

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**  
Katedra biologických a biochemických věd

**IMUNOTOXICITA**

**Eva Kolaříková**

Bakalářská práce

**2017**

**The University of Pardubice**  
**Faculty of chemical-technology**  
Department of Biological and Biochemical sciences

**IMMUNOTOXICITY**

**Eva Kolaříková**

Bachelor thesis

**2017**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Kolaříková**  
Osobní číslo: **C13252**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Imunotoxicita**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji o negativním působení chemických či fyzikálních faktorů na funkce imunitního systému, které může vést ke zvýšené incidenci či závažnosti infekčních chorob, k rozvoji rakoviny či autoimunitních onemocnění a alergií.
2. Vypracujte přehled jednotlivých látek, které jsou známé jako imunotoxikanty (PCB, PAH, azbest, benzen, dioxiny, některé mykotoxiny atd.).
3. Popište metody testování imunotoxicity.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o významu testování látek ovlivňující imunitní systém člověka. Diskutujte možnost stanovení imunotoxicity na primárních a nádorových buněčných liniích.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**18. prosince 2015**

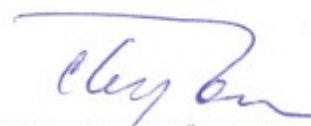
Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou použity v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst.1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 8. 5. 2017

Eva Kolaříková

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytovala.

## ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá imunotoxicitou. Imunotoxicita je míra vlivu některých chemických látek nebo fyzikálních vlivů na imunitní systém, tyto látky nazýváme imunotoxikanty. Účinky imunotoxikantů se projeví například imunosupresí, která může přispívat k rozvoji rakoviny, nebo imunostimulací, která by mohla vést k rozvoji autoimunitních onemocnění a alergií. V práci je uveden přehled vybraných imunotoxikantů a mechanismy jejich účinku. V závěru práce jsou uvedeny možnosti testování imunotoxicity.

## KLÍČOVÁ SLOVA

imunotoxikant, imunomodulace, testování imunotoxicity

## TITLE

Immunotoxicity

## ANNOTATION

This bachelor thesis is dealing with immunotoxicity. Immunotoxicity is an ability of certain chemical or physical effects to influence immune system, we call these substances immunotoxicants. The effects of immunotoxicants are shown in immunosuppression, which can contribute to development of cancer or immunostimulation which contribute to development of autoimmune diseases and allergies. This thesis features an overview of the selected immunotoxicants and their mechanisms of action. In the conclusion of the thesis there is a list of options which can be used while testing immunotoxicity.

## KEYWORDS

immunotoxicant, immunomodulation, immunotoxicity tests



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>13</b>
<b>1. IMUNOTOXIKOLOGIE</b> .....	<b>14</b>
1.1 HISTORIE IMUNOTOXIKOLOGIE.....	14
1.2 HLAVNÍ FUNKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	15
1.3 VZNIK BUNĚK IMUNITNÍHO SYSTÉMU .....	16
<b>2. IMUNOTOXICKÉ ÚČINKY XENOBIOTIK NA IMUNITNÍ SYSTÉM</b> .....	<b>18</b>
2.1 IMUNOSUPRESE .....	18
2.2 IMUNOSTIMULACE.....	18
2.2.1 HYPERSENZITIVNÍ REAKCE .....	19
2.2.2 AUTOIMUNITNÍ REAKCE .....	19
<b>3. IMUNOTOXIKANTY</b> .....	<b>20</b>
3.1 BENZEN.....	20
3.2 AZBEST .....	22
3.3 POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAH).....	25
3.4 POLYCHLOROVANÉ BIFENYLY (PCBS).....	26
3.5 DIOXINY.....	27
3.6 MYKOTOXINY .....	28
3.6.1 AFLATOXINY .....	28
3.6.2 OCHRATOXINY .....	29
3.6.3 PATULIN .....	29
3.6.4 TRICHOTECENY .....	29
3.7 TĚŽKÉ KOVY .....	30
3.7.1 OLOVO .....	30
3.7.2 ARZEN .....	30
3.7.3 RTUŤ .....	31
3.7.4 BERYLLIUM .....	31
3.8 XENOESTROGENY.....	31
3.9 UV-B ZÁŘENÍ.....	33
<b>4. MECHANISMY ÚČINKŮ JEDNOTLIVÝCH IMUNOTOXIKANTŮ</b> .....	<b>34</b>
4.1 BENZEN.....	34
4.2 AZBEST .....	35
4.3 TĚŽKÉ KOVY .....	36
4.3.1 OLOVO .....	36
4.3.2 ARZEN .....	36
4.3.3 RTUŤ .....	36

4.3.4	BERYLLIUM .....	36
4.4	POLYCYKLICKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAH).....	37
4.5	POLYCHLOROVANÉ BIFENYLY (PCB).....	37
4.6	DIOXINY.....	37
4.7	MYKOTOXINY .....	38
4.8	XENOESTROGENY.....	38
4.9	UV-B ZÁŘENÍ.....	38
<b>5.</b>	<b>STANOVENÍ IMUNOTOXICITY.....</b>	<b>40</b>
5.1	STUPEŇ 1.....	41
5.1.1	IMUNOPATOLOGIE.....	41
5.1.2	HUMORÁLNÍ IMUNITA.....	41
5.1.3	BUNĚČNÁ IMUNITA.....	42
5.2	STUPEŇ 2 – KOMPLEXNÍ TESTOVÁNÍ.....	44
5.2.1	HUMORÁLNÍ ODPOVĚĎ.....	44
5.2.2	BUNĚČNÁ IMUNITA.....	44
<b>6.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>48</b>

## Seznam zkratek

NK	„přirozený zabíječ“, natural killers
PAH	polyaromatické uhlovodíky, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
SPC	kyselina S-phenylcysteinová
CYP 450	cytochrom P 450
PCBs	polychlorované bifenyly, polychlorinated biphenyls
PCDD	polychlorované dibenzodioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
OTA	ochratoxin A
DON	deoxynivaleon
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
ROS	reaktivní formy kyslíku, Reactive Oxygen Species
AM	alveolární makrofágy
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
IL	interleukin
AhR	aryl uhlovodíkový receptor, aryl hydrocarbon receptor
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
SLE	systémový lupus erythematosus
ER	estrogenový receptor

## Seznam ilustrací

OBR. 1 SCHÉMA AKTIVACE IMUNITNÍHO SYSTÉMU [8] .....	16
OBR. 2 STRUKTURNÍ VZOREC BENZENU .....	20
OBR. 3 KONCENTRACE BENZENU V OVZDUŠÍ PRO RŮZNÁ ZAMĚSTNÁNÍ [14] .....	21
OBR. 4 FORMY AZBESTU, CHRYSOLIT (VLEVO), AMOSIT (UPROSTŘED), KROCIDOLIT (VPRAVO) [18]	23
OBR. 5 VLÁKNA AZBESTU V PLICNÍ TKÁNI (CHRYSOLIT A KROCIDOLIT)[17] .....	23
OBR. 6 POMĚR PRAVDĚPODOBNOTI VÝSKYTU RAKOVINY PLIC (KOMBINACE AZBESTU A KOUŘENÍ)[20] .....	24
OBR. 7 STRUKTURNÍ VZORCE VYBRANÝCH POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ .....	25
OBR. 8 STRUKTURNÍ VZOREC POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCBS) .....	26
OBR. 9 STRUKTURNÍ VZORCE VYBRANÝCH DIOXINŮ .....	27
OBR. 10 STRUKTURÁLNÍ VZOREC AFLATOXINU B1 .....	28
OBR. 11 STRUKTURNÍ VZOREC OCHRATOXINU A (VLEVO) A PATULINU (VPRAVO) .....	29
OBR. 12 STRUKTURÁLNÍ VZOREC T-2 TOXINU (VLEVO) A DON (VPRAVO) .....	30
OBR. 13 STRUKTURNÍ VZORCE VYBRANÝCH RŮZNORODÝCH XENOESTROGENŮ .....	32
OBR. 14 PRINCIP METODY ELISA [71] .....	42
OBR. 15 PRINCIP PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE [72] .....	43

## Úvod

Imunotoxicita označuje míru vlivu chemických látek na imunitní systém. Studium imunotoxicity se zabývá imunotoxikologie, která je jedním z oborů toxikologie. Jedná se o poměrně mladý obor, který vznikl v 70. a 80. letech 20. století.

Imunotoxikologie se zaměřuje především na reakci xenobiotik s imunitním systémem a následným účinkem těchto sloučenin na imunitní systém, jejichž výsledkem může být imunitní suprese či stimulace.

Imunotoxické látky mohou závažně ovlivňovat zdraví lidí, a proto je důležité imunotoxicitu u jednotlivých látek sledovat.

Tato bakalářská práce je přehledem vybraných chemických a fyzikálních imunotoxikantů. Popisuje základní mechanismy, kterými tyto imunotoxikanty působí na organismus. Dodnes bohužel nejsou veškeré mechanismy účinku jednotlivých imunotoxikantů známy, a proto se v mnohých případech mechanismus účinku jen předpokládá.

V závěru práce jsou uvedeny jednotlivé metody, kterými lze imunotoxicitu těchto látek prokázat. Imunotoxicita je v posledních letech nejčastěji zkoumána na laboratorních zvířatech, bohužel výsledky z těchto pokusů nejsou plně přenositelné na člověka, navíc se při těchto pokusech zjistí pouze konečné výsledky po expozici imunotoxikantu, bez poznání jejich mechanismu působení. Přesnější výsledky k objasnění mechanismu účinku imunotoxikantů by mohla přinést nová metoda testování, a to testování pomocí mnohobuněčných kultur.

# 1. Imunotoxikologie

Imunotoxikologie je jednou z oblastí toxikologie. Jedná se o mnohostrannou disciplínu, která se zabývá účinky fyzikálních a chemických látek na imunitní systém. Tyto látky a vlivy jsou označovány jako imunotoxikanty a mohou vyvolat histologické změny lymfatických orgánů, nebo způsobit kvantitativní či kvalitativní funkční poruchy imunitního systému.

Disciplína imunotoxikologie zahrnuje studium detekce, výskytu, a mechanismů nepříznivých účinků indukované imunitní dysfunkce [1, 2].

Především se zaměřuje na reakci xenobiotik s imunitním systémem. Zabývá se přímým toxickým účinkem sloučenin na imunitní systém, který může vést k imunitní supresi či stimulaci. Může ale také dojít k imunologicky zprostředkovaným reakcím s toxickou sloučeninou a v jejím důsledku k rozvoji autoimunitních onemocnění. Reakcí xenobiotik s imunitním systémem dále dochází k rozvoji alergie, poškození tkání a také rakoviny [3].

Základy imunotoxikologie čerpají především z toxikologie a imunologie, dále také z dalších biomedicínských věd jako je klinická a interní medicína, alergologie, buněčná a molekulární biologie. Důležité je rovněž posouzení rizik, které přispívají k našemu lepšímu pochopení nežádoucích účinků imunotoxikantů a vývoji nových konceptů a technik použitelných pro predikci a vyšetřování imunotoxických účinků léků a chemikálií [1, 4].

## 1.1 Historie imunotoxikologie

I dnes v prvních letech 21. století je imunotoxikologie relativně mladou oblastí toxikologie. První symposium věnované imunotoxikologii se konalo v Lyonu (Francie) dne 24. října 1974. Toto symposium bylo zaměřené pouze na imunitně zprostředkované nežádoucí účinky léků.

Nicméně, první vysvětlení problematiky týkající se poruch imunitního systému se konalo v roce 1979 v USA pod záštitou Akademie Věd v New Yorku. Po této přednášce následovalo speciální vydání v časopise Léčiva a chemická toxikologie. Toto vydání bylo speciálně věnované imunotoxikologii a dá se považovat za jeden ze základních textů toho oboru. V roce 1983, Davies prohlásil zrození imunotoxikologie [1, 5].

Avšak již koncem 19. a počátkem 20. století se začínají objevovat ve vědecké literatuře informace o možném imunotoxikologickém účinku některých látek. V roce 1903 byl například popsán supresivní účinek éteru na fagocytózu [6].

Mezi lety 1970 a 1980 dochází ke kritickému zlomu ve vývoji imunotoxikologie zavedením základních toxikologických konceptů, jako je výběr relevantní dávky, délky trvání expozice a zvířecího druhu do pre-klinických studií hodnotících imunotoxicitu. Koncept

odstupňovaných protokolů, který je dnes široce přijímaný, v pre-klinickém hodnocení poruch imunitního systému byl v této době představen americkými autory. Bylo zjištěno imunotoxické působení u řady sloučenin například u cyklofosfamidu, benzidinu, diethylstilbestrolu, hexachlorbenzenu, vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků, pesticidů (Chlordan). V této době se konala také řada významných symposií, avšak navzdory významným pokrokům byla imunotoxikologie posuzována pouze z pohledu imunosuprese.

Na popud evropských vědců byla koncem let 1980 imunotoxikologie rozšířena o další poruchy, a to především autoimunity a hypersenzitivní reakce. Velká pozornost byla věnována autoimunitním reakcím vyvolaných léčiv. Některá léčiva musela být kvůli závažným autoimunitním účinkům stažena z trhu. Jako příklad lze uvést beta-blokátor Practolol, který vyvolával okulokutánní syndrom [5].

Hypersenzitivní reakce byly jednou z hlavních příčin stažení některých léčiv z trhu během 80. a 90. let 20. století. Závažné hypersenzitivní reakce se objevily například u nesteroidního antiflogistika Isoxikamu, o jehož podání se objevoval Stevensonův-Johnsonův syndrom nebo toxická epidermální nekrolýza [5, 7].

## **1.2 Hlavní funkce imunitního systému**

Imunitní systém je tvořen propojením buněk a molekul, jejichž úlohou je rozpoznání „cizích“ a „vlastních“ částí a zajištění integrity těla. Primární funkce imunitního systému spočívá v ochraně před invazivními patogeny, především bakteriemi, viry, plísněmi, kvasinkami, a také nádory. Tato role imunitního systému je zásadní pro přežití.

Látky, které dokáží vyvolat imunitní odpověď, se nazývají antigeny. Některé látky mohou vyvolat imunitní odpověď až po navázání na nosič (některé léky, například peniciliny). Tyto látky jsou označovány jako hapteny.

Součástí imunitního systému jsou lymfatické orgány. Primárními lymfatickými orgány jsou kostní dřeň a brzlík. V kostní dřeni dochází ke vzniku všech imunokompetentních buněk, v brzlíku dozrávají buňky, které následně označujeme jako T lymfocyty. Mezi sekundární lymfatické orgány patří slezina, lymfatické uzliny a slizniční lymfatická tkáň (tonzily, apendix, Peyeroovy pláty ve střevě).

Dvěma základními mechanismy imunitního systému, které se navzájem doplňují, jsou imunita specifická a imunita nespecifická (Obr. 1) [5].

## Nespecifická imunita

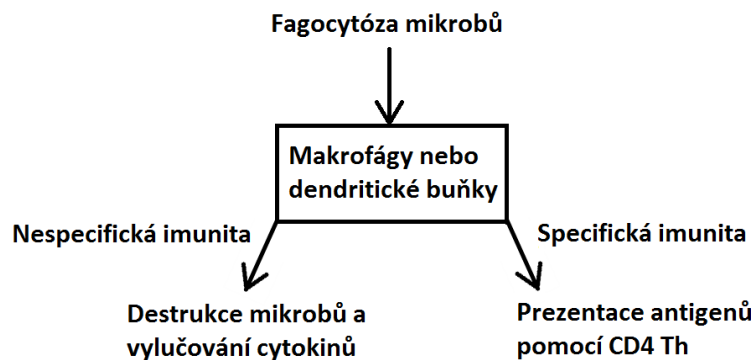
Zajišťuje prvotní obranu při kontaktu s antigenem. Je aktivována během několika minut. Její součástí jsou fyzikální bariérové systémy (kůže, sliznice dýchací, zažívacího a urogenitálního traktu), některé buňky (NK buňky), komplement, interferony, fagocytóza a zánět. Na rozdíl od specifické imunity nemá imunologickou paměť.

## Specifická imunita

Specifická imunita je cílena přímo proti danému patogenu, ale její aktivace probíhá v řádu dnů. Na rozdíl od nespecifické imunity je zde vytvářena imunologická paměť.

Základními složkami specifické imunity jsou buněčná a humorální imunita. Humorální imunita je zajištěna především protilátkami, produkovány B lymfocyty. Buněčnou imunitu vykonávají pomocné a cytotoxické T lymfocyty.

V případě specifické i nespecifické imunity hrají důležitou roli makrofágy a dendritické buňky. Fagocytují a zabíjí mikroby a předkládají antigen pomocným T lymfocytům, které aktivují specifickou část imunity, což vede k produkci protilátek B lymfocyty nebo aktivaci cytotoxických T lymfocytů [8].



Obr. 1 Schéma aktivace imunitního systému [8]

## **1.3 Vznik buněk imunitního systému**

Kostní dřeň je hlavním orgánem imunitního systému, kde vnikají veškeré imunitní buňky. Kostní dřeň se nachází ve středu a epifyze kostí. Jednotlivé buňky se diferencují z pluripotentní buňky, z níž myeloidní řadou vznikají nezralé myeloidní buňky a makrofágy. Myeloidní buňky se dále diferencují do zralých buněk. Za patologických podmínek (nádor) nedochází k diferenciaci a nezralé buňky jsou uvolněny do krve, z těch se stanou odvozené supresorové buňky, které mají imunopresivní aktivitu [9].



Lymfoidní řadou vnikají z pluripotentní buňky prekurzory pro T a B lymfocyty. T prekurzory jsou uvolněny z kostní dřeně a putují do thymu, kde dochází k jejich diferenciaci do imunokompetentních Th (receptor CD4) a Tc (receptor CD8) lymfocytů [8].

B lymfocyty se stávají zralými až po kontaktu s antigenem. Následně se mění v plazmatické buňky a jsou schopny produkovat protilátky proti daným antigenům. Některé B lymfocyty se mohou přeměnit v paměťové buňky, které urychlují tvorbu protilátek při sekundární imunitní odpovědi po opětovném setkání s antigenem.

## 2. Imunotoxické účinky xenobiotik na imunitní systém

Imunitní systém chrání tělo před vnějšími vlivy, které by jej mohly poškodit. Kromě nejčastějších vnějších vlivů jako jsou bakterie a viry, existuje řada toxických látek, které ovlivňují funkce imunitního systému. Imunotoxické látky ovlivňují imunitní systém několika způsoby [10].

Prvním typem je imunosuprese, jejímž působením dochází ke snížení funkcí imunitního systému. Druhým typem působení toxických látek na imunitní systém je imunostimulace, kdy dochází ke zvýšení funkcí imunitního systému. Do této skupiny řadíme rovněž reakce hypersenzitivní a autoimunitní [4].

### 2.1 Imunosuprese

Imunosuprese je snížení aktivace nebo účinnosti imunitního systému. V důsledku imunosuprese dochází k častějšímu výskytu infekcí, které bývají častější a závažnější než u imunokompetentních jedinců, a také maligních onemocnění [6].

Příkladem imunosupresivního působení xenobiotik u člověka může být tzv. Yusho otrava, ke které došlo v roce 1968 v západním Japonsku. Hlavní příčinou byla kontaminace rýžového oleje 2,3,4,7,8-penta-chlorodibenzofuranem a došlo k hromadné otravě lidí. Pacienti trpěli různými systémovými symptomy, především únavou, nevolností, bolestí svaly a klouby, kožními a ústními pigmentacemi a také zvýšeným výtokem z očí [7].

Také některá léčiva vyvolávají imunosupresivní účinky. Jedním z příkladu mohou být kortikosteroidy, které potlačují funkce T lymfocytů a fagocytů. U pacientů, léčených kortikosteroidy se častěji vyskytují infekce vyvolané stafylokoky a gram-negativními bakteriemi, ale také infekce vyvolané intracelulárními patogeny (např. mykobakterie) a některými viry.

Mezi látky, jejichž působením může dojít ke vzniku malignit, patří například benzen, azbest nebo PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky).

Imunosupresivní působení některých látek se využívá v lékařství při transplantaci orgánů nebo léčbě některých autoimunitních onemocnění (např. cyklosporin, tacrolimus) [5, 6].

### 2.2 Imunostimulace

Imunostimulace je zvýšení aktivace nebo účinnosti imunitního systému. Základními typy imunostimulace jsou hypersenzitivní reakce a autoimunitní reakce.

### **2.2.1 Hypersenzitivní reakce**

Hypersenzitivita může být definována jako reprodukovatelná reakce vyvolávající příznaky iniciované expozicí definovanému stimulu při dávce tolerované běžnými jedinci. Známymi mechanismy působení hypersenzitivity xenobiotik jsou IgE protilátkami zprostředkované reakce nebo T lymfocyty zprostředkovaná kontaktní přecitlivělost. Hypersenzitivní reakce jsou jen zřídka závažné, výjimečně však může dojít k anafylaktické reakci, která je život ohrožující, agranulocytóze či „toxicodermii“ (dermatitis medicamentosa).

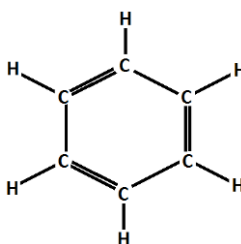
### **2.2.2 Autoimunitní reakce**

Autoimunitní reakce vyvolané imunotoxikanty se vyskytují poměrně vzácně. Jedním z příkladů látek vyvolávajících autoimunitní reakci lze uvést antihypertenzní lék  $\alpha$ -metyldopu, u níž byl prokázán vznik autoimunitní hemolytické anémie [4, 6].

### 3. Imunotoxikanty

Působení imunotoxikantů na imunitní systém je dáno jejich imunotoxicitou, která může mít na imunitní systém řadu nepříznivých vlivů. Na jedné straně jde o porušení proti-infekční a proti-nádorové ochrany a neschopnost reagovat na vakcíny, na druhé straně může vést k hypensenzitivitě imunitního systému až k autoimunitě. Zde je přehled látek známých jako imunotoxikanty [1].

#### 3.1 Benzen



Obr. 2 Strukturální vzorec benzenu

Benzen (Obr. 2) je velmi těkavá, bezbarvá a také vysoce hořlavá kapalina, která má charakteristický zápach. Chemicky je nejmenší a nejvíce stabilní aromatický uhlovodík, účastní se substitučních a adičních reakcí. Vyrábí se z ropy a používá se jako nepolární rozpouštědlo (barvy, cement, lepidla, chlorbenzenové sloučeniny) a jako výchozí látka pro syntézu mnoha chemických látek (pryskyřice, plasty, barviva). Z hlediska toxicity pro lidský organismus je zdrojem především jeho přítomnost v ovzduší, kam se dostává vlivem průmyslové výroby při zpracování produktů, které ho obsahují (výroba ropných produktů, koksování uhlí, výroba aromatických uhlovodíků) a užívání těchto produktů (benzín) [11, 12].

#### Toxikinetika

Benzen se do lidského těla dostává především pomocí dýchacích cest. Kontaminace vzduchu tedy hraje významnější roli než ostatní možné zdroje (jídlo, voda, kontakt látky s kůží). To ovšem neplatí pro akutní toxické účinky benzenu, kdy toxikinetika bezprostředně souvisí s účinky (např. zarudnutí kůže) [10, 13].

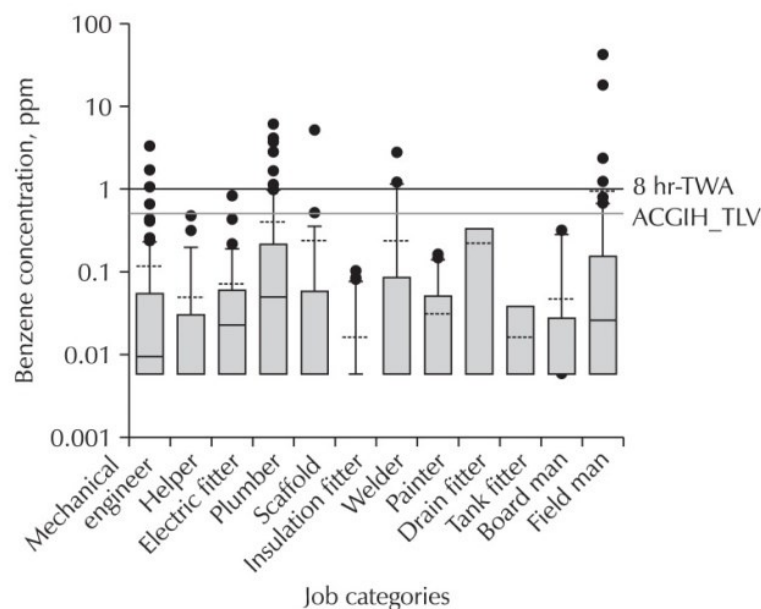
#### Toxicita a imunotoxicita

Benzen byl komerčně využíván po více než století, a kolem roku 1900 se objevila první podezření na jeho toxické účinky. Má dráždivé účinky na oči a sliznice. Při delší lokální expozici na kůži může způsobit zarudnutí kůže, pálení, hromadění tekutin a puchýře. Při vdechnutí toxické dávky benzenu vznikají akutní otravy, které se projevují srdeční arytmií, depresí CNS a asfyxií [10].

Koncentrace benzenu v ovzduší se pohybuje od  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (venkovské prostředí) do  $350 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (průmyslové oblasti). V extrémních případech (benzínové pumpy) může koncentrace benzenu v ovzduší dosahovat až  $10 \text{mg}/\text{m}^3$ . Denní expozice se výrazně liší pro kuřáky  $1800 \mu\text{g}/\text{den}$  a pro nekuřáky  $50 \mu\text{g}/\text{den}$ . Akutní toxicita benzenu je nízká, při laboratorních pokusech na potkanech, kdy jim byla orálně podáván, byla LD 50 stanovena v rozmezí  $3000 \text{mg}/\text{kg}$ – $8100 \text{mg}/\text{kg}$ .

Při perorálním použití je nejmenší letální dávka 10 ml (8,8 g) s příznaky zahrnující vrávoravou chůzi, zvracení, mělký a rychlý puls, somnolenci, ztrátu vědomí. Současná pozornost je však zaměřena na dlouhodobé účinky nízkých koncentrací benzenu v pracovním a životním prostředí. U lidí exponovaných koncentracím od  $40 \text{mg}/\text{m}^3$  do  $3500 \text{mg}/\text{m}^3$  po dobu delší než 3 měsíce se vyskytují příznaky útlumu kostní dřeně až aplastické anémie. Vliv na imunitní systém je však již při nižších koncentracích, dochází ke změnám v humorální i buněčné imunitě. Také může být sledována zvýšená citlivost k alergiím a bylo prokázáno riziko vzniku leukemie [12, 13].

Přehled koncentrací benzenu vyskytující se na různých pracovištích. Vyznačená hranice je maximální přípustná koncentrace na pracovišti, které je zaměstnanec vystaven po dobu osmi hodinové směny. Tato hranice je stanovena americkou konferencí průmyslových hygieniků (Obr. 3 ).



Obr. 3 Koncentrace benzenu v ovzduší pro různá zaměstnání [14]

Chronické toxické účinky přináší větší obavy než akutní účinky benzenu. Osoby dlouhodoběji vystavené účinkům benzenu zprvu trpí nespecifickými příznaky jako je únava, bolest hlavy a ztráta chuti k jídlu. Dochází také ke změně v počtu krevních kompartmentů.

Nejčastěji dochází ke snížení počtu bílých krvinek. Podrobnější vyšetření krve může ukázat abnormálně zvýšený počet lymfocytů v krvi, anémii a pokles počtu krevních destiček, které jsou nezbytné pro srážení krve. Příčinou těchto změn je působení benzenu na kostní dřeň. Kvůli obavám, že dlouhodobá expozice benzenu může způsobit leukémii nebo nádorové bujení, byla zavedena různá opatření. Především byly sníženy přípustné hladiny benzenu na pracovišti, a pokud je to možné, tak je benzen nahrazen jinými látkami, například xylenem nebo toluenem [10].

Toxicita je způsobena vznikem jeho toxických metabolitů v játrech. Toxicita benzenu vyvolává aplastickou anémii, a to negativním působením několika metabolitů na kmenové buňky kostní dřeně. Dále působením metabolitů benzenu na kostní dřeň dochází ke vzniku nevhodného mikroprostředí pro růst a zrání nových buněk dřeně. Mechanismus vzniku leukemie působením benzenu však není podrobně znám. Benzen a jeho metabolity nejsou přímo mutageny, nicméně jsou vysoce klastogenní (mají vliv na přerušení, odstranění a změna uspořádání chromozomů). Na základě pokusů na zvířatech pak byla prokázána karcinogenost [11].

### Biomarkery

Pro benzen byly vyvinuty tři biomarkery. Nejčastěji používaný a velice citlivý je kyselina mukonová, což je jeden z hlavních metabolitů benzenu vylučovaný močí. Testuje se pomocí chromatografie nebo hmotnostní spektroskopie. Dalším biomarkerem je výskyt kyseliny S-phenylcysteinové (SPC) v hemoglobinu podobnou metodou jako v předchozím případě. Při laboratorních pokusech se však ukázalo, že výsledky získané pomocí této metody se výrazně liší pro potkany, myši a lidi. Třetím biomarkerem je výskyt SPC v albuminu podobně jako v předchozím případě. Na základě experimentů se však ukázala zkouška SPC jako náročná a nepřesná [15].

## **3.2 Azbest**

Azbest je tvořen skupinou vláknitých silikátových minerálů. Pro jeho fyzikálně-chemické vlastnosti jako je pevnost v tahu, izolační schopnosti a snadné zpracování byl hojně využíván pro různé konstrukce více než 100 let. V současné době je jeho používání na ústupu, ale je stále využíván v některých zemích, a to navzdory alarmujícím zprávám o jeho toxicitě a možnostech karcinogenity. Mezi nejrozšířenější průmyslově používané azbesty patřil především chrysotil (vzorec přibližně  $3\text{MgO}\cdot 2\text{SiO}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), amosit (přibližně  $11\text{FeO}\cdot \text{MgO}\cdot 16\text{SiO}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a krocidolit (přibližně  $\text{Na}_2\text{O}\cdot \text{Fe}_2\text{O}_3\cdot 3\text{FeO}\cdot 8\text{SiO}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ ). U nás rozhodla Evropská komise v roce 1999 o postupném odstranění veškerého využití azbestu a úplném zákazu všech jeho typů. Povolen je pouze chrysotil v membránách stávajících chlorových elektrolyzačních

aparatur, chrysotil vyskytující se přirozeně ve skalách či půdě a chrysotil pro vojenské využití. Většina současné expozice populace je způsobena zneškodněním odpadů obsahující azbest, jejichž zpracováním (broušením, řezáním apod.) mohou do ovzduší unikat vlákna a prach azbestu [16, 17].



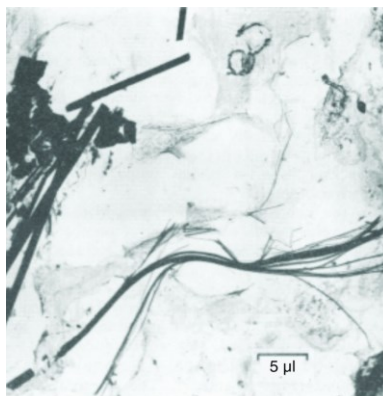
Obr. 4 Formy azbestu, chrysolit (vlevo), amosit (uprostřed), krocidolit (vpravo) [18]

### Toxikinetika

Azbest se do lidského těla dostává v podobě vláken, která jsou vdechnuta do plic a kde následně uvíznou (Obr. 5). Velikost těchto vláken a jejich tvar má významný vliv na toxikinetiku azbestu. Vlákna o délce až 200  $\mu\text{m}$  mohou uvíznout v plicích, pokud mají průměr již do 3  $\mu\text{m}$ , nejriskantnější vlákna jsou přitom delší než 5  $\mu\text{m}$  a užší než 1,5  $\mu\text{m}$ . Přitom vlákna chrysolitu, která jsou zakřivená, a vytváří shluky, se v plicích nedostávají tak hluboko a v takovém množství jako vlákna amositu či krocidolitu (ty patří mezi tzv. amfiboly, které tvoří hladká vlákna se špičatými konci). Tím je chrysolit menším rizikovým faktorem pro vývoj mezotheliomu. U plicních nádorů či azbestózy však odlišnosti zjištěny nebyly [16, 19].

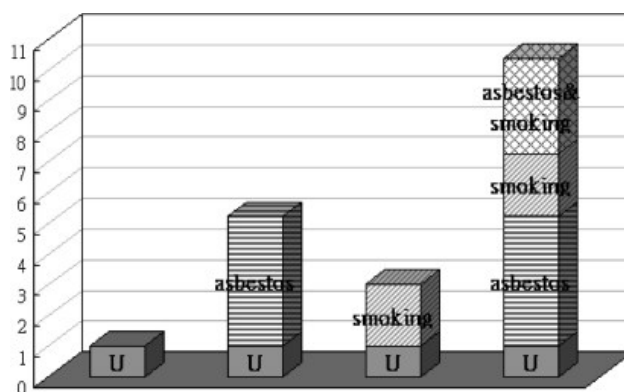
### Toxicita a imunotoxicita

Inhalace azbestu způsobuje poškození plic a má za následek charakteristický typ rakoviny plic. Toxicita azbestu byla předmětem rozsáhlého výzkumu. Přesné patogenní mechanismy, kterými azbestová vlákna vyvolávají plicní toxicitu a nádorové transformace však nebyly dosud plně pochopeny. Mezi diskutované mechanismy patří generování volných radikálů z kovu, reaktivních forem dusíku a uvolňování cytokinů. To má za následek indukovanou genotoxicitu a změnu imunitní odpovědi. Chrysolit je navíc velice hemolytický.



Obr. 5 Vlákna azbestu v plicní tkáni (Chrysolit a Krocidolit)[17]

Tři hlavní patologické stavy způsobené inhalací azbestu jsou azbestóza, rakovina plic a mezoteliom. Azbestóza je důsledek způsobení fibrózy a zesílení poplicnice vlivem přítomnosti vláken azbestu. Období do vývoje rakoviny plic je dlouhé, 20–40 let, kdy ve výrazně vyšším riziku jsou kuřáci (Obr. 6). Zvláštním případem rakoviny je mezoteliom, což je nádor výstelky plic a hrudníku či břišní dutiny. To je způsobeno přítomností azbestu v poplicnici. Vývoj tohoto smrtelného typu rakoviny trvá více než 30 až 50 let. Není však ovlivněn kouřením [10, 17, 19].



Obr. 6 Poměr pravděpodobnosti výskytu rakoviny plic (kombinace azbestu a kouření)[20]

#### Sledování v ovzduší

Sledovaným ukazatelem je ve smyslu nařízení vlády č. 178/2001 Sb. početní koncentrace vláken o rozměrech délka větší než 5  $\mu\text{m}$ , průměr menší než 3  $\mu\text{m}$  a poměr délky k průměru menší než 3:1 v pracovním ovzduší. Podstatou metody určení počtu vláken je prosávání vzduchu zařízením s filtrem, na němž se vlákna azbestu zachytí. Vše musí probíhat za podmínek daných právními předpisy. Mezní limit při standardních podmínkách je 1000 vláken/ $\text{m}^3$  [16, 21].

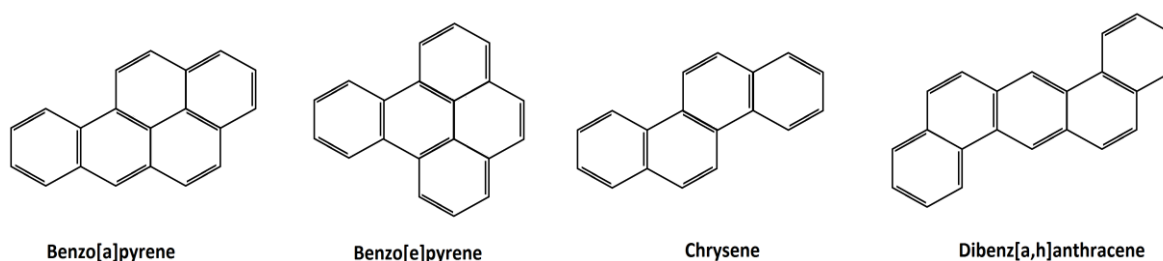
#### Biomarkery

Vzhledem k toxikokinetice azbestu není přítomen v lidských tekutinách, což znesnadňuje odhalení azbestu jako toxikantu. První možností je sledování pleurálních plaků vizualizované na rentgenu hrudníku, nebo pomocí počítačové tomografie. Pleurální plaky jsou vymezené kruhové oblasti zhuštění parietální nebo brániční pohrudnice složených z kolagenové pojivové tkáně. Ty jsou nejčastěji důsledkem expozice azbestu, objevují se však až 20-40 let po první expozici. Navíc mohou být viděny po pleurální infekci nebo pleurálním krvácení. Vzhledem k výše uvedenému je použití pleurálních plaků jako biomarkerů azbestu velice omezené a není dostatečně konkrétní [22].



### 3.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs, z anglického Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Obr. 7) je třída organických látek, která vzniká vystavováním složitých organických látek vysokým teplotám a tlakům. Vznikají tedy především při nedokonalém spalování jiných uhlovodíků jako termodynamická reakce směsi bohaté na uhlík a chudé na vodík. Jedná se o pevné látky s nízkou těkavostí při pokojové teplotě, relativně vysoké molekulové hmotnosti, dobrou rozpustností v organických rozpouštědlech, nerozpustností ve vodě. Mohou být degradovány na jednodušší látky. Většina z nich jsou tvořena třemi a více kondenzovanými benzenovými kruhy obsahující pouze uhlík a vodík. Zdroje PAH jsou například spalovací motory, výfuky, kamna, kouř z cigaret, pečené jídlo, uhelné dehty, nafta, asfalt či ropné zbytky [10, 23].



Obr. 7 Strukturní vzorce vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků

#### Toxikinetika

Z hlediska závažnosti se dostává PAH do lidského těla především inhalací kouře, výfukových plynů či cigaretového kouře, kdy se zachycuje do plicních sklípků. Největší množství PAH se však do těla dostane v podobě potravy – smažené a pražené potraviny. PAH může kontaminovat i půdu a vodu a tedy i další zemědělské produkty. Některé přípravky obsahující PAH se používají k léčení kožních onemocnění, u některých pacientů se však objevily nežádoucí účinky, které vedli až k neoplastické proliferaci. PAH jsou velice lipofilní, což jim umožňuje širokou distribuci ve tkáních zvířat i lidí [23].

#### Toxicita a imunotoxicita

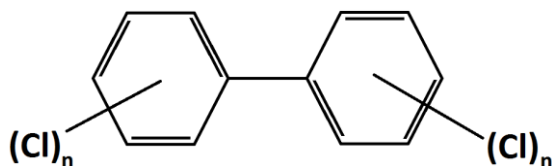
U celé řady PAH byla prokázána na základě pokusů na zvířatech jejich karcinogenost na lidský organismus. Ukázalo se, že nádorovým onemocněním nejsou postiženy oblasti prvního kontaktu s PAH (rakovina dutiny ústní), jako spíše místa dlouhodobého působení. Obecně platí, že PAH jsou lipofilní sloučeniny, které mohou snadno prostoupit buněčnou membránou pomocí pasivní difúze a mohou se metabolizovat ve všech tkáních. Pomocí metabolických enzymů především CYP 450 (cytochrom P 450) je metabolizován do toxických metabolitů, které mohou reagovat a poškodit DNA, což vede k mutaci a indikaci nádoru [24].

## Biomarkery

Jako standardní a široce akceptované biomarkery se staly metabolity obsažené v moči. Konkrétně například 1-hydroxypyren, 1- a 2-hydroxynaftalen, 2- a 3-hydroxyfluoren. Jednou z metod vyšetření těchto biomarkerů může být pomocí chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) [24].

### **3.4 Polychlorované bifenyly (PCBs)**

Polychlorované bifenyly (Obr. 8) se skládají ze dvou spojených benzenových kruhů, ve kterém jeden nebo více atomů vodíku byly nahrazeny atomy chloru. Jedná se o lipofilní látky s výraznou chronickou toxicitou. Díky jedinečným chemickým vlastnostem (tepelná stabilita, odolnost vůči kyselinám a zásadám, nízká rozpustnost ve vodě) byly PCB masově vyráběny v 30. až 70. letech minulého století. Využití našly především jako chladicí kapaliny, maziva v transformátorech, zářivky a jako součást barev, tmelů, těsnění apod. Široká škála aplikací měla za následek uvolnění do životního prostředí a jeho vlastnosti potom zamezují jakýmkoliv degradací látky. I dnes PCB neúmyslně vznikají jako vedlejší produkt při výrobě barev a barviv [25, 26].



Obr. 8 Strukturální vzorec polychlorovaných bifenyly (PCBs)

## Toxikinetika

Nejvíce PCB je do lidského těla přijímáno v podobě potravin, tyto PCB mají tendenci být velice chlorované, a proto mají menší sklony k tvorbě metabolitů. Oproti tomu městský vzduch a ovzduší v budovách, které byly postaveny za použití PCB, obsahuje PCB s méně atomy chlóru a jsou často označovány jako nestálé či přechodné. K expozici také dochází při kontaktu s kůží [25].

## Toxicita a imunotoxicita

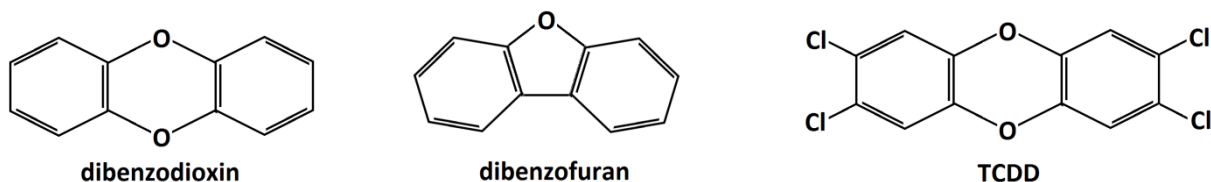
Akutní toxicita PCB je nízká, spočívá především v podráždění očí, potíže s dýcháním. Při kontaktu s kůží může způsobit popáleniny. Všeobecně pak přispívá k příznakům dlouhodobé toxicity. Od roku 2013 je PCB považován jako lidský karcinogen a je často spojován s rakovinou tlustého střeva. Při dlouhodobé expozici PCB dochází k vývoji neurotoxicity, poruchy imunitního systému a změnám hladiny hormonů štítné žlázy. Z imunotoxického hlediska byla zjištěna zvýšená náchylnost k infekcím a snížená protilátková odpověď na očkování.

Metabolity PCB vznikají především v játrech, některé z nich mají dokonce detoxikační účinky. Vzhledem k tomu, že PCB je velice lipofilní látka odolná proti biotransformacím, má tendenci vnikat do tukových tkání nebo plazmy. Některé PCB a jejich metabolity jsou přímo dioxiny (toxická látka popsána níže). Podrobný metabolismus PCB však není dosud detailně znám [25, 26].

### 3.5 Dioxiny

Dioxiny (Obr. 9) tvoří skupiny polyhalogenovaných aromatických uhlovodíků, které jsou významné kontaminanty životního prostředí a znečišťující látky. Tato strukturálně různorodá skupina obsahuje polychlorované dibenzodioxiny (PCDD), polychlorované dibenzofurany (PCDF) a některé polychlorované bifenyly (PCB). Dioxiny jsou seskupeny především kvůli jejich podobným fyzikálním a chemickým vlastnostem a jejich schopnosti vyvolat srovnatelné toxikologické reakce, většina dioxinů je tvořena dvěma benzenovými jádry spojené dvěma atomy kyslíku.

Za nejvíce toxický a prostudovaný je považován 2,3,7,8 -tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), který vzniká spalováním odpadů (především chlorovaných plastů), uhlí, ropy a dřeva, je obsažen ve výfukových plynech a také jako kontaminant v chlorovaných pesticidech. Obdobně jako PCB jsou nerozpustné ve vodě, výborně rozpustné v rozpouštědlech (benzín, toluen, tuky) a je velice odolný proti degradaci [27].



Obr. 9 Strukturální vzorce vybraných dioxinů

#### Toxikinetika

Dioxiny se při svém vzniku dostávají do ovzduší a půdy, poté do zemědělských a průmyslových produktů. Více než 90 % expozice dioxinů je z potravin, zbytek z vdechování, kontaktu s kůží a vodních zdrojů. Vzhledem k tomu že jsou dioxiny dobře rozpustné v tucích, jsou zvláště postiženy živočišné produkty jako maso, mléko, vejce, ryby atd. [26].

## Toxicita a imunotoxicita

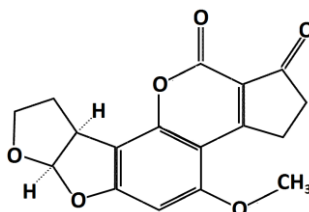
Důsledkem akutní expozice TCDD jsou letargie, zvýšení triglyceridů, chlorakné, bolest hlavy, neuropatie, respirační obtíže, hyperplazie a kachexie. Z hlediska toxicity se řadí mezi kategorie karcinogenů, *in vitro* mutagenů, *in vivo* mutagenů a teratogenů. Chronické příznaky jsou letargie, ztráta chuti, hubnutí, léze ledvin, léze jater, malignity střeva a zvýšení rizik pro vznik sarcomu (zhoubný nádor pojivové tkáně), častější výskyt myelomu, non-Hodgkinsova lymfomu, leukemie a dalších typů rakoviny. Přitom akutní toxicita TCDD je vysoká (u krys je LD 50 pouze 20 µg/kg). V minulosti došlo k několika haváriím, kdy došlo k zamoření ovzduší dioxiny a otravě lidí, kteří si odnesli doživotní zdravotní následky. Podle některých zdrojů je TCDD nejsilnější známý karcinogen. Více zdrojů uvádí, že toxicita látky spočívá ve sloučenině samotné, nikoli v metabolitech [27, 28].

## 3.6 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické metabolity hub a plísní, které mají širokou škálu struktur a toxických účinků na lidi a zvířata. Toxikogenní houby a plísně mohou za vhodných podmínek růst na požitelných potravinách a tím dochází k jejich kontaminaci. Přitom vznik mykotoxinů není dosud objasněn, nejvíce diskutovaná je teorie jako součást přirozené obrany rostlin proti cizorodým látkám – tím že změní jejich strukturu. Z hlediska imunotoxicity jsou nejzávažnější aflatoxiny, ochratoxiny, patulin a trichoteceny. Většinou jsou mykotoxiny snadno odhalitelné pomocí analýz založených na plynové chromatografii (HPLC) [10, 29, 30].

### 3.6.1 Aflatoxiny

Nejčastějším zdrojem aflatoxinu jsou plesnivé potraviny, především ořechy, obilniny a olejninny. Nejznámější a nejvíce genotoxický a karcinogenní je aflatoxin B1 (Obr. 10), který je generován jako sekundární metabolit především na houbách *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus flavus*. Toxikant napadá především játra, kde je metabolizován na epoxidy, které mají silnou tendenci se vázat na DNA a RNA. Nemoc způsobená zamořením organismu aflatoxinem se nazývá „aflatoxicosis“ a způsobuje hepatotoxicitu až rakovinu jater s příznaky podobné anorexii, malátnosti a horečky [10, 29, 31].



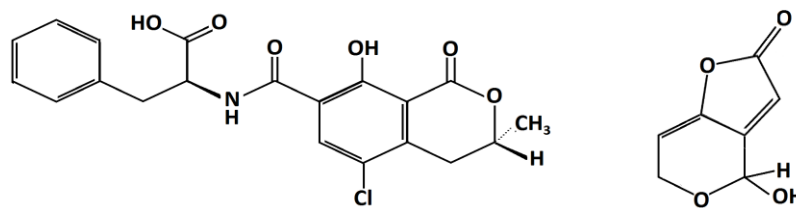
Obr. 10 Strukturální vzorec aflatoxinu B1

### 3.6.2 Ochratoxiny

Ochratoxiny se vyskytují v potravinových komoditách jako jsou fazole, kukuřice, obiloviny, víno, zelená kávová zrna. Jedná se o sekundární metabolity hub *Aspergillus* a *Penicillium*, jejichž nejzávažnějším zástupcem je ochratoxin A (OTA, Obr. 11 vlevo). Tento mykotoxin je karcinogenní a nefrotoxický. Přítomnost OTA v organismu vyvolává vznik DNA aduktů a chromozomálních aberací a může způsobit nádory ledvin. OTA ve vyšších dávkách může mít embryotoxické, teratogenní a imunotoxické účinky [32].

### 3.6.3 Patulin

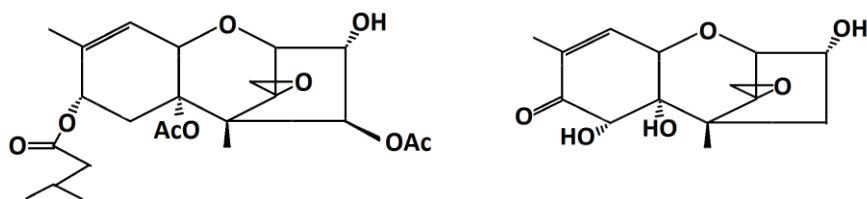
Patulin (Obr. 11) je sekundárním metabolitem především *Penicillium expansum*, který je zodpovědný za rozklad jádrového ovoce (jablka, hrušky). Jedná se o regulovaný mykotoxin v potravinách vyráběných z ovoce, jako jsou šťávy, nápoje, potraviny pro kojence apod. Ačkoli jeho karcinogenita nebyla prokázána, ukázalo se, že má silné účinky na imunitní systém. Ty zahrnují potlačení funkcí makrofágů, zvýšený počet slezinných T-lymfocytů a neurofilů [30].



Obr. 11 Strukturální vzorec Ochratoxinu A (vlevo) a Patulinu (vpravo)

### 3.6.4 Trichoteceny

Z celkového počtu více než 200 známých trichotecenů jsou toxicky nejzávažnější a nejvíce studované T-2 toxin a deoxynivalenon (DON, Obr. 12 vpravo). Tyto mykotoxiny jsou produkovány především rostlinným patogenem *Fusarium graminearum*, které způsobují strupovitost obilovin a v minulosti měly na svědomí těžké hospodářské ztráty. Na organismus působí jako inhibitory translace, které se zaměřují na *peptidyl-transferázy* a způsobují inhibici DNA, RNA syntézy, dělení buněk, membránové struktury, mitochondriální funkce a způsobují pokles T – lymfocytů. Aktivita trichotecenů zvyšuje hladiny oxidativního stresu, což zapříčiňuje vznik volných radikálů. Tyto mykotoxiny tedy mají efekt především na buněčnou imunitu. Mezi příznaky patří imunologické problémy, zvracení, dermatitida a hemoragické léze [33, 34].



Obr. 12 Strukturální vzorec T-2 toxinu (vlevo) a DON (vpravo)

### 3.7 Těžké kovy

Těžké kovy jsou skupinou prvků definované jako stopové chemické prvky určitých vlastností, které jsou ve vyšších koncentracích toxické (některé jsou jedovaté již při nízkých koncentracích, například olovo a rtuť). Anorganické formy většiny kovů mají tendenci se silně vázat k proteinům a dalším biologickým tkáním v závislosti na struktuře a aktuální formě kovu. Například olovo se akumuluje v kostních tkáních, kadmium a rtuť se hromadí v ledvinách. Kostní dřevina a ledviny jsou pak nejvíce postiženy při vysokých koncentracích kovu. Nejvíce kovů se do lidského organismu dostává inhalací (závisí na formě a vlastnostech kovu). Dále absorpce s potravou, kde je kov ovlivněn hodnotou pH, rychlostí pohybu traktem a přítomností jiných látek. Existuje celá řada toxických těžkých kovů, z hlediska imunotoxicity jsou to potom detailněji popsány níže [10].

#### 3.7.1 Olovo

Olovo je těžký toxický kov stále používaný pro svoji kujnost a tavnost (pájení), dále potom pro svoje využití v lékařství jako pohlcovače rentgenového záření. Dříve se hojně používal pro výrobu vodovodních potrubí nebo olovnatého benzínu, pro svoje toxické účinky se však přestal v těchto směrech používat. Olovo má tendenci se rychle dostat do kostních tkání, kde se shromažďuje. Dále se shromažďuje v nižším množství v ledvinách a játrech. Nejdůležitějším biochemickým efektem olova je inhibice syntézy hemoglobinu. Projevy otravy olovem se vyznačují snížením životnosti erytrocytů vedoucí k anémii. Poškození centrálního nervového systému se projevuje podrážděností, únavou až ztrátou paměti, dále ataxií, bolestí hlavy a třesem svalů. V extrémních případech může vyvolat konvulze vedoucí ke kómatu a následnému úmrtí. Z imunotoxického hlediska snižuje celkové hladiny imunoglobulinů a aktivitu komplementu. Z hlediska karcinogenity je klasifikován jako potenciální karcinogen pro člověka [10, 35].

#### 3.7.2 Arzen

Je toxický polokovový prvek, nejčastěji vyskytující se ve sloučeninách jako  $As_2O_3$  (arsenik),  $AsH_3$  (arsenvodík),  $AsCl_3$  apod. Jeho využití v dnešní době je především v metalurgickém a polovodičovém průmyslu. Je přirozenou součástí půdy a můžeme

ho nalézt v potravinách, především v mořských rybách. Arzen se do lidského organismu dostává především v podobě kontaminované pitné vody, dále inhalací a příjmem potravy. Arzen je známý karcinogen spojovaný s rakovinou kůže, plic, močového měchýře, ledvin a jater. Dále má prokazatelné účinky na imunitní systém, kardiovaskulární systém, endokrinní a respirační systém. Zvyšuje závažnost infekcí a incidenci nádorů, způsobuje inhibici NK buněk a Tc-lymfocytů [10, 36]

### **3.7.3 Rtut'**

Rtut' je těžký toxický kov, často se vyskytující v různých formách v přírodě. Lidé jsou chronicky exponováni především konzumací ryb nebo ze zubního amalgámu. Toxicita je dána především formou rtuti. Zatímco inhalovaná rtuť se hromadí především v mozku, kde poškozuje centrální nervový systém, čímž způsobují třes, emocionální nestabilita, podezíravost, nespavost, deprese a podrážděnost. Rtutnaté soli mají tendenci poškozovat střevní sliznice a ledviny, kde způsobují renální tubulární nekrózu a autoimunní glomerulonefritidy. Imunitní dysfunkce způsobená rtutí se pak projevuje jako hypersensitivní reakce na vystavení účinkům rtuti (astma, dermatitida). Snižuje množství NK buněk a lymfocytů [10, 36].

### **3.7.4 Beryllium**

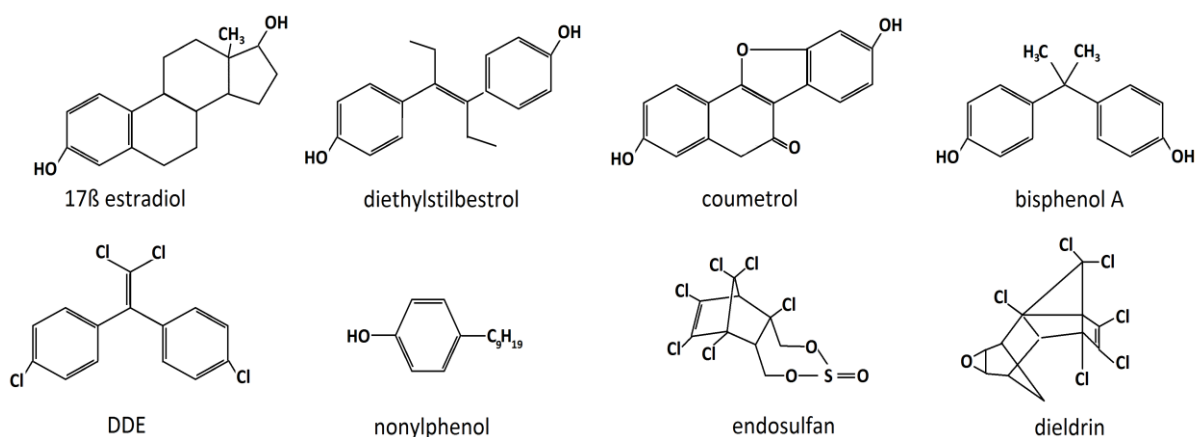
Jedná se o kov se širokým průmyslovým využitím. V přírodě je přítomen v horninách, uhlí, ropě a půdě. Beryllium se těží ve formě rudy – berylu. Primárně se do lidského těla dostává inhalací do plic cigaretovým kouřem a plyny ve kterých je beryllium vázáno. Váže se především na dlouhou dobu v játrech, slezině a kostech. Akutní expozice beryllia je spojována s vyšší mírou rakoviny plic než u chronické beryliózy – onemocnění plic vlivem inhalace beryllia. Z imunitního hlediska beryllium způsobuje hypersensitivitu vyvolávající hromadění leukocytů kolem ložisek beryllia a vzniku granulomů [37].

## **3.8 Xenoestrogeny**

Estrogeny jsou obecně chápány jako skupina steroidních hormonů podílejících se na vývoji sekundárních pohlavních znaků, především u žen. Nefyziologické estrogeny, kam patří fytoestrogeny, mykoestrogeny (produkty rostlin a plísní, viz. Mykotoxiny) a především xenoestrogeny (syntetický původ aktivitami člověka), mohou obdobně hormonálně ovlivnit vývoj člověka [38, 39].

## Toxikinetika

Spektrum expozice xenoestrogeny je široké. Xenoestrogeny jsou dnes součástí běžného jídla a pití, které jsou baleny v plastových nádobách vyrobených z xenoestrogenů (například bisfenol A). Pitná voda, která vzniká v čističkách odpadních vod, je také hojná na xenoestrogeny. Dalším zdrojem xenoestrogenů, jako je nonylfenol, jsou organické vedlejší produkty chemického průmyslu, které jsou schopné dlouho zůstat v životním prostředí a ohrozit tak expozicí i volně žijící zvířata. V neposlední řadě se toto xenobiotikum využívá v řadě léčiv, především v antikoncepci, výrobě pesticidů (zejména již dnes zakázaný DDT), herbicidů, fungicidů apod. Xenoestrogeny i přes svoji rozmanitost (Obr. 13) mají společné to, že jsou lipofilní a dobře pronikají buněčnými strukturami, což jim umožňuje širokou distribuci v tkáních [39, 40].



Obr. 13 Strukturální vzorce vybraných různorodých xenoestrogenů

## Toxicita a imunotoxicita

Toxické účinky xenoestrogenů jsou především spojovány biologickými reakcemi, které mění mužskou a ženskou fyziologii. Jsou často spojovány s obezitou, neplodností, ale i různými nádorovými onemocněními, především hormonálně vyvíjených orgánů (rakovina prsou, vaječníků, prostaty apod.). Z imunotoxického hlediska mají estrogény obecně zásadní vliv na funkci imunitního systému, a to především jejich vlivem na imunitní receptor. Mají výrazný vliv na vznik alergií (především astmatu), mají schopnost vlivem aktivací estrogenních receptorů zasahovat do prezentace antigenů, do polarizace Th lymfocytů, do tvorby IgE a do degranulace žírných buněk. Především pak ovlivňování T lymfocytů může dojít k rozvoji autoimunity. S ohledem na astma je dále podezření vlivu xenobiotik na změny týkajících se změn mechaniky plic, což by zhoršilo i průběh alergických reakcí, tyto účinky xenoestrogenů však nejsou doposud zcela objasněny [40, 41].



### **3.9 UV-B záření**

Jedná se o druh ultrafialového záření se smíšenými účinky na lidský organismus, které vytváří slunce. Většina je pohlcena ozónové vrstvě. Jedná se o „úplný karcinogen“, tedy o mutagen, karcinogen a spouštěč nádoru. UV-B záření však lidskému organismu prospívá přirozenou distribucí vitamínů D a endorfinů v kůži. Nadměrné vystavení UV-B záření však způsobuje atrofii, pigmentové změny a zhoubné bujení. Epidemiologicky je UV-B záření spojováno s třemi nejčastějšími typy rakoviny kůže. Imunologicky UV-B vyvolává řadu imunitních poruch jako lokální a systémovou imunosupresi a kontaktní fotoalergii [42].

## 4. Mechanismy účinků jednotlivých imunotoxikantů

### 4.1 Benzen

Účinky benzenu na lidský organismus se projevují vznikem akutních i chronických onemocnění, které postihují i několik lidských tkání a orgánů. Akutní a chronické expozice benzenu mají za následek poškození centrálního nervového systému, reprodukčního a vývojového systému, imunitního a respiračního systému. Dále je dokázáno, že benzen může vyvolat hematologické onemocnění jako je akutní myeloidní leukémie, akutní chronická lymfatická leukémie a aplastická anémie.

Po vdechnutí se benzen z plic vstřebává do krve a následně je metabolizován v játrech na řadu fenolů a jejich konjugátů. Spojením několika vzájemně shodných metabolitů a následnou aktivací pomocí peroxidázy vznikají reaktivní produkty, jako je například hydrochinon a benzochinon.

Hydrochinon a benzochinon inhibují uvolňování mediátorů, syntézu leukotrienů a produkci cytokinů v lidských bazofílech stimulovaných IgE a non-IgE. Hydrochinon a benzochinon dále inhibuje degranulaci žírných buněk zprostředkované IgE. Tyto inhibiční účinky jsou primárně zprostředkované interferencí s kinázami.

Reaktivní produkty benzenu mohou vést i ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS), které následně poškozují strukturu DNA (štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce), lipidů a proteinů. ROS mohou také ovlivnit kinázy, signální dráhy a nukleární faktory, které jsou zapojeny do regulace buněčné proliferace a apoptózy.

V mnohých studiích bylo potvrzeno, že nadměrný vznik ROS nebo zánětlivých cytokinů může vyvolat chromozomální aberace a karcinogenezi. ROS dále podporuje tvorbu DNA zlomů a výměnu sesterských chromatid [11, 43].

Benzen působí také přímo v plicích, do kterých se primárně dostává po vdechnutí. Benzen a jeho metabolity ovlivňují imunitní odpovědi žírných buněk a bazofilů, a to buď přímo, a nebo tak, že se navážou na jiné buňky, jako jsou například T- lymfocyty, makrofágy a monocyty. Studie *in vitro* a *in vivo* potvrzují, že metabolity benzenu jsou schopny měnit biochemické a funkční schopnosti imunokompetentních buněk a tím negativně ovlivňují imunitní odpověď v plicích. Podle posledních studií je dokázáno, že metabolity benzenu jsou schopny různými mechanismy zasahovat do funkcí bazofilů a žírných buněk a ovlivňovat tak přirozenou imunitu při chronických zánětech v plicích [44].

## 4.2 Azbest

Azbest zvyšuje riziko vzniku celé řady plicních onemocnění například rakoviny plic. Nejčastějším plicním onemocněním vyvolaným působením azbestu je azbestóza.

Azbest ovlivňuje nespecifickou i specifickou imunitu.

### Nespecifická imunita

Po odebrání periferní krve u osob vystavených expozici azbestu, bylo zjištěno, že azbest významně snižuje schopnost NK (natural killers) buněk ničit rakovinou tvorné buňky. NK buňky, patřící do nespecifické imunity jsou schopny rychle lyzovat nádorové buňky a jsou považovány za buňky patřící do první obranné linie proti rakovinou tvorným buňkám. Jejich pokles způsobený účinky azbestu může vést ke vzniku rakoviny plic [45].

Hlavní roli v azbestem vyvolaných chronických zánětech a plicních fibrózách hrají alveolární makrofágy (AM). AM tvoří první obrannou linii v alveolární části plic, která zahrnuje fagocytózu, odstranění vdechnutých vláken a spouštění místních imunologických procesů. Aktivace AM je typická po expozici azbestu. Aktivované AM produkují prozánětlivé mediátory a růstové faktory, které vedou k tvorbě zánětlivých a fibrotických procesů v plicích. Mnoho pokusů dokazuje, že aktivované AM vylučují zánětlivé cytokiny, chemokiny a růstové faktory, které se účastní autokrinní a parakrinní stimulace plicních a krevních buněk. Bylo prokázáno, že plicní makrofágy jsou zapojeny do přestavby tkání v plicích. Účinkem AM je uvolňování velké množství fibronektinu, který je silně chemotaktický pro plicní fibroblasty.

Jedním z mediátorů, vylučovaných AM, je TNF- $\alpha$ , který hraje významnou roli při vzniku fibrózy plic. TNF- $\alpha$  vyvolává řadu reakcí spojených s azbestózou, včetně proliferace fibroblastů, stimulace extracelulárních matricových proteinů a produkci chemokinů.

Působením cytokinů, produkovaných AM dochází k nahromadění neutrofilů v plicích. Zvýšené množství neutrofilů v plicích je častým nálezem u osob vystavených účinkům azbestu. Neutrofilové produkují reaktivní formy kyslíku a proteolytické enzymy, které poškozují plicní tkáň [45, 46]

### Specifická imunita

U osob vystavených účinkům azbestu dochází ke zvýšené produkci imunoglobulinů (IgA, IgG, IgM, IgE) a protilátek v séru (antinukleární protilátky, revmatoidní faktor). V řadě pokusů byla zjištěna zvýšená hladina B- lymfocytů [45].

## **4.3 Těžké kovy**

### **4.3.1 Olovo**

Mechanismy odpovědné za imunotoxicitu nebyly doposud plně objasněny. Je však dokázáno, že olovo vyvolává destrukci buněčné membrány lidských lymfocytů a monocytů [47].

Olovo inhibuje produkci oxidu dusnatého, což vede ke zvýšení sekrece TNF- $\alpha$ . Olovo dále aktivuje T-1 lymfocyty což vyvolává nerovnováhu mezi pomocnými Th 1 lymfocyty a pomocnými Th 2 lymfocyty. Tato nerovnováha způsobuje změnu v imunitních odpovědích, což následně zapříčiňuje zvýšenou náchylnost jedince k různým chorobám [48].

### **4.3.2 Arzen**

V životním prostředí se vyskytuje arzen ve formě arzenitanu nebo arzeničnanu. Arzeničnan je v lidském těle metabolizován z arzeničnanu na arzenitan a následně podléhá methyloaci. Methyloací arzenitanu vzniká mono- a di-methylovaný arzenitan. Monomethylovaný arzenitan je nejjedovatější forma arzenitanu a po požití arzeny, je tato forma vylučována močí. Vylučování mono-methylovaného arzenitanu močí zvyšuje riziko vzniku nádorů ve vylučovacím ústrojí.

Mechanismy vzniku nádorů zahrnují oxidativní stres, inhibici oprav DNA, chromozomální aberace, tvorbu mikrojader, indukci apoptózy, epigenetické modifikace vedoucí k aberantní expresi genů a schopnost změnit fenotyp populací kmenových buněk [49].

### **4.3.3 Rtuť**

Rtuť je významný imunotoxikant. U rtuti byl zejména prokázán vliv na vznik autoimunitního onemocnění, známého jako lupus erythematoses. Pravděpodobnost vzniku autoimunitního onemocnění vyvolaného působením rtuti zvyšuje genetická predispozice, infekce nebo zvýšená zátěž antigeny [50].

Působením rtuti v organismu dochází k hyperimmunoglobulinémii a produkci autoprotilátek. Díky tomu následně dochází ke vzniku imunokomplexů, což může vést ke vzniku glomerulonefritidy [51].

### **4.3.4 Beryllium**

Dlouhodobější působení beryllia na lidský organismus může vést ke vzniku zánětu plic. Pokud je vystavování se účinkům beryllia dlouhodobější, dochází k uvolnění beryllium specifických CD4+ T-lymfocytů do periferní krve. Tyto CD4+ T-lymfocyty

se následně hromadí v plicích a vznikají zde granulomy (zánětlivé shluky). V granulomech je navázáno beryllium a to je následně endocytováno makrofágy. Na makrofágy působí ROS (reaktivní forma kyslíku) a ty posléze podléhají apoptóze. Apoptózané makrofágy jsou endocytovány dalšími makrofágy. Apoptózané zbytky makrofágů obsahující beryllium podporují aktivaci dalších specifických CD4 + T-lymfocytů. Tyto aktivované T-lymfocyty proliferují a uvolňují prozánětlivé cytokiny. Po uvolnění prozánětlivých cytokinů dochází k uvolnění beryllium-specifických paměťových buněk CD4 + T buněk z krve do granulomu. Tento děj se neustále opakuje a tímto je zapříčiněn vznik chronického zánětu [52].

#### **4.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)**

Znečištění ovzduší, včetně znečištění polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH), může přispívat ke zvýšenému výskytu astmatu. PAH jsou schopny navázat se na aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). Navázání polycyklického aromatického uhlovodíku na AhR vede ke vzniku IL-17 a IL-22, které umožňují neutrofilům proniknout do dýchacích cest a proliferovat do buněk hladkého svalstva a následně remodelovat tkáň. Zvýšená produkce IL-17 a IL-22 jsou spojeny se vznikem astmatu.

#### **4.5 Polychlorované bifenyly (PCB)**

Imunotoxicita polychlorovaných bifenyly je zprostředkována aktivací aryl uhlovodíkového receptoru (AhR), na který se PCB váží. Aroclor 1254, jedna z nejvíce používaných směsí PCB, zvyšuje fragmentaci DNA ve slezinných buňkách, což naznačuje, že apoptóza je v korelaci s poruchou imunitního systému. Aroclor 1254 indukuje fragmentaci DNA bez aktivace AhR a apoptóza je ovlivněna alfa-naphtoflavonem, známým antagonistou AhR [53].

#### **4.6 Dioxiny**

U TCDD byly studovány jeho proměnlivé účinky, které mají estrogení a antagonistickou aktivitu. Je rovněž prokázáno, že dioxiny jsou schopny modulace proteinů buněčného cyklu, indukci involuce brzlíku a modulovat expresi cytokinů.

Dioxiny mají imunosupresivní účinky. Po vystavení účinkům dioxinů dochází ke snížení počtu T-lymfocytů a cytokinů, včetně IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 a IL-10. Kromě toho klesá i hladina protilátek IgG a IgM [54, 55].

## 4.7 Mykotoxiny

AFB1 (aflatoxin B1) je metabolizován hlavně v játrech pomocí CYP 450. Metabolizaci AFB1 vzniká epoxid, který je schopen se vázat na DNA za vzniku 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy AFB1 (AFB1-N7-Gua) aduktu. Působením AFB1-N7-Gua dochází k transverzi G(guaninu) na T(thymin) což vede k mutacím a karcinogenezi [56].

Mechanismus účinku ochratoxinu (OTA) je složitý a doposud není zcela objasněn. Působením ochratoxinu dochází k inhibici syntézy proteinů, indukci oxidačního stresu, tvorbě aduktu DNA, apoptóze či nekróze a zastavení buněčného cyklu [57].

Oxidační stres a apoptóza podporované působením ochratoxinu A způsobují renální toxicitu [58].

## 4.8 Xenoestrogeny

Xenoestrogeny, zejména ethinylestradiol, mohou přispět k sexuální dichotomii imunitních reakcí a k rozvoji autoimunitních onemocnění, a to zejména u žen. Příkladem autoimunitních onemocnění u žen je například systémový lupus erythematoses (SLE) nebo revmatoidní artritida [59].

Mechanismus účinků xenoestrogenů spočívá v tom, že xenoestrogeny jsou schopny se navázat na estrogenové receptory (ER), a tento receptor aktivují nebo blokují. K dnešnímu dni byly nalezeny dva estrogenové receptory ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Oba tyto receptory patří mezi steroidní receptory a jsou schopny regulovat genovou expresi [60].

Po navázání xenoestrogenu na ER v jádře buňky, dochází k aktivaci ER a změně exprese genu. Po aktivaci ER se začínou uvolňovat kinázy a fosfatázy, které jsou schopny způsobit modifikace různých proteinů.

Na ER se nevážou jen xenoestrogeny, ale i fytoestrogeny (například kumestrol). Fytoestrogeny mají dokonce 100-1000x vyšší afinitu k ER než 17- $\beta$ -estradiol. Vazby fytoestrogenu s ER $\beta$  mohou zapříčinit vznik rakoviny prsu nebo snížení produkce hormonů brzlíku [61, 62].

## 4.9 UV-B záření

U UV-B záření byla prokázána imunosupresivní aktivita. UV-B záření primárně působí na brzlík, kde negativně působí na T- lymfocyty, které v brzlíku dozrávají a diferencují se zde. UV-B záření je tedy schopné měnit T- buněčné imunitní reakce prostřednictvím různých cest, například pomocí cytokinů (například TNF- $\alpha$ ) a rozpustných mediátorů.

UV-B záření negativně působí i na Epidermální Langerhansovy ostrůvky. Působením UV-B záření na Langerhansovy ostrůvky dochází ke snížení aktivity prezentujícího antigenu a jeho schopnosti stimulovat T1 typ imunity.

Účinkům UV-B záření podléhají i keratinocyty umístěné v kůži. Při působením UV-B záření na keratinocyty, začnou keratinocyty produkovat a uvolňovat četné rozpustné a imunosupresivní mediátory. Díky těmto účinkům UV-B záření dochází ke snížení lokální imunity proti nádorům, potlačení imunitního systému a předčasnému stárnutí pokožky [63, 64].

## 5. Stanovení imunotoxicity

Imunotoxikologie vychází z platnosti Bertrandova zákona, který definuje u „toxických“ látek jejich negativní efekt na organismus v již nízkých koncentracích, zatímco „netoxické“ látky mohou mít škodlivý vliv pouze ve vysokých koncentracích. Tyto postuláty jsou založeny na experimentálních pracích, které byly prováděny na zvířatech. Při sledování osob, které byly vystaveny působení xenobiotik, však bylo zjištěno, že není možné závěry imunotoxikologických studií převádět na člověka v celém rozsahu získaných reakcí [65].

Jednou z možností stanovení imunotoxicity látek jsou epidemiologické studie. Jejich výhodou je vysoká informační hodnota, avšak jsou velmi nákladné a jejich nevýhoda spočívá ve velké přirozené variabilitě. Imunotoxicita byla epidemiologicky stanovena pouze pro několik málo látek např. dioxiny a polychlorované bifenyly, azbest, olovo a některé pesticidy.

Častěji se imunotoxicita stanovuje pomocí laboratorních studií. Jejich výhodou je nízká variabilita experimentů, studie však mohou probíhat pouze na laboratorních zvířatech [66].

Neexistuje jednoznačné a komplexní nadnárodní doporučení nebo standart pro hodnocení imunitoxicity. Obvykle jsou využívány doporučení od nadnárodních organizací jako je European Medicines Agency (EMA), Food and Drug administration (FDA), National Institute for public Health and the Environment (RIVM).

Nejprve se stanovuje obecná toxicita, a to nejdříve akutní toxicita, při níž se zjišťuje stanovení střední smrtelné dávky LD 50. Poté následuje určení chronické toxicity, při níž se sleduje běžné toxikologické parametry a dále parametry, které by indikovali imunotoxikologické působení.

Pokud standartizované testy indukují imunotoxicitu, provádí se specifické testování imunotoxicity. Testování imunotoxicity má dva stupně.



## 5.1 Stupeň 1

Po aplikaci xenobiotika nejprve hodnotí jeho vliv na obecné a základní vlastnosti imunitního systému.

### 5.1.1 Imunopatologie

#### Kompletní krevní obraz a diferenciální počet bílých krvinek

Především se zjišťuje diferenciální rozpočet leukocytů a lymfocytů a poměr jednotlivých řad. Mohu být stanoveny na základě mikroskopie (počítací komůrka) nebo jednoduchými počítači tzv. cell counter.

#### Hmotnosti lymfoidních orgánů, tělesná hmotnost a teplota

Histopatologie, hrubé a mikroskopické vyšetření sleziny, brzlíku, lymfatických uzlin, Peyerových plátů a kostní dřeně [67].

### 5.1.2 Humorální imunita

#### Celkové bílkoviny v séru, albuminy, globuliny

#### Produkce protilátek IgM, IgG, IgA a IgE

Je hodnoceno množství a třídy protilátek pomocí metody ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, Obr. 14). Stanovení pomocí metody ELISA může být v kompetitivním nebo nekompetitivním uspořádání, podle toho zda reakce antigenu s protilátkou probíhá současně za přítomnosti indikátoru nebo je indikátor přidán až po proběhnutí reakce antigenu s protilátkou.

Principem ELISY je obecně to, že protilátka, případně antigen je navázán na stěny mikrotitrační destičky a destička je poté inkubována. Po inkubaci musí být vymyty nenavázané protilátky (případně antigeny) pomocí promývacího roztoku, a neobsazená místa se zablokují pomocí blokovacího roztoku. Poté je do jamek mikrotitrační destičky přidán vyšetřovaný vzorek. Dojde k reakci mezi antigenem a protilátkou za tvorby imunokomplexu. Poté se destička opět promyje a přidá se konjugát obsahující enzym, který se naváže na imunokomplexy. Nenavázaný konjugát je opět promyt a do destičky je přidán substrát obsahující chromogen. Poté dojde k reakci mezi enzymem, substrátem a chromogenem, při níž je nejčastěji uvolněným kyslíkem oxidován chromogen za vzniku barevné změny.

Intenzitě této barevné změny je přímo úměrné množství specifických protilátek (nebo antigenu). Intenzitu zbarvení změříme pomocí spektrofotometru [68, 69].

## Celková hemolytická aktivita komplementu

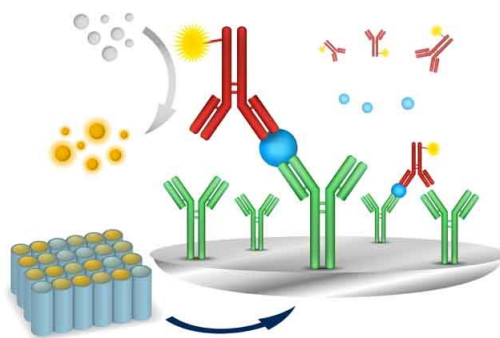
Tato metoda je velmi jednoduchá. Principem je reakce senzibilizovaných erytrocytů s naředěným sérem. Zjišťuje se schopnost komplementu lyzovat erytrocyty. Aktivitě komplementu odpovídá ředění séra, při němž došlo k 50% hemolýze.

## Screening sérových auto-protilátek.

Mezi screeningové metody pro vyšetření sérových autoprotilátek patří například mikroskopické vyšetření nepřímou imunofluorescencí. Tato technologie byla používána vůbec jako první metoda pro odhalení protilátek, důležitých pro diagnostiku autoimunitních onemocnění. Vyšetření se provádí z lidské tkáně (jater, ledvin, žaludku, močového měchýře, slinivky břišní, atd.) a z izolované buňky (karcinomu laryngu, střevních buněk)

Metoda nepřímé imunofluorescence umožňuje detekci širokého spektra protilátek namířených proti buněčným antigenům [70].

Screeningové metody jsou obecně snadné a rychlé na provedení, nejsou finančně náročné a nejsou ani náročné na vybavení laboratoře. Účelem těchto je metod je především určit to, zda je vzorek pozitivní či nikoliv. Tyto metod jsou dostatečně citlivé, avšak nejsou příliš specifické.

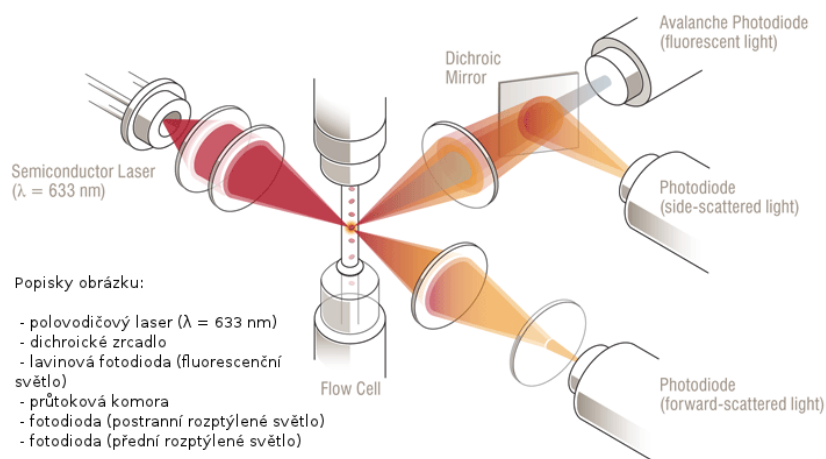


Obr. 14 Princip metody ELISA [71]

### **5.1.3 Buněčná imunita**

#### Jednotlivé typy buněk (B lymfocyty a CD4 + / CD8 + T lymfocyty)

Ke stanovení se používá průtoková cytometrie (Obr. 15). Tato metoda slouží k analýze buněk v suspenzi získaných z mízních uzlin, kostní dřeně nebo sleziny. Buněčná suspenze se před vložením do cytometru označí pomocí monoklonálních protilátek (mAb), na kterých je navázána fluorescenční molekula. Tyto monoklonální protilátky se specificky vážou na povrch nebo uvnitř vyšetřovaných buněk. Takto připravený vzorek se vloží do cytometru.



Obr. 15 Princip průtokové cytometrie [72]

Při stanovení v průtokovém cytometru musí být proud částic přesně umístěn v analyzátoru. To zajišťuje plášť tvořený tekutinou, který vzorek umístí za pomoci čerpadel nebo tlaku v nádrži pláště do průtokové komory. Pomocí diferenčních tlaků je proud vzorku vytvarován do kužele. Samotná analýza je založena na fluorescenci, pomocí níž se přesně stanoví buněčné subpopulace [73].

#### Kvantifikace rezidentních peritoneálních buněk a fagocytární schopnosti

Fagocytární schopnosti vyšetřujeme pomocí testu ingesce a testu oxidačního vzplanutí. Test ingesce je založen na zjišťování, zda je fagocyt schopen pohltnout cizorodý předmět. Jako substráty pro tento test se používají hlavně bakterie nebo kvasinky. Z bakterií nebo kvasinek se vytvoří suspenze, která se poté inkubuje s krví pacienta. Po inkubaci se zhotoví nátěr na sklíčko a pod mikroskopem pozorujeme celkem 100 neutrofilů a zároveň se počítá kolik neutrofilů bylo schopno pohltnout částice.

Tento test se příliš nevyužívá, nemá totiž téměř žádnou výpovědní hodnotu. K výraznému poklesu fagocytózy dochází jen velmi zřídka a to jen u opravdu vážných stavů pacienta [74].

Test oxidačního vzplanutí se hodnotí pomocí chemiluminiscence. Aby byl fagocyt schopen oxidačního vzplanutí, musí být schopný cizí buňku rozpoznat, navázat a pohltnout. Membrána fagolysosomů obsahuje NADPH oxidasu, která katalyzuje kyslík na vysoce toxické látky, jako jsou například superoxid ( $\text{O}^{2-}$ ), chlornan ( $\text{HOCl}$ ), hydroxylové radikály a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tyto látky se poté podílejí a oxidačním vzplanutím.

Tato metoda využívá toho, že všechny uvedené látky působí jako oxidanty, při reakci s luminoforem tedy dojde k jeho oxidaci za vzniku záření, které detekujeme pomocí luminometru. Množství vyzářeného světla je přímo úměrné fagocytóze [75].

## 5.2 Stupeň 2 – komplexní testování

Provádí se, pokud testy z 1. stupně ukazují na možnou imunotoxicitu látky, nebo když je sloučenina určena pro imunologickou aplikaci

### 5.2.1 Humorální odpověď

Kinetické vyhodnocení humorální odpovědi na antigeny, které jsou na T-lymfocytech závislé  
(k testování se využívají například ovčí červené krvinky)

Kinetické vyhodnocení primární humorální odpovědi na antigeny, které jsou na T-nezávislé  
(k testování se využívají například bakteriální polysacharidy)

### 5.2.2 Buněčná imunita

Hypersenzitivita pozdního typu testovaná na ovčích červených krvinkách

Hypersenzitivita pozdního typu je označována jako IV. typ přecitlivělosti. Obecně jsou tyto reakce zprostředkované T lymfocyty a nejčastěji se projevují jako mírné kožní reakce, ale mohou způsobit až multisystémové reakce. Reakce se mohou projevit kdykoliv, 1–2. den od kontaktu s alergenem, ale k reakci může dojít mnohdy i 8 týdnů po kontaktu s alergenem [76].

Smíšená lymfocytová reakce (MLR) [67]

Jedná se o test, který porovnává dvě populace alogenních lymfocytů (od stejného druhu, ale geneticky odlišné. Nejprve se připraví MLC (mixed-lymphocyte cultur) smícháním lymfocytů izolovaných od dvou různých jedinců. Jelikož dva jedinci (s výjimkou jednovaječných dvojčat) nejsou geneticky identičtí, rozdílné histokompatibilní antigeny na povrchu dárce budou aktivovat lymfocyty příjemce a naopak. Výsledkem je aktivace syntézy DNA (měří se na základě inkorporace thymidinu označeného tritiem) a proliferace lymfocytů [66].

Cytotoxicita CTL (cytotoxických T lymfocytů) proti nádorovým alogenním buňkám

Touto metodou vyšetřuje schopnost Tc lymfocytů ničit nádorové buňky. Tato metoda je založená na uvolnění radioaktivního chromu ( $^{51}\text{Cr}$ ) z nádorových buněk. K tomuto uvolnění dojde pouze tehdy, jsou-li cytotoxické T lymfocyty schopné zničit nádorové buňky obsahující radioaktivní Cr. Uvolnění radioaktivního Cr se detekuje pomocí jeho produkce  $\gamma$ -záření.

Ačkoliv je tento test snadno reprodukovatelný a lze relativně snadno provádět, má i několik nevýhod. Má poměrně nízkou hladinu citlivosti, a proto je zapotřebí někdy test provádět opakovaně, dále neposkytuje informace o chování jednotlivých buněk, často také dochází k spontánnímu uvolnění radioaktivního chromu z cílových buněk. [77].

## 6. Diskuze

Imunotoxikologie je poměrně nová vědní disciplína, která však přinesla mnoho důležitých poznatků o působení xenobiotik na imunitní systém. Byly objasněny základní mechanismy účinků xenobiotik na imunitní systém. U řady imunotoxikantů bylo prokázáno, že mohou závažně poškodit lidské zdraví. Imunotoxicita některých látek byla objevena, až řadu let od začátku jejich používání. Proto je velmi důležité sledování imunotoxického účinku látek, aby se předcházelo negativnímu dopadu působení těchto látek na imunitní systém.

Jednou z možností sledování působení xenobiotik na lidský imunitní systém jsou epidemiologické studie. Sledují lidské jedince v jejich přirozeném prostředí, kde jsou vystaveni působení vnějších vlivů (strava, fyzikální, chemičtí a biologičtí činitelé) [78].

Epidemiologické studie jsou vhodné pro určování akutní i chronické imunotoxicity. Jejich nevýhoda však spočívá v obtížné průkaznosti kauzality a nemožnosti vyloučení dalších faktorů, které mohou zkreslovat výsledek, a také jejich vysoká finanční a časová náročnost. Proto byla prokázána imunotoxicita pomocí epidemiologických studií jen u několika málo látek (azbest, olovo, dioxiny) [79].

Imunotoxicita je po řadu let testována především na zvířatech. Tyto *in vivo* metody se staly hlavním zdrojem imunotoxikologických dat. Testování na zvířatech má však řadu nevýhod. Při laboratorních pokusech jsou homogenní skupiny zvířat obvykle vystaveny vysokým dávkám testované látky za účelem sledování jejich nepříznivých vlivů na biologickou odpověď. Na rozdíl od heterogenní lidské populace, která je dlouhodobě vystavena nízkým dávkám polutantů [80].

Právě mezidruhová variabilita a odlišné fyziologické a biochemické procesy zvířat a lidí komplikují extrapolaci výsledků získaných testováním na zvířatech na člověka. Nevýhodou *in vivo* studií je rovněž možnost hodnocení pouze konečného výsledku expozice xenobiotikům, bez poznání mechanismu působení. Studie prováděné na zvířatech jsou poměrně finančně i časově [81].

S objevením *in vitro* metod byly rozšířeny možnosti testování v toxikologii. Tyto testy jsou prováděny na mnohobuněčných kulturách a umožňují studovat základní procesy, které řídí odpověď buňky na toxikant. Použití těchto metod při zjišťování imunotoxicity by pomohlo objasnit mechanismy imunotoxických účinků xenobiotik a umožnilo snížit množství testů prováděných na zvířatech.

Nyní se nejvíce využívají modely *in vitro*. Výhodou těchto testů z etického hlediska je, že nejsou prováděny na zvířatech a také nedochází ke komplikacím při extrapolaci výsledků pozorovaných na zvířeti na člověka.

Modely *in vitro* jsou tvořeny lidskými nebo zvířecími primárními buňkami a permanentní buněčnou linií, přičemž primární buňky mají několik nevýhod a to především omezenou délku života, dále také dochází ke vzniku heterogenních populací, jejich diferenciaci a důsledkem toho je ztráta fenotypu.

Nevýhodou těchto testů je především to, že testy nemusí být vždy relevantní, především kvůli tomu, že buněčné linie mají vysokou variabilitu růstu, dále mají také abnormální genotyp a fenotyp, což může zapříčinit odlišné fyziologické reakce.

Testy prováděné na buněčných liniích jsou v současnosti náročné na provedení, avšak pokrok v oblasti biologie kmenových buněk v posledních letech naznačuje, že lidské kmenové buňky (embryonální, dospělé i indukované pluripotentní) by mohly najít uplatnění při testování imunotoxicity [81].

## 7. Závěr

Předložená bakalářská práce, se zabývá toxickým působením látek na imunitní systém, jednotlivými metodami, jimiž lze imunotoxicitu stanovit, a předkládá přehled nejznámějších chemických a fyzikálních imunotoxikantů.

Přestože je imunotoxikologie poměrně nová vědní disciplína, její význam je nesporný. V řadě studií byl prokázán závažný negativní účinek různých xenobiotik na imunitní systém. Imunotoxicita byla u některých látek objevena až po dlouhé době od začátku jejich používání, a mezitím poškodily zdraví množství lidí. Proto je důležité u nově zaváděných látek imunotoxicitu sledovat, aby se předešlo negativním dopadům na lidské zdraví.

Jednou z možností určování imunotoxicity jsou epidemiologické studie, které jsou však málo využívány, kvůli jejich ekonomické a časové náročnosti. V současnosti se imunotoxicita stanovuje především pomocí testů na zvířatech. Tyto metody však mají také řadu nevýhod, například obtížnou extrapolaci získaných dat na člověka, finanční náročnost a v neposlední řadě také etickou stránku. V dnešní době se přikláníme spíše k testům *in vitro*. Testy *in vitro* jsou prováděny na mnohobuněčných kulturách a umožňují sledovat a objasnit mechanismy imunotoxických účinků xenobiotik. Dalším pozitivem testů *in vitro* je to, že jejich výsledky jsou bez problémů převoditelné na člověka. Díky této nové metodě došlo také ke snížení testů prováděných na laboratorních zvířatech. Nevýhodou tohoto testování je, že buňky, které tvoří modely *in vitro*, mají omezenou délku života, také mohou vznikat heterogenních populací. Následkem toho dochází k vysoké varibialitě růstu, ke vzniku abnormálního genotypu a fenotypu, což zapříčiní odlišné fyziologické reakce. Lepší metodou při zjišťování imunotoxicity by mohlo být využití primárních zárodečných a nádorových buněčných linií.

## 8. Seznam použitých zdrojů

- [ 1 ] Descotes, J. „ *Principles and methods of immunotoxicology* “. 3. vydání. Lyon: Elsevier, 2004. 400 s.
- [ 2 ] Koller, L. D. „ *Toxicologic Pathology: Immunotoxicology today* “. 1987, roč. 15, č. 3, s 346-351.
- [ 3 ] Kimber, I. „ *Toxicology and the immune system: a perspective* “. 1991, roč. 10, č. 6, s 445-449.
- [ 4 ] Descotes, J. „ *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* “. 1988. roč. 26, č. 3-4, s 7-8.
- [ 5 ] Descotes, J. „ *Introduction to immunotoxicology.* “ CRC Press, Lyon, 2003, 183 s.
- [ 6 ] Descotes, J. „ *Immunotoxicology of drugs and chemicals: an Experimental and Clinical Approach* “. 1. vydání. Elsevier, 2004. 398 s.
- [ 7 ] Imamura, T., Matsumoto, S., Akahane, M., Kanagawa, Y., Koike, S., Tajima, B., Matsuya, S., Uchi, H., Shibata, S., Furue, M. „ *Cutaneous Symptoms such as Acneform Eruption and Pigmentation Are Closely Associated with Blood Levels of 2,3,4,7,8-Penta-Chlorodibenzofurans in Yusho Patients* “. 2009, roč. 2, č. 1, s 27.
- [ 8 ] Levinson, W. „ *Review of Medical Microbiology and Immunology* “. 13. vydání. San Francisco: McGraw-Hill Education, 2014, 789 s.
- [ 9 ] Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., Wang, G., Zou, W. „ *Cellular and Molecular Immunology: Bone Marrow and the Control of Immunity* “. 2012. roč. 9, č. 1, s 11-19.
- [ 10 ] Manahan, S. E. „ *Toxicological chemistry: a guide to toxic substances in chemistry* “. 1. vydání. Chelsea: Lewis Publisher, 1989, 317 s.
- [ 11 ] Snyder, R., Witz, G., Goldstein, B. D. „ *Environmental Health Perspectives: The toxicology of benzene* “. 1993. roč. 100, s 293-306.
- [ 12 ] Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, V., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., Byun, H. M., Jiang, J., Marinelli, B., Pesatori, A. C., Pier, A., Yang S. „ *Cancer Research: Changes in DNA Methylation Patterns in Subjects Exposed to Low-Dose Benzene* “. 2007, roč. 67, č. 3, s 876 - 880.
- [ 13 ] Štěpánová, D. „ *Toxikologie benzenu.* “ České Budějovice, 2007.



- [ 14 ] Chung, E., Shin, J., Lee, B., Kwon, J., Lee, N., Chung, K., Lee, J., Lee, I., Kang, S., Jang, J. "Characteristics of Occupational Exposure to Benzene during Turnaround in the Petrochemical Industries." *Safety and Health at Work* 1.1 (2010): 51–60. PMC. Web. 25 June 2016.
- [ 15 ] Bechtold, W. E., Willis, J. K., Sun, J. D., Griffith, W. C., Reddy, T. V., *Carcinogenesis: Biological markers of exposure to benzene: S-phenylcysteine in albumin*. 1992, roč. 13, č. 7, s 1217-1220.
- [ 16 ] „Nakládání s odpady obsahující azbest“. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha: QCM, s.r.o., 2006 [cit. 2016-06-19]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/puda/legislativa\\_odpady/odpady\\_azbest.pdf?highlightWords=azbest](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/puda/legislativa_odpady/odpady_azbest.pdf?highlightWords=azbest)
- [ 17 ] Pascolo, L., Gianoncelli, A., Schneider, G., Salomé, M., Schneider, M., Calligaro, C., Rizzardì, C. „Scientific reports: The interaction of asbestos and iron in lung tissue revealed by synchrotron-based scanning X-ray microscopy“. 2013, roč. 3, č. 1123.
- [ 18 ] „Zdravotní rizika spojená s expozicí azbestu: Projekt Inovace výuky chemického a procesního inženýrství a ochrany životního prostředí na FchT Univerzity Pardubice“. CZ.1.07/2.2.00/15.0353. In: [Http://www.mpouzar.net/](http://www.mpouzar.net/) [online]. Pardubice: UPCE [cit. 2016-06-25]. Dostupné z: [www.mpouzar.net/prednasky/asbestos.ppt](http://www.mpouzar.net/prednasky/asbestos.ppt)
- [ 19 ] Heppleston, A. G. „*Environmental Health Perspectives: Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos*“. 1984, roč. 55, s 111–127.
- [ 20 ] Yano, E., Wang, X., Wang, M., Qiu, H., Wang, Z. „*Occupational and Environmental Medicine: Lung Cancer Mortality from Exposure to Chrysotile Asbestos and Smoking: A Case-control Study within a Cohort in China*.“ 2010, roč. 67, č. 12, s 867–871.
- [ 21 ] Nařízení vlády ve znění zákona č. 155/2000, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví a zaměstnanců při práci podle § 133a odst. 6 a § 134c odst. 7 a k provedení § 134 písm. a) až c) zákona č. 65/1965 Sb. „zákoník práce“
- [ 22 ] Mesaros, C., Worth, A. J., Snyder, N. W., Christofidou-Solomidou, M., Vachani, A., Albelda, S. M., Blair, I. A. „*Bioanalytical techniques for detecting biomarkers of response to human asbestos exposure*“. 2015, roč. 7, č. 9, s 1157–1173.
- [ 23 ] Gehle, K. „*Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*“. Atlanta, 1995, 487 s.

- [ 24 ] Best, E. A., Juarez-Colunga, E., James, K., LeBlanc, W. G., Serdar, B. „*PLOS ONE: Biomarkers of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cognitive Function among Elderly in the United States*“. 2016, roč. 5, č. 11.
- [ 25 ] Grimm, F., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H., Ludewig, G., Hornbuckle, K., Duffel, M., Bergman, A., Robertson, L. „, *Critical Reviews in Toxicology : Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs)*.“ 2015, roč. 45, č. 3, s 245–272.
- [ 26 ] Lehmann, G. M., Christensen, K., Maddaloni, M., Phillips, L. J. „, *Environmental Health Perspectives: Evaluating Health Risks from Inhaled Polychlorinated Biphenyls: Research Needs for Addressing Uncertainty*.“ New York, č. 508, s 109–113.
- [ 27 ] Rysavy, N. M., Maaetoft-Udsen, K., Turner, H. (2013). „*Journal of Applied Toxicolog: Dioxins: diagnostic and prognostic challenges arising from complex mechanisms*.“. 2013, roč. 33, č. 1, s 1-8.
- [ 28 ] Sullivan, J.B. Jr., G.R. Krieger.“ *Hazardous Materials Toxicology-Clinical Principles of Environmental Health*.“ Michiganská univerzita: Williams and Wilkins, 1992, 1242 s.
- [ 29 ] Berthiller, F., Crews, C., Dall’Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, P. I., Seefelder, W., Speeijers, G., Stroka, J.“ *Molecular Nutrition & Food Research: Masked mycotoxins*“. 2013 , roč. 57, č. 1, s 165-186.
- [ 30 ] Puel, O., Galtier, P., Oswald, I. P. „, *Toxins: Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin*“. 2010, roč. 2, č. 4, s 613–631.
- [ 31 ] Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H. S., Kieszak, S., Njapau, H. „, *Environmental Health Perspectives: Case–Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak*“. 2005, roč. 113, č. 12, s 1779–1783.
- [ 32 ] Reddy, L., & Bhoola, K. „, *Toxins: Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health*“. 2010, roč. 2, č. 4, s 771–779.
- [ 33 ] Bin-Umer, M. A., McLaughlin, J. E., Basu, D., McCormick, S., Tumer, N. E. „, *Toxins: Trichothecene Mycotoxins Inhibit Mitochondrial Translation—Implication for the Mechanism of Toxicity*“. 2011, roč. 3, č. 12, s 1484–1501.
- [ 34 ] McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., Alexander, N. J. „, *Toxins: Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins*“. 2011, roč. 3, č. 7, s 802–814.
- [ 35 ] Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. „, *Frontiers in Plant Science: Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics*“. 2016, roč. 8, č. 6, 1143 s.

- [ 36 ] Bernhoft, R. A. „*Journal of Environmental and Public :Mercury Toxicity and Treatment*”. 2012, Los Angeles, 10 s.
- [ 37 ] Cooper, R. G., Harrison P. A. „*Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine: The Uses and Adverse Effects of Beryllium on Health*”. 2009, roč. 13, č. 2, s 65–76.
- [ 38 ] SVAČINA, Š. „*Klinická dietologie*“. 1. vydání. Praha: Grada, 2008, 367 s
- [ 39 ] Watson, Cheryl S. et al. „*Steroids: Xenoestrogens Are Potent Activators of Nongenomic Estrogenic Responses*”. 2007, roč. 72, č. 2, 124–134.
- [ 40 ] Viñas, R., Yow-Jiun J., Watson S. Ch. „*International Journal of Environmental Research and Public Health: Non-Genomic Effects of Xenoestrogen Mixtures*”. 2012, roč. 9, č. 8, s 2694- 2714.
- [ 41 ] „Bonds R. S., Midoro-Horiuti T. „*Allergy and Clinical Immunology: Vliv estrogenu na alergii a astma*“. roč. 2013, č. 10, s 49-55.
- [ 42 ] D’Orazio,J., Jarrett,S., Amaro-Ortiz, A., Scott T. „*International Journal of Molecular Sciences: UV Radiation and the Skin*“. 2013, roč. 14, č. 6, s 12222-12248.
- [ 43 ] Falzone L., Marconi A., Loreto C., Franco S., Spandidos D.A., Libra M. „*Molecular medicine reports: Occupational Exposure to Carcinogens: Benzene, Pesticides and Fibers*”. 2016, roč. 14, č. 5, s 4467-4474.
- [ 44 ] Triggiani, M., Loffredo, S., Granata F., Staiano R. I, Marone G. „*Current pharmaceutical design: Modulation of Mast Cell and Basophil Functions by Benzene Metabolites*“. 2011, roč. 17, č. 24, s 3830-3835.
- [ 45 ] Rosenthal, G. J., Corsini E., Simeonova P. „*Environmental Health Perspectives: Selected New Developments in Asbestos Immunotoxicity*”. 1998, č. 106, s 159-169.
- [ 46 ] Nishimura, Y., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Lee, S., Matsuzaki, H., Wada, Y., Nishiike-Wada, T., Iguchi, H., Otsuki, T. „*Environmental Health and Preventive Medicine: Altered Functions of Alveolar Macrophages and NK Cells Involved in Asbestos-Related Diseases*“. 2013, roč. 18, č. 3, s 198–204.
- [ 47 ] de la Fuente, H., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Díaz-Barriga, F., Saavedra-Alanís, V., Layseca, E., González-Amaro, R. „*Clinical and Experimental Immunology: Effect of Arsenic, Cadmium and Lead on the Induction of Apoptosis of Normal Human Mononuclear Cells*”. 2012, roč. 129, č. 1, s 69-77.

- [ 48 ] Dietert, R. R., Lee, J. E, Hussain, I., Piepenbrink, M.. „*Toxicology and Applied Pharmacology:Developmental immunotoxicology of lead*“. 2004, roč. 198, č. 2, s 86-94.
- [ 49 ] Dangleben, N. L., Skibola Ch. F.,Smith M. T.. „*Environmental Health: Arsenic Immunotoxicity*“. 2013, roč. 12, č. 73.
- [ 50 ] Silbergeld K. E., Silva I. A., Nyland J. F. „, *Toxicology and applied pharmacology: Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health*“. 2005, roč. 1, č. 207, s 282-292.
- [ 51 ] Caruso, J. A., Stemmer, P. M., Dombkowski, A., Caruthers, N. J., Gill, R., Rosenspire, A. J. „*Toxicology and applied pharmacology: A Systems Toxicology Approach Identifies Lyn as a Key Signaling Phosphoprotein Modulated by Mercury in a B Lymphocyte Cell Model*“. 2004, roč. 207, č. 1, s 47-54.
- [ 52 ] Sawyer, R. T., Maier L. A. „, *Biometals: Chronic Beryllium Disease: An Updated Model Interaction between Innate and Acquired Immunity*“. 2011, roč. 24, č. 1, s 1-17.
- [ 53 ] Young, J. J. I., Youk E. S, Lee S. H., Suh J., Na Y. J., Kim, H. M.. „*Toxicology and Applied Pharmacology: Polychlorinated Biphenyl-Induced Apoptosis of Murine Spleen Cells Is Aryl Hydrocarbon Receptor Independent but Caspases Dependent*“. 2002, roč. 181, č. 2, s 69-78.
- [ 54 ] Azenabor, A.A., Chaudhry A. U. “*Journal of Reproductive Immunology: „17 $\beta$ -Estradiol induces L-type Ca<sup>2+</sup> channel activation and regulates redox function in macrophages*“. 2003, roč. 59, č. 1, s 17-28.
- [ 55 ] CHen, H. M., Lee Y. H., Chen R. J., Chiu H. W., Wang B. J., Wang Y. J.. „, *Chemico-Biological Interactions: The immunotoxic effects of dual exposure to PCP and TCDD*“. 2013, roč. 206, č. 2, Tainan,s 166-174.
- [ 56 ] Wild, Ch. P., Gong Y. Y. „, *Carcinogenesis: Mycotoxins and Human Disease: A Largely Ignored Global Health Issue*“. 2010, roč. 31, č. 1, s 71-82.
- [ 57 ] Kőszegi, T., Poór M. „, *Toxins: Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level*“. 2016, roč. 8, č. 4, s 11.
- [ 58 ] Liang, R, Shen, X. L., Zhang, B, . „, *Scientific reports: Apoptosis signal-regulating kinase 1 promotes ochratoxin A-induced renal cytotoxicity*“. 2015, roč. 5, č. 8078.
- [ 59 ] Ndebele,K., Graham B., Tchounwou P. B. „, *International Journal of Enviromental Research and Public Health: Estrogenic Activity of Coumestrol, DDT, and TCDD in Human Cervical Cancer Cells*“. 2010, roč. 7, č. 5, s 2045–2056.

- [ 60 ] Géraldine Delbès, Christine Levacher and René Habert. „*Reproduction: Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development*”. 2010, roč. 132, č. 4, s 527-538.
- [ 61 ] Oborná, I., Fingerová H., Březinová J. „*Interní medicína pro praxi: Fytoestrogeny v gynekologické praxi*“. 2007, roč. 9, č. 10, s 459-461.
- [ 62 ] Viñas, R., Jeng, Y. J., Watson Ch. S. „*International journal of environmental research and public health: Non-Genomic Effects of Xenoestrogen Mixtures*”. 2012, roč. 9, č. 8, s 2694-2714.
- [ 63 ] Goettsch, W. G., de Gruijl, J. F.R., van Loveren, H. „*Thymus: UV-B and the immune system. A review with special emphasis on T cell-mediated immunity*”. 1993, roč. 21, č. 2, s 93-114.
- [ 64 ] Beissert S., Schwarz T. „*The journal of investigative dermatology: Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression.*“ 1999, roč. 4, č. 1, s 61-64.
- [ 65 ] Petanová Jitka. „*Medicína pro praxi: Vliv prostředí na imunitní systém*“. 2007, č. 6, s 256-258.
- [ 66 ] ROVENSKÝ, Jozef. „*Revmatologický výkladový slovník*“. 1. Vydání, Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1614-3
- [ 67 ] *VIVO science „Immunotoxicity“*. *VIVO science* [online]. Gronau [cit. 2016-06-19]. Dostupné z:  
[http://www.vivoscience.com/ouroffers/immunotoxicity/?gclid=CNz4l\\_jers0CFSQW0wodVvsAgQ](http://www.vivoscience.com/ouroffers/immunotoxicity/?gclid=CNz4l_jers0CFSQW0wodVvsAgQ)
- [ 68 ] De Azevedo, P., Sylvestre, T. Cavalcante, R., Carvalho, L., Moris, D., de Oliveira, M., Mendes, R. „*Plos one: Evaluation of the Double Agar Gel Immunodiffusion Test and of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Chronic Pulmonary Aspergillosis.*” 2015, roč. 10, č. 8.
- [ 69 ] Rubio F, Guo E, Kamp L. „*Journal of Environmental & Analytical Toxicology: Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products*“. 2014, roč. 5, č. 249.
- [ 70 ] Tozzoli, R., Antico, A., Porcelli, B., Bassetti, D. „*Auto-immunity highlights: Automation in Indirect Immunofluorescence Testing: A New Step in the Evolution of the Autoimmunology Laboratory*“. 2012, roč. 3, č. 2, s 59-65.
- [ 71 ] ELISA Kits. In: *Origine* [online]. Rockville: Medical Center Dr, 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.origene.com/ELISA/>

- [ 72 ] *Cymedica* [online]. Hořovice: Cymedica spol. s.r.o., 2011 [cit. 2016-06-25]. Dostupné z: <http://www.cymedica.com/www/ru/hematologicky-analyzator-idexx-procyte-dx/technologie-2/>
- [ 73 ] Piyasena, M. E., Graves S. W. ., *Lab on a Chip: The Intersection of Flow Cytometry with Microfluidics and Microfabrication*“. 2014, roč. 14, č. 6, s 1044-1059.
- [ 74 ] Karavitis, J., Kovacs, E. J. ., *Journal of Leukocyte biology: Macrophage Phagocytosis: Effects of Environmental Pollutants, Alcohol, Cigarette Smoke, and Other External Factors*“. 2011, roč. 90, č. 6, Maywood, s 1065-1078.
- [ 75 ] Schoppmann, A. A., Sromicki, K., Brungs J., von der Wiesche S., Hock M., Kolaus, M., Hemmrsbach, W., Ullrich, R., O. ., *Cell communication and signaling: The Oxidative Burst Reaction in Mammalian Cells Depends on Gravity*“. 2013, č. 11, s 98.
- [ 76 ] Rive, C. M., Bourke, J., Phillips E. J. ., *The clinical biochemist. Reviews: Testing for Drug Hypersensitivity Syndromes*“. 2013, roč. 34, č. 1, s 15-38.
- [ 77 ] Zaritskaya, L., Shurin, R. M., Sayers, J. T., Malyguine, M. A. ., *Expert reviews of vaccines: New Flow Cytometric Assays for Monitoring Cell-Mediated Cytotoxicity*“. 2014, roč. 9, č. 6, s 601-614.
- [ 78 ] Lewallen, S., Courtright, P. ., *Community eye health: Epidemiology in practice: Case-control studies*“. 1998, roč. 11, č. 28, s 57-58.
- [ 79 ] Devlin, R. B., Frampton, M. L., Ghio, A. J. ., *Experimental and Toxicologic pathology: In vitro studies: What is their role in toxicology?*“. 2005, roč. 57, č. 1, s 183-188.
- [ 80 ] Anson, B. D., Kolaja, K. L., Kamp, T. J. ., *Clinical pharmacology & Therapeutics: Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology*“. 2011, roč. 89, s 754-758.
- [ 81 ] Scott, C. W., Peters, M. F., Dragan, Y. P. ., *Toxicology letters: Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing*“. 2013, roč. 219, č. 1, s 49-58.