

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Tereza Myslivcová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Toxicita těžkých kovů u krevních elementů**

Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of chemical technology

**Heavy Metals Toxicity In Blood**

Bachelor thesis

2023

Tereza Myslivcová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Myslivcová**  
Osobní číslo: **C20247**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Toxicita těžkých kovů u krevních elementů**  
Téma práce anglicky: **Heavy Metals Toxicity In Blood**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis toxicity těžkých kovů. V rámci tohoto se nejprve zaměřte na popis druhů těžkých kovů, jejich výskyt v životním prostředí či potravinách. Zpracujte také přehled jejich obecných účinků v živých systémech na buněčné, či subbuněčné úrovni. Následně se detailně zaměřte na popis účinku těchto toxických prvků na jednotlivé elementy krve, tj. erytrocyty, leukocyty či trombocyty, a to jak u jejich diferencovaných forem, tak i během vzniku v kostní dřeni.

2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem *Toxicita těžkých kovů u krevních elementů* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2023

Tereza Myslivcová, v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych chtěla poděkovat vedoucímu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, PhD. za cenné rady, připomínky a trpělivost během zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za podporu během psaní i při celém studiu, kdy mi byli všichni velkou oporou.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se věnuje toxicitě těžkých kovů, především Cd, Hg a Pb u erytrocytů, leukocytů a trombocytů. V úvodní části se práce zabývá vývojem těchto krevních elementů. Následně jsou vybrané těžké kovy charakterizovány a je shrnut i jejich výskyt v životním prostředí. Hlavní část práce se zaměřuje na popis toxicity těžkých kovů u erytrocytů, leukocytů a trombocytů u *in vitro* a *in vivo* studií. Závěrem je zmíněna chelatační terapie jako běžně používaná léčba při intoxikaci těžkými kovy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Těžké kovy, toxicita, kadmium, olovo, rtuť, erytrocyty, leukocyty, trombocyty, oxidační stres

## **TITLE**

Heavy Metals Toxicity In Blood

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the toxicity of heavy metals, i.e. Cd, Hg and Pb, in erythrocytes, leukocytes and platelets. In the introductory part of the thesis the evolution of these blood elements has been discussed. Subsequently, selected heavy metals have been individually characterized and their occurrence in the environment summarized. The main part of the thesis has been focused on the description of heavy metal toxicity in erythrocytes, leukocytes and platelets in *in vitro* and *in vivo* studies. Finally, chelation therapy has been mentioned as an example of commonly used treatment for heavy metal intoxication.

## **KEYWORDS**

Heavy Metals, Toxicity, Cadmium, Lead, Mercury, Erythrocytes, Leukocytes, Platelets, Oxidative Stress



# OBSAH

ÚVOD.....	13
<b>1. KRVETVORBA.....</b>	<b>14</b>
1.1 Erytrocyty.....	14
1.2 Erytropoéza.....	15
1.3 Leukocyty.....	16
1.4 Leukopoéza.....	17
1.5 Trombocyty.....	19
1.6 Megakaryopoéza.....	20
<b>2. TĚŽKÉ KOVY.....</b>	<b>22</b>
2.1 Kadmium.....	22
2.1.1 Metalothionein a kadmium.....	24
2.1.2 Role oxidačního stresu v mitochondriích.....	24
2.1.3 Účinky Cd <sup>2+</sup> na imunitní systém.....	25
2.1.4 Funkční a strukturální účinky kadmia na lidské erytrocyty.....	28
2.1.5 Zvýšená aktivace trombocytů při chronické intoxikaci Cd <sup>2+</sup> .....	29
2.2 Rtuť.....	30
2.2.1 Mechanismus toxicity Hg.....	31
2.2.2 Působení rtuti na erytrocyty.....	32
2.2.3 Methylrtuť jako spouštěč endoteliální adheze leukocytů.....	35
2.3 Olovo.....	36
2.3.1 Mechanismus toxicity olova.....	37
2.3.2 Vliv Pb na krevní elementy a hematopoézu.....	37
<b>3. LÉČBA A SNÍŽENÍ TOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ.....</b>	<b>39</b>
3.1 Chelatační terapie při jednotlivých intoxikacích.....	40
3.2 Výsledky a nežádoucí účinky chelatační terapie.....	41
ZÁVĚR.....	42
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Přehled erythropoézy od HSC po erytrocyt.....	16
Obrázek 2: Vývoj leukocytů od hematopoetické kmenové buňky.....	17
Obrázek 3: Přehled interakcí krevních destiček.....	19
Obrázek 4: Přehled megakaryopoézy.....	21
Obrázek 5: Hlavní cesty expozice $Cd^{2+}$ a toxické účinky na orgány v lidském těle.....	23
Obrázek 6: Popis působení $Cd^{2+}$ na buňku.....	25
Obrázek 7: Prooxidační a prozánětlivé účinky $Cd^{2+}$ na neutrofilů a makrofágy.....	27
Obrázek 8: Účinky iontů $CdCl_2$ na morfologii lidských erytrocytů.....	29
Obrázek 9: Expres P-selektinu (A) a $\alpha GPIIb/IIIa$ (B).....	30
Obrázek 10: Snímky normálních erytrocytů a $HgCl_2$ ošetřených erytrocytů.....	32
Obrázek 11: Schematické znázornění toxicity $HgCl_2$ .....	33
Obrázek 12: $Hg^{2+}$ -indukovaná prokoagulační aktivita v erytrocytech.....	34
Obrázek 13: Ošetření lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk MeHg.....	36
Obrázek 14: Cesta možného vstupu Pb do živočišného systému.....	38
Obrázek 15: Průběh chelatační terapie.....	40
Obrázek 16: Strukturní vzorce chelatačních činidel.....	41

## SEZNAM ZKRATEK

ALA	Kyselina $\delta$ -aminolevulová
ALAD	Dehydrogenáza kyseliny $\delta$ -aminolevulové
AP-1	Aktivátorový protein 1
BAL	Dimercaprol ( <i>British anti-Lewisite</i> )
BFU-E	Kolonie tvořící shluky-erytroidu ( <i>Burst Forming Unit-Erythroid</i> )
BFU-MGK	Kolonie tvořící shluky-megakaryocytů
CD40L	CD40 ligand
CFU-E	Kolonie tvořící jednotky-erytroidu ( <i>Colony Forming Unit Erythroid</i> )
CFU-GM	Kolonie tvořící jednotky-granulocytů a makrofágů
CFU-MGK	Kolonie tvořící jednotky-megakaryocytů
DMPS	2,3-dimerkapto-1-propansulfonát
DMSA	Kyselina meso-dimerkaptojantarová
EPO	Erytropoetin
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion
HSC	Hematopoetická kmenová buňka
ICAM-1	Intracelulární adhezivní molekula-1
JNK	c-Jun N-terminální kináza
LTB4	Leukotrien B4
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCP-1	Monocytární chemoatraktivní protein-1
MeHg	Methylrtuť
MetHb	Methemoglobin
MGK	Megakaryocyt
MPV	Střední objem trombocytů ( <i>Mean Platelet Volume</i> )
MT	Metalothionein
MV	Mikrovezikuly
NF $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa
PDW	Objemová variabilita trombocytů ( <i>Platelet Distribution Width</i> )
PS	Fosfatidylserin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku

SCF	Růstový faktor ( <i>Stem Cells Factor</i> )
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor-alfa
TPO	Trombopoetin
vWF	von Willebrandův faktor

## ÚVOD

Těžké kovy jsou hrozbou pro lidské zdraví na celém světě. Jedná se o přirozeně se vyskytující prvky, které mají hustotu a atomovou hmotnost minimálně 5x vyšší než voda. Řadíme mezi ně kovy jako je chrom, kobalt, mangan, měď a zinek, které jsou základními kovy a jsou nezbytné pro fyziologické a biochemické funkce. V případě jejich nedostatku dochází ke vzniku různých onemocnění a syndromů. Naopak kovy jako je arsen, kadmium, rtuť a olovo jsou těžkými kovy s vysokým stupněm toxicity. Ke kontaminaci životního prostředí dochází vlivem přírodních (sopečné erupce, zvětrávání) i antropogenních činností (spalování ropy a uhlí, konzervace dřeva, zpracování kovů v rafinériích).

Cílem této práce je popsat výskyt, možnosti expozice a jednotlivé mechanismy toxicity kadmia, rtuti a olova v buněčné i subbuněčné úrovni a následné detailnější zaměření na intoxikaci krevních elementů pomocí studií *in vivo* a *in vitro*. V případě *in vivo* studií se využívají přímo jedinci vystavené pracovní expozici těžkým kovům.

# 1. KRVETVORBA

Krvetvorba, resp. hematopoéza, probíhá po celý život jedince. Jedná se o proces tvorby krevních elementů (erytrocyty, leukocyty, trombocyty) z hematopoetických kmenových buněk (HSC). HSC mají charakteristické schopnosti diferenciaci a sebeobnovy (Kumar *et al*, 2019). V průběhu sebeobnovy vstupují kmenové buňky do buněčného cyklu za cílem se rozdělit a dát vznik dalším kmenovým buňkám. Naopak diferenciaci umožňuje HSC se vyvinout ve zralejší buňky s progresivní linií (Gaballa *et al*, 2019).

Během vývoje jedince dochází nejprve k hematopoéze ve žloutkovém váčku embrya, která zahrnuje dvě fáze: primitivní a definitivní (Kumar *et al*, 2019). V případě primitivní hematopoézy (extraembryonální), která trvá od 19. dne do 8. týdne po početí, dochází k tvorbě primitivních jaderných erytrocytů, které usnadňují transport kyslíku nezbytný pro přežití embrya. Definitivní hematopoéza (intraembryonální) probíhá v dorzální aortě, kde z mezodermových derivátů vznikají hematopoetické progenitory. Následně po plném vyvinutí embrya přechází krvetvorba do fetálních jater, která slouží jako důležitý hematopoetický orgán a probíhá v nich definitivní erytropoéza. Zároveň placenta a slezina též přispívají k hematopoéze (Gaballa *et al*, 2019). Kolem 10. týdne *in utero* vývoje dochází ke vzniku krvetvorby v kostní dřeni, která zůstává krvetvorným místem po celý život jedince (Kumar *et al*, 2019). Postupně v dospělosti se hematopoéza omezuje pouze na kost pánevní, obratle, lebku a metafýzy dlouhých kostí. Z tohoto důvodu je zvýšené množství erytrocytů u novorozenců v porovnání s dospělým jedincem považováno za fyziologické (Gaballa *et al*, 2019).

Hematopoéza začíná prostřednictvím HSC, které se rozvíjejí v lymfoidní a myeloidní progenitorové buňky. Lymfoidní progenitorové buňky dále dávají vznik NK buňkám, T-lymfocytům, B-lymfocytům a z nich plazmatickým buňkám. Naopak myeloidní progenitorové buňky se vyvíjejí v trombocyty, erytrocyty, neutrofil, eozinofily, bazofily a monocyt, které se vyvíjejí v makrofágy a dendritické buňky.

## 1.1 Erytrocyty

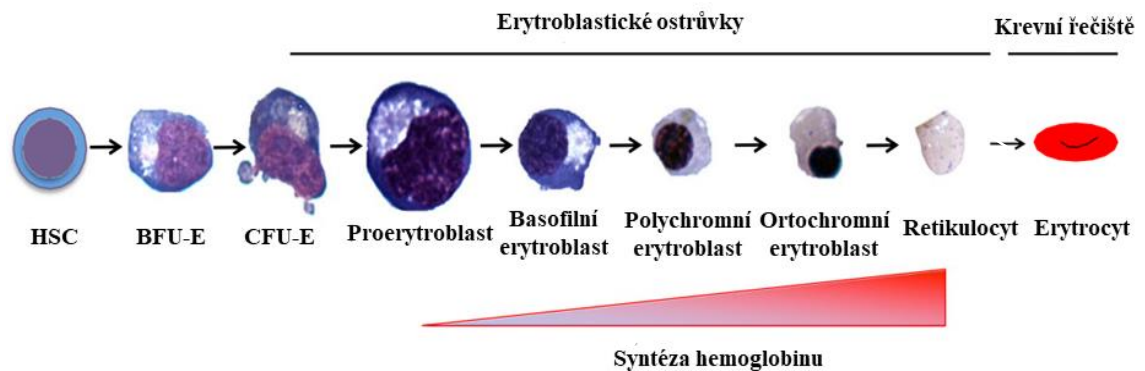
Červené krvinky jsou bezjaderné buňky bikonkávního tvaru s životností kolem 120 dnů vznikající z HSC. Vlivem hormonů a cytokinů procházejí postupně procesem zrání v plně funkční erytrocyty. Za podporu jejich tvorby (tj. erytropoézy) je zodpovědný hormon erythropoetin (EPO), syntetizovaný v ledvinách u dospělých jedinců. Naopak *in utero*

EPO produkují játra a tím se stávají hlavním orgánem erythropoézy. Erytrocyty umožňují transport kyslíku z plic do tkáňových kapilár a zároveň odstraňují vytvořený oxid uhličitý díky hemoglobinu. Hemoglobin ve své struktuře obsahuje 4 globinové podjednotky a v jeho středu se nachází železo umožňující transport plynů, které je červenými nezralými krvinkami vychytáváno díky transferinovému cyklu (*Klinken, 2002*).

## 1.2 Erythropoéza

Erythropoéza je poměrně složitý, několikastupňový proces od HSC po plně zralé erytrocyty. Nejprve dochází k diferenciaci HSC ze společného myeloidního progenitoru na *Burst Forming Unit-Erythroid* (BFU-E) (*Zivot et al, 2018*). BFU-E jsou první buňky, které jsou označovány za nezralou červenou krvinku a exprimují receptory pro *Stem Cells Factor* (SCF). Následnou diferenciací vzniká *Colony Forming Unit-Erythroid* (CFU-E), který exprimuje menší množství receptorů pro SCF a je více závislý na EPO (*Klinken, 2002*). Druhá fáze erythropoézy zahrnuje již morfologicky rozeznatelné buňky a jejich postupné zrání se projevuje odlišnými změnami ve vzhledu jednotlivých vývojových stádií. Prvním stádiem je proerytroblast mající velké jádro. Proerytroblast se dále vyvíjí v menší bazofilní normoblast, jehož jádro má tvar „ciferníku“ a jeho cytoplazma je extrémně basofilní s perinukleárním projasněním (*Jagannthan-Bogdan et al, 2013*). V další fázi dochází ke vzniku polychromního erytroblastu, který díky vyšším hladinám hemoglobinu způsobí naředění obsahu ribozomů a barva cytoplazmy se změní z modré na růžovou. Něž dojde ke vzniku retikulocytů, předchází jim vznik ortochromních erytroblastů, které mají kondenzované jádro a růžovější cytoplazmu z důvodu zvýšené koncentrace hemoglobinu. Jádra ortochromních erytroblastů jsou vyloučena, pohlcena makrofágy a následně dochází ke vzniku retikulocytů. Retikulocyty vstupují do krevního oběhu a během 1-2 dnů následuje jejich postupné zrání a dosyntetizování konečného obsahu hemoglobinu. Poté, co u nich dojde k postupné ztrátě organel, dochází k vyžrání retikulocytů v erytrocyty. Během této fáze vyžrávání díky rozsáhlé remodelaci membrány získávají erytrocyty bikonkávní tvar a jsou schopny cirkulovat krevním řečištěm (Obr. 1). Tato diferenciace erytroblastů probíhá v místech nazývajících se erytroblastické ostrůvky, které jsou typické pro erythropoézu u savců, a jsou složeny z centrálního makrofágu, který je obklopen erytroblasty v různých stupních zrání. Centrální makrofág napomáhá fagocytovat enukleovaná jádra, umožňuje řízení přenosu železa do syntézy erytroidů, reguluje

rychlost erythropoézy pomocí negativních a pozitivních zpětných vazeb a vylučuje cytokiny, které podporují proliferaci a zrání erytrocytů (Zivot *et al*, 2018).



Obrázek 1: **Přehled erythropoézy od HSC po erythrocyt** (HSC: Hematopoetická kmenová buňka, BFU-E: Kolonie tvořící shluky-erytroidu, CFU-E: Kolonie tvořící jednotky-erytroidu), (Upraveno dle Zivot *et al*, 2018).

### 1.3 Leukocyty

Bílé krvinky jsou buňky mající organely a jádro, ale naopak neobsahují hemoglobin. Tvoří buněčnou složku imunitního systému, který je obecně zodpovědný za imunoregulaci, imunologický dohled a obranu. Imunitní systém je komplexní síť imunitních buněk (neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, lymfocytů, makrofágů), imunitních orgánů (brzlík, mandle, slezina, kostní dřeň, lymfatické orgány) a imunoaktivních látek (imunoglobuliny, cytokiny, interferony, protilátky lysozymy, faktory komplementu) (Wang *et al*, 2021).

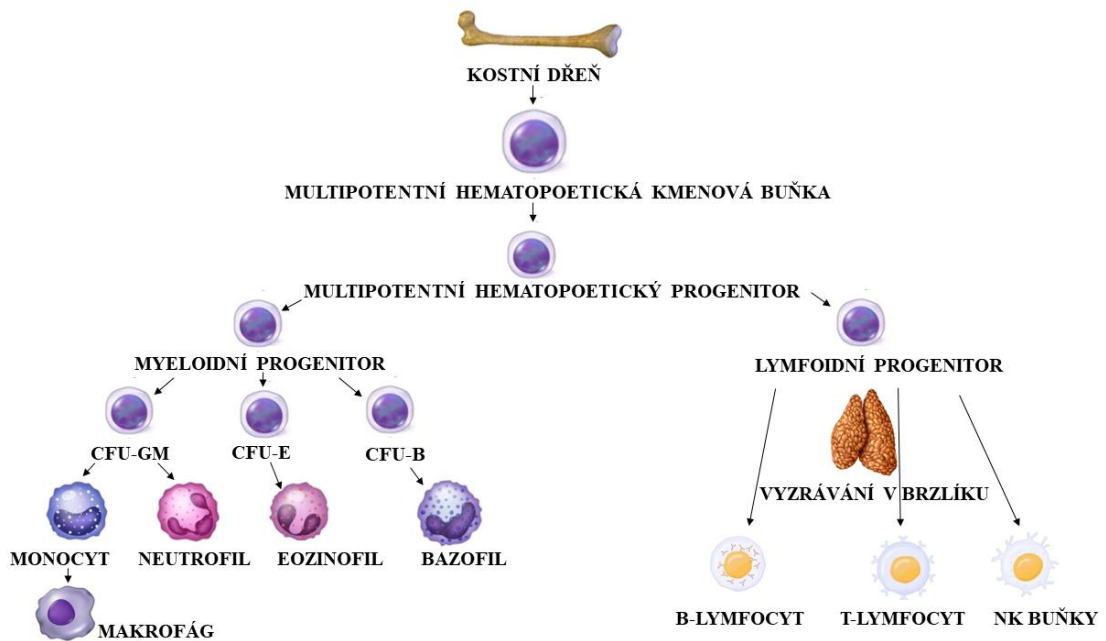
Hlavní funkcí leukocytů je obrana organismu před patogeny a s tím spojené odstraňování odpadních a toxických látek a poškozených buněk. Stimulace tvorby leukocytů závisí na mnoha faktorech, nicméně jejich značná část je uvolněna zralým leukocytem, aby v místě poranění či infekce bylo dostatečné množství leukocytů. Z tohoto důvodu se tedy jejich počet v době infekce a poranění výrazně zvyšuje (Humphry *et al*, 2022).

Leukocyty se od erythrocytů odlišují na základě 4 vlastností: a) schopnost migrace z krevního řečiště; b) améboidní pohyb; c) pozitivní chemotaxe; d) fagocytóza patogenů a poškozených buněk. Na základě pozitivní chemotaxe dochází k pohybu leukocytů směrem k patogenům či poškozené tkáni a fagocytóza je zprostředkována prostřednictvím neutrofilů, eozinofilů a monocytů.



## 1.4 Leukopoéza

Leukocyty jsou produkovány v kostní dřeni myeloidními kmenovými buňkami, které se dále dělí na buňky progenitorové. Neutrofily a monocyty mají společný progenitor, naopak bazofily a eozinofily mají 2 samostatné progenitorové buňky. Vyjma monocytů, každý z buněčných typů prochází vývojovými stádii od blastových buněk k myelocytům, než se stanou zralými buňkami. Vývoj v kostní dřeni probíhá u většiny leukocytů, ale výjimkou jsou lymfocyty. Lymfocyty v kostní dřeni vznikají ze společného progenitoru a následně migrují do lymfoidních tkání (slezina, lymfatické uzliny, brzlík), kde probíhá jejich vývoj. Monocyty se v konečné fázi diferencují na makrofágy v periferních tkáních. Leukocyty se dělí na agranulocyty a granulocyty. Mezi granulocyty řadíme bazofily, eozinofily, neutrofily a všechny tyto buňky mají cytoplazmatická granula, která jsou po obarvení snadno viditelná pod mikroskopem. Naopak mezi agranulocyty řadíme monocyty a lymfocyty, které obsahují sekreční vezikuly špatně pozorovatelné pod mikroskopem a jejich funkčnost se od sebe vzájemně liší (Obr. 2) (Humphry et al, 2022).



Obrázek 2: Vývoj leukocytů od hematopoetické kmenové buňky (CFU-E: Kolonietvořící jednotky-erytroidu, CFU-GM: Kolonie tvořící jednotky-granulocytů a makrofágů, CFU-B: Kolonie tvořící jednotky-bazofilů).

Neutrofily představují až 70% zastoupení cirkulujících leukocytů s typickým multilobulárním jádrem a krátkou životností. Jedná se o buňky schopné fagocytózy a jsou první obrannou linií proti bakteriálním infekcím. Za pomoci diapedézy jsou na základě

chemotaktických látek uvolněných z poškozené tkáně přitahovány do místa zánětlivé reakce (*Minors, 2004*).

Eozinofily tvoří cca 2 % z celkového počtu leukocytů cirkulujících v krvi. Obecně může být jejich počet zvýšen u pacientů s alergickým onemocněním. Od neutrofilů se odlišují svým dvoualočnatým jádrem. Mají schopnost obrany před parazity, pohlcení bakterií a buněčných zbytků označených protilátkou. Po setkání s parazitem uvolňují látky ze svých granul, která obsahují trávicí enzymy pro napadení parazita (*Humphry et al, 2022*).

Pouze 0,5-1 % z leukocytů tvoří bazofily, které obsahují histamin a heparin (*Minors, 2004*). V místě poranění jsou schopny vně buňky uvolňovat histamin, čímž dochází k vazodilataci a zvýšenému průtoku krve. Naopak produkcí heparinu zabraňují srážení krve (*Humphry et al, 2022*).

Monocyty jsou zastoupeny kolem 5 % z celkového počtu leukocytů cirkulujících v krvi a jsou typické v krevním nátěru díky jejich velkému, centrálně uloženému ledvinovitému jádru. Jejich přítomnost v krevním oběhu je pouze po krátkou dobu, protože migrují do tkání s cílem se přeměnit na tkáňové makrofágy. Makrofágy mají schopnost fagocytovat a hrají důležitou roli v obraně proti chronickým infekcím, parazitům i virům. Zároveň je 1 % makrofágů přeměněno na dendritické buňky, které se účastní na prezentaci cizích antigenů na T-lymfocytech (*Minors, 2004*).

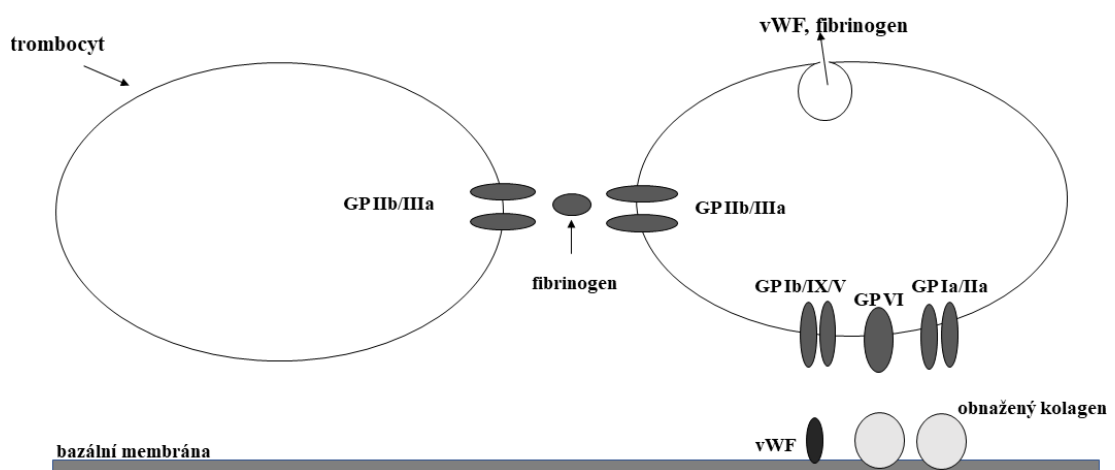
20–30 % z leukocytů jsou lymfocyty, které zodpovídají za specifickou imunitní reakci a dělí se na NK buňky, T-lymfocyty a B-lymfocyty. B-lymfocyty po dozrávání v kostní dřeni následně obíhají mezi lymfatickými uzlinami, slezinou a krevním oběhem. Po setkání se specifickým antigenem je jejich úkolem produkce protilátek. Naopak T-lymfocyty dozrávají v brzlíku a mezi jejich funkce patří obrana proti infekcím. T-lymfocyty jsou tak zodpovědné za imunitu zprostředkovanou buňkami, opoždění hypersenzitivních reakcí a odmítnutí transplantátů (*Humphry et al, 2022*).

Poslední třídou jsou NK buňky, které jsou zodpovědné za imunologický dohled nad nepoškozenými tkáněmi. NK buňky mají schopnost se navázat na abnormální buňky a následně uvolnit z vezikulů perforin, který se naváže na membránu abnormálních buněk a způsobí tvorbu pórů. Po jejich vzniku dojde k prostupu granzymů do buňky, uvolnění proteinů a iontů ven z buňky a následně k buněčnému rozpadu (*Humphry et al, 2022*).

## 1.5 Trombocyty

Krevní destičky jsou diskoidní bezjaderné buňky a k jejich obměně dochází každých 8-10 dní. Primárně slouží jako regulátory hemostázy a sekundární rolí trombocytů je regulace přirozené imunity a angiogeneze. V případě poranění cév reagují prostřednictvím změny tvaru, následným vyloučením obsahu svých granulí a agregací za vzniku krevních sraženin (*Thon et al, 2012*).

Při adhezi trombocytů hraje hlavní roli kolagen. Vzájemnou interakci mezi trombocyty a kolagenem zprostředkovávají receptory glykoproteinové povahy na povrchu trombocytů a von Willebrandův faktor (vWF). To znamená, pokud dojde k poškození stěny krevní cévy, dochází k navázání obnaženého kolagenu na vWF. vWF funguje jako prostředník pro adhezi trombocytů a vše je zprostředkované vazbou na glykoproteinový (GP) komplex GP Ib/IX/V nacházející se na povrchu trombocytů. GP komplex působí na sebe navzájem s fibrinogenem a díky tomu hraje značnou roli při adhezi a agregaci krevních destiček na povrch endotelu. Tento proces navázání probíhá v případě vysokého stresového stříhu. Při podmínkách nízkého stresového stříhu dochází k navázání trombocytů ke kolagenu prostřednictvím povrchového komplexu GP Ia/IIa. Po těchto iniciačních krocích se GP VI též naváže na kolagen a funguje jako signální molekula pro aktivaci trombocytů. V důsledku toho dochází ke změně tvaru destiček a na svůj povrch exprimují proteiny GP IIb/IIIa. Následně dochází k agregaci trombocytů prostřednictvím GP IIb/IIIa na jejich povrchu s fibrinovým můstkem a vzniká zátka uzavírající stěnu cévy (Obr. 3). Po aktivaci destiček se uvolňuje vWF sloužící k adhezi, serotonin pro vazokonstrikci, faktor V pro hemokoagulaci, inhibitory proteáz a mitogenní faktory (PDGF, VEGF), (*Szalai et al, 2006*).



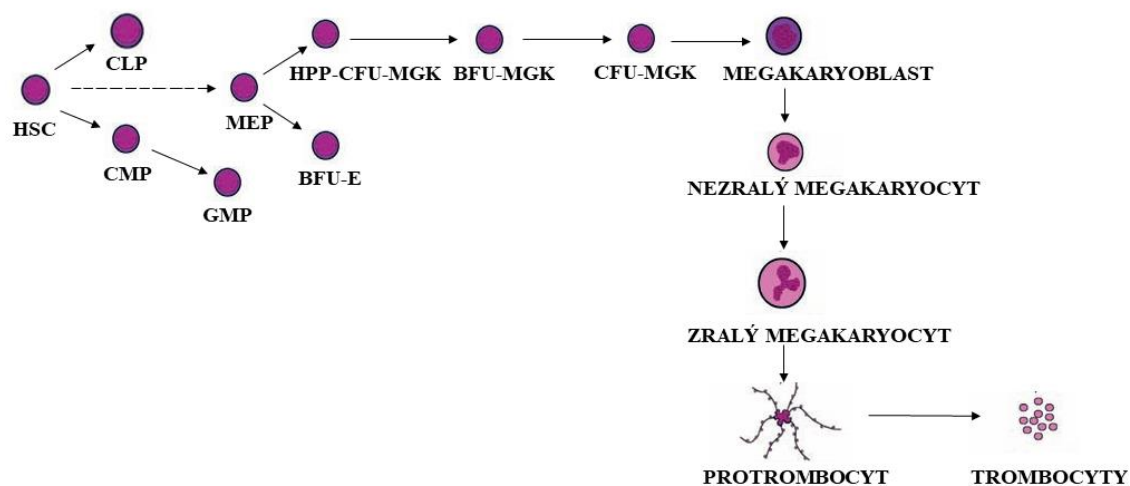
Obrázek 3: Přehled interakcí krevních destiček (vWF: von Willebrandův faktor, GP: glykoprotein), (*Upraveno dle Szalai et al, 2006*).

## 1.6 Megakaryopoéza

Trombocyty vznikají z jaderných megakaryocytů, které se u dospělých primárně nacházejí v kostní dřeni, ale při raném vývoji jsou přítomny ve žlutkovém váčku, slezině a fetálních játrech. Megakaryocyty (MGK) řadíme mezi myeloidní buňky kostní dřene a jejich počty jsou regulovány trombopoetinem (TPO), chemokiny, nebo pomocí změn exprese ligandů pro receptory na povrchu megakaryocytů (*Thon et al, 2012*). TPO stimuluje megakaryopoézu a vede ke zvýšené produkci trombocytů. Hlavním místem jeho produkce jsou játra, v malé míře i stromální buňky kostní dřene a ledviny. Zároveň TPO stimuluje expresi proteinů nacházejících se na buněčném povrchu včetně CD42 (GP Ib), CD61/41 (GP IIb/IIIa) a indukuje endomitózu (*Szalai et al, 2006*).

Původ megakaryocytů je z HSC, které se nacházejí v proximální osteoblastické nice. Z nich se buď přes společný myeloidní progenitor, nebo progenitor erytrocytů, vyvíjí jednotka megakaryocytů tvořící kolonie s vysokým proliferačním potenciálem (HPP-CFU-MGK). Dalším vývojovým stádiem jsou prekurzory kolonie tvořící shluky megakaryocytů (BFU-MGK) a prekurzory kolonie tvořící jednotky megakaryocytů (CFU-MGK), které exprimují antigen CD34. Z těchto prekurzorů dochází dále ke vzniku megakaryoblastu a z megakaryoblastu vzniká nezralý polyploidní megakaryocyt, který neproliferuje a je přechodným stádiem pro zralé MGK. Zralé MGK se v konečné fázi svého vývoje přesouvají do sinusoid dřene a následně umožňují proces uvolňování cytoplazmy, v jejichž výběžcích vznikají protrombocyty, které po oddělení od megakaryocytů dávají vznik trombocytům v krevní cirkulaci (Obr. 4) (*Szalai et al, 2006*).

Megakaryocyty podstupují během svého zrání několika chromozomálními duplikacemi bez buněčného dělení nazývané endomitóza. Výsledkem endomitózy je vznik jednoho polylobulovaného jádra, díky tomu, že megakaryocyt nedokončí M fázi a místo toho vstupuje znovu do G1 fáze. Objem cytoplazmy megakaryocytů se zvyšuje s ploidií, tím se zvětšuje jejich velikost a postupně se plní organelami typickými pro trombocyty, cytoskeletárními proteiny, granuly a invaginovaným membránovým systémem (*Thon et al, 2012*).



Obrázek 4: **Přehled megakaryopoézy** (HSC: Hematopoetická kmenová buňka, CLP: Společný lymfoidní progenitor, CMP: Společný myeloidní progenitor, GMP: Granulo-makrofágový progenitor, MEP: Poskytuje erytrocyty a megakaryocyty, BFU-E: Kolonie tvořící shluky-erytroidu, HPP-CFU-MGK: Jednotka megakaryocytů tvořící kolonie s vysokým proliferačním potenciálem, BFU-MGK: Kolonie tvořící shluky megakaryocytů, CFU-MGK: Kolonie tvořící jednotky megakaryocytů), (Upraveno dle Szalai et al, 2006).

## 2. TĚŽKÉ KOVY

Mezi těžké kovy řadíme všechny kovové prvky, popřípadě metaloidy (arsen), které mají hustotu  $5 \text{ g/cm}^3$  a vyšší. Do této skupiny kovů patří: arsen (As), chrom (Cr), kadmium (Cd), kobalt (Co), mangan (Mn), měď (Cu), olovo (Pb) a rtuť (Hg). Kobalt, mangan a měď jsou pro metabolismus člověka nezbytné pouze v nízkých koncentracích (*Singh et al, 2011*). Při překročení prahové koncentrace nebo narušení homeostázy se stávají toxickými pro organismus. Naopak při nedostatečném množství těchto kovů dochází ke vzniku onemocnění a syndromů. Arsen, kadmium, olovo a rtuť jsou řazeny mezi kovy, které nemají práh toxicity a patří mezi potenciálně toxické. Jedná se o látky, které mají při nižších koncentracích fyzikálně-chemické vlastnosti podobné hořčíku a vápníku (*Tchounwou et al, 2012*). Tyto neesenciální kovy způsobují zvýšenou náchylnost k infekcím, zvýšené riziko vzniku autoimunitních onemocnění a vznik rakoviny i v případě intoxikace malým množstvím (*Ebrahimi et al, 2020*). Jejich toxicita nezávisí pouze na dávkách, ale i na pohlaví a věku daného jedince a mohou způsobovat různé poruchy: kardiovaskulární, neurologické (rtuť), respirační (kadmium) nebo hematopoetické. Těžké kovy vstupují do buněk pomocí proteinových transportérů a iontových kanálů. Obecně ovlivňují struktury buněčné membrány, endoplazmatické retikulum, jádro a enzymy zapojené do metabolismu. Jejich ionty reagují s jadernými proteiny a DNA, čímž způsobují poškození DNA a časté změny v konformaci, které následně vedou k apoptóze nebo karcinogenezi (*Sas-Nowosielska et al, 2015; Tchounwou et al, 2012*). Hlavní roli v karcinogenitě a toxicitě těžkých kovů hraje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), potlačení antioxidační obrany a inaktivace enzymů (*Baladi-Mood et al, 2021*).

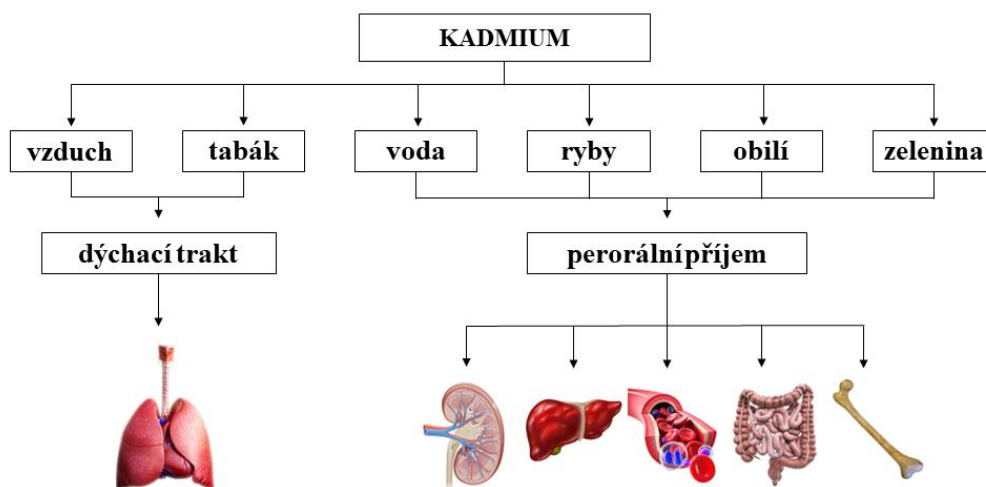
Díky antropogenní činnosti dochází ke kontaminaci podzemních vod, půd a ovzduší těžkými kovy. Mezi jejich průmyslové zdroje řadíme: zpracování kovů v rafinériích, konzervace dřeva, nebo spalování uhlí a fosilních paliv (*Tchounwou et al, 2012*). Zároveň mohou být kontaminovány i potraviny prostřednictvím zavlažovacího systému při použití znečištěných vod či vlivem přírodních jevů, jako jsou sopečné erupce a eroze půd (*Jaishankar et al, 2014*).

### 2.1 Kadmium

Kadmium je neesenciální, měkký, stříbřitě bílý kov s poměrně velkou toxicitou. Ve sloučeninách se vyskytuje především ve dvojmocném oxidačním stavu. Typickým znakem je jeho podobnost se zinkem a rtuť, která je způsobena vlivem fyzikálně-chemických vlastností.

Hlavními zdroji kontaminace jsou potraviny (korýši, krabi, vnitřnosti, houby, rýže, obilí), voda, sváření, spalování fosilních paliv, fosfátová hnojiva nebo kouř z cigaret. V jedné cigaretě se nachází kolem 1–2  $\mu\text{g}$  Cd a díky tomu je rizikovým faktorem pro vznik osteoporózy především u kuřáků (Grenchi et al, 2020).

Cd způsobuje dysfunkci u orgánů jako jsou ledviny, játra, plíce a může způsobit poškození varlat nebo hematopoetického systému. Nejenže má cytotoxické účinky, které mohou navodit apoptózu a nekrózu, ale je i lidským karcinogenem (Grenchi et al, 2020). Cd způsobuje rakovinu slinivky, prostaty, prsu, jater, ledvin a plic. Na základě zjištění Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny patří kadmium mezi karcinogeny skupiny 1 (Ebrahimi et al, 2020). Do těla se dostává především dýchacím traktem při vdechování malých částic, prostřednictvím gastrointestinálního traktu a v malé míře přes kůži (Grenchi et al, 2020). Po vstupu do těla je Cd přijímáno prostřednictvím krve a transportováno ve vazbě na membrány erytrocytů, albuminu nebo metalothioneinu (MT) do orgánů. Primárním orgánem akumulace po příjmu Cd do krve z gastrointestinálního traktu jsou játra. Naopak při dlouhodobé expozici Cd navozuje syntézu MT, na které se Cd naváže a je následně transportován do ledvin (Obr. 5) (Matović et al, 2015).



Obrázek 5: Hlavní cesty expozice Cd a toxické účinky na orgány v lidském těle (Upraveno dle Wang et al, 2021).

Kadmium poškozuje tkáň především tvorbou ROS, které narušují syntézu nukleových kyselin, proteinů a způsobují poškození DNA. Při nižších koncentracích snižuje opravy DNA, upreguluje cytokiny a protoonkogeny, aktivuje degradaci proteinů a indukuje expresi MT, glutathiontransferáz, reaktantů akutní fáze a DNA polymerázy (Tchounwou et al, 2012).

Akutní expozice se projevuje bolestmi břicha, ztrátou vědomí a šokem během 15-30 minut. Naopak při chronické expozici má negativní účinky na hladinu serotoninu,

acetylcholinu a norepinefrinu a z těla se vylučuje prostřednictvím slin, moči, případně u kojících matek přes mateřské mléko a jeho biologický poločas je 25 let (*Grenchi et al, 2020; Tchounwou et al, 2012*).

### 2.1.1 Metalothionein a kadmium

Metalothionein (MT) je nízkomolekulární protein obsahující značné množství cysteinu, vyskytující se ve čtyřech izoformách. Nachází se v jádrech buněk, mitochondriích, cytoplazmě a lysozomech. MT byl prvně nalezen v kůře ledvin koní jako protein zodpovědný za kumulaci kadmia ve tkáních. Díky obsahu cysteinu je jejich afinita k těžkým kovům poměrně vysoká. Tato vazebná afinita se testuje *in vitro* s MT krysích jater a v minulosti bylo zjištěno následující pořadí afinity MT k jednotlivým kovům:  $Cd > Pb > Hg$  (*Grenchi et al, 2020*).

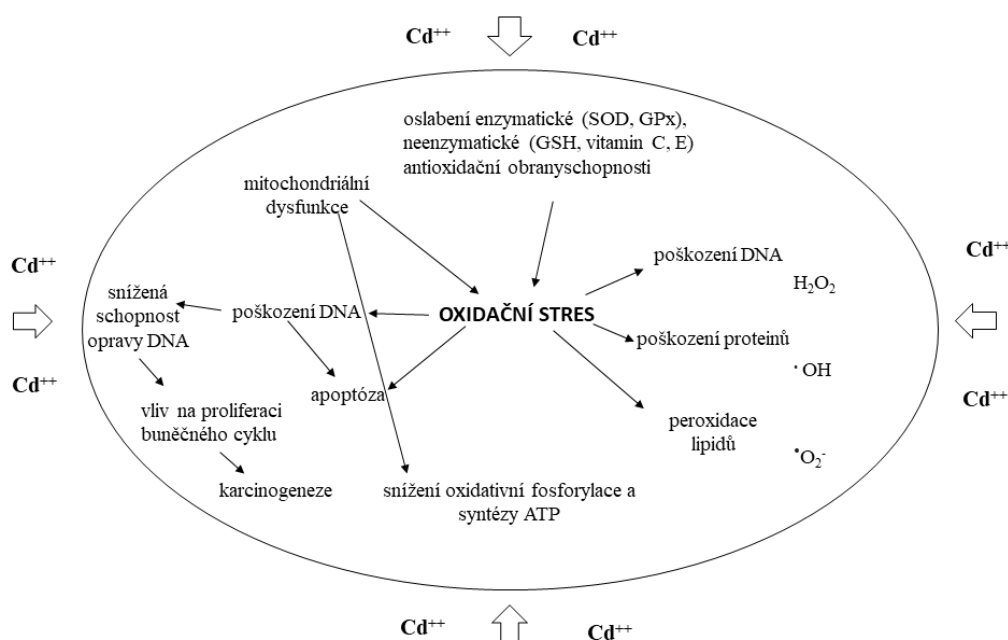
Hlavní funkcí MT je především udržení homeostázy zinku a mědi, ochrana před toxickými účinky kovů (především před kadmiiem) a vychytávání volných radikálů z oxidačního stresu. Při nadměrné expozici  $Cd^{2+}$  dochází k poruše navázání  $Cd^{2+}$  na MT, což vede ke kumulaci  $Cd^{2+}$  v těle. Hromadění MT probíhá v hepatocytech, kde vzniká Cd-MT komplex, díky čemuž chrání buňku před toxicitou iontů kadmia. Uvnitř lysozomů renálních buněk je tento komplex degradován na aminokyseliny a volné ionty a tyto uvolněné ionty umožňují syntézu nových MT v ledvinách. Syntéza tohoto proteinu v lidském těle probíhá také v játrech. Jejich produkce závisí nejen na přítomnosti Se, Cu a Zn ve stravě, ale i na přítomnosti histidinu a cysteinu. Poté co je  $Cd^{2+}$  absorbováno, je následně transportováno do jater přes střevní MT. Dále jaterní Cd-MT redistribuje  $Cd^{2+}$  do ledvin, které jsou cílovým orgánem toxicity a v nich dochází postupně k filtraci přes glomerulární bariéru, reabsorpci do proximálních tubulárních buněk a následné kumulaci v ledvinách. Díky tomuto procesu jsou ledviny považovány při dlouhodobé expozici  $Cd^{2+}$  za kritický orgán toxicity. Biologický poločas Cd-MT komplexů je krátký v porovnání s biologickým poločasem  $Cd^{2+}$  (*Nordberg et al, 2022*).

### 2.1.2 Role oxidačního stresu v mitochondriích

Oxidační stres je stav, kdy dochází k narušení rovnováhy mezi reaktivními formami kyslíku (ROS) a antioxidanty. Hlavním místem produkce ROS jsou mitochondrie, které při působení xenobiotik zvyšují jejich množství. Hlavním thiolovým antioxidantem je glutathion (GSH), který je primárním cílem pro  $Cd^{2+}$  z důvodu vysoké afinity k thiolům.  $Cd^{2+}$  není schopno v biologických systémech přímo katalyzovat redoxní reakce, ale podílí se na zvyšování koncentrace volného Fe v proteinech, a tím zvyšuje množství redoxně-aktivních kovů (*Cuypers et al, 2010*). Mnoho studií odhalilo, že intoxikace  $Cd^{2+}$



ovlivňuje mitochondriální funkci, která způsobuje narušení komplexních signálních drah, což vede ke značné produkci ROS (peroxid vodíku, hydroxylové radikály, superoxidové radikály) vyvolávající oxidační stres (Alkharashi et al, 2017; Grenchi et al, 2020). Při zvýšené produkci ROS dochází v organismech ke spuštění antioxidačních mechanismů pro minimalizování oxidačního poškození. V případě vzniku oxidačního stresu dochází k poškození proteinů a DNA, peroxidaci membránových lipidů a narušení syntézy ATP, čímž dochází k dysfunkci mitochondrií a indukci apoptózy při stresových situacích (Obr. 6) (Grenchi et al, 2020; Cuypers et al, 2010). Zároveň je  $Cd^{2+}$  schopno adherovat k mitochondriální membráně vedoucí k mitochondriální depolarizaci s následným poškozením organel. Proloužený oxidační stres v mitochondriích vyvolává apoptózu a nekrózu, která následně vede k chronickému zánětu, selháním ledvin a neurodegenerativním a kardiovaskulárním onemocněním (Alkharashi et al, 2017).



Obrázek 6: **Popis působení  $Cd^{2+}$  na buňku** (GSH: Glutathion, SOD: Superoxid dismutáza, GP: Glykoprotein), (Upraveno dle Grenchi et al, 2020).

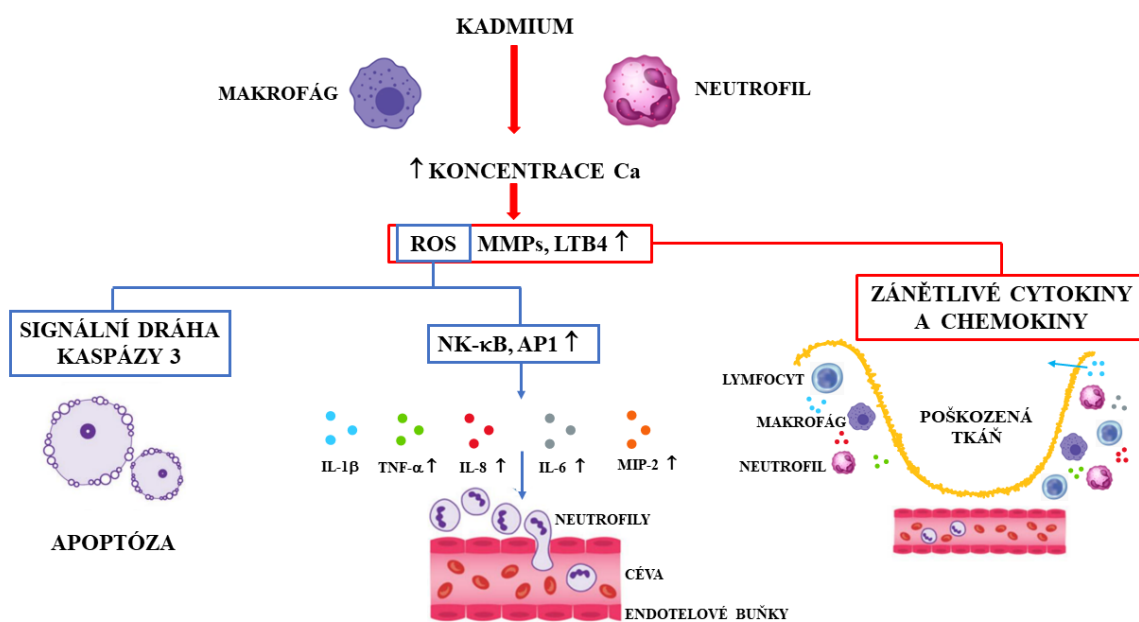
### 2.1.3 Účinky $Cd^{2+}$ na imunitní systém

Ionty Cd mají schopnost interakce s imunitními buňkami, mění jejich funkčnost a tím způsobují poškození imunitního systému. Díky tomu, že ovlivňují fagocytární kapacitu a proliferaci makrofágů, zvyšují množství neutrofilů a snižují počet NK buněk, dochází ke vzniku zánětlivé reakce. Toxicita  $Cd^{2+}$  významně zhoršuje reakci hostitele na infekci. Po vstupu  $Cd^{2+}$  do imunitní buňky má snahu obsazovat kovy-vázající proteinové domény a nahrazovat esenciální kovy v enzymech, což vede k jejich inhibici. Především zinek spolu

s  $\text{Cd}^{2+}$  vzájemně soutěží o vazebná místa na buněčných membránách a při vysokých koncentracích  $\text{Cd}^{2+}$  dochází ke snížení příjmu zinku buňkami. Díky tomu toxicita  $\text{Cd}^{2+}$  predisponuje jedince k nedostatku zinku. Hlavním rysem toxicity je apoptóza, tzn. programovaná buněčná smrt (*Theron et al, 2012; Wang et al, 2021*).

Při dlouhodobé expozici nízkým dávkám  $\text{Cd}^{2+}$  dochází k jeho akumulaci v buňkách přirozené imunity, kam zahrnujeme makrofágy, monocyty, neutrofilů, NK buňky a dendritické buňky (*Wang et al, 2021*). Přirozená imunita slouží jako první obranná linie proti infekcím a je zprostředkována výše zmíněnými buňkami a různými mechanismy, které vedou k rozpoznání tělu vlastního od nevlastního. Přirozená imunitní reakce je poměrně rychlá a působí nezávisle na dráze antigenu (*Hosseini-Khannazer et al, 2020*).  $\text{Cd}$  v oxidačním stavu  $2^+$  má podobné chemické vlastnosti jako vápník a na základě této podobnosti může vstupovat do buněk prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů. Při expozici myších makrofágů  $\text{Cd}^{2+}$  o koncentracích 20-500  $\mu\text{M}$  bylo prokázáno, že dochází ke zvyšování cytosolové koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Zároveň bylo popsáno, že expozice  $\text{Cd}^{2+}$  u buněčných linií myších makrofágů aktivuje signální intracelulární dráhu  $\text{Ca}^{2+}$ -ROS-JNK-kaspáza-3, která reguluje fosforylaci a defosforylaci c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a p38 mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) modulující mitochondriální aktivitu i proliferaci vedoucí k apoptóze. Naopak intoxikace neutrofilů způsobuje narušení antioxidační funkce, což následně vede k apoptóze a imunosupresi neutrofilů.  $\text{Cd}^{2+}$  se také podílí na škodlivých prozánětlivých a prooxidačních interakcích s makrofágy. V případě prooxidační aktivity, *Freitas et al (2010)* prokázali, že při působení  $\text{CdCl}_2$  na lidské neutrofilů dochází ke zvýšené produkci ROS, především  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{HOCl}$ . Mezi další mechanismy prooxidační aktivity zprostředkované  $\text{Cd}^{2+}$  patří: a) inhibice superoxid dismutázy; b) vyčerpání glutathionu a proteinových sulfhydrylů; c) aktivace 5-lipooxygenázy; d) oxidativní aktivace transkripčních faktorů. Vlivem vyčerpání GSH a proteinových sulfhydrylů dochází k narušení intracelulární antioxidační obrany a aktivace 5-lipooxygenázy vede ke zvýšené produkci leukotrienu B4 (LTB4), který senzibilizuje buňky pro zvýšenou aktivitu NADPH oxidázy. Naopak oxidativní aktivace transkripčních faktorů, jako je nukleární faktor kappa (NF $\kappa$ B) a aktivátorový protein 1 (AP-1) aktivují expresi genů kódujících prozánětlivé proteiny (*Theron et al, 2012; Wang et al, 2021*).

$\text{Cd}^{2+}$  způsobuje i plicní zánět a poškození, která jsou výsledkem prooxidačních interakcí kovu s alveolárními makrofágy a ostatními buňkami imunitního systému, což vede k oxidační aktivaci NF $\kappa$ B a AP-1 (Obr. 7). NF $\kappa$ B a AP-1 podporují zvýšenou syntézu interleukinů (IL-6 a IL-8) a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- $\alpha$ ) (*Theron et al, 2012*).



Obrázek 7: Prooxidační a prozánětlivé účinky Cd na neutrofile a makrofágy (ROS: Reaktivní formy kyslíku, MMPs: Matrixové metaloproteinázy, LTB4: Leukotrien B4, NFκB: Nukleární faktor kappa, AP1: Aktivátorový protein 1, IL: Interleukiny, TNF-α: Tumor nekrotizující faktor α, MIP-2: Makrofágový zánětlivý protein), (Upraveno dle Theron et al, 2012).

García–Mendoza et al (2019) uvedli, že během studie *in vitro* na myších žírných buňkách po expozici Cd<sup>2+</sup> došlo k vyčerpání GSH vedoucí k cytotoxicitě a naopak uvolňování TNF-α a IgE zprostředkované histaminem bylo intoxikací oslabeno. Z tohoto důvodu jsou při expozici Cd<sup>2+</sup> žírné buňky mnohem citlivější na působení oxidačního stresu. U myších dendritických buněk Cd<sup>2+</sup> působí jako imunosupresivum tím, že brání jejich zrání a při chronické expozici CdCl<sub>2</sub> dochází ke snížení exprese povrchových molekul histokompatibilního komplexu II. třídy a znaku CD40 (Wang et al, 2021). Cd<sup>2+</sup> také spouští mitochondriální oxidační stres v lidských monocyttech a lymfocytech. Během studie *in vitro* byla prokázána snížená životaschopnost s následnou buněčnou smrtí lymfocytů a monocytů při vysoké i nízké koncentraci Cd<sup>2+</sup>. Expozice Cd<sup>2+</sup> má vliv i na jejich jadernou morfologii, což bylo prokázáno při inkubaci s CdCl<sub>2</sub>, kde vykazovaly kondenzovaný chromatin, fragmentovaná jádra i nukleární smrštění způsobené prostřednictvím apoptózy. S apoptickou buněčnou smrtí též koreluje snížení jejich mitochondriálního membránového potenciálu, který je nezbytný pro udržení fyziologických funkcí buněk (Alkharashi et al, 2017).

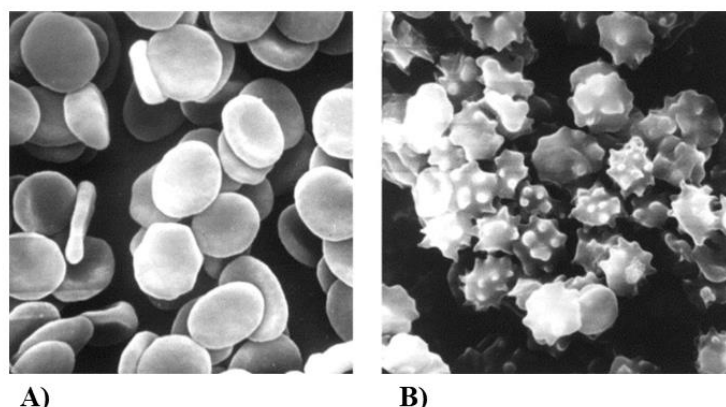
U adaptivní imunity nastává proces apoptózy u T- a B-lymfocytů. Jednotlivé podskupiny lymfocytů mají různou citlivost na expozici Cd<sup>2+</sup>. Podskupiny T-lymfocytů reagují

na apoptotické účinky podle následujícího pořadí:  $CD8^+ > CD4^- CD8^- > CD4^+ CD8^+ > CD4^+$ . Zároveň  $Cd^{2+}$  způsobuje značné zvýšení počtu lymfocytů Th17 a snížení počtu lymfocytů Th1 a Th2. U B-lymfocytů obecně těžké kovy ovlivňují buňku buď pronikáním kovů do nitra prostřednictvím  $Ca^{2+}$  kanálů typu L, nebo reakcemi s povrchovými strukturami. Dochází tedy ke značnému ovlivnění exprese povrchových antigenů a inhibice syntézy protilátek, proto  $Cd^{2+}$  může přímo ovlivňovat funkci i růst imunitních buněk (Krocova et al, 2000; Wang et al, 2021).

#### 2.1.4 Funkční a strukturální účinky kadmia na lidské erythrocyty

Nedostatek životně důležitých kovů, jako je zinek a železo, vede ke zvýšené absorpci těžkých toxických kovů do krevního řečiště.  $Cd^{2+}$  se vstřebává do krevního řečiště prostřednictvím kovových transportérů a následně způsobuje interakci  $Cd^{2+}$  s krevními a buněčnými složkami jako je GSH, lidský sérový albumin, membránové proteiny erythrocytů a intracelulární proteiny.  $Cd^{2+}$  může vyvolat změnu metabolického i antioxidantního stavu erythrocytů, zvýšit peroxidaci lipidů, vyvolat anémii nebo změnit skelet membrány (Suwalsky et al, 2004).

Prvním bodem kontaktu po expozici  $Cd^{2+}$  je buněčná membrána erythrocytů, která obsahuje proteiny, lipidy, sacharidy a vodu, přičemž lipidy savčí membrány se skládají především z fosfolipidů, sfingomyelinu a cholesterolu (Suwalsky et al, 2004). Při inkubaci erythrocytů s 1 mM  $CdCl_2$  bylo zpozorováno, že  $Cd^{2+}$  způsobuje vznik echinocytů, což je charakterizováno vznikem výčnělků na povrchu erythrocytů a tím erythrocyty ztrácejí svůj typický bikonkávní tvar. Vznik echinocytů je způsoben interakcí  $Cd^{2+}$  s vnější lipidovou dvouvrstvou, což následně vede ke zvětšení povrchu vnějšího cípu v porovnání s vnitřním cípem.  $Cd^{2+}$  tedy mění strukturu lipidové dvojvrstvy a tím ovlivňuje tekutost, která následně ovlivňuje přenosy signálů a aktivitu proteinů. Tyto morfologické změny byly zpozorovány při zvětšení 2500 x pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (Obr. 8) (Kerek et al, 2018). Zároveň  $Cd^{2+}$  inhibuje  $Na^+/K^+$ -ATPázu, což vede k porušení membrán lidských erythrocytů. Mezi molekulární mechanismy účinku  $Cd^{2+}$  na erythrocyty zahrnujeme: a) interakce s fosfolipidy v membránách; b) působení na rozhraní lipid-protein ovlivňující aktivitu iontových kanálů; c) přímá interakce s iontovými kanály nebo pumpami (Suwalsky et al, 2004).



Obrázek 8: Účinky iontů  $\text{CdCl}_2$  na morfologii lidských erytrocytů (A: neošetřené erytrocyty; B: erytrocyty inkubované s 1 mM  $\text{CdCl}_2$ ), (Převzato z Suwalsky et al, 2004).

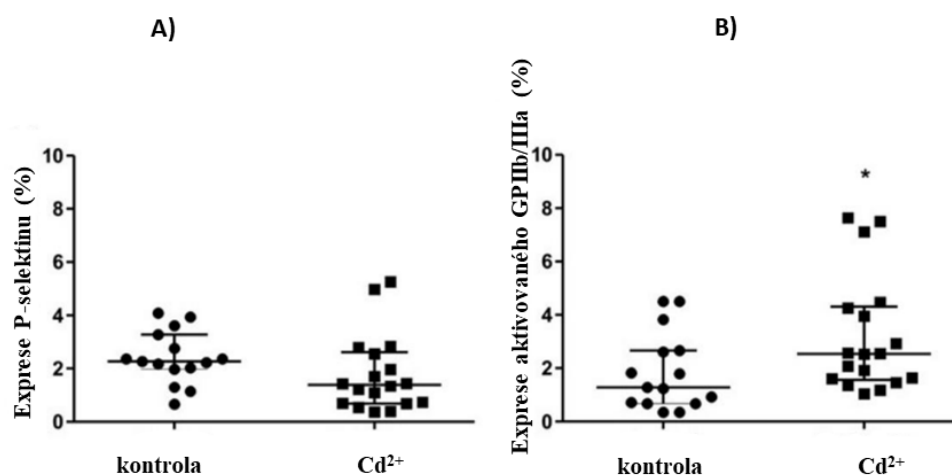
$\text{Cd}^{2+}$  také zasahuje do procesu erythropoézy. Důvodem ovlivnění erythropoézy je, že ionty Cd jsou velmi toxické pro ledviny, které jsou místem syntézy EPO stimulující tvorbu erytrocytů v kostní dřeni. Mezi mechanismy, kterými  $\text{Cd}^{2+}$  ovlivňuje erythropoézu, patří: a) akumulace železa; b) narušení syntézy hemu a s ním spojená snížená kapacita krve přenášet kyslík; c) ovlivnění produkce EPO.  $\text{Cd}^{2+}$  též ovlivňuje šířku distribuce velikosti červených krvinek, která je považována za rizikový marker kardiovaskulárních onemocnění a za indikátor anémie. Při anémii vyvolané intoxikací  $\text{Cd}^{2+}$  dochází k hemolýze způsobené deformací erytrocytů, nedostatečnému množství železa z důvodu snížené střevní absorpce a hypofunkci EPO (Horiguchi et al, 2011; Peters et al, 2021).

### 2.1.5 Zvýšená aktivace trombocytů při chronické intoxikaci $\text{Cd}^{2+}$

$\text{Cd}^{2+}$  nepříznivě ovlivňuje aktivitu trombocytů v důsledku cévního poranění nebo přímého účinku na trombocyty. Studie, která využívala lidské trombocyty, zjistila, že  $\text{Cd}^{2+}$  bylo absorbováno do trombocytů a způsobilo fosforylaci proteinů indukovanou trombinem. Trombocyty, které byly ošetřeny 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$ , měly zvýšenou peroxidaci lipidů a s tím souvisely i zvýšené hladiny malondialdehydu.  $\text{Cd}^{2+}$  též vyvolává oxidační stres v trombocytech i přesto, že je redoxně neaktivním iontem, který přímo není schopen generovat ROS. Mechanismus  $\text{Cd}^{2+}$  spočívá v tom, že se váže na SH-skupiny proteinů a zvyšuje produkci ROS nepřímo tím, že způsobuje narušení antioxidantních enzymů jako jsou kataláza, superoxiddismutáza a glutathionperoxidáza (Nontarach et al, 2016).

Během pilotní studie prováděné na ženách vystavených chronické intoxikaci  $\text{Cd}^{2+}$  bylo prokázáno, že u nich docházelo ke zvýšenému stupni aktivace krevních destiček a vzniku

zánětu. Tato aktivita byla způsobena zvýšenou expresí aktivovaného GPIIb/IIIa, zvýšením hladiny CD40 ligandu (CD40L) a P-selektinu (Obr. 9). P-selektin je glykoprotein membrány trombocytů, který je na povrch exponován po degranulaci. Následná adheze trombocytů na endoteliální buňky byla zprostředkována interakcí mezi integrinem na endoteliálních buňkách a aktivovaným GPIIb/IIIa prostřednictvím fibrinogenu. Vlivem této interakce došlo k uvolnění transmembránového proteinu CD40L z trombocytů a stimulaci zánětu v endoteliálních buňkách (Nontarach et al, 2016).



Obrázek 9: **Expres P-selektinu (A) a aGPIIb/IIIa (B) na povrchu krevních destiček v důsledku chronické expozice Cd<sup>2+</sup>** (Upraveno dle Nontarach et al, 2016).

## 2.2 Rtut'

Jedná se o toxický těžký kov vyskytující se ve 3 formách – organická (např. rtuť navázaná na methyl, ethyl, fenyl), anorganická (kovová rtuť, rtuťové páry) a elementární (kapalná a těkavá při pokojové teplotě). Jednotlivé formy se liší svým klinickým významem a biologickým chováním na základě chemických struktur (Tchounwou et al, 2012). K uvolňování Hg do atmosféry dochází z přírodních zdrojů (vulkanická činnost) a z antropologických činností (spalování odpadu, spalování uhlí, tavení). V prostředí atmosféry dochází díky chemickým reakcím k přeměně Hg na dvojmocnou formu Hg<sup>2+</sup> vázající se na částice a následnému pronikání z atmosféry do vodních zdrojů (Akkays et al, 2019). Většina expozice Hg je tedy způsobena požitím kontaminovaných ryb. Další příčinou Hg toxicity je uvolňování Hg ze zubních amalgámů, které vede ke chronické expozici s nízkou hladinou Hg u lidí. Sloučeniny rtuti mají i uplatnění ve výrobě fluorescenčních žárovek, případně v krémech na odstranění pih, kde HgCl<sub>2</sub> nevratně inhibuje tyrosin, který je důležitý při tvorbě melaninu. V elektrochemickém průmyslu se Hg využívá pro výrobu termostátů a spínačů. V neposlední

řadě případnými zdroji intoxikace mohou být například teploměry a baterie. Dříve byla rtuť přítomna i v některých farmaceutických léčích, dezinfekčních prostředcích, nebo jako fungicid na ochranu rostlin (*Tchounwou et al, 2012*).

Při vdechování elementární rtuti v podobě par je jejich vstřebávání umožněno přes sliznice a plíce s následnou oxidací, kde cílovým orgánem je mozek (*Baladi-Mood et al, 2021*). Tyto páry mají vysokou afinitu k sulfhydrylovým skupinám, díky čemuž se vážou na AMK obsahující síru. Naopak methylrtuť, která je absorbována ve střevech, se ukládá do tkání a neprochází v takovém množství přes hematoencefalitickou bariéru jako rtuť elementární. V případě solí rtuti, které jsou poměrně stabilní, nerozpustné a obtížně vstřebatelné, jsou cílovým orgánem ledviny a střevní buňky (*Baladi-Mood et al, 2021*).

Intoxikace jednotlivých forem se projevuje typickými symptomy. Expozice elementární Hg je spojena s dušností, kašlem, horečkou, halucinacemi a zánětem dásní (*Berlin et al, 2015*). V případě organické Hg jsou typickými projevy hluchota, slepota, mentální retardace či dětská obrna především u dětí exponovaných *in utero*. Anorganická Hg způsobuje nespavost, erytém, neuropsychické poruchy, či ztrátu hmotnosti. U intoxikace nízké koncentrace dochází ke vzniku oxidačního stresu, buněčné cytotoxicitě a zvýšení koncentrace  $\beta$ -amyloidu, což vede k neurodegenerativním poruchám u dospělých jedinců, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba (*Wu et al, 2016*).

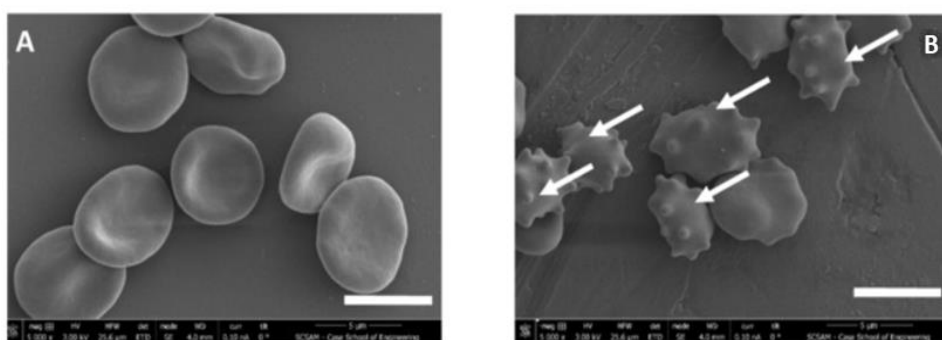
### **2.2.1 Mechanismus toxicity Hg**

Mechanismus toxicity rtuti závisí na mnoha faktorech, jako je délka expozice, dávka, forma Hg nebo individuální citlivost daného jedince (*Wu et al, 2016*). Rtuť má obecně poměrně vysokou afinitu k sulfhydrylovým (SH) skupinám a reaguje s thioley, včetně GSH a kyseliny alfa-lipoové, čímž dochází k narušení metabolické rovnováhy a antioxidačního obranného systému. V případě vazby Hg na proteiny obsahující selen dochází k inhibici glutathionperoxidázy a zhoršení oxidačního stresu vlivem zabránění obnovy intracelulární redoxní rovnováhy. Při reakcích s cysteinovými zbytky je Hg schopna reagovat s buněčnými proteiny a tím inhibovat a měnit strukturální či enzymatické funkce proteinů vedoucí k dysfunkcím buněčné aktivity. Především byla popsána inhibice aktivity glykolytického enzymu hexokinázy a fosfofruktokinázy a modifikace membránových proteinů včetně erytrocytárního proužku 3 a tubulinu. Dalším mechanismem je rtuť indukovaná dysfunkce mitochondrií ovlivňující aktivitu ATP-syntázy, která způsobuje defekty transportu elektronů a oxidativní fosforylaci vedoucí ke zvýšené produkci ROS, a tím k narušení redoxní

homeostázy (Notariale et al, 2021). Nadměrné množství ROS poškozuje nukleové kyseliny, enzymy, lipidy, případně vede ke smrti buněk (Wu et al, 2016). Vyjma toho je u mitochondrií možným cílem Hg toxicity karnitinový transportér. Toxicita Hg též způsobuje zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  z důvodu zvýšení mobilizace intracelulárních rezerv, ale i zvýšení influxu  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostředí, což zapříčiní aktivaci endonukleáz, lipáz a proteáz. V neposlední řadě Hg uplatňuje svůj mechanismus toxicity v podobě snížené hladiny oxidu dusnatého, kdy jeho nedostatek spolu s oxidačním stresem může vést ke vzniku infarktu myokardu, ischemickým chorobám srdce, či hypertenzi. Doprovodnými mechanismy jsou snížená migrace a proliferace endoteliálních buněk, podpora agregace trombocytů, aktivace faktoru XIII a koagulačních drah. Zároveň nedávné výzkumy poukazují i na hematologické účinky při expozici rtuť, včetně lymfocytózy, lymfopenie, bazofilie, neutrofilie a anémie v důsledku hemolýzy a ztrát krve z gastrointestinální sliznice (Notariale et al, 2021).

### 2.2.2 Působení rtuť na erythrocyty

Hg se přednostně hromadí v erythrocytech a tím způsobuje zvýšení prokoagulačních aktivit erythrocytů a zároveň vyvolává jejich morfologické změny (Ahmad et al, 2019). Tyto morfologické změny byly zpozorovány během studie *in vitro* při  $\text{HgCl}_2$  expozici pomocí skenovací elektronové mikroskopie při zvětšení 5000 x. Konkrétně erythrocyty ošetřené  $0,5 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  po dobu 24 hodin při pokojové teplotě se projevovaly ztrátou bikonkávního tvaru a vykazovaly tvar echinocytů (Obr. 10) (Akkaya et al, 2019).

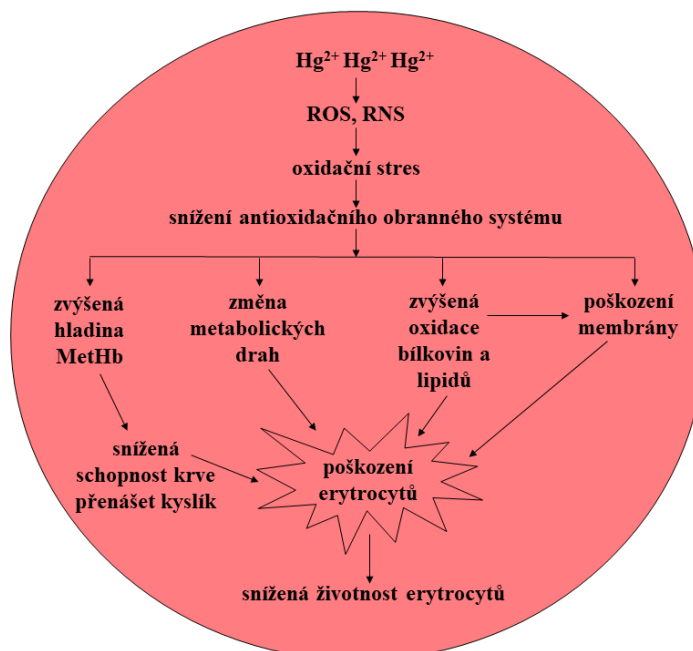


Obrázek 10: (A) Snímky normálních erythrocytů, (B)  $\text{HgCl}_2$  ošetřených erythrocytů (Měřítko představuje délku  $5 \mu\text{m}$ ), (Převzato z Akkaya et al, 2019).

Ionty  $\text{Hg}^{2+}$  po vstupu do erythrocytů způsobují produkci ROS a RNS vyvolávající oxidační stres. ROS/RNS oxidují hemoglobin vzhledem k jeho hojnosti v erythrocytech na methemoglobin (MetHb). Během studie bylo zjištěno, že při inkubaci erythrocytů s  $5 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  byla hladina MetHb téměř dvojnásobná. MetHb funguje jako neaktivní přenašeč kyslíku

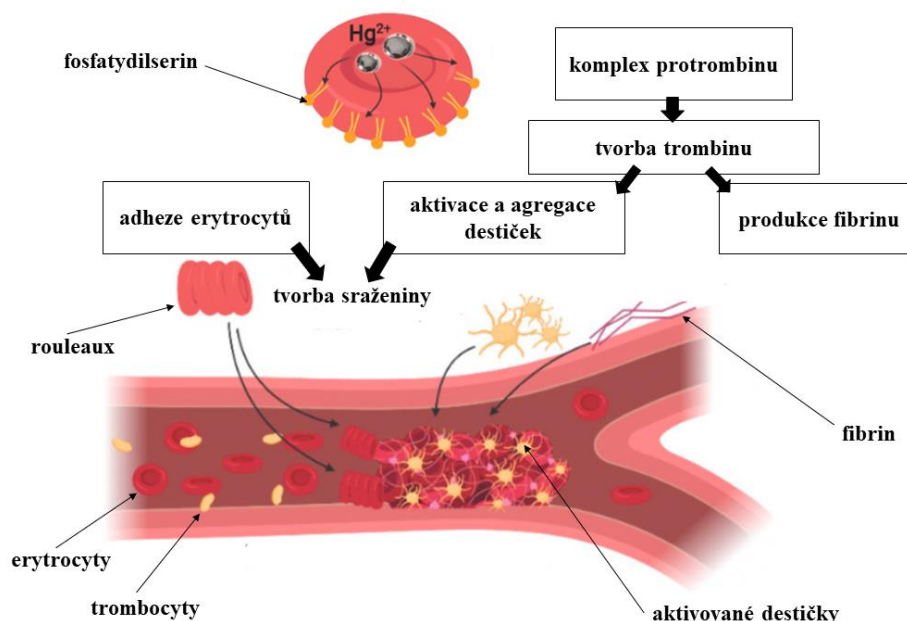


a jeho zvýšené hodnoty snižují schopnost erytrocytů přenášek kyslík z plic do tkání a následně vede k hypoxickému stavu. Zároveň vzniklé ROS v erytrocytech jsou schopny z poškozených buněk unikat a tím vyvolat oxidační poškození v jiných buňkách, které jsou v kontaktu s cirkulující krví. Krev slouží jako antioxidant a je hlavním médiem pro detoxikaci vzniklých ROS/RNS v buňkách přicházejících do styku s krví. V případě snížené antioxidační ochrany erytrocytů dochází ke snížené schopnosti krve zhášet ROS/RNS, což způsobuje zvýšenou peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů, které poškozují buněčnou membránu. Také dráhy metabolismu glukózy jsou působením  $\text{Hg}^{2+}$  inhibovány.  $\text{HgCl}_2$  inhibuje obě cesty metabolismu glukózy v erytrocytech, hexózamonofosfátový zkrat a glykolýzu, prostřednictvím snížení aktivity jejich markerových enzymů. Aktivity prvního enzymu hexokinázy a posledního enzymu pyruvátkinázy, byly při ošetření erytrocytů s  $\text{HgCl}_2$  významně sníženy. Protože erytrocyty postrádají mitochondrie, je glykolýza jediným zdrojem ATP. Na základě inhibice dráhy metabolismu glukózy, dochází vlivem zbavování buňky ATP ke snižování energetické hladiny. Nedostatek ATP následně činí buňky zranitelnějšími vůči oxidačnímu poškození. Všechny tyto zmíněné události vedou k oxidačnímu poškození erytrocytů, které jsou rychle odstraněny z oběhu, především slezinou a odstranění poškozených erytrocytů vede ke zkrácení jejich životnosti (Obr. 11). Takto vzniklá snížená životnost erytrocytů vede k anémii, která je typickou komplikací při expozici  $\text{Hg}^{2+}$  (Ahmad et al, 2019).



Obrázek 11: Schematické znázornění toxicity  $\text{HgCl}_2$  vedoucí ke stavu oxidačního stresu v lidských erytrocytech (ROS: Reaktivní formy kyslíku, RNS: Reaktivní formy dusíku), (Ahmad et al, 2019).

Vzniklý oxidační stres popisovaný výše má vliv i na endoteliální buňky. Hlavní nevýhodou endoteliálních buněk je jejich citlivost na oxidační stres. Oxidační stres vyvolává zprvu endoteliální zánět, a poté dysfunkci endotelu s následným vznikem aterosklerózy nebo trombofilní diatézy. Z mnoha studií bylo zjištěno, že pracovníci, kteří jsou vystaveni parám Hg, mají 20x vyšší koncentraci tohoto kovu v krvi než v krevní plazmě, díky tomu, že erythrocyty jsou preferenčním místem pro kumulaci Hg. Při endoteliální dysfunkci tedy hrají poměrně velkou roli právě erythrocyty a jejich expozice fosfatidylserinu (PS) na vnější straně buněčné membrány. Deplece SH skupin zprostředkována Hg způsobuje inhibici flipázy a aktivaci skramblázy, čímž se zvyšuje exprese adheze proteinu na vnějším povrchu buňky a produkce trombinu. Erythrocyty nesoucí PS poskytují místo pro vznik protrombinázového komplexu vedoucího ke tvorbě trombinu a tím je stimulována koagulační kaskáda už při nízkých dávkách  $\text{Hg}^{2+}$  (Obr. 12) (Notariale et al, 2021). Mezi další protrombotické faktory červených krvinek patří změny v jejich membránových proteinech, proteinech cytoskeletu a proužku 3. Především modifikace těchto proteinů způsobuje morfologické změny a tvorbu mikrovezikul (MV) (Notariale et al, 2022).



Obrázek 12:  $\text{Hg}^{2+}$ -indukovaná prokoagulační aktivita v erythrocytech (Upraveno dle Notariale et al, 2021).

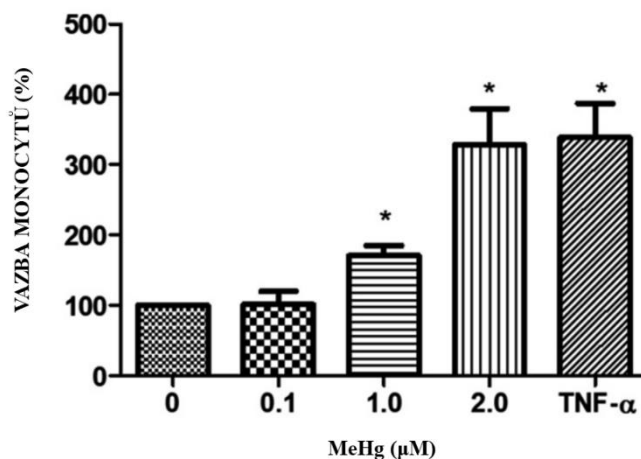
Hg má také velmi dobrou schopnost se vázat s GSH a MT, což hraje klíčovou roli při udržování integrity erythrocytů, energetické rovnováhy a zvýšeného množství  $\text{Ca}^{2+}$ . Všechny tyto změny vedou ke zvýšené křehkosti membrány erythrocytů a uvolňování MV. Z toho důvodu

se erythrocyty považují za přispěvatele ke zvýšení trombotických příhod, které jsou spojené s intoxikací Hg (*Notariale et al, 2021*).

### 2.2.3 Methylrtuť jako spouštěč endoteliální adheze leukocytů

Methylrtuť (MeHg) představuje největší riziko pro lidské zdraví. Anorganická rtuť se z průmyslu uvolňuje do ovzduší, ze kterého se vlivem srážek dostává do řek a rybníků. Ve vodách řek a rybníků následně přebírají roli bakterie, které pohltí rtuť a prostřednictvím procesu biometylace přeměňují toxin na MeHg. MeHg se poté prostřednictvím potravního řetězce dostává od bakterií, přes planktony a menší ryby až do větších ryb. Díky této postupné kumulaci MeHg v rybách se stává rizikovým faktorem pro lidi (*Fowler et al, 2021*).

Během *in vitro* studie bylo prokázáno, že MeHg hraje významnou roli v adhezi monocytů k lidským mikrovaskulárním endoteliálním buňkám a zároveň způsobuje zvýšenou expresi některých prozánětlivých cytokinů a adhezivních molekul. Výše zmíněná adheze monocytů k endoteliálním buňkám cév je iniciačním krokem ke vzniku aterosklerózy a následnému kardiovaskulárnímu onemocnění. Na základě vazby těchto buněk na endoteliální výstelku je podporována jejich migrace do subendoteliálního prostoru s následnou diferenciací v makrofágy vlivem stimulace monocytárního chemoatraktivního proteinu-1 (MCP-1). Tyto makrofágy vychytávají okolní buňky, než se následně přemění na pěnové makrofágy, které hrají významnou roli v raném stádiu tvorby aterosklerotických lézí. Významné zvýšení exprese chemotaktických a zánětlivých cytokinů včetně intracelulární adhezivní molekuly-1 (ICAM-1), IL-6, IL-8 a MCP-1 vedou též ke zvýšené adhezi a vazbě monocytů. Konkrétně hladiny ICAM-1 zprostředkovávají adhezi imunitních buněk k endoteliálním buňkám, MCP-1 umožňuje vazbu na CC chemokinové receptory migrujících monocytů a indukuje jejich diferenciaci na makrofágy. Interleukiny se zapojují do zánětlivých reakcí, které mohou následně vést k destrukci cév. Výsledkem této studie tedy bylo (Obr. 13), že při ošetření lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk koncentracemi 2,0  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$  MeHg po dobu 4 hodin buňky vykazovaly významné 3,4x a 1,7x zvýšení adheze monocytů ve srovnání s kontrolními buňkami kultivovanými pouze v médiu bez MeHg. Jako pozitivní kontrola byl použit TNF- $\alpha$  promotor vazby monocytů, který indukoval významné 3,4x zvýšení adheze monocytů (*Fowler et al, 2021*).



Obrázek 13: Ošetření lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk MeHg vykazující zvýšení adheze monocytů (TNF- $\alpha$ : Tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ), (Upraveno dle Fowler *et al.*, 2021).

## 2.2 Olovo

Olovo je velmi toxický, stříbrný, perzistentní kov, který neplní žádné biologické funkce (Jaishankar *et al.*, 2014). I přesto, že se přirozeně vyskytuje v malém množství v zemské kůře, průmyslová činnost, jako je těžba či spalování fosilních paliv, způsobují jeho uvolňování do prostředí ve vysokých koncentracích (Tchounwou *et al.*, 2012). Vlivem spalování fosilních paliv dochází k uvolňování Pb, které se ukládá do rostlin a následně do podzemních vod. Díky tomuto procesu jsou potraviny a pitná voda považovány za hlavní zdroj expozice u populace. Mezi další zdroje patří: kouření, olovené vodovodní potrubí, akumulátory, střeliva, ale i barvy na bázi olova. Tyto barvy jsou považovány za zdravotní hrozbu intoxikace u dětí v USA a projevují se změnou v chování, poruchou učení nebo snížením IQ (Jaishankar *et al.*, 2014; Gillis *et al.*, 2012). Naopak intoxikace u mužů vede ke snížení počtu spermií a u žen ke spontánním potratům (Tchounwou *et al.*, 2012).

Obecně k expozici Pb dochází především prostřednictvím gastrointestinálního a dýchacího traktu. Vstřebávání pokožkou u anorganického olova je zanedbatelné, ale na druhou stranu organické sloučeniny díky rozpustnosti v lipidech se snadno absorbují i přes neporušenou pokožku (Staudinger *et al.*, 1998). Do krevního řečiště se poté dostává okolo 35 % vdechovaného Pb, které se po vstřebání zadržuje v krvi 30-35 dnů a během následujících 4-5 týdnů se hromadí v zubech, mozku, plicích, játrech nebo kůře nadledvin (Jaishankar *et al.*, 2014; Gillis *et al.*, 2012). Naopak při dlouhodobých chronických expozicích se značné množství olova ukládá do kostí, kde nahrazuje vápník v kostní matici. Biologický poločas olova

v kostech je okolo 20-30 let. Jeho vyučování z těla je pomalé a tím snadno dochází ke kumulaci v těle (*Staudinger et al, 1998*).

Při nadměrné expozici Pb na pracovištích po krátké době dochází k akutním otravám anorganickým olovem. Tyto expozice často způsobují únavu, zácpy, dysfunkce centrálního nervového systému, bolesti hlavy nebo zvracení a vyvolávají poškození ledvin a mozku. Chronická toxicita se projevuje bolestí hlavy, ztrátou libida, impotencí, depresemi a má nepříznivé účinky na krevní tlak a metabolismus vitamínu D (*Staudinger et al, 1998; Tchounwou et al, 2012*).

### **2.3.1 Mechanismus toxicity olova**

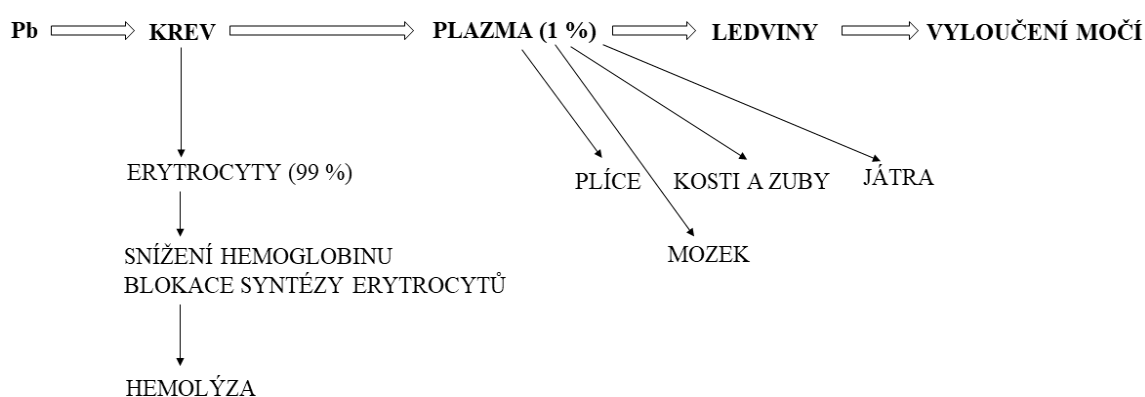
Olovo má schopnost napodobit nebo inhibovat účinky vápníku a zároveň interagovat s proteiny (*Tchounwou et al, 2012*). Dalším mechanismem je stimulace kalmodulinu a cAMP fosfodiesterázy, čímž zvyšuje v synaptických váčcích fosforylaci proteinu zprostředkovanou kalmodulinem (*Gonick, 2011*). Stejně jako u ostatních těžkých kovů, i olovo vyvolává oxidační stres. Mezi nežádoucí účinky patří nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku, ale na druhou stranu i vyčerpání zásob antioxidantů. Na základě inhibice dehydrogenázy kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (ALAD) olovem dochází ke zvýšení hladin kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (ALA) v erythrocytech, která stimuluje produkci ROS. Olovo inhibuje biosyntézu hemu a způsobuje bazofilní tečkování, anémii, zvýšení močového koproporfyrinu a erythrocytárního zinku protoporfyrinu (*Gillis et al, 2012; Jangid et al, 2012*).

### **2.3.2 Vliv Pb na krevní elementy a hematopoézu**

Primární cestou pracovní expozice Pb je především inhalace. Následně je Pb absorbováno a vstupuje do krevního oběhu. Po akutní intoxikaci je 99 % Pb akumulováno v erythrocytech, kde způsobuje narušení jejich funkcí a 1 % zůstává v plazmě (Obr. 14) s biologickým poločasem 28 dní (*Ray, 2016*).

Při intoxikaci Pb dochází k morfologickým změnám erythrocytů především na echinocytární formy vlivem zvýšené propustnosti membrány a celkovému přeuspořádání membránových lipidů. *Jang et al (2011)* během studie našli, že erythrocyty jedinců vystavených Pb vykazovaly anizocytózu a výraznou hypochromázii i polychromázii. Zároveň mnoho erythrocytů mělo bazofilní tečkování tvořené inkluzemi agregovaných ribozomů, často

napodobujících Heinzova tělíska nebo dokonce retikulocyty. Hlavním výsledkem intoxikace Pb je anémie způsobená zvýšenou destrukcí krevních buněk a poškozením biosyntézy hemu. Pb je schopno urychlit sekvestraci erytrocytů ve slezině díky expozici PS na jejich povrchu a následně zvýšit erytrofagocytózu prostřednictvím makrofágů. Pb zároveň zhoršuje biosyntézu hemu vlivem inhibice dehydrogenázy kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (ALAD), která je nezbytnou součástí v biosyntéze hemu (Ray, 2016). ALAD je enzym obsahující zinek, který katalyzuje druhý krok syntézy hemu, konkrétně katalyzuje kondenzaci 2 molekul kyseliny  $\delta$ -aminolevulové na 1 molekulu porfobilinogenu (Briffa et al, 2020).



Obrázek 14: Cesta možného vstupu Pb do živočišného systému (Upraveno dle Ray, 2016).

V případě trombocytů způsobuje vysoká hladina Pb inhibici agregace vlivem vysoké citlivosti membrány na oxidační stres (Ray, 2016). Aktivace proteinkinázy C, snížení hladin NO, poškození endotelu nebo zvýšená hladina inhibitoru aktivátoru plazminogenu-1 jsou možnými mechanismy, kterými Pb může ovlivňovat střední objem trombocytů (MPV) a objemovou variabilitu trombocytů (PDW). MPV udává průměrnou velikost trombocytů a slouží jako indikátor zánětu a trombózy, naopak PDW je specifickým markerem aktivace destiček. Dobrakowski et al (2016) během studie na pracovnících, kteří byli vystaveni olovu po krátkou dobu, prokázali zvýšenou hladinu růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (PDGF AB/BB) a snížení PDW a MPV. Naopak u chronicky exponovaných pracovníků byly zpozorovány zvýšené hodnoty MPV a snížené PDW. Důležité je poznamenat, že počty trombocytů se mezi těmito skupinami nelišily. Z tohoto plyne, že vliv Pb na parametry trombocytů je závislý na délce expozice a výsledky této studie poukazují, že při chronické expozici dochází ke zvýšené megakaryopoéze (Chwalba et al, 2018).

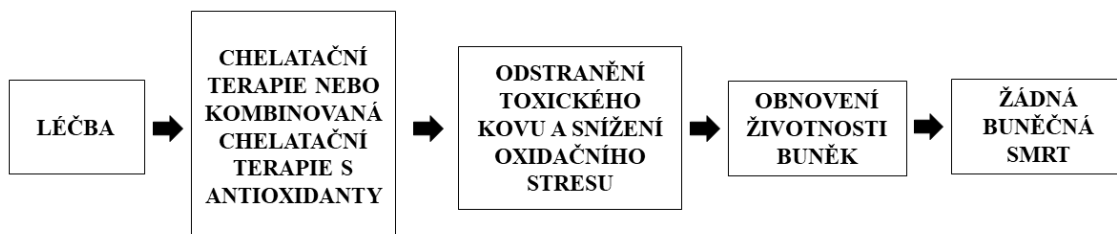
Pb nepůsobí pouze na krevní elementy jako takové, ale zasahuje i do procesu jejich vzniku. Do studie bylo zapojeno 37 mužů pracovně vystavených Pb po dobu 36-44 dnů. Pracovníci byli vystaveny poměrně vysokým dávkám, protože nedodržovali bezpečnost a správně nepoužívali ochranné pomůcky. Výsledky poukazují, že při krátkodobé expozici Pb dochází ke snížení několika hladin faktorů, které ovlivňují hematopoézu. Koncentrace SCF, jako kritického faktoru v hematopoéze zvyšující diferenciaci, proliferaci a přežití hematopoetických linií, byla snížena o 25 %. Zároveň také došlo k významnému poklesu koncentrace G-CSF a bylo prokázáno, že růstový faktor hepatocytů, PDGF AB/BB a adhezní molekula 1 endoteliálních buněk krevních destiček (PECAM-1) vykazovaly též snížené hladiny (*Chwalba et al, 2018; Dobrakowski et al, 2016*).

### 3. LÉČBA A SNÍŽENÍ TOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ

Chelatační terapie je primární léčbou intoxikace těžkými kovy. Během chelatace dochází k navázání iontů/molekul ligandu na centrální atom/iont kovu pomocí koordinačních vazeb v cyklické struktuře. Ligand obsahuje dva nebo více atomů, které jsou schopny poskytnout pár elektronů k vytvoření kovalentní vazby s atomem/iontem kovu (*Kim et al, 2019*). Mezi atomy donoru elektronů v daném chelatačním činidle patří síra, dusík a kyslík. Rozhodujícími vlastnostmi chelatačního činidla pro mobilizaci daného kovu z tkáně je vysoká afinita k toxickému kovu. Kromě toho hraje důležitou roli i penetrace chelátoru do tkáňových kovových usazenin a rychlé odstranění chelátu močí (*Aaseth et al, 2018*). Ionty olova a rtuti mají vyšší afinitu k síře a dusíku než ke kyslíkovým ligandům, zatímco pro vápník je tomu naopak. Proto tyto rozdíly v afinitě jsou základním principem výběru chelatačních činidel. V některých případech se chelatační terapie kombinuje i s antioxidanty pro zvýšení účinnosti daného chelátoru. Cílem této terapie je následné odstranění toxického kovu a snížení oxidačního stresu, aby nedocházelo ke smrti buněk (Obr. 15) (*Kim et al, 2019*). Důležité je zmínit, že tato chelatační terapie by měla být využívána u onemocnění, která přímo souvisejí s toxicitou kovů, protože nevhodný výběr chelatačních činidel může mít nepříznivé zdravotní účinky (*Aaseth et al, 2018*).

Mezi ideální chelatační činidla patří chemicky netoxické a inertní komplexy s atomy/ionty kovů. Tato činidla jsou snadno vylučována z těla bez jakékoliv další interakce s životně důležitými orgány a jsou schopna vstupovat do buněčných membrán a odstraňovat

toxické kovy. Zároveň mají větší afinitu k toxickým kovům než ke kovům pro tělo vlastní (*Kim et al, 2019*). Příklady používaných chelatačních činidel jsou Dimercaprol (BAL),  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ , Penicilamin nebo Acetyl-penicilamin (*Aaseth et al, 2018*).



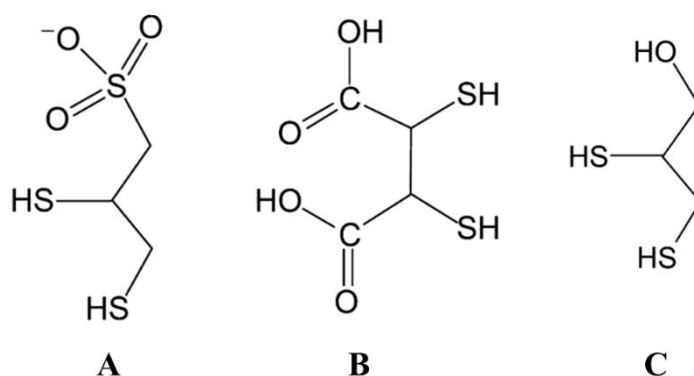
Obrázek 15: Průběh chelatační terapie (*Upraveno dle Kim et al, 2019*).

### 3.1 Chelatační terapie při jednotlivých intoxikacích

Při intoxikaci Hg se využívají chelatační činidla, jako je kyselina meso-dimerkaptojantarová (DMSA) a 2,3-dimerkapt-1-propansulfonát (DMPS), která účinně odstraňují rtuť ledvinami. Obě činidla jsou podávána orálně a mají nižší toxicitu, než BAL. Hlavním rozdílem mezi DMSA a DMPS je, že DMSA lépe odstraňuje MeHg z oblasti mozku, zatímco DMPS účinně odstraňuje MeHg z ledvin (*Kim et al, 2019*). Monoterapie DMSA nebo DMPS je využívána pouze u středně těžkých akutních otrav rtutí nebo olovem. Naopak při těžkých otravách anorganickou nebo elementární rtutí se využívá kombinace DMPS-BAL (*Aaseth et al, 2018*).

Mezi využívaná chelatační činidla při intoxikaci Pb patří Dimercaprol a  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ . Dimercaprol známý také pod názvem *British anti-Lewisite* (BAL) obsahuje dvě sulfhydrylové skupiny a jednu skupinu hydroxylovou (Obr. 16). BAL se běžně používá pro olovo, ale i pro rtuť. K chelataci dochází prostřednictvím vazby atomu kovu/iontu s thiolovou skupinou a následně vzniká stabilní komplex kov-ligand, který se později vylučuje prostřednictvím ledvin. Reakcí BAL s  $\text{Pb}^{2+}$  dochází ke vzniku stabilního 5-členného komplexu (*Aaseth et al, 2018*).  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$  se využívá především k léčbě otravy olovem, kdy atom vápníku této sloučeniny je nahrazen kovovými ionty za vzniku ve vodě rozpustného komplexu. V případě monoterapie za použití  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$  dochází k odstranění pouze extracelulární Pb, proto se  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$  používá v kombinaci s nízkou dávkou BAL, aby se jejich účinnost zvýšila (*Kim et al, 2019*).





Obrázek 16: **Strukturní vzorce chelatačních činidel: DMPS (A), DMSA (B), BAL (C),** (Aaseth et al, 2018).

U intoxikace  $\text{Cd}^{2+}$  se k léčbě využívá EDTA, DMPS a DMSA. Při studiích na zvířatech bylo prokázáno, že DMSA odstraňuje  $\text{Cd}^{2+}$  účinněji než DMPS. Na druhou stranu *in vivo* i *in vitro* studie naznačují, že EDTA má mnohem lepší účinnost než DMSA při mobilizaci intracelulárního Cd a pro vyšší účinnost je EDTA kombinována s antioxidanty, konkrétně s GSH, který chrání před nefrotoxicitou (Kim et al, 2019).

### 3.2 Výsledky a nežádoucí účinky chelatační terapie

Dosavadní studie poukazují, že za úspěšnou léčbou při otravě těžkými kovy stojí kombinace více chelátorů najednou. Jejich principem je, že lipofilní činidlo mobilizuje kov z intracelulárních zásob a dále se o vyloučení kovů stará hydrofilní chelátor (Aaseth et al, 2018). Tato terapie způsobuje i nežádoucí účinky. Mezi běžné nežádoucí účinky nejčastěji patří nevolnost, bolest hlavy, zvracení, bolest svalů, gastrointestinální potíže nebo horečka. Naopak mezi závažné nežádoucí účinky se řadí poškození ledvin, nízká hladina vápníku v krvi, srdeční selhání nebo dýchací potíže. Zároveň je nezbytné, aby během léčby byla dodávána vhodná dávka léků v pravidelných intervalech, protože vysoké dávky mohou způsobit snížení hladin esenciálních kovů (Kim et al, 2019).

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo popsat vliv těžkých kovů, jako je kadmium, rtuť a olovo na krevní elementy. Tyto těžké kovy jsou velmi rozšířené v životním prostředí vlivem průmyslové a antropogenní činnosti a mají toxické účinky na životně důležité orgány jako jsou ledviny, játra, kosti, ale zároveň ovlivňují imunitní a hematopoetický systém.

Kadmium je poměrně toxický kov způsobující především dysfunkci ledvin, které jsou hlavním místem syntézy EPO stimulující erythropoézu v kostní dřeni. U zralých erytrocytů  $\text{Cd}^{2+}$  způsobuje změny v antioxidačních stavech, vyvolává anémii a mění morfologické struktury z bikonkávního tvaru na tvar echinocytů. Při interakci s buňkami imunitního systému ovlivňuje proliferaci makrofágů, fagocytární kapacitu, zvyšuje množství neutrofilů a vede ke vzniku zánětlivé reakce. V případě intoxikace rtuťí, ionty  $\text{Hg}^{2+}$  po vstupu do erytrocytů způsobují produkci ROS a RNS, které vyvolávají oxidační stres a snižují funkci antioxidačního obranného systému. Tyto kroky následně vedou ke zvýšené hladině MetHb, změnám metabolických drah a poškození membrán vedoucí k poškození erytrocytů a jejich snížení životnosti. Důležitým poznatkem při intoxikaci rtuťí je, že se stejně jako olovo, přednostně hromadí v erytrocytech a způsobuje jejich značné prokoagulační aktivity. U intoxikace Pb jsou hlavním cílem erytrocyty. Pb způsobuje destrukci krevních buněk a poškození biosyntézy hemu, což následně vede k anémii. Při studiích bylo prokázáno, že Pb také zasahuje do procesu hematopoézy vlivem snížení nejdůležitějších faktorů, jako jsou SCF, G-CSF, PDGF AB/BB nebo PECAM-1.

Za úspěšnou léčbu při intoxikaci těžkými kovy je považována chelatační léčba za použití kombinace více chelátorů najednou. Tyto chelatační činidla je potřeba dodávat v pravidelných intervalech a koncentracích, protože jejich vysoké dávky by mohly způsobit nežádoucí účinky, jako je snížení hladin důležitých esenciálních kovů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aaseth J., Ajsuvakova O. P., Skalny A. V., et al. Chelator combination as therapeutic strategy in mercury and lead poisonings. *Coordination Chemistry Reviews*. **2018**, 358, 1-12.
2. Ahmad S., Mahmood R. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: Enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. *Environmental Science and Pollution Research*. **2019**, 26(6), 5645-5657.
3. Akkaya B., Kucukal E., Little J. A., et al. Mercury leads to abnormal red blood cell adhesion to laminin mediated by membrane sulfatides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. **2019**, 1861(6), 1162-1171.
4. Alkharashi N. A. O., Periasamy V. S., Athinarayanan J., et al. Cadmium triggers mitochondrial oxidative stress in human peripheral blood lymphocytes and monocytes: Analysis using in vitro and system toxicology approaches, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **2017**, 42, 117-128.
5. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., et al. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic.: *Frontiers in Pharmacology*. **2021**, 12, 1663-9812.
6. Berlin M., Zalups K. Z., Flower B. A. Mercury. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. **2015**, 4(2), 1013-1075.
7. Briffa J., Sinagra E., Blundell R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*. **2020**, 6(9), 1-26.
8. Chwalba A., Maksym B., Dobrakowski M., et al. The effect of occupational chronic lead exposure on the complete blood count and the levels of selected hematopoietic cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2018**, 355, 174-179.
9. Cuypers A., Plusquin M., Remans T., et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. **2010**, 23, 927-940.
10. Durak D., Kalender S., Uzun F. G., et al. Mercury chloride-induced oxidative stress in human erythrocytes and the effect of vitamins C and E in vitro. *African Journal of Biotechnology*. **2010**, 9(4), 488-495.
11. Dobrakowski M., Boroń M., Czuba Z. P., et al. Blood morphology and the levels of selected cytokines related to hematopoiesis in occupational short-term exposure to lead. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2016**, 305, 111-117.

12. Ebrahimi M., Khalili N., Razi S., et al. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression. *J Environ Health Sci Engineer.* **2020**, 18, 335–343.
13. Fowler J., Tsui M. T., Chavez J., et al. Methyl mercury triggers endothelial leukocyte adhesion and increases expression of cell adhesion molecules and chemokines. *Experimental Biology and Medicine.* **2021**, 246(23), 2522-2532.
14. Gaballa M., Ramos C. A. Overview of Normal Hematopoiesis. *Handbook of Benign Hematology.* **2019**, 1, 1-22.
15. Genchi G., Sinicropi M. S., Lauria G., et al. The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* **2020**, 17(11), 1660-4601.
16. Gillis B. S., Arbieva Z., Gavin I. M. Analysis of lead toxicity in human cells. *BMC Genomics.* **2012**, 13(1), 1471-2164.
17. Gonick H. Lead-Binding Proteins: A Review. *Journal of Toxicology.* **2011**, 1, 1-10.
18. Horiguchi H., Oguma E., Kayama F. Cadmium Induces Anemia through Interdependent Progress of Hemolysis. Body Iron Accumulation, and Insufficient Erythropoietin Production in Rats. *Toxicological Sciences.* **2011**, 122 (1), 198-210.
19. Hossein-Khannazer N., Azizi G., Eslami S., et al. The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* **2020**, 42(1), 1-8.
20. Humphry E., Armstrong C. E. Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine.* **2022**, 23(2), 118-122.
21. Jagannathan-Bogdan M., Zon L. I. Hematopoiesis. *Development.* **2013**, 140(12), 2463-2467.
22. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology.* **2014**, 7(2), 60-72.
23. Jangid A. P., John P. J., Yadav D., et al. Impact of Chronic Lead Exposure on Selected Biological Markers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* **2012**, 27(1), 83-89.
24. Kerek E., Hassanin M., Prenner E. J. Inorganic mercury and cadmium induce rigidity in eukaryotic lipid extracts while mercury also ruptures red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* **2018**, 1860(3), 710-717.
25. Kim J.-J., Kim Y.-S., Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* **2019**, 54, 226-231.
26. Klinken S. P. Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **2002**, 34(12), 1513-1518.
27. Krocova Z., Macela A., Kroca M., et al. The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicology in Vitro.* **2000**, 14(1), 33-40.

28. Kumar A., D'souza S.S., Thakur A.S. Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Stem Cells International*. **2019**, 13, 1-13.
29. Matović V., Buha A., Đukić-Ćosić D., et al. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys, *Food and Chemical Toxicology*. **2015**, 78, 130-140.
30. Minors D. S. Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. **2004**, 5(5), 174-178.
31. Nontarach A., Srihirun S., Chaturapanich G., et al. Increased platelet activation in subjects chronically exposed to cadmium: A pilot study. *Platelets*. **2016**, 7(1), 1369-1635.
32. Nordberg M., Nordberg G.F. Metallothionein and Cadmium Toxicology—Historical Review and Commentary. *Biomolecules*. **2022**, 12(3), 360.
33. Notariale R., Infantino R., Palazzo E., et al. Erythrocytes as a Model for Heavy Metal-Related Vascular Dysfunction: The Protective Effect of Dietary Components. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(12), 1-18.
34. Notariale R., Längst E., Perrone P., et al. Effect of Mercury on Membrane Proteins, Anionic Transport and Cell Morphology in Human Erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*. **2022**, 56, 500-513.
35. Peters J. L., Perry M. J., McNeely E., et al. The association of cadmium and lead exposures with red cell distribution width. *Plos one*. **2021**, 16(1), 1-15.
36. Ray R. R. Haemotoxic Effect of Lead: *Proceedings of the Zoological Society*. **2016**, 69(2), 161-172.
37. Sas-Nowosielska H., Pawlas N. Heavy metals in the cell nukleus – role in pathogenesis. *Acta Biochimica Polonica*. **2015**, 62(1), 7-13.
38. Singh R., Gautam N., Mishra A., et al. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*. **2011**, 43(3), 246-253.
39. Staudinger K. C., Roth V. S. Occupational lead poisoning. *American family physician*. **1998**, 57(4), 719-726.
40. Suwalsky M., Villena F., Norris B., et al. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2004**, 98(6), 1061-1066.
41. Szalai G., LaRue A. C., Watson D. K. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2006**, 63(21), 2460-2476.
42. Tchounwou P.B., Yedjou C. G., Patlolla A. K., et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. **2012**, 101, 133-164.

43. Theron A., Tintinger G., Anderson R. Harmful Interactions of Non-Essential Heavy Metals with Cells of the Innate Immune System. *Journal of Clinical Toxicology*. **2012**, 3(1), 1-10.
44. Thon J. N., Italiano J. E. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. *Handbook of Experimental Pharmacology*. **2012**, 210, 3-22.
45. Wang Z., Ying S., Wenbo Y., et al. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. *Frontiers in Immunology*. **2021**, 12, 1664-3224.
46. Wu X., Cobbina S. J., Mao G., et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*. **2016**, 23, 8244-8259.
47. Zivot A., Lipton J. M., Narla A., et al. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine*. **2018**, 24(1), 1076-1551.