607X.
- Jankovská, I., Miholová, D., Bejček, V., Vadlejch, J., Šulc, M., Száková, J., Langrová, I. 2010a. Influence of parasitism on trace element contents in tissues of red fox (*Vulpes vulpes*) and its parasites *Mesocestoides* spp. (Cestoda) and *Toxascaris leonina* (Nematoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58. (2). 469 - 477. ISSN: 0090-4341.
- Jankovská, I., Miholová, D., Langrová, I., Bejček, V., Vadlejch, J., Kolihová, D., J., Šulc, M. 2009. Influence of parasitism on the use of small terrestrial rodents in environmental pollution monitoring. *Environmental Pollution*. 157 (0). 2584 - 2586. ISSN: 0269-7491.

- Jankovska, I., Miholova, D., Petrtyl, M., et al. 2011. Intestinal Parasite *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala) from European Perch (*Perca fluviatilis*) as a Bioindicator for Lead Pollution in the Stream "Jevanský potok" Near Prague, Czech Republic. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 86 (3). 342-346 .
- Jankovská, I., Vadlejch, J., Száková, J., Miholová, D., Kunc, P., Knížková I., Langrová, I. 2010b. Experimental studies on lead accumulation in the cestode *Moniezia expansa* (Cestoda: Anoplocephalidae) and its final host (*Ovis aries*), *Ecotoxicology*. 19. (5). 928 - 932. ISSN: 0963-9292.
- Jíra, J. 1998. *Lékařská helmintologie*. Galén. Praha. 526 s. ISBN 80-85824-82-5.
- Jirsa, F., Leodolter-Dvorak, M., Krachler, R., et al. 2008. Heavy metals in the nase, *Chondrostoma nasus* (L. 1758), and its intestinal parasite *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas 1781) from Austrian rivers: Bioindicative aspects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 55 (4). 619-626.
- Johnson, W. J., Cain, G. D. 1988. The Selective Uptake of Cholesterol by the Rat Tapeworm *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry & Molecular Biology*. 91 (1). 51-58
- Jones, W. E. 1979. Niclosamide as a Treatment for *Hymenolepis-diminuta* and *Dipylidium-caninum* Infection in Man. *Ameriaca Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28 (2). 300-302
- Jurczuk, M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Brzoska, M. M. 2006. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology*. 219. 11-21.
- Kehoe, R. A. 1987. Studies of lead administration and elimination in adult volunteers under natural and experimentally induced conditions over extended periods of time. *Food and Chemical Toxicology*. 25. 425-493.
- Kehoe, R. A., Thamann, F. 1931. The behavior of lead in the animal organism, II Tetraethyl lead. *Ameridcan Journal of Hygiene*. 13 (2). 478-498.
- Kennedy, C. R. 1997. Long-term and seasonal changes in composition and richness of intestinal helminth communities in eels *Anguilla anguilla* of an isolated English river. *Folia Parasitologica*. 44 (4). 267-273.
- Keymer A. E. 1980. The Influence of *Hymenolepis-diminuta* on the Survival and Fecundicity of the Intermediated Host, *Tribolium-confusum*. *Parasitology*. 81 (Oct). 405-421
- Keymer A. E., Anderson, R. M. 1979. Dynamics of Infection of *Tribolium-confusum* by *Hymenolepis-diminuta* – influence of Infective-Stage Density and Spatial-Distribution. *Parasitology*. 79 (Oct). 195-207
- Keymer, A. 1982. The Dynamics of Infection of *Tribolium-confusum* by *Hymenolepis diminuta* – Influence of Exposure Time and Host Density. *Parasitology*. 84 (FEB). R3-R3
- Khaleghzadeh-Ahangar, H., Malek, M., McKenzie, K. 2007. The parasitic nematodes *Hysterothylacium* sp. type MB larvae as bioindicators of lead and cadmium: a comparative study of parasite and host tissues. *Parasitology*. 138 (11). 1400-1405
- Khalil, M., Furness, D., Polwart, A., Hoole, D. 2009. X-ray microanalysis (EDXMA) of cadmium-exposed eggs of *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda: Bothriocephalidea) and the influence of this heavy metal on coracidial hatching and activity. *International Journal for Parasitology*. 39 (10). 1093-1098
- Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Cohen, A. H., et al. 1992a. Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high-dose lead administration. *Kidney Int*. 41. 1192-1203.
- Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Cohen, A., et al. 1992b. Experimental model of lead nephropathy. II. Effect of removal from lead exposure and chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Environ Res*. 58. 35-54.



- Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Weiler, E. W. J. 1993. Lead-induced hypertension: Possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens.* 6. 723-729.
- Khotimchenko, M., Serguschenko, I., Khotimchenko, Y. 2006. Lead absorption and excretion in rats given insoluble salts of pectin and alginate. *International Journal of Toxicology.* 25 (3). 195-203
- Kishimoto, T., Oguri, T., Ueda, D., Tada, M. 1995. Effect of lead on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Arch Toxicol.* 69 (10). 718-21.
- Klaassen, C. D., Shoeman, D. W. 1974. Biliary excretion of lead in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 (9). 434-446.
- Klar, B., Sures, B. 2004. A nonlinear model of stress hormone levels in rats - the interaction between pollution and parasites. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 59 (1). 23-30.
- Klein, M., Barbe, F., Pascal, V., Weryha, G., Leclere, J. 1998. Lead poisoning secondary to hyperthyroidism: report of two cases. *European Journal of Endocrinology.* 138 (2). 185-188.
- Kojadinovic, J., Potier, M., Le Corre., M., et al. 2007. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environmental Pollution.* 146 (2). 548-566.
- Koo, W. W. R., Succop, P. A., Bornschcin, R. L., et al. 1991. Serum vitamin D metabolites and bone mineralization in young children with chronic low to moderate lead exposure. *Pediatrics.* 87. 680-687.
- Korrick, S. A., Hunter, D. J., Rotnitzky, A., et al. 1999. Lead and hypertension in a sample of middle-aged women. *Am J Public Health.* 89 (3). 330-335.
- Kostial, K., Kello, D., Jugo, S., et al. 1978. Influence of age on metal metabolism and toxicity. *Environ Health Perspect.* 25. 81-86.
- Kračmár, S., Baruš, V., Tenora, F. 2000. Amino acid contents in *Contracaecum himeu* and *C. rudolphii* (Nematoda: Anisakidae), parasites of cormorants, *Helminthologia.* 37. 237-239.
- Krishnan K, Andersen ME, Clewell HJ III, et al. 1994. Physiologically based pharmacokinetic modeling of chemical mixtures. In: Yang RSH, ed. *Toxicology of chemical mixtures: Case studies, mechanisms, and novel approaches.* San Diego, CA: Academic Press, 399-437.
- Kroening, K. D., Zimmerman, N. P., Bass, P., et al. 2002. Partial characterization of a tapeworm-secreted signal factor inducing sustained spike potentials in the smooth muscle of the rat small intestine. *Journal of Parasitology.* 88 (2). 227-231
- Kroening, K. D., Zirnmerman, N. P., Bass, P., et al. 2003. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: A tapeworm-secreted signal molecule communicating with the rat host's small intestine. *Journal of Parasitology.* 89 (6). 1136-1141
- Krupicer, I. 1995. The effect of heavy metal immissions with mercury dominance on the course of grazing helmitoses in sheep. *Vet. Med-Czech.* 40. 11-15.
- Krupicer, I., Peško, B. 1992. Grazing helmitoses in sheep in the immission region of mercury producing plant. *Aktuálna problematika v diagnostike, prevencii a terapii vnútorných chorôb prežúvavcov.* 3. - 4. 6. 1992, Košice, 67 s.
- Krupicer, I., Velebný, S., Legáth, J. 1996. Effect of emissions from mercury treating metallurgical works on the intensity of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Med-Czech.* 41. 103-106.
- Lafferty, K. D., Kuris, A. K. 1999. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography.* 44. 564-590
- Landsberg, J. H., Blakesley, B. A., Reese, R. O., et al. 1998. Parasites of fish as indicators of environmental stress. *Environmental Monitoring and Assesment.* 51 (1-2). 211-232.
- Leggett RW. 1993. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect* 101:598-616.

- Lethbridge, R. C. 1971. Hatching of *Hymenolepis-diminuta* Eggs Penetration of Hexacants in Tenebrionolitor Beetles. Parasitology. 62(Jun). 445-456
- Levander, O. A., Morris, V. C., Ferretti, R. J. 1977. Comparative Effects of Selenium and Vitamin-E in Lead-Poisoned Rats. Journal of Nutrition. 107 (3). 378-382.
- Levander, O. A., Morris, V. C., Ferretti, R. J. 1977. Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient leadpoisoned rats. Journal of Nutrition. 107. 363-372.
- Levi, M. H., Raucher, B. G., Teicher, E., et al. 1987. *Hymenolepis-diminuta* – One of 3 Enteric Patogens Isolated from Child. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 7 (4). 255-259.
- Liu, Z.P., 2003. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non-ferrous metal smelters. Science of the Total Environment. 309, 117–126.
- Loghman-Adham, M. 1997. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. Environ Health Perspect. 105:928-939.
- Lustberg, M., Silbergeld, E. 2002. Blood lead levels and mortality. Arch Intern Med. 162. 2443-2449.
- Luster, M. I., Faith, R. E., Kimmel, C. A. 1978. Depression of Humoral Immunity in Rats Following Chronic Developmental Lead-Exposure. Journal of Environmental Pathology and Toxicology. 1 (4). 397-402.
- Ma, W. 1996. Lead in mammals. In: Beyer, W. N., Heinz, G. H., Redmon-Norwood, A. W. (eds.) Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations. CRC Press, Boca Raton, FL. 281–296.
- MacKenzie, K., Williams, H. H., Williams, B., McVicar, A. H., Sinddall, R. 1995. Parasites as indicators of water quality and the potential use of helminth transmission in marine pollution studies. In: Baker, J., Muller, R., Rollins, D. (eds.) Advances in Parasitology 35. 85-144. ISBN: 978-0-12-031735-6
- Maddaloni, M., Lolocono, N., Manton, W., et al. 1998. Bioavailability of soil-borne lead in adults by stable isotope dilution. Environ Health Perspect. 106. 1589-1594.
- Mader, P., Curdova, E. 1997. Decomposition methods of biological materials for the determination of trace elements. Chemické listy. 91 (4). 227-236.
- Mader, P., Szakova, J., Miholova, D. 1998. Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. Analisis. 26 (3). 21-129.
- Maema, M. 1986. Experimental-Infection of Tribolium-confusum (Coleoptera) by *Hymenolepis-diminuta* (Cestoda) – Host Fecundicity during Infection. Parasitology. 92. Part 2. 405-412.
- Mahaffey, K. R., Anest, J. L. 1986. Association of erythrocyte protoporphyrin with blood lead level and iron status in the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976-1980. Environ Res. 41. 327-338.
- Mahaffey, K. R., Capar, S. G., Gladen B. C., Fowler, B. A. 1981. Concurrent exposure to lead, cadmium and arsenic. Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. J. Lab. Clin. Med. 98. 463-481.
- Mahaffey, K. R., Gartside, P. S., Glueck, C. J. 1986. Blood lead levels and dietary calcium intake in 1- to 11year- old children: The Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980. Pediatrics. 78. 257-262.
- Mahaffey, K. R., Rosen, J. F., Chesney, R. W., et al. 1982. Association between age, blood lead concentration, and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. Am J Clin Nutr. 35. 1327-1331.
- Maittani, T., Watahiki, A., Suzuki, K. T. 1986. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 83 (2). 211-217.
- Malek, M., Haseli, M., Mobedi, I., et al. 2007. Parasites as heavy metal bioindicators in the shark *Carcharhinus dussumieri* from the Persian Gulf. Parasitology. 134. 1053-1056.

- Mangoud, A. M., Eissa, M. H., Abdallan, M. A., Hassan, M. M., Sabry, A. H., Fikry, A. A., Morsy, T. A. 1991. Pathological and immunopathological changes in albino mice experimentally infected with *Hymenolepis nana*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 21, 43–51.
- Marcus AH. 1985a. Multicompartment kinetic models for lead: I. Bone diffusion models for long-term retention. *Environ Res* 36:441-458.
- Marcus AH. 1985b. Multicompartment kinetic models for lead: II. Linear kinetics and variable absorption in humans without excessive lead exposure. *Environ Res* 36:459-472.
- Marcus AH. 1985c. Multicompartment kinetic models for lead: III. Lead in blood plasma and erythrocytes. *Environ Res* 36:473-489.
- Markowitz, G. 2000a. Brush with death: A social history of lead poisoning. *Health Affairs*. 19 (6). 300-301.
- Markowitz, M. 2000b. Lead poisoning: a disease for the next millennium. Review. *Current Problems in Pediatrics*. 30. 62–70.
- Markowitz, M. E., Weinberger, H. L. 1990. Immobilization-related lead toxicity in previously lead-poisoned children. *Pediatrics*. 86. 455-457.
- Marques, C. C., Nunes, A. C., Pinheiro, T., et al. 2006. An assessment of time-dependent effects of lead exposure in Algerian mice (*Mus spretus*) using different methodological approaches. *Biological trace Element Research*. 109 (1). 75-89.
- Martin, J., Holland, C. 1984. Scanning Electron-Microscope Studies of the Mucosa of Rats Infected with *Hymenolepis-diminuta* (Cestoda). *Journal of Helminthology*. 58 (2). 93-99
- Mateo, R., Baos, A.R., Vidal, D. Camarero, P.R., Martinez-Haro, M., Taggart, M.A. 2011. Bioaccessibility of Pb from Ammunition in Game Meat Is Affected by Cooking Treatment. *Plos One*. 6 (1). e15892
- McCabe, M. J., Singh, K. P., Reiners, J. J. 1999. Lead intoxication impairs the generation of a delayed type hypersensitivity response. *Toxicology*. 139. 255-264.
- McGowan, C. 1989. Influence of Vitamin-B6 Status on Aspects of Lead-Poisoning in Rats. *Toxicology Letters*. 47 (1). 87-93.
- McKay, D. M. 2006. The beneficial helminth parasite? *Parasitology*. 132. Part 1. 1-12
- McKay, D. M., Halton, D. W., Johnston C. F., et al. 1990. *Hymenolepis-diminuta* – Changes in Intestinal Morphology and the Enterochromaffin Cell-Population Associated with Infection in Male C57 Mice. *Parasitology*. 101. Part 1. 107-113.
- Mead R. W., Zappas, N., Thomford, J., et al. 1986. Developmental-Changes in *Hymenolepis-citelli* and *Hymenolepis-diminuta*. *Journal of Parasitology*. 72 (6). 908-912.
- Mead, R. W., Roberts, L. S. 1972. Intestinal Digestion and Absorption of Starch in Intact Rat – Effect of Cestode (*Hymenolepis-diminuta*) Infection. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 41 (4). 749-760.
- Melon, A., Wang, A., Phan V., et al. 2010. Infection with *Hymenolepis diminuta* Is More Effective than Daily Corticosteroids in Blocking Chemically Induced Colitis in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Art.num. 384523
- Merwad, A. M. A., Mitchell S. M., Zajac A. M. et al. 2011. Effects of high pressure processing on hatching of eggs of the zoonotic rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Veterinary Parasitology*. 176 (2-3). 185-188.
- Mettrick, D. F. 1971. *Hymenolepis diminuta* – pH Changes in Rat Intestinal Contents and Worm Migration. *Experimental Parasitology*. 29 (3). 386-491.

- Mettrick, D. F. 1971. *Hymenolepis-diminuta* – Microbial Fauna, Nutritional gradient and Physicochemical Characteristics of Small Intestine of Uninfected and Parasitized Rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 49. (11). 972-984
- Moczon, T. 2006. Accumulation and utilization of lipids during the development of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids. Acta Parasitologica. 51(2). 152-155
- Möller, H. 1987. Pollution and parasitism in the aquatic environment. International Journal for Parasitology. 17. 353-361.
- Morrison, J. N., Quarterman, J. 1987. The relationship between iron status and lead absorption in rats. Biol Trace Element Res. 14. 115-126.
- Movsesyan, S. O., Jivanyan, K. A., Chubaryan, F. A., et al. 2008. Experimental hymenolepiasis of rats: preliminary data on histopathological changes of visceral organs Acta Parasitologica. 53 (2). 193-196.
- Mudipall, A. 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. Indian J. Med. Res. 126. 518-27.
- Munoz-Antoli, C., Haro-Blasco, R., Toledo, R., Esteban, J.G. 2013. Unusual cestodiasis in a Spanish infant. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 31 (2). 116-117
- Mushak P. 1991. Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: Overview of biological and biophysico-chemical aspects. Chem Speciat Bioavail. 3. 87-104.
- Mykkänen, H. M., Wasserman, R. H. 1981. Gastro-intestinal absorption of lead (<sup>203</sup>Pb) in chicks: Influence of lead, calcium and age. J Nutr. 111. 1757-1765.
- Nachev, M., Schertzinger, G., Sures, B. 2013. Comparison of the metal accumulation capacity between the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* and larval nematodes of the genus Eustrongylides sp infecting barbel (*Barbus barbus*). Parasites & Vectors. 6. In press.
- Nachev, M., Zimmermann, S., Rigaud, T., Sures, B. 2010. Is metal accumulation in *Pomphorhynchus laevis* dependent on parasite sex or infrapopulation size? Parasitology. 137 (8). 1239-1248
- Nam, D. H., Lee, D. P. 2006. Monitoring for Pb and Cd pollution using feral pigeons in rural, urban, and industrial environments of Korea. Science of the Total Environment. 357 (1-3). 288-295.
- Nash, D., Magder, L. S., Sherwin, R., et al. 2004. Bone density-related predictors of blood lead level among peri- and postmenopausal women in the United States: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. Am J Epidemiol. 160 (9). 901-911.
- Nawrot, T. S., Thijs, L., Hond, E. M. D., et al. 2002. An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: A meta-analysis. J Hum Hypertens. 16. 123-131.
- Neal, R., Yang, P., Fiechtl, J., et al. 1997. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. Toxicology Letters. 91 (3). 169-178.
- Needleman, H. L. 2004. Lead poisoning. Annu Rev Med. 55. 209-222.
- Nollen, P. M. 1975. Studies on reproductive-system of *Hymenolepis-diminuta* using autoradiography and transplantation. Journal of Parasitology. 61 (1). 100-104
- Novak, M., Hudpeth, C., Blackburn, B. J. 1993. H-1-NMR Study of Metabolic Alternation in the Small Intestine of Rats Infected with *Hymenolepis-diminuta*. International Journal of Biochemistry. 25 (11). 1587-1591.
- O’Flaherty EJ. 1995a. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. Toxicol Appl Pharmacol 131:297-308
- O’Flaherty, E. J. 1986. The rate of decline of blood lead in lead industry workers during medical removal: The effect of job tenure. Fundam Appl Toxicol. 6. 372-380.
- O’Flaherty, E. J. 1991b. Physiologically based models for bone-seeking elements. III. Human skeletal and bone growth. Toxicol Appl Pharmacol. 111. 332-341.

- O'Flaherty, E. J. 1993. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 118. 16-29.
- Oaks, J. A., Lumsden, R. D. 1971. Cytosolic Studies on Absorptive Surface of Cestodes 5. Incorporation of Carbohydrate-Containing Macromolecules into Tegument Membranes. *Journal of Parasitology.* 57 (6). 1256-1268
- Odjegba, V.J., Fasidi I.O., 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology.* 13 (7), 637–646.
- O'Flaherty, E. J. 1987. Modeling: An introduction. *Pharmacokinetics in risk assessment. Drinking water and health.* Vol. 8. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 27-35.
- Oldereid, N. B., Thomassen, Y., Attramadal, A., et al. 1993. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. *J Reprod Fertil.* 99. 421-425.
- Omokhodion, F. O., Crockford, G. W. 1991. Lead in Sweat and its Relationship to Salivary and Urinary Levels in Normal Healthy-Subjects. *Science of the Total Environment.* 103 (2-3). 113-122.
- Ong, C. N., Lee, W. R. 1980a. Distribution of lead-203 in human peripheral blood *in vitro*. *Br J Ind Med.* 37. 78-84
- Ong, C. N., Lee, W. R. 1980b. Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. *Br J Ind Med.* 37. 7077.
- Ong, C. N., Lee, W. R. 1980c. High affinity of lead for fetal hemoglobin. *Br J Ind Med.* 37. 292-298.
- Oomen, A. G., Tolls, J., Sips, A. J. A. M., et al. 2003a. Lead speciation in artificial human digestive fluid. *Arch Environ Contam Toxicol.* 44. 107-115.
- Othman, A. I., El-Missiry, M. A. 1998. Role of Selenium against lead toxicity in male rats. *J. Biochem. Molecular Toxicology.* 12 (6). 345-349.
- Oyoo-Okoth, E., Admiraal, W., Osano, O., Hoitinga, L., Kraak, M.H.S. 2010. Metal specific partitioning in a parasite-host assemblage of the cestode *Ligula intestinalis* and the cyprinid fish *Rastrineobola argentea*. *Science of the Total Environment.* 408 (7). 1557-1562.
- Oyoo-Okoth, E., Admiraal, W., Osano, O., Kraak, M.H.S., Were-Kogogo, P.J.A., Gichuki, J., Ngure, V., Makwali, J., Ogwai, C. 2012. Dynamics of metal uptake and depuration in a parasitized cyprinid fish (*Rastrineobola argentea*). *Aquatic Toxicology.* 124. 34-40.
- Packer, L. 1991. Protective Role of Vitamin-E in Biological-Systems. *American Journal of clinical Nutrition.* 53 (4) Supplement: S. S1050-S1055.
- Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 19. 227-250.
- Paglia, D. E., Valentine, W. N., Dahlgren, J. G. 1975. Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'nucleotidase and other erythrocyte enzymes: Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *J Clin Invest.* 56. 1164-1169.
- Paglia, D. E., Valentine, W. N., Fink, K. 1977. Lead poisoning: Further observations on erythrocyte pyrimidine-nucleotidase deficiency and intracellular accumulation of pyrimidine nucleotides. *J Clin Invest.* 60. 1362-1366.
- Pagliuca, A., Mufti, G. J., Baldwin, D., et al. 1990. Lead-poisoning: Clinical, biochemical, and hematological aspects of a recent outbreak. *J Clin Path.* 43. 277-281.
- Palmas, C., Bortoletti, G., Conchedda, M., et al. 1986. Immunological Memory and Lymphoblast-Migration in Mice Infected with *Hymenolepis nana*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research.* 72 (3). 397-403.
- Palmas, C., Wakelin, D., Gabriele, F. 1984. Transfer of Immunity Against *Hymenolepis-nana* in Mice with Lymphoid-Cell or Serum from Infected Donors. *Parasitology.* 89 (Oct). 287-

- Pande, M., Flora, S. J. 2002. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*. 177. 187-196.
- Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., et al. 2005. Lead toxicity update. A brief review[J], *Med Sci Monit* a11. 329–336.
- Pappas, P. W., Barley, A. J. 1999. Beetle-to-beetle transmission and dispersal of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) eggs via the feces of *Tenebrio monitor*. *Journal of Parasitology*. 85 (2). 384-385
- Pappas, P. W., Barley, A. J., Wardrop, S. M. 1999. *Hymenolepis diminuta*: Glucose and glycogen gradients in the adult tapeworm. *Experimental Parasitology*. 91 (4) 315-326.
- Pappas, P. W., Read, C. P. 1975. Parasitological Review: Membrane transport in helminth parasites. *Experimental Parasitology*. 37. 469-530.
- Pappas, P. W., Wardrop, S. M. 1997. Preliminary biochemical characterization of faeces from uninfected rats and rats infected with the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Helminthology*. 71 (1). 57-59
- Parker, G.H., Hamr, J. 2001. Metal levels in body tissues, forage and fecal pellets of elk (*Cervus elaphus*) living near the ore smelters at Sudbury, Ontario. *Environmental Pollution*. 113 (3), 347-355.
- Pascoe, D., Cram, P. 1977. The effects of parasitism on the toxicity of cadmium to the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology*. 10. 467–472.
- Patamia, I., Cappello, E., Castellano-Chiodo, D., Greco, F., Nigro, L., Cacopardo, B. 2010. A human case of *Hymenolepis diminuta* in a child from eastern Sicily, *Korean Journal of Parasitology*. 48. 167–169.
- Patamia, I., Cappello, E., Castellano-Chiodo, D., Greco, F., Nigro, L., Cacopardo, B.A. 2010. Human Case of *Hymenolepis diminuta* in a Child from Eastern Sicily. *Korean Journal of Parasitology*. 48 (2). 167-169
- Patra, R. C., Swarup, D., Dwivedi, S. K. 2001. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*. 162 (2). 81-88.
- Patrick, L. 2006. Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*. 11 (2). 114-127.
- Patrick, L. 2006b. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*. 11 (1). 2-22.
- Philip, A. T., Gerson, B. 1994. Lead-Poisoning 1. Incidence, Etiology, and Toxicokinetics. *Clinic in Laboratory Medicine*. 14 (2). 423-444.
- Philips, C.J.C., Chiy, P.C., Zachou., E. 2005. Effects of cadmium in herbage on the apparent absorption of elements by sheep in comparison with inorganic cadmium added to their diet *Environmental Research*. 99 (2). 224-234.
- Phillips, C.J.C., Mohamed, M.O., Chiy, P.C. 2011. Effects of duration of exposure to dietary lead on rumen metabolism and the accumulation of heavy metals in sheep. *Small Ruminant Research*. 100 (2-3). 113-121.
- Phillips, D. J. H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review. *Environmental Pollution*. 13 (4). 281-317.
- Pike, A. W., Chappell, L. H. 1981. *Hymenolepis-diminuta* – Worm Loss an Worm Weigth-Loss in Long-Term Infection of the Rat. *Experimental Parasitology*. 51 (1). 35-41.
- Pirkle, J. L., Kaufmann, R. B., Brody, D. J., et al. 1998. Exposure of the U.S. population to lead, 1991-1994. *Environ Health Perspect*. 106 (11). 745-750.
- Pistl, J., Krupicer, I., Kovalkovicova, N., et al. 2008. The effect of chronic lead acetate trihydrate intoxication in Wistar rats on experimental *Ascaris suum* infestation and immunity. *Helminthologia*. 45 (2). 69-75.

- Pistl, J., Mikula, I., Krupicer, I., Šniarc, J. 1995. The influence of heavy metal emissions and *Fasciola hepatica* infestation on the immunogenicity of a *Listeria* vaccine. *Vet. Hum. Toxicol.* 37. 110–112.
- Pocock, S. J., Shaper, A. G., Walker, M., et al. 1983. Effects of tap water lead, water hardness, alcohol, and cigarettes on blood lead concentrations. *J Epidemiol Community Health.* 37. 1-7.
- Podesta, R. B., Mettirck, D. F. 1974. Components of Glucose-Transport in Host-Parasite System, *Hymenolepis-diminuta* (Cestoda) and rat Intestine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 52 (2). 183-197.
- Pollock, C. A., Ibels, L. S. 1986. Lead intoxication in paint removal workers on the Sidney Harbour Bridge. *Med J Aust.* 145.635-639.
- Pounds, J. G, Marlar, R. J., Allen, J. R. 1978. Metabolism of lead-210 in juvenile and adult Rhesus monkeys *Macaca mulatta*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 19. 684-691.
- Purdy, R. E., Smith, J. R., Ding, Y., et al. 1997. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am J Hypertens.* 10. 997-1003.
- Quinnell, R. J. 1988. Host Age and The Growth and Fecundicity of *Hymenolepis- diminuta* in the Rat. *Journal of Helminthology.* 62 (2). 158-162.
- Rabinowitz, M. B. 1991. Toxicokinetics of Bone Lead. *Environmental Health Perspectives.* 91. 33-37.
- Rabinowitz, M. B., Kopple, J. D., Wetherill, G. W. 1980. Effect of food intake on fasting gastrointestinal lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 33. 1784-1788.
- Rabinowitz, M. B., Wetherill, G. W., Kopple, J. D. 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 58. 260-270.
- Raether, W., Hanel, H. 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitology Research.* 91 (5). 412-438.
- Raghavan, S. R. V., Gonick, H. C. 1977. Isolation of low-molecular-weight lead-binding protein from human erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 155. 164-167.
- Rath, E. A., Walkey, M. 1987. Fatty-Acid and Cholesterol-Synthesis in Mice Infected with the Tapeworm *Hymenolepis-microstoma*. *Parasitology.* 95. Part 1. 79-92.
- Read, C. P. 1959. The role of carbohydrates in the biology of Cestodes. VIII. *Experimental Parasitology.* 8. 365-382.
- Read, C. P. 1967. Longevity of Tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology.* 53 (5). 1055-1056.
- Read, C. P. 1970. Some physiological and biochemical aspects of host parasite relationship. *Journal of Parasitology.* 56. 643-652.
- Read, C. P. 1972. *Animal Parasitism.* Prentice-Hall Inc. New Jersey. 182 p. ISBN: 9780130376718.
- Read, C. P., Simmons, J. E., Rothman, A. H. 1959. Kinetics of Amino Acid Penetration in Tapeworms. *Journal of Parasitology.* 45 (4). 27-28.
- Reardon, C., Sanchez, A., Hogaboam, C. M. et al. 2001. Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Infection and Immunity.* 69 (7). 4417-4423
- Reeves, P.G., Vanderpool, R.A. 1998. Organ content and fecal excretion of cadmium in male and female rats consuming variable amounts of naturally occurring cadmium in confectionery sunflower kernels (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Nutritional Biochemistry.* 9 (11) 636-644.
- Regoli, F., Orlando, E. 1994. Bioavailability of biologically detoxified lead: Risks arising from consumption of polluted mussels. *Environ. Health Perspect.* 102 (3). 335–338
- Retief, N. R., Avenant-Oldewage, A., du Preez, H. 2005. The use of cestode parasites from the largemouth yellowfish, *Labeobarbus kimberleyensis* (Gilchrist and Thompson, 1913) in the Vaal Dam,

South Africa as indicators of heavy metal bioaccumulation. Conference: 6th WaterNet/Warfsa/GWP-SA Symposium Location: Ezulwini, SWAZILAND Date: NOV 02-04, 2005

- Retief, N. R., Avenant-Oldewage, A., du Preez, H. 2006. The use of cestode parasites from the largemouth yellowfish, *Labeobarbus kimberleyensis* (Gilchrist and Thompson, 1913) in the Vaal Dam, South Africa as indicators of heavy metal bioaccumulation. *Physics and Chemistry of the Earth*. 31 (15-16). 840-847.
- Ribeiro, A. R., Eira, C., Torres, J., et al. 2009. Toxic Element Concentrations in the Razorbill *Alca torda* (Charadriiformes, Alcidae) in Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56 (3). 588-595.
- Rice, D. C. 1996b. Effect of long-term lead exposure on hematology, blood biochemistry, and growth curves in monkeys. *Neurotoxicology*. 18. 221-236.
- Riggs, M. R., Lemily, A. D., Esch, G. W. 1987. The Growth, Biomass, and Fecundicity of *Bothriocephalus-Acheilognathi* in a North-Carolina Cooling reservoirs. *Journal of Parasitology*. 73 (5). 893-900.
- Richards, K. S., Arme C. 1983. The Rostellar Tegumentary Cytoplasm of the Metacestode of *Hymenolepis-diminuta* (Cyclophyllidae, Cestoda). *Parasitology*. 86 (Feb). 83- 88
- Richards, K. S., Arme C. 1984a. An Ultrastructural Analysis of Cyst Wall Development in the metacestode of *Hymenolepis-diminuta* (Cestoda). *Parasitology*. 89 (Dec). 537-566
- Richards, K. S., Arme C. 1984b. Maturation of the Scolex Syncytium in the Metacestode of *Hymenolepis-diminuta*, with the Special Reference to Microtrix Formation. *Parasitology*. 88 (Apr). 341-349
- Roberts, L. S. 1983. Carbohydrate metabolism. In Arme, C., Pappas, P. W. (eds). *The biology of the Eucestoda 2*. Academic press. London. 343-390.
- Roberts, L. S., Insler, G. D. 1982. Developmental Physiology of Cestodes 17. Some Biological Properties of Putative Crowding Factors in *Hymenolepis-diminuta*. *Journal of Parasitology*. 68 (2). 263-269
- Roberts, L. S., J. Janovy, Jr. 1996. *Foundations of Parasitology*. 5<sup>th</sup> edition, Wm C. Brown, Co., Dubuque, Iowa, 659 p.
- Roberts, L. S., Mong, F. N. 1973. Developmental Physiology of Cestodes 13. Vitamin B<sub>6</sub> Requirement of *Hymenolepis diminuta* during *In-vitro* Cultivation. *Journal of Parasitology*. 59 (1). 101-104
- Rohela, M., Ngui, R., Lim, Y.A.L., Kalaichelvan, B., Hafiz, W.I.W. Redzuan, A.N.M., Mohd, A. N. 2012. A case report of *Hymenolepis diminuta* infection in a Malaysian child. *Tropical Biomedicine*. 29 (2). 224-230.
- Rosenman, K. D., Sims, A., Luo, Z., et al. 2003. Occurrence of lead-related symptoms below the current Occupational Safety and Health Act allowable blood lead levels. *J Occup Environ Med*. 45 (5). 546-555.
- Rosin, A. 2009. The Long-term Consequences of Exposure to Lead. *Israel Medical Association Journal*. 11 (11). 689-694.
- Rothenberg, S. J., Schnaas, L., Salgado-Valladares, M., et al. 2002a. Increased ERG a- and b-wave amplitudes in 7- to 10-year-old children resulting from prenatal lead exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43 (6). 2036-2044.
- Rothman, A. H. 1959. The Role of Bile Salts in the Biology of Tapeworms 2. Further Observation on the Effects of Bile Salts on Metabolism. *Journal of Parasitology*. 45 (4). 379-383
- Rousseau, M-C., Straif, K., Siemiatycki, J. 2005. IARC Carcinogen Update. *Environ Health Perspect* 113. A580-A581.
- Ruby, M.V., Davis, A., Link, T.E. et al. 1993. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ Sci Technol* 27:2870-2877



- Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M. 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science & Technology*. 30 (2). 422-430.
- Ryzhikov, K.M., Gvozdev, E.V., Tokobaev, M.M., Shaldybin, L.S., Matzaberidze, G.V., Merkusheva, I.V., Nadtochii, E.V., Khohlova, I.G., Sharpilo, L.D. 1978. Keys to the helminths of the rodent fauna of the USSR. Cestodes and trematodes. Izdatel'stvo Nauka, Moskva, 232 pp.
- Sabbioni, E., Marafante, E. 1976. Identification of Lead-Binding Components in Rat-Liver – In Vitro Study. *Chemico-Biological Interactions*. 15 (1). 1-20
- Sadykov, R., Digel, I., Artmann, A.T., Porst, D., Linder, P., Kayser, P., Artmann, G., Savitskaya, I., Zhubanova, A. 2009. *Journal of Occupational Health*. 51 (1). 64-73.
- Sakai, T. 2000. Biomarkers of lead exposure. *Industrial Health*. 38 (2). 127-142.
- Sakai, T., Yanagihara, S., Kunugi, Y., et al. 1982. Relationships between distribution of lead in erythrocytes in vivo and in vitro and inhibition of ALA-D. *Br J Ind Med*. 39. 382-387.
- Sanad, M. M. 1991 Effect of *Hymenolepis nana* on protein and lipid content in the intestinal mucosal cells of mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 21 (1). 75 – 79.
- Sanderson, C. J. 1991. Control of eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol*. 94. 122-126.
- Sarret, G., Vangronsveld, J., Manceau, A., Musso, M., D'Haen, J., Menthonnex, J. J., Hazemann, J. L. 2001. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environmental Science and Technology*. 35 (13), 2854-2859.
- Selvaraj, N., Bobby, Z., Sathiyapriya, V. 2006. Effect of lipid peroxides and antioxidant on glycation of hemoglobin: An *in vitro* study on human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta*. 366. 190-195.
- Serwint, J.R., Damokosh, A.I., Berger, O.G., Chisolm, J.J. Jr, Gunter, E.W., Jones, R.L., Rhoads, G.G., Rogan W. 1999. No difference in iron status between children with low and moderate lead exposure. *J Pediatr*. 135 (1). 108-110.
- Sharma, N.C, Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J., Sahi, S.V. 2004. Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (9), 2068-2073.
- Shea, J. F. 2005a. Sex differences in frass production and weight change in *Tenebrio molitor* (Coleoptera) infected with cysticercoids of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) *Journal of Insect Science*. 5. 31.
- Shea, J. F. 2005b. The effect of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) cysticercoids on the weight change, frass production, and food intake of the intermediate host, *Tenebrio molitor* (Coleoptera) *Parasitology Research*. 98 (1). 1-4.
- Sheiman, I. M., Shkutin, M. F., Terenina, N. B., et al. 2006. A behavioral study of the beetle *Tenebrio molitor* infected with cysticercoids of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Naturwissenschaften*. 93 (6). 305-308
- Sherlock, J. C., Ashby, D., Delves, H. T., et al. 1984. Reduction in exposure to lead from drinking water and its effect on blood lead concentrations. *Hum Toxicol*. 3. 383-392.
- Sherlock, J. C., Quinn, M. J. 1986. Relationship between blood and lead concentrations and dietary lead intake in infants: The Glasgow Duplicate Diet Study 1979-1980. *Food Addit Contam*. 3.167-176.
- Shostak, A. W. 2008. Effect of age of the intermediate host *Tribolium confusum* (Coleoptera) on infection by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Journal of Parasitology*. 94 (1). 152-157
- Schilderman, P. A. E. L., Hoogewerff, J. A., vanSchooten, F. J., et al. 1997. Possible relevance of pigeons as an indicator species for monitoring air pollution. *Environmental Health Perspectives*. 105 (3). 322-330.

- Schludermann, C., Konecny, R., Laimgruber, S., Lewis, J. W., Schiemer, F., Chovanec, A., Sures, B. 2003. Fish macroparasites as indicators of heavy metal pollution. *Parasitology*. 126. S61–S69.
- Schroeder, H. A., Tipton, I. H. 1968. The human body burden of lead. *Arch Environ Health*. 17.965-978.
- Schwartz J. 1988. The relationship between blood lead and blood pressure in the NHANES II survey. *Environ Health Perspect*. 78.15-22.
- Schwartz, J. 1995. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men. *Arch Environ Health*. 50. 3137.
- Schwartz, J., Landrigan, P. J., Baker, E. L. Jr. 1990. Lead-induced anemia: Dose-response relationships and evidence for a threshold. *Am J Public Health*. 80. 165-168.
- Silbergeld, E. K., Schwartz, J., Mahaffey, K. 1988. Lead and osteoporosis: Mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environ Res*. 47. 79-94.
- Siles-Lucas, M., Hemphill, A. 2002. Cestode parasites: Application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship. In: Baker, J. R., Muller, R., Rollinson, D. (eds.) *Advantage in Parasitology* 51. Academic Press. London. 133-230. ISBN: 0-12-031751-6.
- Singh, B., Dhawan, D., Mangal, P. C., et al. 1994. Combined Action of Lead and Lithium on Essential and Nonessential Elements in Rat-Blood. *Biological Trace Element Research*. 46 (1-2). 15-28.
- Sinicropi, M. S., Amantea, D., Caruso A., et al. 2010. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Archives of Toxicology*. 84 (7). 501-520
- Sivaprasad, R., Nagaraj, M., Varalakshmi, P. 2002. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch Toxicol*. 76. 437-441.
- Sivaprasad, R., Nagaraj, M., Varalakshmi, P. 2004. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem*. 15.18-23.
- Skalicka, M., Korenekova, B., Nad, P., 2002. Lead in livestock from polluted area. *Trace Elem Electrolytes*. 19, 94–96.
- Skoczynska, A. Smolik, R., Jelen, M. 1993. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch Toxicol*. 67. 200-204.
- Smith Jr., D. M., Mielke, H. W., Heneghan, J. B., 2008. Subchronic Lead Feeding Study in Male Rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 55, 518–528.
- Smith, D. R., Kahng, M. W, Quintanilla-Vega, B., et al. 1998b. High-affinity renal lead-binding proteins in environmentally-exposed humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 115. 39-52.
- Snyder, J. E., Filipov, N. M., Parsons, P. J., et al. 2000. The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice. *Toxicol Sci*. 57. 87-94.
- Soliman, M.F.M. 2012. Heavy metal pollution across sites affecting the intestinal helminth communities of the Egyptian lizard, *Chalcides ocellatus* (Forskal, 1775). *Environmental Monitoring and Assessment*. 184 (12). 7677-7685
- Soltice, G. E., Arai, H. P., Scheibne, E. 1971. Host-Parasite Interaction of *Tribolium-confusum* and *Tribolium-castaneum* with *Hymenolepis-diminuta*. *Canadian Journal of Zoology*. 49 (2). 265-273.
- Somashekaraiah, B. V., Venkaiah, B., Prasad, A. R. K. 1990. Biochemical diagnosis of occupational exposure to lead toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*. 44. 268-275.
- Specian, R. D., Lumsden, R. D. 1980. The Micro-anatomy and Fine-structure of the rostellum of *Hymenolepis diminuta*. *Zeitschrift fur Parasitologie - Parasitology Research*. 63 (1). 71-88.
- Staessen, J. A., Lauwerys, R. R., Bulpitt, C. J., et al. 1994. Is a positive association between lead exposure and blood pressure supported by animal experiments? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 3 (3). 257-263.

- Starke, W. A., Oaks, J.A. 1999. *Hymenolepis diminuta*: Praziquantel removal of adult tapeworms is followed by apoptotic down-regulation of mucosal mastocytosis. *Experimental Parasitology*. 92 (3). 171-181
- Starling, J. A. 1975. Tegumental Carbohydrate Transport in Intestinal Helminths – Correlation between Mechanisms of Membrane-Transport and Biochemical Environment of Absorptive Surface. *Transaction of the American Microscopical Society*. 94 (4). 508-523
- StatSoft, Inc (2009) STATISTICA (data analysis software system), version 9.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Stradowski, M. 2004. The development of *Hymenolepis diminuta* tapeworms of inbred line WMS il1 in rats of the WAG alb. race in primary and secondary infections of varying intensity *Helminthologia*. 41(1). 9-14.
- Sukhdeo, M. V. K. 1997. Earth's third environment: The worm's eye view. *Bioscience*. 47 (3). 141-149
- Sukhdeo, M. V. K., Kerr, M. S. 1992. Behavioural adaptation of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* to its environment. *Parasitology*. 104 (33) 1-336.
- Sures, B. 2000. Competition for minerals between *Acanthocephalus lucii* and its definitive host perch (*Perca fluviatilis*). *International Journal for Parasitology*. 32 (9). 1117-1122.
- Sures, B. 2003. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: an overview and perspective. *Parasitology*. 126. Supplement: S. S53-S60.
- Sures, B. 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. 20 (4). 170-177.
- Sures, B. 2006. How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts *Journal of Helminthology*. 80 (2). 151-157.
- Sures, B., Dezfuli, B. S., Krug, H. F. 2003a. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) interferes with the uptake and accumulation of lead (Pb-210) in its fish host chub (*Leuciscus cephalus*). *International Journal for Parasitology*. 33 (14). 1617-1622
- Sures, B., Franken, M., Taraschewski, H. 2000a. Element concentrations in the archiacanthocephalan *Macracanthorhynchus hirudinaceus* compared with those in the porcine definitive host from a slaughterhouse in La Paz, Bolivia. *International Journal for Parasitology*. 30 (10). 1071-1076.
- Sures, B., Grube, K., Taraschewski, H. 2002. Experimental studies on the lead accumulation in the cestode *Hymenolepis diminuta* and its final host, *Rattus norvegicus*. *Ecotoxicology*. 11 (5). 365-368.
- Sures, B., Jürges, G., Taraschewski, H. 2000b. Accumulation and distribution of lead in the archiacanthocephalan *Moniliformis moniliformis* from experimentally infected rats. *Parasitology*. 21. Part 4. 427-433.
- Sures, B., Radszuweit, H. 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Journal of Helminthology*. 81 (2). 191-197.
- Sures, B., Scheef, G., Klar, B., et al. 2002. Interaction between cadmium exposure and infection with the intestinal parasite *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) on the stress hormone levels in rats. *Environmental Pollution*. 119 (3). 333-340.
- Sures, B., Scheible, T., Bashtar, A. R., et al. 2003b. Lead concentrations in *Hymenolepis diminuta* adults and *Taenia taeniaeformis* larvae compared to their rat hosts (*Rattus norvegicus*) sampled from the city of Cairo, Egypt. *Parasitology*. 127 Part 5. 483-487.
- Sures, B., Siddall, R. 1999. *Pomphorhynchus laevis*: the intestinal acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (*Leuciscus cephalus*), *Experimental Parasitology*. 93. 66–72.
- Sures, B., Siddall, R. 2003. *Pomphorhynchus laevis* (Palaeacanthocephala) in the intestine of chub (*Leuciscus cephalus*) as an indicator of metal pollution. *International Journal for Parasitology*. 33 (1). 65-70.

- Sures, B., Siddall, R., Taraschewski, H. 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitology Today*. 15 (1). 16-21.
- Sures, B., Steiner, W., Rydlo, M., et al. 1999. Concentrations of 17 elements in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), in different tissues of perch (*Perca fluviatilis*), and in perch intestinal parasites (*Acanthocephalus lucii*) from the subalpine lake Mondsee, Austria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18 (11). 2574-2579.
- Sures, B., Taraschewski, H. 1995. Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. *Parasitology Research*. 81 (6). 494-497.
- Sures, B., Taraschewski, H., Jackwerth, E. 1994. Lead content of *Paratenuisentis-Ambiculus* (Acanthocephala), *Anguillicola-Crassus* (Nematoda) and Their Host *Anguilla-Anguilla*. *Disease of Aquatic Organisms*. 19 (2). 105-107.
- Sures, B., Taraschewski, H., Jackwerth, H. 1994. Comparative-Study of Lead Accumulation in Organ of Perch (*Perca-Fluviatilis*) and its Intestinal Parasite *Acanthocephalus-Lucci*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 52 (2). 269-273
- Sures, B., Taraschewski, H., Rokicki, J. 1997. Lead and cadmium content of two cestodes, *Monobothrium wagneri* and *Bothriocephalus scorpii*, and their fish hosts. *Parasitology Research*. 83 (6). 618-623.
- Sures, B., Taraschewski, H., Rydlo, M. 1997. Intestinal fish parasites as heavy metal bioindicators: A comparison between *Acanthocephalus lucii* (Palaeacanthocephala) and the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 59 (1). 14-21.
- Sures, B., Thielen, F., Baska, F., et al. 2005. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. *Environmental*. 98 (1). 83-88.
- Suzuki, T., Yoshida, A. 1979a. Effectiveness of Dietary Iron and Ascorbic-Acid in the Prevention and Cure of Moderately Long-Term Lead Toxicity in Rats. *Journal of Nutrition* 109 (11). 1974-1978.
- Suzuki, T., Yoshida, A. 1979b. Effect of Dietary Supplementation of Iron and Ascorbic-Acid on Lead Toxicity in Rats. *Journal of Nutrition*. 109 (6). 982-988.
- Symanski, E., Hertz-Picciotto, I. 1995. Blood lead levels in relation to menopause, smoking, and pregnancy history. *Am J Epidemiol*. 141 (11). 1047-1058.
- Šebelová, Š., Dušek, L., Gelnar, M., Jurajda, P. 1998. Is there relationship between parasite community structure and level of bioaccumulation of pollutants within parasite environment? *Helminthologia*, 35 (1-2). 163-171. ISSN 0440-6605.
- Takagi, Y., Matsuda, S., Imai, S., et al. 1988. Survey of Trace-Elements in Human Nails – an International Comparison. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41 (5). 690-695.
- Talcott, P. A., Koller, L. D. 1983. The Effect of Inorganic Lead and or a Polychlorinated Biphenyl on the Developing Immune-system of Mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 12 (2-3). 337-352.
- Tan, B. D., Jones, A. W. 1969. *Hymenolepis-microstoma*. Retardation of Growth and Development of Larval and Pupal Stages of *Tribolium-confusum*. *Experimental Parasitology*. 26 (3). 393-397.
- Tanaka, R. D., Macinnis, A. J. 1975. Explanation of Apparent Reversal of Circadian Migration by *Hymenolepis-diminuta* (Cestoda) in Rat. *Journal of Parasitology*. 61 (2). 271-280.
- Tandon, S. K., Flora, S. J. S., Singh, S. 1987. Influence of Pyroxine (Vitamin-B6) on Lead-Intoxication in Rats. *Industrial Health*. 25 (2). 93-96.
- Tandon, S. K., Prasad, S., Singh, S., et al. 2002. Influence of age on lead-induced oxidative stress in rat. *Biological Trace Element Research*. 88 (1). 59-69.

- Tekin-Ozan, S., Barlas, M. 2008. Concentrations of selected heavy metals in *Ligula intestinalis* L., 1758 plerocercoids (Cestoda) compared to its host's (*Tinca tinca* L., 1758) organs from Beyşehir Lake (Turkey) *Helminthologia*. 45 (2). 76-80.
- Tekin-Ozan, S., Kir, I. 2005. Comparative study on the accumulation of heavy metals in different organs of tench (*Tinca tinca* L. 1758) and plerocercoids of its endoparasite *Ligula intestinalis*. *Parasitology Research*. 97 (2). 156-159.
- Tekin-Ozan, S., Kir, I. 2008. Concentrations of some heavy metals in tench (*Tinca tinca* L., 1758), its endoparasite (*Ligula intestinalis* L., 1758), sediment and water in Beyşehir Lake, Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*. 17 (4). 597-603.
- Tenora, F., Baruš, V., Kračmář, S., Dvořáček, J. 2000. Concentrations of some heavy metals in *Ligula intestinalis* plerocercoids (Cestoda) and *Philometra ovata* (Nematoda) compared to some their hosts (Osteichthyes), *Helminthologia*. 37. 15-18.
- Teodorova, S., Metcheva, R., Topashka-Ancheva, M. 2003. Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba* - I. Analysis of Zn, Cu, Pb, and Cd disposition and mathematical model for Zn and Cd bioaccumulations. *Environmental Research*. 91(2). 85-94
- Tersago, K., De Coen, W., Scheirs, J., et al. 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution*. 132 (3). 385-394.
- Thielen, F., Zimmermann, S., Baska, F., et al. 2004. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environmental Pollution*. 129 (3). 421-429.
- Thompson, G. N., Robertson, E. F., Fitzgerald, S. 1985. Lead mobilization during pregnancy. *Med J Aust*. 143. 131.
- Tkachuck, R.D., MacInnis, A.J. 1971. The effect of bile salts on the carbohydrate metabolism of two species of hymenolepidid cestodes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 40 (4). 993-1003.
- Tomášková, L., Bejček, V., Sedláček, F., Šťastný, K., Tkadlec, E., Zima J., 2003. Population biology of shrews (*Sorex araneus* and *Sorex minutus*) from a polluted area in Central Europe. *Carnegie Museum of Natural History Special Publication, Pittsburgh*. 137 (4). 527-532. ISSN: 0145-9031
- Topashka-Ancheva, M., Metcheva, R., Teodorova, S. 2003. Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba* II. Genetic, cell, and metabolic disturbances. *Environmental Research*. 92 (2). 152-160.
- Torres, J., de Lapuente, J., Eira, C., Nadal, J. 2004. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoides arfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain. *Parasitology Research*. 94 (6). 468-470.
- Torres, J., Eira, C., Miquel, J., Foronda, P., Feliu, C. 2011. Cadmium and lead concentrations in *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) and *Rodentolepis microstoma* (Cestoda), and in their definitive hosts, *Rattus rattus* and *Mus domesticus* in El Hierro (Canary Archipelago, Spain). *Acta Parasitologica*. 56 (3) 320-324.
- Torres, J., Foronda, P., Eira C., et al. 2010. Trace Element Concentrations in *Raillietina micracantha* in Comparison to Its Definitive Host, the Feral Pigeon *Columba livia* in Santa Cruz de Tenerife (Canary Archipelago, Spain). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58 (1). 176-182.
- Torres, J., Peig, J., Eira, C., Borrás, M. 2006. Cadmium and lead concentrations in *Skrjabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain), *Environmental Pollution*. 143 (1). 4-8.
- Treble, R. G., Thompson, R. S. 1997. Preliminary results of a survey of lead levels in human liver tissue. *Bull Environ Contam Toxicol*. 59. 688-695.

- Turčeková, L., Hanzelová, V., Špakulová, M. 2002. Concentration of heavy metals in perch and its endoparasites in the polluted water reservoir in Eastern Slovakia. *Helminthologia*. 39 (1). 23–28.
- Uglen, G. L., Just, J. J. 1982. Trypsin Inhibition by Tapeworms – Antienzyme or pH. *American Zoologist*. 22 (4). 898-898
- Uchikawa, T., Ueno, T., Hasegawa, T., Maruyama, I., Kumamoto, S., Ando, Y. 2009. *Parachlorella beyerinckii* accelerates lead excretion in mice. *Toxicology and Industrial Health*. 25 (8). 551-556
- Ullrich, A., Sures, I., Degidio, M., et al. 1994. The Secreted Tumor-Associated Antigen 90K is a Potent Immune Stimulator. *Journal of Biological Chemistry*. 269 (28). 18401-18407.
- van der Vorst, E., Dhont, H., Cesborn, J.H., Capron, M., Dessaint, J.P., Capron A. 1988. Influence of an *Hymenolepis diminuta* infection on IgE and IgA bound to mouse intestinal eosinophils. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 87. 281–285.
- Vaziri, N. D., Ding, Y. 2001. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: Role of superoxide. *Hypertension*. 37. 223-226.
- Vaziri, N. D., Ding, Y., Ni, Z. 1999b. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension*. 34. 558-562.
- Vaziri, N. D., Ding, Y., Ni, Z. 2001. Compensatory up-regulation of nitric-oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J Pharmacol Exp Ther*. 298 (2). 679-685.
- Vaziri, N. D., Sica, D. A. 2004. Lead-induced hypertension: Role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep*. 6.314-320.
- Vaziri, N.D., Liang, K., Ding Y. 1999a. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int*. 56. 1492-1498.
- Vesely, T., Tlustos, P., Szakova, J. 2011. Organic salts enhanced soil risk elements leaching and bioaccumulation in *Pistia stratiotes*. *Plant Soil and Environment*. 57 (4), 166-172.
- Victory, W., Vander, A. J., Markel, L. K., et al. 1982a. Lead exposure begun *in utero* decreases renin and angiotensin II in adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 170. 63-67.
- Victory, W., Vander, A. J., Shulak, J. M., et al. 1982b. Lead, hypertension, and the renin-angiotensin system in rats. *J Clin Med*. 99. 354-362.
- Vidal-Martinez, V. M., Pech, D., Sures, B., et al. 2010. Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology*. 26 (1). 44-51.
- Visioli, G., Marmiroli, N. 2013. The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants. *Journal of Proteomics*. 79. 133-45.
- von Nickisch-Rosenegk, M., Brown, W.M., Boore, J.L. 2001. Complete sequence of the mitochondrial genome of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*: Gene arrangements indicate that platyhelminths are eutrochozoans. *Molecular Biology and Evolution*. 18 (5). 721-730.
- Waalkes, M. P., Klaassen, C. D. 1985. Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fund Appl Toxicol*. 5. 473-477.
- Wack, M., Komuniecki, R., Roberts, L. S. 1983. Amino-Acid-Metabolism in the Rat Tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology*. 74 (3). 399-402.
- Waeschenbach, A., Webster, B.L., Littlewood, D.T.J. 2012. Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 63 (3). 834-847.
- Wachs, B. 1982. Concentration of Heavy - Metals in Fishes from the River Danube. *Zeitschrift fur Wasser un Abwasser Forschung - Journal for Water and Wastewater Research*. 15 (2). 43-49.

- Watson, W. S., Morrison, J., Bethel, M. I. F., et al. 1986. Food iron and lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 44. 248-256.
- Watts, S. D. M., Fairbair, D. 1974. Anaerobic excretion of Fermentation Acids by *Hymenolepis diminuta* during Development in Definitive Host. *Journal of Parasitology.* 60 (4). 621-625
- Webb, T. J., Hurd, H. 1995. *Hymenolepis diminuta*-Induced Fecundity Reduction May be Caused by Changes in Hormone-Binding to *Tenebrio monitor* ovaries. *Parasitology.* 110. Part 5. 565-571.
- Webster, J. P., Gowtage-Sequeira, S., Berdoy, M., et al. 2000. Predation of beetles (*Tenebrio molitor*) infected with tapeworms (*Hymenolepis diminuta*): a note of caution for the Manipulation Hypothesis. *Parasitology.* 120. Part 3. 313-318
- Wedeen, R. P., Maesaka, J. K., Weiner, B., et al. 1975. Occupational lead nephropathy. *Am J Med.* 59. 630-641.
- Wedeen, R. P., Mallik, D. K., Batuman, V. 1979. Detection and treatment of occupational lead nephropathy. *Arch Intern Med.* 139. 53-57.
- Weis, C. P., LaVelle, J. M. 1991. Characteristics to consider when choosing an animal model for the study of lead bioavailability. *Chem Speciat Bioavail.* 3. 113-119.
- Weisse, M. E., Raszka, W. V. Jr. 1996. Cestode infection in children. *Advances in Pediatric Infectious Diseases.* 12. 109-53.
- Wells, A. C., Venn, J. B., Heard, M. J. 1975. Deposition in the lung and uptake to blood of motor exhaust labelled with <sup>203</sup>Pb. Inhaled Particles IV. Proceedings of a Symposium of the British Occupational Hygiene Society. Pergamon Press. Oxford. England. 175-189.
- Wilkinson, J.M., Hill, J., Phillips, C.J.C., 2003. The accumulation of potentially-toxic metals by grazing ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society.* 62 (2). 267-277.
- Willis, C., Poulin, R. 2000. Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes? *Folia Parasitologica.* 47 (1). 6-10.
- Wittmers, L. E., Wallgren, J., Alich, A., et al. 1988. Lead in Bone 4. Distribution of Lead in the Human Skeleton. *Archives of Environmental Health.* 43 (6). 381-391.
- Wiwanitkit, V. 2004. Overview of *Hymenolepis diminuta* infection among Thai patients, *Medscape General Medicine.* 6. 7.
- Woelfl, S., Mages, M., Torres, P. 2008. Trace metal concentrations in single specimens of the intestinal broad flatworm (*Diphyllbothrium latum*), compared to their fish host (*Oncorhynchus mykiss*) measured by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy.* 63 (12). 1450-1454.
- Worden, B. D., Parker, P. C., Pappas, P. W. 2000. Parasites reduce attractiveness and reproductive success in male grain Beetles. *Animal Behaviour.* 59. Part 3. 543-550.
- Xie, Y., Chiba, M., Shinohara, A., et al. 1998. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Ind Health.* 36. 234-239.
- Yan, G. Y., Norman, S. 1995. Infection of *Tribolium* Beetles with a Tapeworm – Variation in Susceptibility within and between Beetle Species and among Genetic Strains. *Journal of Parasitology.* 81(1). 37-42
- Yan, G. Y., Phillips, T. W. 1996. Influence of tapeworm infection on the production of aggregation pheromone and defensive compounds in *Tribolium castaneum*. *Journal of Parasitology.* 82 (6). 1037-1039
- Yan, G. Y., Stevens, L., Goodnight, C. J., et al. 1998. Effects of a tapeworm parasite on the competition of *Tribolium* Beetles. *Ecology.* 79 (3). 1093-1103
- Yu, C. C., Lin, J. L., Lin-Tan, D. T. 2004. Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: A four-year prospective longitudinal study. *J Am Soc Nephrol.* 15. 1016-1022.

- Zelikoff, J. T., Parsons, E., Schlesinger, R. B. 1993. Inhalation of particulate lead oxide disrupts pulmonary macrophage-mediated functions important for host defense and tumor surveillance in the lung. *Environmental Research*. 62 (2). 207-222.
- Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., et al. 1978. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res*. 12. 29-34.
- Zimmerman, N. P., Bass, P., Oaks, J. A. 2001. Modulation of caudal intestinal permeability in the rat during infection by the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*. 87 (6). 1260-1263.
- Zimmerman, N. P., Brownfield, M. S., DeVente, J., et al. 2008. cGMP secreted from the tapeworm *Hymenolepis diminuta* is a signal molecule to the host intestine. *Journal of Parasitology*. 94 (4). 771-779
- 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*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37 (2). 190-195
- Zubitskaya, M. A. 1974. Studies on details of *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) morphology and biology and *Tribolium confusum* beetles. PhD Dissertation. University of Frunze.
- Zubitskaya, M. A., Arakcheeva, C. G., Lerner, P. M. 1972. Some problems of experimental hymenolepiasis. *Medical Journal of Uzbekistan*. 4. 12-15.