

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nefrotoxicita těžkých kovů

Barbora Štursová

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Nephrotoxicity of heavy metals

Barbora Štursová

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Štursová**
Osobní číslo: **C15283**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Nefrotoxicita těžkých kovů**
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) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na nefrotoxické působení těžkých kovů. První část textu bakalářské práce věnujte charakterizaci skupiny těžkých kovů, jmenujte ty nejvýznamnější z nich a shrňte jejich obecné nežádoucí účinky na lidské zdraví.
- 2) Dále se zaměřte zejména na kadmium, rtuť a olovo a popište toxické působení těchto kovů. U kadmia shrňte mechanismy jeho nefrotoxického působení a porovnejte je s mechanismy nefrotoxického působení rtuti. Následně uveďte nejčastěji využívané buněčné modely pro testování nefrotoxického působení těchto vybraných těžkých kovů a charakterizujte jejich využití a limity (např. buněčné linie HK-2, LLC-PK1, aj.)
- 3) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

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. Jiří Handl

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

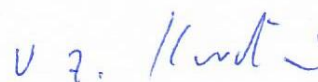
Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci 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., 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 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Barbora Štursová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Handlovi za odborné vedení, trpělivost a vstřícnost při zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za trpělivost, podporu a pomoc po dobu mého studia.

Anotace

V úvodu práce jsou stručně charakterizovány těžké kovy a jejich vliv na životní prostředí. Hlavní část textu je zaměřena na kadmium, rtuť a olovo, u kterých jsou popsány způsoby expozice, mechanismy transportů do buněk a toxické účinky na organismy. Těžké kovy patří mezi silně nefrotoxické látky ovlivňující funkci a stavbu ledvin. Nefrotoxické působení těžkých kovů lze sledovat pomocí *in vivo* či *in vitro* studií. V práci jsou stručně zmíněny *in vitro* způsoby testování nefrotoxicity se zaměřením na vhodné buněčné linie. Nejpoužívanější buněčnou linií jsou HK-2 buňky, pocházející z ledvin zdravého dospělého člověka. Často se používají při zjišťování mechanismu nefrotoxického působení cizorodých látek na funkci ledvin, mechanismu transportu cizorodých látek do ledvinných buněk a při identifikaci transportérů zapojujících se do přenosu cizorodých látek v ledvinách. Mezi další lidské buněčné linie často používané při výzkumu nefrotoxicity patří například RPTEC/TERT1 buněčná linie. Dále jsou ve výzkumu hojně využívány i zvířecí buněčné linie NRK-52E, JTC-12, WKPT, OK, LLC-PK1 a MDCK, které jsou v práci také zmíněny.

Klíčová slova

nefrotoxicita, kadmium, rtuť, olovo, buněčné linie

Annotation

I briefly summarized heavy metals and their influence on the environment in this thesis introduction. The main part of this thesis is focused on cadmium, lead and mercury. By these elements are described ways of exposition, transport mechanisms to cells and toxic effects to organism. Heavy metals are highly nephrotoxic substances that affect kidney function and structure. The nephrotoxic effect of heavy metals can be monitored by *in vivo* or *in vitro* studies. *In vitro* methods in this thesis are mentioned in the context of nephrotoxicity testing focus on a suitable cell line. The most widely used cell line is HK-2 cell line. HK-2 cells come from kidneys of a healthy adult person. They are often used to detect of the mechanism of nephrotoxic effect of strange substances on kidney function, the transport mechanism of strange substances in kidney cells, and to identification of transporters involved in the transfer of strange substances in kidneys. Other human cell lines used mainly in nephrotoxicity research include for example, RPTEC/TERT1 cell lines. Furthermore, the animal cell lines NRK-52E, JTC-12, WKPT, OK, LLC-PK1 and MDCK, which are also mentioned in this thesis, are widely used.

Keywords

Nephrotoxicity, Cadmium, Mercury, Lead, Cell lines

Obsah

Úvod.....	13
1 Těžké kovy.....	14
1.1 Kadmium	15
1.1.1 Expozice.....	17
1.1.2 Vylučování.....	18
1.1.3 Toxicita	18
1.1.4 Metalothionein	19
1.1.5 Vliv Cd na enterocyty.....	19
1.1.6 Vliv Cd na játra	21
1.1.7 Vliv Cd na nervovou soustavu.....	23
1.1.8 Vliv Cd na kosti	23
1.1.9 Vliv Cd na těhotenství.....	23
1.2 Rtuť	24
1.2.1 Expozice.....	25
1.2.2 Vylučování.....	26
1.2.3 Vliv Hg na enterocyty.....	26
1.2.4 Vliv Hg na játra	27
1.2.5 Vliv Hg na nervovou soustavu.....	28
1.2.6 Vliv Hg na plodnost, těhotenství a dětský vývoj.....	28
1.2.7 Vliv Hg na erytrocyty	29
1.2.8 Vliv Hg na imunitní systém	29
1.3 Olovo.....	30
1.3.1 Expozice.....	31
1.3.2 Toxicita	32
1.3.3 Vliv Pb na těhotenství a dětský vývoj	33

1.3.4	Vliv Pb na krevní obraz	34
1.3.5	Vliv Pb na kosti	34
1.3.6	Vliv Pb na nervový systém	36
2	Nefrotoxicita	39
2.1	Kadmium	39
2.2	Rtuť	42
2.3	Olovo	43
2.4	Porovnání toxicity kadmia, olova a rtuti	44
3	Testování nefrotoxického působení	45
3.1	Testování <i>in vivo</i>	45
3.2	Testování <i>in vitro</i>	45
3.3	Nejpoužívanější zvířecí buněčné linie	45
3.4	Nejpoužívanější lidské buněčné linie	47
4	Závěr	50
	Seznam použité literatury	51

Seznam použitých zkratek

3,4-MDA	3,4-metylendioxyamfetamin
4-HNE	4-hydroxynon-2-enal
ALAD/ALAD-1/ALAD-2	Dehydratáza aminolevulové kyseliny/ Dehydratáza aminolevulové kyseliny 1/ Dehydratáza aminolevulové kyseliny 2
Alb	Albumin
ALT	Alaninaminotransferáza
BAX protein	Pro-apoptický protein z rodiny Bcl-2 regulující propustnost vnější mitochondriální membrány
BUN	Močovinový dusík v krvi
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
Cd-Alb	Komplex Cd a Albuminu
Cd-Mt	Komplex Cd a Metalothioneinu
cMOAT	Kanalikulární multispecifický organický aniontový transportér 1
CNS	Centrální nervový systém
Cys	Cystein
CysGly	Cysteinyglycin
DMT1	Transportér dvojmocných iontů 1
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
ERY	Erytrocyty
Fer1	Feritin
GGT	Gama-glutamyltransferáza
GIT	Gastrointestinální trakt
GR	Glutathionreduktáza
GSH	Glutathion
GSSG	Disulfid glutathionu
Hcy	Homocystein
HMW	Proteiny s vysokou molekulovou hmotností
hTERT	Lidská telomerázová reverzní transkriptáza
hZTL1	Lidský zinkem regulovatelný transportér zinku 1

IL-8	Interleukin-8
KIM-1	Molekula poškození ledvin 1
LAT 1/LAT 2	L transportér aminokyselin 1/ L transportér aminokyselin 2
LDH	Laktátdehydrogenáza
LMW	Proteiny s nízkou molekulovou hmotností
MDA	Malondialdehyd
Mt/Mt1/ Mt2	Metalothionein/Metalothionein1/Metalothionein2
MTP-1/MTP-2	Transportní protein kovů 1/ Transportní protein kovů 2
NAC	N-acetyl cystein
NAG	N-acetyl-beta-D-glukózaminidáza
NF – κB	Jaderný faktor κB
NK buňky	Natural killer buňky
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NO	Oxid dusnatý
OAT	Transportér organických aniontů
OATP	Polypeptid transportující organické anionty
OCT	Transportér organických kationtů
RBP	Retinol vázající protein
R-Cd-R	Konjugát Cd^{2+} s proteiny obsahujícími -SH skupinu
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutáza
Tf	Transferin
TMP	Tetramethylpyrazin
UCd	Kadmium v moči
Vit. D	Vitamín D
ZnT/ZnT-1/ZnT-2	Transportér zinku/Transportér zinku 1/ Transportér zinku 2
α-GST /GST	α-Glutathion S-transferáza/ Glutathion S-transferáza

Úvod

Těžké kovy jsou stopové prvky značně znečišťující životní prostředí. Díky vysokému poločasu rozpadu a schopnosti ukládat se do organismů dochází k jejich akumulaci v přírodě. Mezi nejvýznamnější škodlivé těžké kovy patří kadmium, rtuť a olovo. Jejich množství v přírodě se zvyšuje činnostmi člověka, mezi které řadíme kouření, spalování fosilních paliv, těžbu rud, výrobu autobaterií a řadu dalších výrobních procesů. Příjem kovů živými organismy je ovlivněn faktory jako je míra okolního znečištění a doba expozice, druh organismu, pH a teplota. U rostlin se pak dále jedná o množství organické složky v půdě a formu přítomného dusíku.

Nejčastějším způsobem intoxikace těžkými kovy je požití kontaminovaných potravin, vdechnutí kontaminovaných částic nebo jejich případný vstup skrze kůži z kosmetických přípravků obsahujících jejich stopové množství. Při intoxikaci organismu dochází k ovlivnění funkce řady orgánů a systémů. Ovlivněna je funkce ledvin, jater, centrálního nervového systému, periferního nervového systému, imunitního systému a růstu. Také jejich vlivem dochází ke změně krevního obrazu, ke snížení plodnosti u žen i mužů, k ovlivnění vývoje a růstu plodu a dětí, k ovlivnění vývoje a růstu kostí. Těžké kovy jsou navíc prokazatelně karcinogenní a teratogenní. Důležitým mechanismem toxického působení těžkých kovů jsou iontové mimikry, kdy ionty těchto kovů napodobují dvoumocné endogenní ionty důležité pro správnou funkci organismu, váží se na jejich vazebná místa a ovlivňují procesy uvnitř buněk.

Pro studium nefrotoxického působení těchto kovů se využívají studie *in vivo* i *in vitro*. U *in vivo* studií se využívají laboratorní zvířata nebo dochází k pozorování lidských jedinců s pracovní expozicí vybraným těžkým kovům. Výhodou těchto studií je, že výsledky pocházejí z komplexních, před intoxikací správně fungujících organismů. U *in vitro* studií se nejčastěji využívají kultivační buněčné linie, u kterých je přesně definované prostředí a koncentrace roztoků, které jsou jim aplikovány. Výsledky získané *in vitro* jsou důležité, protože u buněčných linií nedochází k ovlivnění funkce činností jiného systému a je tak možné zjistit funkce buněk jako takových. Nejčastěji užívanou buněčnou linií jsou HK-2 buňky, jejichž největší výhodou je jejich původu z dospělých lidských ledvinných epitelových buněk proximálních tubulů. Při vhodné kultivaci mají HK-2 buňky zachovaný fenotyp a další vlastnosti lidských tubulárních buněk.

1 Těžké kovy

Za těžké kovy považujeme obecně kovy s hustotou vyšší než 5 g.cm^{-3} (Víden, 2005). Většina z nich je řazena mezi stopové prvky. Jako stopový můžeme označit ten prvek, jehož koncentrace nepřesahuje 250 pg na gram matrice. Stopové prvky můžeme rozdělit do tří skupin, a to na prvky esenciální, prvky potenciálně esenciální, jejichž esenciální role u člověka nebyla dosud jednoznačně doložena, třetí skupinou jsou pak prvky potenciálně toxické a toxické. Přesto, že je prvek řazen mezi potenciálně toxické, může být ve velmi malých dávkách pro organismus důležitý. Tato skutečnost se projevuje při snížení jeho příjmu pod určitou hranici, kdy následně dojde ke snížení důležité fyziologické funkce. Například pokud je prvek součástí organické struktury plnicí v organismu životně důležitou funkci, snížením jeho příjmu se sníží její exprese. Esenciálními prvky jsou jod (I), zinek (Zn), selen (Se), měď (Cu), molybden (Mo), železo (Fe) a chrom (Cr). Mezi potenciálně esenciální řadíme mangan (Mn), křemík (Si), nikl (Ni), bor (B), fluor (F) a vanad (V). Do skupiny stopových prvků toxických a potenciálně toxických pak řadíme olovo (Pb), kadmium (Cd), rtuť (Hg), arsen (As), hliník (Al), lithium (Li) a cín (Sn) (WHO, 1996).

Těžké kovy jsou velmi významné kontaminanty životního prostředí s tendencí akumulovat se v živých organismech. Znečištění životního prostředí těžkými kovy způsobují převážně antropogenní zdroje, mezi které patří spalování fosilních paliv (Li a kol., 2016) a hutnictví (Henderson a kol., 1998). Těžké kovy jsou schopné vertikální i horizontální migrace. Vertikální migrace znamená, že prostupují zemskou půdou do hloubky, a to dle následující posloupnosti $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Cu}$. Poměrně vysoká migrační schopnost se projevuje i u niklu. Nejvyšší koncentrace těchto kovů byla naměřena do hloubky jednoho metru, při hloubce vyšší jak jeden metr, se migrační schopnost snižuje. Tento typ migrace výrazně ohrožuje podzemní vody. Horizontální migrace těžkých kovů vede ke znečištění prostředí v okolí jejich zdroje. Nejvyšší horizontální migrační schopnost je prokázána u Cr, naopak nejnižší u Cu. Snadno mobilizovatelnými prvky jsou Zn, Cr a Pb. Zároveň jsou tyto kovy ve srovnání s jinými těžkými kovy stabilní v anaerobních podmínkách, avšak labilní v podmínkách aerobních. Míra kontaminace prostředí a migrační schopnosti těžkých kovů nejsou závislé na jejich koncentraci v půdě díky různé toxicitě jednotlivých prvků. Díky této skutečnosti některé těžké kovy i při nízkých koncentracích výrazně znečišťují své okolí (Zhang a kol., 2018; Kim a kol., 2015).

Stopové prvky, řadící se mezi těžké kovy, jsou schopné pronikat z vnějšího prostředí do živých organismů (*Miao a kol., 2005*). Ve tkáních se těžké kovy ukládají v závislosti na typu tkáně a kovu. Koncentrace kadmia ve svalové tkáni ryb je při porovnání s koncentrací kadmia v rybích játrech nižší. Množství uloženého kadmia závisí též na druhu organismu. Některé organismy mají vyšší schopnost akumulace znečišťujících kovů než jiné (*Storelli a kol., 2005*). Roku 2005 provedl *Miao a kol.* studii toxického účinku Cd, Cu a Zn na mořské řasy, ve které bylo prokázáno, že těžké kovy ovlivňují růst daných řas. Při stoupající koncentraci těžkých kovů v prostředí docházelo k poklesu růstu pozorovaných řas. Tento pokles nastal ve chvíli, kdy koncentrace těžkých kovů v jejich okolí dosáhla prahové hodnoty. Podobně se, se zvyšující koncentrací v okolí, zvyšovala koncentrace kovů uvnitř buněk. Tím byla potvrzena schopnost těžkých kovů akumulovat se v živých organismech. Bioakumulační schopnost Cu a Zn je srovnatelná. Z uvedených kovů byl nejméně toxický zinek, vzhledem k vysoké koncentraci jeho volných iontů v okolí buněk bez jejich viditelných změn. Naopak koncentrace kadmia při prvotní pozorované změně buněk byla poměrně nízká, tedy kadmium je výrazně toxické již při malých koncentracích (*Miao a kol., 2005*).

Obecně lze říci, že těžké kovy mají na zdraví člověka velmi negativní vliv. Na lidský organismus působí nefrotoxicky (*Barbier a kol., 2005*), hepatotoxicky (*Sarmiento-Ortega a kol., 2017; Shaikh a kol., 1999*), neurotoxicky (*Branca a kol., 2018*), karcinogenně (*Il'yasova a Schwartz, 2005*) a imunotoxicky (*Contrino a kol., 1988*), dále ovlivňují fertilitu (*Wang a kol., 2016; Zahir a kol., 2005*), vývoj plodu u těhotných žen (*Zahir a kol., 2005*) a stavbu kostí (*Staessen a kol., 1999*).

1.1 Kadmium

Kadmium je spolu se svými sloučeninami látkou znečišťující životní prostředí (*Guo a kol., 2018*). V přírodě se v malé míře přirozeně vyskytuje v sulfidických rudách spolu s olovem a zinkem (*WHO, 2011*). Vlivem činnosti člověka se jeho ložiska v přírodě zvětšují. Zvýšené množství Cd v půdě je způsobeno jeho ukládáním z atmosféry, používáním fosfátových hnojiv s určitým obsahem Cd a sedimentací kalů v odpadních vodách (*Jönsson a kol., 2013*). Zvýšený obsah v půdě způsobuje vstup prvku do rostlin. Tento vstup je ovlivněn řadou faktorů (*Wang a kol., 2017*). Důležitá je velikost biologicky dostupné frakce, jež je definována jako část Cd v půdě,

kteřá může být absorbována rostlinami a půdními organismy (Kim a kol., 2015). Při snížení pH půdy je vstup Cd do rostlin usnadněn (Wang a kol., 2017). Například optimální pH, pro vstup kadmia do kořenového systému brambor, je 6,5. Dalším faktorem ovlivňujícím vstup kadmia do rostliny, jsou sloučeniny dusíku použité jako hnojivo. Pokud je v půdě přítomný dusík ve formě dusitanů, je vstup kadmia do kořene vyšší, než když je přítomen ve formě amonných solí (Jönsson a kol., 2013). Biologická dostupnost Cd, je rovněž ovlivněna množstvím organických látek v půdě. Jejich zvýšené množství snižuje příjem Cd organismy (Pauget a kol., 2011).

Známou metodou odstraňování Cd z půdy je fytořemediace, která využívá k odstranění Cd z půdy rostliny s vysokou absorpční kapacitou. Nevýhodou této metody je délka trvání, jelikož během procesu dekontaminace nemůže být zemědělská půda využívána (Mori a kol., 2016). Pokud je kontaminovaná půda zemědělsky využívána, vyprodukované plodiny jsou rovněž kontaminované. Následné zpracování těchto produktů v potravinářském průmyslu a jejich konzumace lidmi způsobuje intoxikaci jejich organismů. Například u ústřic bylo zjištěno, že při pozření částice Fe₂O₃, u které došlo k sorpci kadmia z vody, dojde vlivem kyselého prostředí ve střevech k jeho desorpci (McConchie a kol., 1991; Munksgaard a kol., 2017).

Poté, co je organismus intoxikován kadmíem, může jeho transport do buněk probíhat několika mechanismy. Prvním je endocytóza komplexů Cd²⁺ a transportních proteinů, jako je albumin (Cd-Alb) nebo metalothionein (Cd-Mt). Dalším může být transport pomocí membránových transportérů, kdy Cd²⁺ tvoří koordinačně kovalentní komplexy s nízkomolekulárními biomolekulami obsahujícími thiolovou skupinu. Mezi takové biomolekuly patří glutathion (GSH) a cystein (Cys). Vzniklé komplexy jsou následně přeneseny pomocí membránových transportérů do buněk. Posledním známým mechanismem jsou iontové mimikry, kdy má ion Cd²⁺ schopnost chovat se jako jiné dvojmocné ionty (např.: Zn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺) a navázat se na jim určená vazebná místa membránových proteinů, popřípadě vstupovat do buňky prostřednictvím membránových kanálů těchto iontů (Bridges a Zalups, 2005). Důležitou skutečností je, že kadmium v komplexu s metalothioneinem (Mt) nemá na buňky významný toxický vliv, avšak volné kadmium ve formě iontu je pro ně kriticky toxické (Prozialeck a Edwards, 2012).

1.1.1 Expozice

Expozice člověka kadmium je vysoká. Dochází k ní, jak již bylo zmíněno výše, hlavně požíváním kontaminovaných potravin či doplňků stravy obsahujících kadmium (*Abernethy a kol., 2010*). Hlavním zdrojem Cd jsou kontaminované ryby, obiloviny, ořechy a zelenina (*Quraishi a kol., 2016*). Rovněž se vyskytuje v potravinách, k jejichž výrobě se používají již zmíněné kontaminované plodiny, například v cereálních tyčinkách, chlebu či kojenecké výživě (*Jean a kol., 2018*). Další možností intoxikace je aktivním či pasivním vdechování cigaretového kouře (*Satarug a Moor, 2004*) a výfukových plynů (*Sánchez-Martín a kol., 2000*), případně pití znečištěné vody (*WHO, 2011; Grau-Perez a kol., 2017*). U kuřáků je tedy hlavním způsobem intoxikace vdechování cigaretového kouře. Při kouření dochází k absorpci až 50 % Cd obsaženého v cigaretovém kouři. Porovnáním krevního kadmia kuřáků a nekuřáků bylo zjištěno, že u kuřáků je hladina 4-5x vyšší (*Widziewicz a Loska, 2016; Elinder a kol., 1976; Godt a kol., 2006*).

Doba, za kterou se projeví patologické stavy, závisí na denní dávce, která může v kontaminovaných oblastech dosáhnout hodnoty až několik set μg . Při expozici potravou 140-260 μg Cd denně, se například dysfunkce ledvin projeví přibližně za 50 let. Pokud dochází k expozici inhalací v prostředí obsahujícím 50 μg Cd / m^3 , ledvinná dysfunkce se projeví do 10 let. Z toho vyplývá, že absorpce v gastrointestinálním traktu (GIT) je nižší než absorpce v plicích. Absorpci v GIT ovlivňují dva hlavní faktory, strava a stav zásob živin v organismu. Důležité jsou především zásoby a příjem Fe. Při nedostatku Fe se množství absorbovaného Cd zvyšuje. Za běžných podmínek lze přijmout od 1 do 20 % Cd ve stravě, v průměru se jedná o 5 % Cd z celkového množství ve stravě. Vdechováním může organismus absorbovat 30-50 % vdechovaného množství Cd. V plicích je z dávky ukládáno jen 10 %. Přesné množství je ovlivněno velikostí částic Cd a rozpustností Cd v organických látkách (*WHO, 1996; Prozialeck a Edwards, 2012; Satarug a Moor, 2004; IPCS, 1992*). Při intoxikaci inhalací dochází ke vdechování částic prachu o různém průměru, na jejichž povrchu jsou nasorbovány těžké kovy. Karcinogenní vliv těchto částic je ovlivněn jejich množstvím v prostoru, dobou expozice, hmotností jedince a opět také jejich velikostí. Vyšší riziko vzniku karcinomu s sebou nese vdechování jemných částic, které se ukládají ve větší míře v dolních cestách dýchacích. Částice hrubého charakteru jsou deponovány v horních cestách dýchacích.

Nejrizikovější věkovou skupinou pro intoxikaci touto cestou jsou děti (Widziewicz a Loska, 2016; Elinder a kol., 1976; Godt a kol., 2006).

V prvních třech letech života je míra hromadění Cd v organismu nižší než v letech následujících. Během této doby se v těle naakumulují 4 % z celkového množství Cd, jež se v průměru nahromadí v organismu za celý život. Tělesná zátěž dětí činí jednu třetinu až jednu polovinu tělesné zátěže dospělých. Celkové množství Cd naakumulovaného za život je z větší části nahromaděno v dospělosti (Jean a kol., 2018; IPCS 1992).

1.1.2 Vylučování

Významná část Cd je z těla vylučována močí (Morales a kol., 2006). Zanedbatelná část Cd se vylučuje i potem (Sears a kol., 2012), mlékem během kojení a stolicí. Množství Cd ve stolici lze brát jako ukazatel denního příjmu kadmia potravou v případě, že nedochází k další expozici inhalací (IPCS, 1992).

1.1.3 Toxicita

Při dlouhodobém vdechování kadmia může dojít k obstrukčním onemocněním dýchacích cest. U vysoké hladiny expozice dýcháním dochází k akutní pneumonitidě doprovázené plicním edémem, po které může následovat smrt (WHO, 2010).

Přibližně polovina tělesné zátěže kadmiiem je uložena v játrech a ledvinách (IPCS, 1992). Hlavním místem akumulace kadmia v těle jsou ledviny, kde je jeho biologický poločas 10-35 let (WHO, 2010). Určitá část Cd vyskytujícího se v krevním řečišti se ukládá do erytrocytů (ERY). Jeho plazmatická koncentrace je nízká (IPCS, 1992). Hladina Cd v plné krvi je při chronické expozici ukazatelem nedávné expozice. Po ukončení expozice tato hladina odráží množství Cd deponovaného v organismu. Krevní Cd lze rozdělit do dvou skupin lišících se délkou biologického poločasu. První skupina má krátký biologický poločas 75-130 dní, druhá se vyznačuje dlouhým biologickým poločasem 7-16 let (Jin a kol., 2002).

Na počátku intoxikace ion Cd^{2+} ovlivňuje procesy předcházející nekróze a apoptóze proximálních tubulárních buněk. Konkrétně se jedná o změny adhezivních vlastností proximálních tubulárních buněk zprostředkovaných kadherinem, změny v buněčné signální kaskádě a u buněčných autofagických procesů. Nicméně apoptóze podléhá méně jak 5 % buněk proximálního tubulu. Zbytek buněk je Cd neovlivněný, nebo u nich dochází k autofagickým opravám doprovázeným

proliferací. Cd ovlivňuje mezibuněčné spoje zprostředkované E-kadherinem, N-kadherinem i VE-kadherinem. Kadherin patří mezi transmembránové proteiny. Extracelulární konec obsahuje vazebná místa pro Ca^{2+} ionty a oblasti umožňující adhezi. Intracelulárně se vyskytující konec se váže na β -katenin, ten je napojen na α -katenin, který se váže na cytoskelet. V proximálním tubulu jsou epitelové buňky pospojovány díky N-kadherinu, jehož množství se vlivem Cd^{2+} snižuje. Snížení exprese mRNA pro N-kadherin je pozorováno až po 12 týdnech. Vzhledem k tomu, že změny lokalizace N-kadherinu v tubulární buněčné membráně jsou patrné již po šesti týdnech, prvotní účinek Cd^{2+} je přímo na N-kadherin nebo na reakční dráhy ovlivňující jeho funkci. V důsledku jeho úbytku se mění lokalizace Na^+/K^+ -ATPázy. Běžně se vyskytuje na membráně proximální tubulární buňky na bazolaterální straně, účinkem Cd^{2+} se lokalizace Na^+/K^+ -ATPázy mění na celý povrch buňky proximálního tubulu. Při ztrátě N-kadherinu z buněčné membrány dojde k nahromadění α -kateninu v buněčném jádře a k částečné aktivaci exprese genů regulovaných β -kateninem. (Prozialeck a Edwards, 2012).

U jedinců vystavených Cd byla také pozorována vyšší četnost výskytu rakoviny ledvin (Il'yasova a Schwartz; 2005), plic (Elinder a kol., 1985) varlat a prostaty (Goyer a kol., 2004). U pacientů, u kterých bylo detekováno Cd v moči, byla pozorována vyšší četnost výskytu kardiovaskulárních onemocnění (Tellez-Plaza a kol., 2013).

1.1.4 Metalothionein

Míra exprese Mt je ovlivněna znečištěním okolí a okolní teplotou. S rostoucí hodnotou okolního znečištění a okolní teploty dochází k jejímu zvýšení (Rorat a kol., 2017). U těhotných žen přítomnost Cd ovlivňuje metalothionein1 (Mt1) mRNA a metalothionein2 (Mt2) mRNA v játrech matky a v placentě. Při krátkodobém vystavení Cd je množství Mt1 a Mt2 mRNA v játrech matky zvýšeno. V placentě je zvýšeno množství Mt2 mRNA, u placentární mRNA ke změně množství nedochází. Při chronické expozici Cd dochází ke zvýšení množství Mt2 mRNA v játrech (Wang a kol., 2016).

1.1.5 Vliv Cd na enterocyty

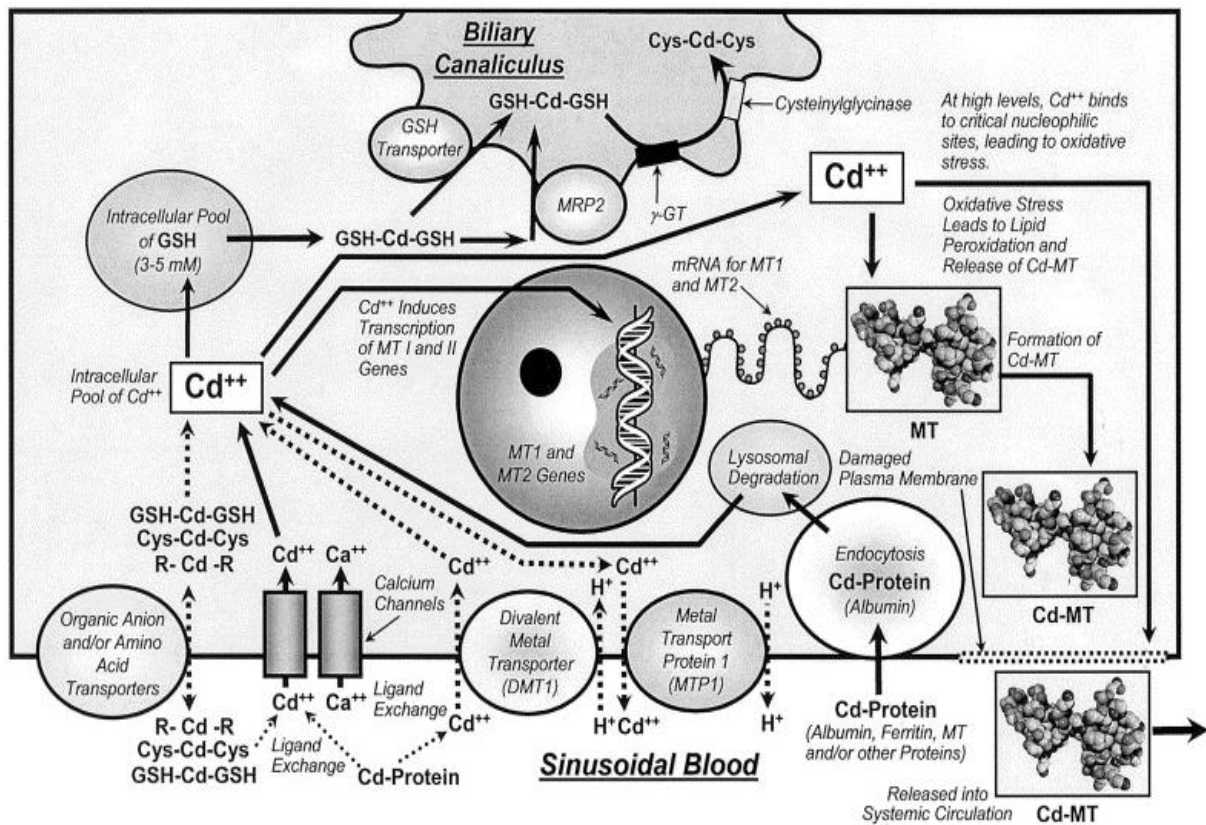
Z kontaminované potravy se Cd^{2+} vstřebává v duodenu a proximálním jejunu. V luminální cytoplazmatické membráně enterocytů se nachází dvojmocný kovový transportér 1 (DMT1), který umožňuje transport Fe^{2+} z potravy do buněk. Díky iontové

podobnosti Fe^{2+} a Cd^{2+} dochází k vstřebávání Cd^{2+} do enterocytů prostřednictvím DMT1. Cd^{2+} se ve střevě váže na nukleofilní místa aminokyselinových a proteinových ligandů. Pokud se tento komplex dostane do blízkosti nukleofilnějšího ligandu, dojde k disociaci a uvolnění Cd^{2+} a jeho navázání na membránový transportér. Kromě DMT1 je významným transportérem umožňujícím transport Cd^{2+} lidský zinkem regulovaný zinkový transportér 1 (hZTL1). Cd^{2+} je schopen chovat se také jako Zn^{2+} a vázat se na jemu určená vazebná místa na transportérech. Stejně tak se Cd^{2+} může chovat jako Ca^{2+} a procházet do buněk pomocí Ca^{2+} kanálů. Většina Cd^{2+} přijatá enterocyty přes lumenální plazmatickou membránu je vázána na aminokyselinový či peptidový ligand. Z enterocytů je ion Cd^{2+} transportován pomocí transportéru zinku 1 (ZnT-1). Na bazolaterální plazmatické membráně enterocytů se vyskytuje Ca-ATPáza, která se podílí na transportu Cd^{2+} z enterocytů do krevního oběhu. Díky schopnosti Cd^{2+} chovat se jako Ca^{2+} je Cd^{2+} kompetitivním inhibitorem Ca-ATPázy (*Bridges a Zalups, 2005*).

Množství Cd absorbovaného v enterocytech je závislé na délce expozice a na koncentraci Cd, jemuž byly vystaveny. Vlivem působení nízkých hladin Cd může docházet ke zvýšení proliferace buněk. Pokud Cd působí ve vyšších koncentracích, dochází ke snížení životaschopnosti buněk. Při jejich vystavení koncentraci $20\mu\text{M}$ Cd^{2+} po 24 hodin dochází k odštěpení monovrstvy buněk. Při vysokých koncentracích Cd se jeho schopnost vstupovat do buněk snižuje. Tento jev je pravděpodobně spjat s chemickými a fyzikálními vlastnostmi Cd v přítomnosti jiných životně důležitých prvků, jako je Fe, Zn či Ca. Vlivem Cd dochází ke snížení regulace uvolňování prozánětlivého cytokinu interleukinu-8 (IL-8). Tedy uvolňování IL-8 je zvýšeno (*Razzuoli a kol., 2018*).

1.1.6 Vliv Cd na játra

Po absorpci Cd^{2+} enterocyty dochází k jeho transportu do krevního oběhu, odkud se následně dostává i do jater. Hepatocyty přijímají kadmium receptory zprostředkovanou endocytózou komplexů Cd^{2+} s proteinem (obr. 1).



Obr. 1: Diagram transportu Cd přes kanalikulární a sinusovou membránu hepatocytů (převzato a upraveno z: *Zalups a Ahmad, 2003*).

Za fyziologických podmínek se jedná například o komplexy s albuminem (Alb), feritinem (Feri), Mt a transferinem (Tf). Pokud je v potravě přítomno Cd, dochází vlivem iontové podobnosti k záměně fyziologického iontu v komplexech za Cd^{2+} . Při přiblížení komplexů Cd-protein k vápenatým kanálkům dochází k výměně ligandů, a Cd^{2+} je s jejich pomocí dopraveno do hepatocytů díky své podobnosti s Ca^{2+} . Výměna ligandů probíhá i u thiolových komplexů Cd^{2+} . Cd^{2+} ke vstupu do hepatocytů pravděpodobně využívá také DMT1, který tuto funkci zastává i v enterocytech. Dalším transportérem na sinusové membráně je transportní protein kovů 1 (MTP-1), který umožňuje transport Cd^{2+} z hepatocytů do sinusové krve. Oba tyto transportéry potřebují ke správné funkci proton. V sinusové krvi se Cd^{2+} také vyskytuje ve formě konjugátů s Cys (Cys-Cd-Cys), s GSH (GSH-Cd-GSH), či s jinými thioley o nízké molekulové hmotnosti (R-Cd-R). Tyto komplexy pro vstup do hepatocytů využívají

transportéry aminokyselin nebo organických aniontů (OAT). Po vstupu do buňky jsou komplexy Cd-protein degradovány v lysozomech. Cd^{2+} může být pomocí MTP-1 transportováno zpět do sinusové krve, nebo může svým vlivem na buněčné jádro indukovat transkripci genu pro Mt1 a Mt2. Mt utváří v buňce komplex s přítomným kadmíem (Cd-Mt). Tento komplex opouští hepatocyty skrz porušenou plazmatickou membránu do sinusové krve, odkud je krevním řečištěm transportován, například do ledvin. Molekuly těchto komplexů jsou dostatečně malé, proto v ledvinách dochází k jejich filtraci na glomerulech a následné reabsorpci epitelovými buňkami proximálních tubulů. K porušení membrány dochází vlivem vysoké expozice Cd^{2+} , kdy se kadmium začne vázat na nukleofilní vazebná místa v buňce. Tento proces vyvolává oxidační stres, který vede k peroxidaci lipidů. Přes rozrušenou membránu mohou procházet i volné Cd^{2+} . Při interakci intracelulární depozice Cd^{2+} a GSH vzniká komplex GSH-Cd-GSH, který je pomocí GSH transportéru nebo transportního proteinu kovů 2 (MTP-2) na kanalikulární membráně transportován ven z hepatocytů do žlučového sběrného kanálku. Zde je působením Gama-glutamyltransferázy (GGT) a cysteinylglycinázy přeměněn na Cys-Cd-Cys. Při nekróze či apoptóze hepatocytů je Cd^{2+} uvolňován do krevního oběhu ve formě komplexu Cd-Mt. (*Bridges a Zalups, 2005; Zalups a Ahmad, 2003*).

K ukládání Cd v játrech dochází ve formě komplexu Cd-Mt. S prodlužující se délkou expozice se jeho množství zvyšuje. Vlivem uloženého Cd dochází ke zvýšení jaterních triglyceridů, intrahepatických fosfolipidů a jaterního cholesterolu. Rovněž dochází ke změně lipidového fenotypu, která se projevuje zvýšeným množstvím VLDL a LDL, a sníženou hladinou HDL. U HDL částic navíc dochází ke změně složení, kdy hladiny fosfolipidů, esterifikovaného a volného cholesterolu jsou sníženy, a hladiny triglyceridů zvýšeny. Při dlouhodobém působení Cd se rovněž zvyšuje sérová aktivita alaninaminotransferázy (ALT) a laktátdehydrogenázy (LDH), a stejně tak hladiny GSH a 3,4-methylendioxyamfetaminu (3,4-MDA) v jaterní tkáni. GSH a 3,4-MDA jsou antioxidanty, při jejichž vyčerpání nebo inaktivaci dochází ke zvýšení toxického působení Cd^{2+} . Z těchto skutečností vyplývá, že hlavním mechanismem chronické hepatotoxicity kadmia je oxidační stres (*Shaikh a kol., 1999; Sarmiento-Ortega a kol., 2017*).

1.1.7 Vliv Cd na nervovou soustavu

Esenciální prvky jako Zn a Se mají schopnost zmírnit toxický dopad Cd na nervové buňky. Při ošetření buněk roztokem Zn nebo Se před aplikací Cd nedochází k tak rozsáhlému snížení životaschopnosti buněk. Vlivem Cd se zvyšuje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) u diferencovaných i nediferencovaných nervových buněk. U těchto buněk lze kadmíem vyvolané produkci ROS zabránit preventivním ošetřením buněk Zn. Selen má ochranné účinky pouze u nediferencovaných buněk. Cd též vyvolává stres endoplazmatického retikula (ER), který lze snížit pomocí Zn i Se. Dalším účinkem Cd je aktivace apoptické dráhy, kdy úroveň exprese pro-apoptického proteinu BAX je vlivem Cd dvojnásobná. Vlivem Zn dochází ke snížení hladiny tohoto proteinu (*Branca a kol., 2018*).

1.1.8 Vliv Cd na kosti

U jedinců vystavených chronickému působení nízkých hodnot Cd se může projevat demineralizace kostí. S touto je spojena zvýšená křehkost kostí a vyšší riziko zlomenin. Ještě před vznikem proteinurie se projevuje kalciurie. Vlivem Cd nedochází k tvorbě aktivního vitamínu D (vit. D), to ovlivňuje a snižuje vstřebávání Ca ve dvanáctníku a jeho reabsorpci v distálním tubulu (*Staessen a kol., 1999*). Může docházet k projevům osteomalacie a osteoporózy (*WHO, 2010*). Kadmium má také schopnost přímo ovlivňovat kostní buňky negativním působením na jejich schopnost produkovat a mineralizovat kolagen. Rovněž snižuje schopnost buněk inhibovat produkci prokolagenových C-proteáz (*Staessen a kol., 1999*).

1.1.9 Vliv Cd na těhotenství

U těhotných dochází při pozření Cd v pitné vodě ke snížení hmotnosti plodu. Čím je vyšší koncentrace Cd ve vodě, tím je vyšší jeho množství naakumulované u matky a zvyšuje se jeho vliv na růst plodu, vývoj placenty a transport Zn přes placentu. Vlivem Cd se snižuje hmotnost plodu, snižuje se též hmotnost a velikost placenty a vnitřní prostor cév placenty. Většina Cd naakumulovaného v těle matky se ukládá v játrech a v ledvinách. I přesto, že vlivem Cd naakumulovaného v těle matky dochází k zvýšení množství Cd v játrech plodu, jedná se o nepatrné zvýšení při porovnání s množstvím mateřského kadmia (*Wang a kol., 2016*).

Vlivem Cd injektovaného do těla gravidním myším jedincům dochází ke zvýšení množství placentárního Zn a snížení embryonálního Zn (*Wang a kol., 2016*). Placenta

funguje jako bariéra mezi matkou a plodem zabraňující přenosu Cd (Baranowski a kol., 2002). Kadmium způsobuje snížení exprese mRNA placentárních ZnT. Konkrétně se jedná o placentární ZnT-1 a ZnT-2. Teratogenní účinky kadmia a jeho ovlivnění placenty jsou závislé na stádiu gestace v době expozice a na množství zinku v těle (Wang a kol., 2016).

Množství Cd v mateřském mléce je při porovnání s hladinami Pb a As nižší. U žen, které kouřily před těhotenstvím, je hladina Cd v mléce vysoká. Přípustný týdenní příjem Cd u novorozenců je 2,5 mg na kilogram tělesné váhy (Bassil a kol., 2018).

1.2 Rtuť

Rtuť je prvek vyskytující se v přírodě především jako sulfid rtuťnatý, oxid rtuťnatý či methylртуť. Můžeme ji rozdělit podle formy na elementární, organickou a anorganickou rtuť. Elementární neboli kovová rtuť je lesklý stříbrný kov, za pokojové teploty tekutý. Hojně se využívá ve rtuťových teploměrech, elektrických spínačích a relé, barometrech, fungicidech, bateriích, katalyzátorech, zubních výplních, při těžbě zlata z rudy, při galvanickém pokovování a v řadě dalších výrobních procesů. Při pokojové teplotě se určité množství tekutiny odpaří za vzniku rtuťových výparů, které jsou při vdechnutí silně toxické. Anorganické sloučeniny rtuti obsahují síru, kyslík nebo chlór a mají nejčastěji formu bílých prášků či krystalů. Organická forma rtuti obsahuje ve struktuře uhlík a do organismu se snadno dostává díky své rozpustnosti v tukách. Některé běžně se vyskytující organismy jako jsou houby, fytoplankton a bakterie, mají schopnost přetvářet anorganickou formu rtuti na organickou. Touto cestou vzniká nejčastěji methylртуť. Množství rtuti v přírodě se zvyšuje přirozeným rozkladem minerálů nebo činností člověka při spalování fosilních paliv a při těžbě (ATSDR, 1999; Zahir a kol., 2005; Park a Zheng, 2012).

Ionty rtuti mají v organismu vysokou afinitu k biomolekulám obsahujícím -SH skupinu, mezi které řadíme například Alb, GSH, Mt, N-acetyl cystein (NAC), homocystein (Hcy) a Cys. Tedy po absorpci do organismu jsou ionty rtuti přítomny navázané na těchto molekulách lineární koordinací kovalentní vazbou. Konjugáty rtuti a thiolů, jako jsou Cys, Hcy a GSH jsou strukturně podobné endogenním látkám jako je cystin, disulfid glutathionu (GSSG), homocystin a methionin. Díky této podobnosti dochází k transportu těchto konjugátů do buněk pomocí buněčných transportérů a k ovlivňování intracelulárních procesů. Zde je cystin běžně využíván jako substrát pro intracelulární enzym γ -cystathionázu, jehož aktivace probíhá navázáním cystinu

či cystathionu. Při navázání Cys S-konjugátu Hg^{2+} k této aktivaci nedochází. Tedy Cys S-konjugát Hg^{2+} napodobuje strukturní vlastnosti cystinu, ale ne jeho funkční vlastnosti (Bridges a Zalups, 2005). Hlavním mechanismem toxického působení rtuti je inhibice enzymů, v jejímž důsledku dochází k poškození buněk. Mezi doprovodné mechanismy řadíme vyvolání oxidačního stresu a autoimunitních procesů (Park a Zheng, 2012).

1.2.1 Expozice

Všechny organismy jsou vystaveny určitému vlivu rtuti, jelikož rtuť se v přírodě v malém množství vyskytuje přirozeně. Díky činnosti člověka je její množství v městském ovzduší vyšší. Jedná se přibližně o 10-20 ng/m^3 . V nezastavěných oblastech se její hladina pohybuje okolo 6 ng/m^3 . V povrchové vodě je pak hladina 5 dílů rtuti na bilion dílů vody, v půdě pak 20-625 dílů rtuti na miliardu dílů půdy (ATSDR, 1999). Předpokládá se, že emise rtuti každoročně vzroste o 5 % (Zahir a kol., 2005).

Zubní výplně jsou z 50 % tvořeny kovovou rtutí. Zbytek je tvořen cínem, stříbrem, mědí a stopovým množstvím zinku. Množství rtuti uvolněné ze zubních náplní činí až 75 % denní expozice. K další expozici může docházet jejím vdechováním v okolí elektráren, spalovacích motorů, spaloven odpadů, v okolí skládek s nebezpečným odpadem nebo v blízkosti výroben vápna (ATSDR, 1999; Zahir a kol., 2005). Intoxikace organismu může probíhat i pozřením kontaminovaných potravin a vody, farmaceutických výrobků s určitým obsahem rtuti, případně užíváním kosmetických výrobků s obsahem rtuti (Zahir a kol., 2005). Nejvyšší příjem rtuti z potravy mají lidé s vysokou konzumací mořských živočichů žijících v kontaminovaných vodách. Platí pravidlo, že čím starší a větší zvíře, tím více rtuti je v něm nahromaděno (ATSDR, 1999). V GIT traktu dochází ke vstřebání 7-15 % z celkové dávky. Anorganická rtuť může do těla vstupovat i skrz kůži přes epidermis, mazové žlázy nebo vlasové folikuly. Není těkavá, tedy u ní nemůže docházet k náhodnému vdechnutí par (Park a Zheng, 2012). Jejím hlavním místem akumulace jsou ledviny (ATSDR, 1999). Skrz hematoencefalickou bariéru a placentu anorganická rtuť neprochází díky své neschopnosti rozpustit se v tucích. Oproti anorganické formě je elementární forma rtuti těkavá, a proto může dojít k vdechnutí jejích par. Po vdechnutí dochází k absorpci až 80 % dávky Hg v plicích (Park a Zheng, 2012), odtud se elementární rtuť dostane do krevního řečiště, kterým je transportována do cílových orgánů (ATSDR, 1999). V krvi dochází během několika minut k její oxidaci

na Hg^{2+} . Jelikož je elementární rtuť rozpustná v tucích, může procházet skrz placentu a hematoencefalickou bariéru. Před oxidací se elementární forma rtuti vyskytuje v krvi dostatečně dlouho, aby se její část dostala přes hematoencefalickou bariéru a pronikla do mozku, kde dochází k její oxidaci. V oxidované formě již neprojde bariérou zpět a je zde ukládána vazbou na thiolové skupiny (Park a Zheng, 2012) v anorganické formě (ATSDR, 1999). Do mozku se může dostat i pomocí čichové nervové dráhy, kdy projde nosní sliznicí (Park a Zheng, 2012). Ovlivňuje jak mozek a ledviny, tak i centrální nervový systém (CNS), játra a vývoj plodu. Organické formy rtuti se do tkání dostávají nejnějněji a rovněž se hromadí v mozku a plodu. Při pokojové teplotě vznikají páry této formy, jejichž vdechnutím se organické sloučeniny snadno dostanou do organismu (ATSDR, 1999). Při expozici rtuti se v organismu zvýší množství Mt (Park a Zheng, 2012).

1.2.2 Vylučování

Většina přijaté kovové rtuti je vyloučena močí a stolicí. Menší část pak opouští tělo vydechnutím. Anorganická rtuť je vylučována močí a stolicí po dobu několika týdnů až měsíců. Může docházet k jejím přeměnám na kovovou rtuť, která je posléze vyloučena dechem ve formě rtuťových par. Organické formy rtuti, jako je například methylртуť, mohou být tělem přeměněny na anorganickou formu, která je následně vylučována z těla stolicí po dobu několika měsíců (ATSDR, 1999).

Rtuť může být vylučována střevem dvěma mechanismy. První možností je transcelulární či paracelulární sekrece Hg^{2+} skrz enterocyty. Druhým mechanismem je doprava Hg^{2+} do lumenu střev žlučí (Bridges a Zalups, 2005).

1.2.3 Vliv Hg na enterocyty

Absorpce Hg^{2+} je ovlivněna obsahem střev, tedy přítomností ligandů, na které se Hg^{2+} naváže. Samotný způsob transportu Hg^{2+} ze střev také závisí na typu navázaného ligandu. V potravě je přítomna řada aminokyselin a peptidů, které se v případě přítomnosti Hg^{2+} chovají jako ligandy. Lze tedy říci, že Hg^{2+} utvoří konjugát s těmi obsahujícími volnou -SH skupinu. Takto vzniklý konjugát je následně díky své podobnosti s jinými látkami transportován do těla. Hlavním místem absorpce je dvanáctník. Transport Hg^{2+} z enterocytů je ovlivněn jejich vnitřním pH, pokud je alkalické, přechod rtuti do krve je usnadněn. Při pH 4,7 dochází k hromadění rtuti v enterocytech. Přesný mechanismus tohoto transportu však není znám. Organická

forma rtuti se do těla nejčastěji dostane právě pozřením kontaminované vody či potravy skrz luminální cytoplazmatickou membránu enterocytů ve formě S-konjugátů CH_3Hg^+ s Cys a cysteinylglycinem (CysGly). Přítomné dehydropeptidázy degradují $\text{CH}_3\text{HgSCysGly}$ na CH_3HgSCys . Nedegradované množství $\text{CH}_3\text{HgSCysGly}$ se do enterocytů dostává pomocí dipeptidových případně tripeptidových transportérů. Většina konjugátů CH_3HgSCys je do tenkého střeva přiváděna žlučí, odtud jsou znovu vstřebávány enterocyty pomocí transportérů velkých neutrálních aminokyselin, které patří do tzv. L systému. Tento systém je přítomný jak v apikální, tak v bazolaterální membráně a vyznačuje se širokou substrátovou specifikou. Jedná se o dimer tvořený lehkým a těžkým řetězcem, které jsou spojeny disulfidickou vazbou. Dle poznatků zahrnuje L systém dvě izofomy aminokyselinových transportérů, a to L transportér aminokyselin 1 (LAT 1) a LAT 2. Při transportu pomocí tohoto systému napodobuje $\text{CH}_3\text{Hg-S-Cys}$ endogenní molekulu methionin. Transporty organické formy rtuti lze rozdělit do dvou skupin. Do první patří ty závislé na GGT do druhé pak ty transportéry, které lze inhibovat probenecidem. K transportu CH_3HgSCys skrz bazolaterální membránu enterocytů se též využívají transportéry GSH díky jejich vzájemné podobnosti (*Bridges a Zalups, 2005*).

1.2.4 Vliv Hg na játra

Transport Hg^{2+} přes sinusovou membránu hepatocytů není prozatím přesně zdokumentován. Předpokládá se, že je uskutečňován pomocí stejných transportérů, které transportují Hg^{2+} v jiných orgánech. Na kanalikulární membráně jsou přítomny transportéry GSSG, které se na té sinusové nevyskytují. Transport Hg^{2+} přes kanalikulární membránu je závislý na cytoplazmatické koncentraci GSH. Jeho nízká koncentrace zamezuje transportu Hg^{2+} z hepatocytů. Předpokládá se tedy, že GSH utvoří komplex s Hg^{2+} , jež je podobný GSSG. K přenosu přes kanalikulární membránu je následně využíván přenašeč pro GSSG. Organická forma rtuti je po vstřebání enterocyty v tenkém střevu, ve formě S-konjugátu CH_3Hg^+ , transportována krví do jater. Zde je akumulace CH_3Hg^+ ovlivněna hladinami Cys a GSH, které také ovlivňuje transport S-konjugátu CH_3Hg^+ z jater do žluči. Na kanalikulární membráně jsou S-konjugáty organické a anorganické formy rtuti transportovány GSH transportérem. Tímto transportérem se z jater do žluči dostává většina CH_3HgSG . Ve žluči pak dochází k jeho katabolizaci na CH_3HgSCys ,

který je vstřebáván enterocyty v tenkém střevě nebo buňkami vystýlajícími žlučovody (*Bridges a Zalups, 2005*).

1.2.5 Vliv Hg na nervovou soustavu

Organická forma rtuti má na organismus silně negativní účinek díky své organické části, pomocí které se snadno transportuje a začleňuje do tkání. Hlavním místem účinku CH_3Hg^+ je mozek a CNS. Platí zde, stejně jako u anorganické formy rtuti, že se CH_3Hg^+ v organismu nevyskytuje ve volné formě. Téměř okamžitě po svém vstupu do organismu utváří konjugáty s látkami obsahujícími thiolovou skupinu, mezi které řadíme Cys, GSH, NAC či Hcy. Velký význam má Cys S-konjugát CH_3Hg^+ , který má schopnost projít přes hemoencefalickou bariéru za pomoci transportérů velkých neutrálních aminokyselin řadících se do L systému (*Bridges a Zalups, 2005*).

Při vyšší expozici požíváním jídla vyrobeného ze surovin kontaminovaných rtutí se během několika měsíců projevují u dospělých jedinců příznaky parestézie, ataxie, dysartrie a hluchoty, které mohou být následovány smrtí (*Myers a kol., 2000*). Nízké koncentrace Hg vyvolávají u dospělých tvorbu α -synukleinů v dopaminergních neuronech, vlivem toho vznikají Lewyho tělíska. Tyto procesy mohou vést k parkinsonismu. Vlivem navázání Hg na aminokyseliny obsahující síru, dochází k nefunkčnosti řady kofaktorů a enzymů z důvodů inaktivace přítomné síry. Takto znemožněná oxidace síry způsobuje nemoci jako amyotrofickou laterální sklerózu, lupus, Alzheimerovu chorobu, autismus a revmatoidní artritidu. Klinickými projevy intoxikace rtutí jsou svalová únava, snížená svalová síla, narušená jemná motorika, snížení pozornosti, deprese, poškození zraku a krátkodobé sluchové paměti (*Zahir a kol., 2005*). Dále může způsobovat stomatitidu, nadměrné slinění, nesnášenlivost, plachost a podrážděnost (*Park a Zheng, 2012*).

1.2.6 Vliv Hg na plodnost, těhotenství a dětský vývoj

Předpokládá se, že díky molekulové podobnosti s jinými endogenními látkami, je Hg^{2+} v komplexu s aminokyselinami obsahujícími volné -SH skupiny transportována pomocí transportérů těchto endogenních látek. Organická forma rtuti ovlivňuje jak placentu samotnou, tak vývoj CNS plodu. Konjugáty CH_3Hg^+ se snadno dostávají přes placentu transportem, do kterého je zapojen L systém. Při současném příjmu methioninu a rtuti dochází k zvýšení jejich transportu skrz placentu. K této skutečnosti pravděpodobně dochází díky konverzi methioninu na Cys, který utváří s CH_3Hg^+

S-konjugáty. Kromě L systému se v placentě vyskytují i transportéry organických kationtů (OCT), polypeptidy transportující organické anionty (OATP), kanalikulární multispecifický organický aniontový transportér 1 (cMOAT), OAT a ZnT. Díky cMOAT je určitá část CH_3Hg^+ z plodu transportována zpět do krevního oběhu matky (Bridges a Zalups, 2005).

Rtuť znečišťující vody se akumuluje ve vysoké míře v rybách. Při vysoké konzumaci běžně dostupných ryb v prenatalním období nebyl zjištěn nežádoucí účinek na vývoj plodu (Myers a kol., 2000). Avšak u žen vystavených nízkým hladinám rtuti po dlouhou dobu dochází vlivem akumulace rtuti v těle k menstruačním poruchám a ke snížené schopnosti otěhotnět. Při vysokých hladinách methylrtuti dochází k potratům, při nízkých může plod přežít. U těchto plodů dochází k ovlivnění vývoje, a to především nervové soustavy. U novorozenců byla pozorována psychomotorická retardace projevující se poruchou motoriky, pohyblivosti jazyka a paměti. U některých jedinců se projevil autismus. Z neuropatologického hlediska dochází k dysplazii kůry mozku a mozečku a neuronální ektopii. Kritickým obdobím pro expozici je druhý trimestr. Po narození novorozenci přijímají rtuť z těla matky mateřským mlékem. Pozorována byla i snížená plodnost u mužů vlivem snížené pohyblivosti spermií (Zahir a kol., 2005).

1.2.7 Vliv Hg na erythrocyty

Do erythrocytů je organická formy rtuti transportována pomocí několika systémů. Hlavním transportérem jsou OAT, dále se zde vyskytují cysteinový transportér, transportér chloru, D-glukózový transportér a difúzní transportér. Pro vstup do ERY pomocí těchto transportérů rtuť napodobuje substráty těchto transportérů (Bridges a Zalups, 2005).

1.2.8 Vliv Hg na imunitní systém

Jedinci s alergií a imunitními nemocemi mají lymfocyty citlivější. Tato skutečnost byla pozorována u jedinců s atopickým ekzémem, systémovým lupusem či roztroušenou sklerózou. Vlivem chronické expozice nízkým hladinám kovové rtuti dochází k poruše cirkulujících natural killer (NK) buněk a monocytů. Anorganická rtuť způsobuje funkční poruchu monocyto-makrofágového systému (Zahir a kol., 2005).

Contrino a kol. uveřejnil roku 1988 *in vitro* studii o vlivu chloridu rtuťnatého na polymorfonukleární leukocyty. Při dostatečné koncentraci byl prokázán značný vliv

na jejich funkci a životnost. Koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l HgCl_2 způsobuje lýzu buněk a uvolňování LDH do krevního řečiště. Při nižších koncentracích nebyly výše popsané procesy pozorovány, docházelo však k inhibici adherence, potlačení fagocytózy, polarizaci a chemotaxi. Naopak dochází ke zvýšení chemiluminiscence podporující tvorbu H_2O_2 .

1.3 Olovo

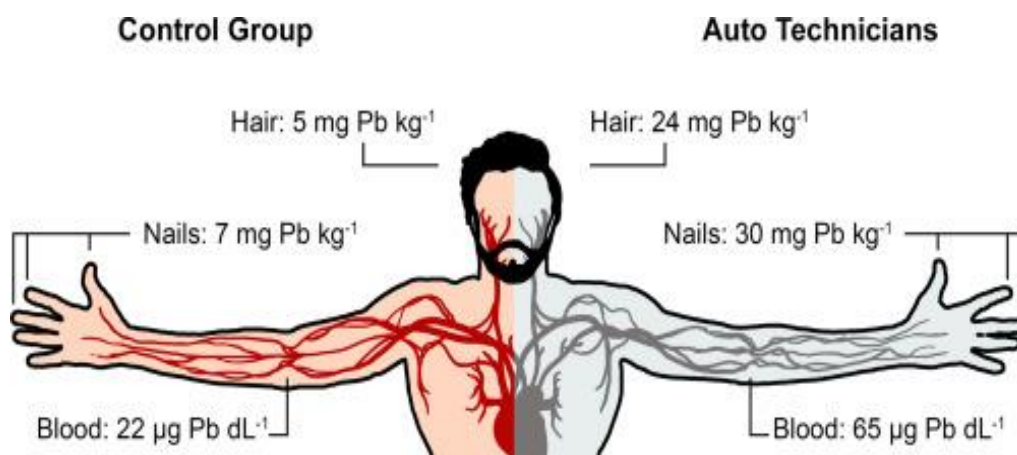
Olovo je prvek vyskytující se v malém množství v zemské kůře (*WHO, 2010*). Může být přítomno ve formě olovnaté soli, nebo kovového olova (*Bridges a Zalups, 2005*). Jeho množství v přírodě se zvyšuje aktivitami jako je geochemické zvětrávání, sopečná činnost a činnost člověka. K té se řadí tavení, těžba, rafinace, spalování olovnatého benzínu, pájení, výroba šperků a olovených akumulacích baterií, keramiky, slitin a barev, případně použití olovených trubek na vodovodní potrubí, recyklace elektronického odpadu (*WHO, 2010*). Olovnaté barvy jsou hojně používané u hraček vyrobených v Číně. Vlivem toho může dojít k intoxikaci dětí (*Gonick, 2008*).

Transport Pb^{2+} do buněk je zprostředkován DMT1. Při pH 5,5 je příjem Fe buňkami skrz DMT1 vyšší v porovnání s transportem při pH 7,4. U Pb dochází ke zvýšení transportu pouze při pH 5,5. Tedy při pH 5,5 může zvýšený obsah Fe ve stravě snížit příjem Pb, díky přednostnímu transportu železa (*Bannon a kol., 2002*). Při nedostatku DMT1 se sníží příjem Fe ale ne Pb, to značí o existenci dalšího mechanismu transportu Pb. Tím může být transport pomocí Ca^{2+} kanálků a iontové mimikry, kdy díky podobnosti Ca a Pb dochází k průchodu Pb^{2+} vápenatými kanálky namísto Ca^{2+} . Sloučeniny způsobující depolarizaci buněk a otevření vápenatých kanálů podporují vychytávání Pb. Další transport může probíhat přes aktivní transportéry Ca^{2+} , jako jsou Ca^{2+} -ATPázy. Do erytrocytů je Pb transportováno pomocí aniontového výměníku. Předpokládá se, že transportér GSSG na kanalikulární membráně hepatocytů zprostředkovává transport S-konjugátů Pb s GSH. V epitelových buňkách proximálních tubulů mohou být komplexy Pb^{2+} a proteinů přijímány endocytózou. Uvnitř buňky pak podléhají degradaci v lysozomech. Olovo umí rovněž napodobovat endogenní ionty a vázat se místo nich na intracelulární vazebná místa. Například může funkčně nahrazovat Ca^{2+} na kalmodulinu, který funguje jako regulátor intracelulárního Ca^{2+} . Olovo také ovlivňuje proteinkinázu C, jež je běžně aktivována navázáním Ca^{2+} . Při intoxikaci olovem místo toho dochází k navázání Pb^{2+} , který je navázán delší dobu než vápník a negativně ovlivňuje buňku. Za běžných podmínek proteinkináza C

ovlivňuje organizaci cytoskeletu, buněčné dělení a komunikaci buněk mezi sebou. V tomto případě může olovo napodobovat funkční i strukturní vlastnosti endogenních látek. Vysoké hladiny Pb narušují hematoencefalickou bariéru, což vede k otoku mozku (*Bridges a Zalups, 2005*).

1.3.1 Expozice

K expozici dochází požitím kontaminovaného jídla, vody, pasivní či aktivní inhalací cigaretového kouře a vdechováním kontaminovaného prachu. Ke kontaminaci jídla může docházet jeho výrobou z kontaminovaných surovin nebo uchováváním v plechovkách obsahujících Pb. U olovnatých plechovek má značný vliv na uvolňování Pb kyselost potravin (*WHO, 2010*). Mezi potraviny schopné akumulovat Pb ze znečištění prostředí řadíme například rýži (*Khan a kol., 2018*), brambory, mrkev, řepu, kapustu, pórek, rebarboru (*Norton a kol., 2015*) a ryby (*Storelli a kol., 2005*). Ke kontaminaci vody dochází nejčastěji jejím průtokem olověným vodovodním potrubím. Nejsnadněji se z něho olovo uvolňuje do měkké kyselé vody. Nejvíce náchylné na expozici olovu jsou těhotné ženy, kojenci a malé děti. Hlavními důvody pro zvýšenou citlivost dětí jsou nedovyvinutá hematoencefalická bariéra, snížená tělesná hmotnost, vyšší hladina vdechovaného kontaminovaného prachu a vyšší absorpce v GIT. Tedy v krvi dítěte je hladina Pb 4-5x vyšší než u dospělých (*WHO, 2010*). Značná expozice probíhá u pracovníků v automobilovém průmyslu (obr. 2) (*Ahmad a kol., 2018*). Hladina expozice se zjišťuje z krve, kostí a zubů (*WHO, 2010*). U kuřáků je hladina Pb v krvi vyšší při porovnání s nekuřáky (*El-Safy a kol., 2004*).



Obr. 2: Rozdíl koncentrace olova mezi kontrolní skupinou a skupinou pracovníků v automobilového průmyslu ve vlasech, nehtech a krvi (Ahmad a kol., 2018).

1.3.2 Toxicita

Olovo má schopnost nahrazovat v molekulách polyvalentní ionty (př.: Ca^{2+} a Zn^{2+}), čímž ovlivňuje transport kovů, energetický metabolismus, apoptózu, iontovou vodivost, buněčnou adhezi, intercelulární a intracelulární signalizaci, různé enzymatické procesy, dozrávání proteinů a genetickou regulaci. V buňkách je vazebná selektivita vyvinuta pro běžně se vyskytující endogenní ionty, pro cizorodé ionty regulační mechanismy vyvinuté nejsou. Olovo má značnou afinitu ke kyslíku a síře vyskytujících se ve vazebných místech proteinů. Při nahrazení Zn^{2+} či Ca^{2+} olovem dochází k narušení buněčných funkcí. Je známa skutečnost, že vazebná místa zinku mají vyšší afinitu k Pb než vazebná místa Ca. Při intoxikaci mají ale vyšší význam vazebná místa Ca díky své vyšší četnosti výskytu v organismu. Tato vazebná místa nesou negativní náboj, vápenaté ionty jsou nabitě kladně. Jejich vzájemnou interakcí dochází ke strukturálním a funkčním změnám proteinů. Dále způsobují snížení elektrického náboje proteinu a změnu elektrostatické interakce s dalšími molekulami. Afinita olova ke specifickým vazebným místům Ca^{2+} a Zn^{2+} je vyšší, než mají tyto ionty. Olovo na místě Ca^{2+} způsobuje abnormální aktivaci proteinu, na místě zinku inhibuje vazebné proteiny. Při záměně Ca^{2+} iontu za Pb^{2+} může být vápník nahrazen strukturálně i funkčně, u zinku má záměna za Pb^{2+} vždy škodlivé účinky. To je pravděpodobně způsobeno výraznými rozdíly mezi olovem a zinkem v koordinačním čísle, elektronické konfiguraci, elektronegativitě a iontovém poloměru (Garza kol., 2006).

Po intoxikaci organismu je Pb transportováno do kostí, jater, ledvin a mozku. Jedná se o kumulativní prvek, proto jsou častěji pozorovány chronické účinky na organismus. K jeho hromadění dochází v kostech a zubech. Způsobuje změny kardiovaskulárního systému a mentální retardaci (WHO, 2010). U dětí, u kterých dochází k otravě olovem častěji (Garza a kol., 2006), ovlivňuje především vývoj nervového systému, způsobuje agresi, snížení inteligenčního kvocientu a poruchu pozornosti (WHO, 2010), sníženou syntézu hemu, zpomalení růstu a ovlivnění neurobehaviorálního vývoje (Schell a kol., 2003). U těhotných žen ovlivňuje vývoj plodu, snižuje porodní váhu, může způsobovat předčasný porod, výskyt malformací, potrat nebo narození mrtvého dítěte. Akutní intoxikace je provázena gastrointestinálními projevy jako je bolest břicha, nauzea, zvracení a anorexie, hypertenze, porucha jater a ledvin, neurologické projevy jako ospalost a encefalopatie, po kterých mohou následovat křeče a smrt. Častěji pozorovaná chronická expozice způsobuje podráždění, bolest hlavy, letargii, svalovou slabost, křeče, třes, paralýzu, ataxii a anémii. Expozice vdechováním způsobuje rakovinu plic. U mužů olovo způsobuje snížený celkový počet spermií a zvýšený výskyt abnormálních spermií (WHO, 2010).

1.3.3 Vliv Pb na těhotenství a dětský vývoj

Při zjišťování míry přenosu Pb z těla matky do těla plodu se sledují hladiny krevního olova matky po celou dobu těhotenství a při porodu, následně se zjišťuje hladina krevního olova u novorozenců. Tímto způsobem byla zjištěna korelace mezi těhotenským BMI, těhotenskou váhou a krevní hladinou Pb u novorozenců. Při vyšší váze a větším obvodu paže matky je hladina novorozeneckého krevního Pb nižší. Vztah byl také pozorován mezi krevním Pb novorozenců a mateřským příjmem železa, Ca a vit. D (Schell a kol., 2003). Celková dávka Pb, která působí na plod, je výsledkem expozice matky a uvolněným Pb z mateřské kostry (Silbergeld, 1991). Hladina krevního olova novorozenců se dá regulovat pomocí úpravy mateřské stravy (Schell a kol., 2003). Bylo pozorováno, že hladina krevního Pb je vyšší u dětí s nedostatkem Fe (Bradman a kol., 2001). U žen nad 30 let byla zjištěna vyšší hladina Pb v mateřském mléce v porovnání s mladšími ženami. Ženy po menopauze mají vyšší hladiny krevního Pb než ženy před menopauzou. U matek vystavených vlivu Pb v dětství byla naměřena značná hladina krevního Pb v těhotenství (Silbergeld, 1991).

1.3.4 Vliv Pb na krevní obraz

Krevní olovo má biologický poločas 35 dní. Zdejší Pb je z 99 % vázáno v ERY na dehydratázu aminolevulové kyseliny (ALAD). Ta existuje ve formě kodominantních alel ALAD-1 a ALAD-2. U pracovníků heterozygotních či homozygotních pro ALAD-2, je vyšší hladina Pb v krvi při porovnání s pracovníky homozygotními pro ALAD-1. ALAD-2 má vyšší schopnost vázat Pb v netoxické formě. U jedinců pracovně vystavených olovu je exprimován erytrocytový vazebný protein olova v případě, že hladina krevního olova přesáhne 39 µg/dl. Takto navázané Pb je netoxické. Pokud nedojde ke vzniku olovo vázajícího proteinu, k toxickým účinkům olova dochází již při malých koncentracích (Gonick, 2008). Do ERY se Pb dostává pomocí aniontových výměníků po vytvoření komplexu s HCO_3^- (Garza a kol., 2006).

Olovo snižuje životnost erytrocytů, způsobuje anémii a zvyšuje retikulocytózu. Ovlivňuje syntézu hemu poškozením enzymů, které se na tomto procesu podílí. Jedná se o koproporfyrinogen oxidázu, ferrochelatázu a dehydratázu kyseliny δ -aminolevulové. Vzniklá anémie může být mikrocytická, makrocytická, normocytární či hypochromní. Má vliv i na zastoupení leukocytů a trombocytů. Může způsobovat přecitlivělost imunitního systému a díky tomu zvýšení imunitní odpovědi. Vlivem interakce s G proteinem a tyrosinkinázou způsobuje narušení buněčné diference a proliferace. Případně ovlivňuje množství hematopoetických cytokinů. Konkrétně se jedná o snížení hladiny faktoru stimulujícího kolonie granulocytů, faktoru kmenových buněk, interleukinu 7, hepatocytového růstového faktoru, adhezní molekuly 1 endoteliálních buněk krevních destiček a odvozeného růstového faktoru. Chronická expozice při hladině olova v krvi pod 50 µg/dl neovlivňuje počet ERY, leukocytů a hladinu hemoglobinu. Způsobuje ale snížení středního objemu ERY, obsahu hemoglobinu v ERY a hematokritu. Také ovlivňuje poměrové zastoupení různých typů leukocytů, způsobuje zvýšení koncentrace hemoglobinu v ERY a středního objemu destiček. Počet smíšených buněk v krevním řečišti je u jedinců vystavených olovu 118x vyšší (Chwalba a kol., 2018).

1.3.5 Vliv Pb na kosti

Olovo mění schopnost buněk v kostech reagovat na regulační mechanismy díky narušení systémů druhých posílů Ca^{2+} a cAMP. Rovněž mění hladiny regulujících látek v krevní cirkulaci. Dále narušuje schopnost buněk produkovat složky kostní hmoty, jako jsou například kolagen a osteopontin. Organická matrice kostí,

těž nazývána osteoid, obsahuje velké množství kolagenu. Ten je tvořen osteoblasty a vlivem Pb je jeho produkce inhibována. Dalším proteinem produkovaným osteoblasty je osteokalcin, který se v osteoidu vázán na hydroxyapatit. Jeho produkci stimuluje 1,25-dihydroxyvitamin D₃ a olovo ji naopak snižuje. Cirkulující hladiny tohoto proteinu v séru odráží stav a obrat kostní hmoty. Nízké hodnoty značí sníženou aktivitu osteoblastů. Ovlivnění jejich funkce olovem lze zvrátit chelatační terapií. V porovnání s osteoblasty jsou osteoklasty mnohem citlivější na olovo a akumulují ho větší množství. V jejich jádrech a cytoplazmě dochází ke vzniku kyselých olovnatých inkluzí. Podobně jako u Ca²⁺, i u Pb²⁺ dochází k obnovování depozice (*Pounds a kol., 1991*).

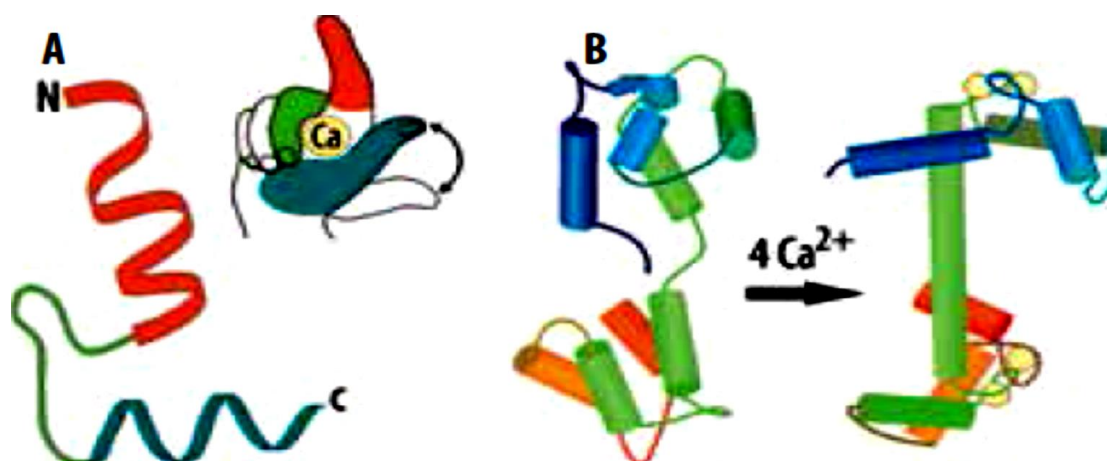
Během těhotenství a laktace jsou zvýšené nároky na Ca. Ty jsou pokryty zvýšeným příjmem z potravy, zvýšenou reabsorpcí a demineralizací kostí. Dochází též ke změnám metabolismu a regulačních mechanismů tohoto prvku. Regulace příjmu a výdeje Ca probíhá pomocí hormonů 1,25-dihydroxyvitaminu D, prolaktinu a parathormonu. V těhotenství je jejich koncentrace zvýšena. Při nedostatku Ca a vitamínu D v potravě dochází ke ztrátě kostní hmoty. Díky těmto změnám dochází k uvolňování Pb²⁺ z kostí. Při mobilizaci kostního olova dochází k jeho transportu do krve a odtud do tkání matky i plodu. Pro receptory je olovo uvolněné z kostí stejné, jako olovo aktuálně přijmuté a na organismus působí stejně toxicky. Hladin Pb v krvi se při těhotenství rychle mění díky jeho průchodu přes placentu. Během třetího trimestru jsou požadavky plodu přibližně 250 mg Ca a matky 1100 mg denně. Při laktaci je denně 400-1600 mg Ca obsaženo v mléce, tehdy se doporučený denní příjem Ca matky zvýší na 1300 mg (*Silbergeld, 1991*).

Dětská kostra je pro účinky olova citlivější než kostra dospělého. Vlivem olova u ní dochází k opožděné osifikaci kostí. Dalším projevem je snížení rychlosti růstu a hladiny osteokalcinu v krvi. U psů byla pozorována i změna fyziologie kostí (*Pounds a kol., 1991*).

1.3.6 Vliv Pb na nervový systém

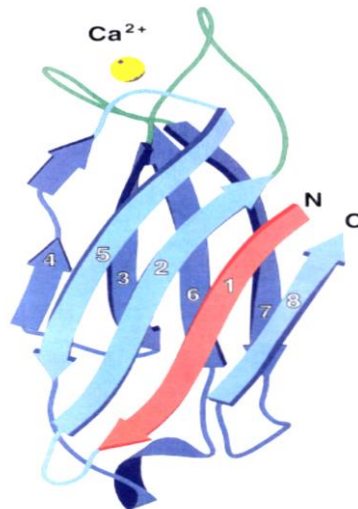
Nervový systém ve vývoji je nejnáchylnější na toxické účinky Pb^{2+} . Olovo působí na iontové kanály a signalizační molekuly vzrušivých buněk nervového systému. Pro tento typ buněk jsou velmi důležité iontové kanály Ca^{2+} mající dvě vazebné struktury. První a pravděpodobně nejčastěji se vyskytující strukturou je motiv EF (obr. 3).

Druhou strukturou je C2 doména s vysokou afinitou k Pb^{2+} . Tvoří ji dva čtyřlísté β -listy s vazebným místem Ca^{2+} ve smyčkách spojujících β -vlákna v horní části



Obr. 3: **Motiv EF.** (A) Motiv pojmenován podle helixů E a F spojených smyčkou. Jejich poloha je podobná ruce, kdy ukazováček a palec míří ven z dlaně, zbytek prstů je stočen do pěsti. Zelená část na obrázku je smyčka spojující helixy, ve které se vyskytují zbytky tvořící vazebná místa Ca^{2+} . (B) Zde je znázorněna konformační změna vlivem navázání 4 atomů Ca^{2+} . Před navázáním vápníku je konformace uzavřená, po navázání dojde k jejímu otevření a k odhalení hydrofobních vazebných míst proteinu pro jiné molekuly (Garza a kol., 2006).

proteinu (obr. 4). Navázáním Ca^{2+} dochází k elektrickým změnám, nikoli ke změnám konformačním. Pokud ke konformačním změnám přeci jen dojde, jsou brány jako druhotná změna. C2 doména je považována za elektrostatický spínač pro spojení s jinými molekulami a vyskytuje se u synaptotagminu a protein kinázy C (Garza a kol., 2006).



Obr. 4: **Struktura domény C2 synaptotagminu I.** Žlutá kulička znázorňuje Ca^{2+} , zeleně jsou znázorněny smyčky nesoucí vazebná místa pro Ca^{2+} . Vazebná doména C2 má dva typy. Zde je červeně znázorněn řetězec $\beta 1$, který je stejný jako řetězec $\beta 8$ druhé topologie. V ostatních řetězcích se topologie domény C2 liší (Nalefski a Falke, 1996).

Při navázání Pb^{2+} namísto intracelulárních iontů dochází k ovlivnění funkce proteinů působících na vezikulární cyklus, proteinů systémů druhého posla, k ovlivnění signalizačních kaskád a exocytárních procesů. Aktivací kalmodulinu a proteinů, které reguluje, dochází k ovlivňování fosforylačních a defosforylačních procesů a rovnováhy mezi tvorbou a degradací signalizačních molekul (př.: cAMP, NO). Kalmodulin také ovlivňuje modulaci různých iontových kanálů důležitých pro buněčnou dráždivost včetně draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem, receptorů N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA) či Ca^{2+} kanálků. Při aktivaci kalmodulinu olovem namísto vápníku tedy dochází k ovlivnění celkové celulární atmosféry. Pór Ca^{2+} kanálku je tvořen 4 glutamátovými zbytky, které se značí jako EEEE. Čím vyšší afinita iontu k EEEE, tím rychleji projde kanálkem. Iontové interakce na tomto lokusu jsou kompetitivní. Díky vyšší afinitě Pb^{2+} k EEEE dochází k vytěsnění Ca^{2+} z lokusů a jejich proudění kanálkem. Olovo blokuje jak Ca^{2+} kanálky typu L, N, R, P, tak některé draselné proudy v neuronech. V dráždivých buňkách dochází vlivem Pb ke zvýšení cytoplazmatické koncentrace vápníku díky jeho uvolňování z mitochondrií. Otevřením Ca^{2+} pórů se do cytoplasmy uvolní i cytochrom C způsobující apoptózu buňky či uvolňování neurotransmiterů. Olovo také zhoršuje energetický metabolismus buňky, podporuje tvorbu ROS a způsobuje peroxidaci lipidů cytoplazmatických membrán. U ER, které běžně obsahuje vysokou koncentraci vápníku, olovo způsobuje inhibici Ca-ATPázy. Vlivem této inhibice dochází u koncentrace Ca^{2+} ke zvýšení v cytoplasmě a k snížení v ER. Vyčerpáním Ca^{2+} v ER dochází ke změně funkcí

zdejších chaperonových a signalizačních proteinů. V jádře se olovo váže na chromatin a jaderné proteiny a ovlivňuje systémy opravy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Garza a kol., 2006).

Klinické příznaky dysfunkce vlivem Pb se prvně projevují u nervového systému. Jako první je vlivem vyšší citlivosti na Pb ovlivněna CNS, a to i nízkými koncentracemi Pb. Druhotně pak dochází k ovlivnění periferní nervové soustavy. Platí pravidlo, že čím vyšší je expoziční hladina Pb, tím větší je jeho vliv na systémové funkce. Indikátorem poruchy nervové soustavy je změna rychlost vedení signálu. Vlivem Pb dochází ke snížení obratnosti a psychomotorické rychlosti, k periferní neuropatii a toxické encefalopatii (Baker a kol., 1984). Některé tkáně jsou olovu náchylnější než jiné. Bylo pozorováno velké poškození hipokampu v porovnání s jinými tkáněmi. Biologický poločas rozpadu Pb v mozku činí dva roky (Garza a kol., 2006). Při krevním olovu vyšším jak 40 µg/dl jsou patrná neurobehaviorální zhoršení, zhoršení tvorby slovní koncepce, krátkodobé paměti a profilů nálady. Změny nálad se projevují zvýšenou četností depresí, hněvu, zmatku a napětí. Pokud hladina krevního olova přesáhla 60 µg/dl, projevovala se u nich nadměrná únava a zhoršení výše popsaných poruch. Také dochází ke zhoršení vizuálních procesů a motorického výkonu (Baker a kol., 1984). U krevních hladin olova v rozmezí 5-35 µg/dl dochází při zvýšení hladiny o 1 µg/dl ke snížení IQ o 2 až 4 body. Během těhotenství v třetím trimestru dochází k synaptogenezi. Při průchodu Pb^{2+} placentou namísto Ca^{2+} dochází k jejímu narušení a k blokaci neurotransmiteru řídícího cytoarchitekturální vývoj mozku (Silbergeld, 1991).

2 Nefrotoxicita

2.1 Kadmium

Vliv Cd na ledviny se projevuje jeho přítomností v moči ve formě Cd-Mt. Tato koncentrace odráží vystavení kadmiu v minulosti a množství Cd deponovaného v organismu. Koncentrace naměřená v ledvinách a v moči (UCd) je ovlivněna délkou expozice a velikostí dávky (Morales a kol., 2006; Jin a kol., 2002). Kuřáci mají hladiny UCd v porovnání s nekuřáky vyšší (Jain, 2017). Ke zvýšení hladiny UCd dochází též při zvýšené konzumaci alkoholu (Quraishi a kol., 2016). Hladina UCd je pozitivně spjata s nárůstem kreatininu v moči (Jain, 2017). Kritická hladina Cd v moči je 1 µg / g kreatininu. Aby byla koncentrace Cd nižší, nesmí příjem Cd potravou převýšit 2,5 µg na kg tělesné hmotnosti za týden (Jean a kol., 2018).

Se zvyšujícím se množstvím nahromaděného Cd v těle, se začínají projevovat renální abnormality. Narušení funkce ledvin se projevuje polyurií, proteinurií, mikroalbuminurií, snížením clearansu kreatininu, zvýšením hladin N-acetyl-beta-D-glukózaminidázy (NAG), ALT, LDH, GGT a glukózy v moči (Prozialeck a kol., 2007; Morales a kol., 2006; Thun a kol., 1989). K uvolňování molekuly poškození ledvin (KIM-1) dochází 4-5 týdnů před projevem proteinurie, 1-3 týdny před detekcí Mt a Clara buněk (CC-16) v moči a o 2 týdny dříve před detekcí α-glutathion S-transferázy (α-GST). Hladina NAG v moči se zvyšuje až po 12 týdnech expozice Cd. Detekce samotného Cd vyloučeného močí je možná po 4 týdnech expozice. Tedy KIM-1 a Cd vyloučené močí, jsou časnými markery intoxikace (Prozialeck a kol., 2007; Prozialeck a kol., 2009). Dochází též ke změně pH a měrné hmotnosti moči. V krvi se porucha ledvin projeví změnou hladiny močovinového dusíku (BUN). U epitelových buněk proximálního tubulu dochází vlivem Cd k částečné ztrátě mikrovilů, výskytu velkých cytoplazmatických vakuol, zvýšenému množství prominentních lysozomů a změně struktury mitochondrií. Místy mohou buňky podléhat nekróze, což mezi nimi způsobuje vznik mezer (Prozialeck a kol., 2007; Morales a kol., 2006; Thun a kol., 1989). Při nízkých hodnotách Zn v séru je vliv Cd na ledviny vyšší (Lin a kol., 2014).

Tubulární dysfunkce se projevuje zvýšeným vylučováním nízkomolekulárních (LMW) proteinů močí. Mezi LMW proteiny řadíme například β₂-mikroglobulin a retinol vázající protein (RBP). Zároveň dochází ke snížení reabsorpce Ca a fosfátů.

Reabsorpční kapacita nefronů je snížena. Při glomerulární dysfunkci dochází k vylučování vysokomolekulárních (HMW) proteinů, mezi které řadíme například Alb a Tf. Kadmium způsobuje převážně tubulární dysfunkci. Glomerulární dysfunkce se oproti tomu projevuje v omezené míře (*Jin a kol., 2002; Morales a kol., 2006; Thun a kol., 1989*).

Při chronickém působení Cd^{2+} na ledviny se v renální tkáni zvyšuje hladina antioxidantů GSH a 3,4-MDA. *Shaikh a kol.* provedl studii ve které zjišťoval vliv inhibice syntézy těchto antioxidantů a jejich následné vyčerpání na nefrotoxické působení Cd. Z výsledků vyplývá, že při vyčerpání GSH se nefrotoxické účinky kadmia projeví do 6 hodin po jeho podání značným zvýšením aktivity LDH a hladiny proteinů v moči (*Shaikh a kol., 1999*). Důležitým mechanismem nefrotoxicity kadmia je vyvolání oxidačního stresu. Při intoxikaci kadmiiem dochází ke snížení hladin endogenních antioxidantů, jako jsou například Cys, GSH, kyselina askorbová, karoten a bilirubin, díky jejich spotřebě na neutralizaci zvýšené produkce ROS. K té dochází díky strukturálním změnám mitochondrií (*Morales a kol., 2006*).

Epitelové buňky proximálního tubulu absorbují kadmium ve formě Cd^{2+} . Dvojmocný ion kadmia má vysokou afinitu k biomolekulám obsahujícím thiolové skupiny, které se vyskytují na lumenální membráně buněk proximálního tubulu. Díky této afinitě vznikají komplexy s Cys nebo GSH ve formě Cys-S-Cd-S-Cys nebo GS-Cd-GS. Druhý zmíněný komplex není buňka schopná transportovat. Působením GGT a cysteinglycinázy přítomných na straně lumenálních epitelových buněk proximálního tubulu dochází k jeho přeměně na Cys-S-Cd-S-Cys, ten je již buňkou transportovatelný. Předpokládá se, že díky iontové podobnosti Hg^{2+} a Cd^{2+} je Cys-S-Cd-S-Cys do buňky transportován stejným mechanismem, jako Cys-S-Hg-S-Cys, a to pomocí OAT1. Kromě tohoto mechanismu je proximální tubulus schopný přijímat ionty Cd^{2+} prostřednictvím Ca^{2+} kanálů či po výměně ligandů přes membránové transportéry (př. DMT1). DMT1 se hojně vyskytuje na lumenální straně plazmatické membrány epitelových buněk, tedy ve vzestupném raménku Henleovy kličky, v membráně hlavních buněk sběrného kanálku a distálního tubulu (*Bridges a Zalups, 2005*). Existují hypotézy naznačující, že transport Cd^{2+} do ledvin a jeho akumulace zde může probíhat i přes bazolaterální plazmatickou membránu. A to buď v komplexu s biomolekulou obsahující thiolovou skupinu jako je Cys či GSH, nebo formou interakce tohoto komplexu s transportérem umístěným na bazolaterální membráně buňky za účelem uvolnění a transportu Cd^{2+} . Množství bazolaterálně

přijátého a naakumulovaného Cd do ledvin je při podání společně s Cys nebo GSH vyšší ve srovnání s hladinou přijatou v jejich nepřítomnosti (*Zalups, 2000*).

Některé látky mají schopnost chránit organismus před nefrotoxickým působením Cd. Mezi takové patří například kurkumin, tetramethylpyrazin (TMP), Telmisartan, NAC a kvercetin. Roku 2018 provedli *Kim a kol.* studii, ve které pozorovali vliv kurkuminu na nefrotoxicitu vyvolanou u krys pomocí Cd. U testovaných objektů došlo díky kurkuminu k opětovnému nárůstu tělesné hmotnosti, k návratu normálních hodnot sérového močovinnového dusíku (BUN) a glukózy přítomné v moči. Stejně tak kurkumin snižuje množství proteinových biomarkerů v moči, inhibuje tvorbu ROS a zabraňuje poškození tubulárních epitelových buněk (*Kim a kol., 2018*).

K látkám ovlivňujícím působení Cd patří též TMP, známý jako Ligustrazin. Při preventivní konzumaci snižuje hodnoty proteinurie, malondialdehydu (MDA), 4-hydroxynon-2-enalu (4-HNE) a disulfidu glutathionu (GSSG) zvýšené účinkem Cd. TMP též ovlivňuje míru exprese enzymů ovlivňujících syntézu aminokyselin obsahujících síru po podání Cd (*Kuang a kol., 2017*).

Telmisartan snižuje BUN a sérový kreatinin zvýšený vlivem Cd. Při jeho podání dochází k potlačení peroxidace lipidů, antioxidačních obranných mechanismů, snížení množství renálního Cd a zvýšení hladin Zn a Se. Zlepšuje histopatologii a snižuje stupeň proximální tubulární nekrózy. To vše při srovnání s jedinci vystavenými Cd, kterým Telmisartan nebyl podán. Jedná se o látku s antiapoptickými, antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi (*Fouad a Jresat, 2011*).

Velmi účinnou ochranou látkou při léčbě nefrotoxicity vyvolané Cd je i NAC, jehož účinky jsou krátkodobé, a proto léčba s jeho pomocí vyžaduje delší dobu trvání. *Shaikh a kol.* provedli studii, ve které byla zvířata vystavena účinku Cd a souběžně léčena NAC. U jedinců s renální koncentrací Cd mezi 200-270 mg/g došlo při přerušení podávání Cd ve stádiu nízké nefrotoxicity k uzdravení bez nutnosti další léčby NAC. U těžké nefrotoxicity došlo při přerušení podávání Cd a dlouhodobé léčbě pomocí NAC k uzdravení (*Shaikh a kol., 1999*).

Poslední zde zmíněnou látkou s protektivním účinkem vůči vlivu Cd je kvercetin patřící do skupiny flavonoidů. Při současném podávání Cd a kvercetinu nedochází k tak výrazným projevům pozorovaných markerů. U některých buněk jsou i přesto v menším rozsahu pozorovány změny jako částečná ztráta mikrovilů a výskyt izolovaných vakuol. Při expozici Cd trvající 9 týdnů jsou v ledvinách sníženy hladiny

superoxiddismutázy (SOD) a glutathionové reduktázy (GR). Účinkem kvercetinu k tak výraznému poklesu nedochází (*Morales a kol., 2006*).

2.2 Rtuť

Rtuť se v ledvinách akumuluje v segmentech proximálních tubulů (*Bridges a Zalups, 2005*). Většina krve při průchodu ledvinami prochází peritubulárními kapilárami, přes vasa recta a odchází ledvinnou žílou. Filtraci na glomerulu podléhá jen 20-30 % z celkového množství Hg v krvi. Určitá část S-konjugátů Hg^{2+} obsažených v krvi je tedy filtrována na glomerulu a účastní se transportů na luminální straně membrány. Zbytek je peritubulární krví přiváděn na bazolaterální stranu membrány (*Zalups a Ahmad, 2004*). Při transportu a akumulaci rtuti značně závisí na její formě a na komplexu který v organismu utvoří. Existuje několik možností příjmu rtuťových iontů buňkami. Nepříliš významným transportem je endocytóza komplexu Hg-albumin na luminální straně cytoplazmatické membrány buněk proximálního tubulu. Další možnost transportu je pomocí Hg^{2+} v S-konjugátu s GSH (GS-Hg-SG). Při něm GS-Hg-SG konjugát vstupuje do luminální komory proximálního tubulu, zde je působením GGT a cysteinylglycinázy přeměněn na thiolový S-konjugát Hg^{2+} . Ve směsi S-konjugátů je přítomen i Cys S-konjugát Hg^{2+} (Cys-S-Hg-S-Cys). Transport rtuti v těle je mnohem rychlejší, pokud je rtuť v Cys S-konjugátu, který je strukturně podobný cystinu. Z tohoto důvodu dochází k jejich záměně na vazebném místě transportního proteinu cystinu. Pro Cys S-konjugáty Hg^{2+} je běžný transport pomocí aminokyselinových transportérů na luminální straně plazmatické membrány proximálních tubulárních buněk. Mezi takové patří Na^+ -independentní transportér $\text{b}^{0,+}$, který přenáší cystin i Cys-S-Hg-S-Cys. Naopak konjugáty Hg^{2+} s GSH, NAC a cysteinylglycinem nepřenáší tak snadno. Substrátem $\text{b}^{0,+}$ jsou také Hcy S-konjugát Hg^{2+} . Z toho tedy vyplývá, že Hcy a Cys S-konjugáty Hg^{2+} jsou imitací cystinu či homocystinu. Transport Hg^{2+} probíhá též přes bazolaterální membránu pomocí OAT 1 a OAT 3 (*Bridges a Zalups, 2005*), s převahou OAT 1. Pomocí OAT 1 jsou transportovány i S-konjugáty rtuti s Cys a NAC. U tohoto transportu je důležitý mechanismus molekulové mimikry. Po vstupu do cytosolu dochází k řadě komplexních výměnných reakcí, v jejichž důsledku se rtuť naváže na důležitá intracelulární nukleofilní místa. S přibývajícím intracelulárně vázanou rtutí nakonec dochází k buněčné smrti (*Zalups a Ahmad, 2004*).

Na ledviny má účinek i organická forma rtuti. Příjem CH_3Hg^+ do epitelových buněk proximálního tubulu je ovlivněn jejich hladinou GSH. S-konjugáty rtuti s GSH jsou vlivem GGT a cysteinylglycinázy přítomných na luminální straně cytoplazmatické membrány přetvořeny na CH_3HgSCys . U tohoto konjugátu se předpokládá, že díky své schopnosti napodobovat molekulu methioninu u aminokyselinových transportérů je následně s pomocí právě těchto transportérů přenesen. Na bazolaterální straně membrány jsou přítomny OAT1, na luminální straně membrány se vyskytují cMOAT2. V ledvinách cMOAT zajišťují odtok škodlivých látek z buněk (*Bridges a Zalups, 2005*).

Při porovnání s játry a mozkiem absorbují ledviny nejvyšší množství rtuti v organismu. Díky své afinitě k -SH skupinám ovlivňuje Hg jaderný faktor κB (NF- κB). Jedná se o transkripční faktor ochraňující buňky před apoptózou, jehož aktivace závisí na thiolových skupinách. Při navázání rtuti na thiolové skupiny k aktivaci NF- κB nedochází, buňky tedy nemají jeho podporu a podléhají apoptóze. Jedná se hlavně o epitelové buňky proximálních tubulů. Ovlivnění ledvin rtutí se v mozku a játrech projevuje snížením hladin alkalické fosfatázy, kyselá fosfatázy a glutathion S-transferázy (GST), naopak zvýšení je pozorováno u hladin reaktivních forem kyseliny thiobarbiturové a u plazmatické koncentrace kreatininu (*Zahir a kol., 2005*). U jedinců s chronickou intoxikací anorganickou formou rtuti jsou běžnými příznaky proteinurie a polyurie, v některých případech může způsobit Nefrotický syndrom, hematurii a anurii (*Park a Zheng, 2012*).

2.3 Olovo

U Pb dochází k přímé korelaci mezi délkou vystavení účinku a hladinou kreatininu v séru a BUN v krvi. Zvýšení hladin těchto ukazatelů je způsobeno snížením clearance kreatininu a močoviny. U jedinců s pracovní expozicí olovu po dobu jednoho roku došlo k výskytu nukleárních inkluzí Pb v buňkách proximálních tubulů. Při delší expozici po dobu 4-12 let se inkluze u pracovníků nevyskytují, ale dochází u nich k projevům různých stupňů difúzní peritubulární či intersticiální fibrózy. Nefropatie způsobená olovem se projevuje hyperurikémií, redukcí solí kyseliny močové v moči a někdy i artritidou a dnou. Onemocnění dnou je spojeno se sníženou sekrecí kyseliny močové v moči. Podáním Ca-EDTA dojde naopak k snížení koncentrace kyseliny močové v séru a k zvýšení jejího vylučování močí. Komplex Ca-EDTA má také schopnost uvolňovat depozici Pb z kostí. U pacientů trpících dnou a selháním ledvin byla po přidání Ca-EDTA pozorována vyšší hladina Pb v moči v porovnání

s těmi trpícími „pouze“ selháním ledvin. Pro detekci selhání ledvin vlivem olova se používá měření glomerulární filtrace pomocí clearance inulinu a p-aminohipurátu. Pozorovaná proteinurie je nízká, nebo žádná. Dochází ale ke zvýšenému vylučování enzymů NAG a lysozymu z ledvinných tubulů. Dále lze pozorovat snížení hladin ikosanoidu 6-keto-PGF_(1α) a zvýšení tromboxanů v moči (Gonick, 2008).

Expozice olovu kouřením cigaret způsobuje tubulární dysfunkci projevující se zvýšeným vylučováním GST, NAG a α₁-mikroglobinu. K jejich vylučování dochází i při expozici nekuřáků. Hlavním místem působení Pb v proximálním tubulu je segment S₃. Při kombinaci s pracovní expozicí olova jsou jejich hladiny v moči ještě vyšší. To vypovídá o synergickém působení kouření a toxicity olova. Tubulární dysfunkce se též projevuje vylučováním Cu, Zn a Pb v moči. To je způsobeno vlivem Pb na tubulární reabsorpci těchto kovů (El-Safty a kol., 2004).

2.4 Porovnání toxicity kadmia, olova a rtuti

Z kadmia, olova a rtuti jsou nefrotoxické účinky nejpodrobněji prozkoumané u kadmia. Pro transport do buněk využívají podobné transportní mechanismy. Důležitou vlastností těchto kovů je schopnost napodobovat endogenní ionty a molekuly, díky tomu mají na ledviny tak velký vliv. Všechny tři kovy způsobují polyurii. U intoxikace Cd a Hg dochází k proteinurii projevující se vylučováním LMW a HMW proteinů. Při expozici olovu nastává proteinurie pouze v malé míře nebo nenastává vůbec. Všechny tři rovněž způsobují změny v látkovém složení moči a patologické změny v morfologii buněk. Intoxikace každým z těchto kovů se projeví jejich přítomností v moči, dále také snižují clearance kreatininu, díky čemuž se zvyšuje jeho hladina v krvi. K nekróze renálních buněk vlivem Cd dochází ojediněle, při intoxikaci Hg pak častěji.

3 Testování nefrotoxického působení

3.1 Testování *in vivo*

In vivo testování probíhá na živých organismech v prostředí laboratoře s přesně definovanými podmínkami. Vystavení toxickému účinku zkoumané látky může probíhat prostřednictvím kontaminované vody, potravy, inhalací či injekčně. Testovaná zvířata jsou rozdělena do skupin dle potřeby výzkumu. Kontrolní skupinou by měli být živočichové s fyziologickou funkcí buněk a orgánů. S výsledky získanými u těchto kontrolních živočichů jsou porovnávány výsledky získané u intoxikovaných živočichů (Huang a kol., 2017).

3.2 Testování *in vitro*

In vitro studie probíhají v laboratorním prostředí s přesně definovanými vlivy působícími na buněčné kultury či části organismů. Pro testování nefrotoxicity mohou být užívány i izolované renální buňky a nefronové fragmenty. Výhodou užití buněčných kultur je, že nejsou ovlivňovány procesy probíhajícími v orgánu či organismu (Ryan a kol., 1994; Pfaller a Gstraunthaler, 1998). Při testování *in vitro* na buněčných kulturách jsou používány primární kultury glomerulárních epitelálních a mezangiálních buněk a buněk ledvinného epitelu z různých míst podél nefronu, nebo trvalé buněčné linie ledvinných epitelů. Pro získání publikovatelných výsledků je nutné, aby buňky používané při testování měly fyziologickou funkci transportních systémů a zachované charakteristiky nefronových segmentů. Růst a diferenciaci buněk je ovlivněna složením kultivačního media, dobou kultivace a kultivačním substrátem (Pfaller a Gstraunthaler, 1998).

3.3 Nejpoužívanější zvířecí buněčné linie

Mezi nejpoužívanější buněčné linie patří MDCK buněčná linie, jež je odvozená z ledvin dospělého kokršpaněla. Dnes jsou buňky této linie považovány za heterogenní populaci a vykazují podobné vlastnosti jako distální tubulární buňky. Vytváří monovrstvu polarizovaných buněk s těsnými spoji obsahující velké množství mitochondrií a polyribosomů. Jejich kultivační médium musí obsahovat hormony (př.: inzulin a glukagon), růstové faktory a řadu dalších sloučeniny jako například Tf. Na membráně se vyskytuje Na^+ -dependentní transportér neutrálních aminokyselin, Na^+/K^+ -ATPáza a Na^+/H^+ antiport. Tato buněčná linie je používána při studiu

membránových transportérů, virových infekcí a cytopatologických účinků látek (*Vrbová a kol., 2016*).

Prasečí buněčné linie LLC-PK1 byla vyizolována z prasete kmene Hampshire. Její jedinečnou schopností je 3D růst, při kterém vznikají sféroidy s monovrstvou polarizovaných buněk na povrchu, která utváří účinnou bariéru pro difúzi. Díky kuboidnímu tvaru buněk předpokládáme, že pochází z proximálního tubulu, avšak tvar a umístění mitochondrií spolu s přítomností a tvorbou vazopresinových transportérů naznačuje netubulární původ buněk. V buňkách této linie se vyskytuje GGT, megalin, alkalická fosfatáza, dochází v nich k Na⁺-dependentním transportům aminokyselin, hexózu a fosfátů. Jednotlivé buňky jsou spojeny těsnými spoji, uvnitř se v dostatečné míře vyskytují malé a velké endozomy, lysozomy, mitochondrie a Golgiho aparát. Na apikální straně mají dobře vyvinuté mikrovily a na bazální straně mají tenkou bazální membránu. Po fixaci glutaraldehydem vykazují diferenciaci a vhodnou polarizaci. LLC-PK1 linie je vhodná k testování transcelulárních transportních mechanismů buněk proximálních tubulů. Jedná se o studium navázání látek na membránu, jejich endocytózu, skladování a uvolňování do cirkulace. Tato linie je spolu s liniemi WKPT-0293 Cl.2 a NRK-52E používána pro zkoumání mechanismů Cd-indukované apoptózy v ledvinných buňkách (*Fujiwara a kol., 2012, Nielsen a kol., 1998, Vrbová a kol., 2016*).

Ledvinné buněčné linie vačic, označované jako OK buněčné linie, mají nízké hladiny GGT a neprodukuje alkalickou fosfatázu. Nepřítomnost výše zmíněných enzymů v těchto buněčných liniích je problémem, a to z důvodu jejich přítomnosti a nepostradatelnosti v buňkách proximálních tubulů. Z tohoto důvodu byly tyto linie vhodně modifikovány (*Pfaller a Gstraunthaler, 1998*). Dnes jsou OK buněčné linie odvozovány od proximálních tubulů a vytváří polarizované monovrstvy s desmozomy a mikrovily na apikální membráně. Byla u nich zjištěna produkce mnoha enzymů jako je alkalická fosfatáza, aminopeptidáza a GGT, dále pak přítomnost membránových transportérů kyselých a neutrálních aminokyselin, glukózy a fosfátů. OK buňky jsou používány pro studium parathyroidního hormonu, dopaminových receptorů a membránového transportu (*Vrbová a kol., 2016*).

Buňky krysí buněčné linie WKPT tvoří polarizovanou monovrstvu diferencovaných buněk s délkou mikrovilů nižší než u *in vivo* buněk proximálních tubulů, avšak srovnatelnou s jinými buněčnými liniemi. Tyto monovrstvy se pěstují na porézních nosičích pokrytých kolagenem. Jednotlivé buňky spojené těsnými spoji

a desmozomem si zachovávají fenotyp buněk proximálních tubulů, obsahují mitochondrie, hladké a hrubé ER, Golgiho aparát a klathrin obsahující vezikuly. Primární kultury proximálních tubulárních buněk potkana netransdukované nebo fibroblastové kokultivace do dvou týdnů zemřou. K transdukcii se používá retrovirus. Buňky WKPT jsou využívány pro zjištění příjmu a výdeje Na^+ pomocí přítomných transportérů jako jsou apikální Na^+/H^+ měniče, bazolaterální Na^+/K^+ -ATPázy a Na^+ -bikarbonátové kotransportéry (Woost *a kol.*, 1996). Například WKPT-0293 Cl.2 buňky 2. segmentu proximálního tubulu krysa jsou používány pro zjištění hladiny exprese proteinů DMT1 a transferinového receptoru 1 důležitých pro příjem železa buňkou (Yu S.-S. *a kol.*, 2017).

Buněčné linie NRK-52E jsou imortalizované epitelové buňky vyizolované z normálních krysích ledvin vlastnostmi se podobající proximálním tubulárním buňkám. Vyskytují se v nich specifické ledvinné enzymy jako alkalická fosfatáza, GGT, LDH, N-acyláza, beta-lyáza a v lysozomech obsažená N-acetyl-beta-glukosaminoxidáza. Aktivity GR a GST jsou nižší v porovnání s *in vivo* modely. Bazolaterální membrána buněčné linie NRK-52E obsahuje OAT a Na^+/K^+ -ATPázu. V jejím kultivačním médiu musí být přítomný D-valin a L-ornitin, látky důležité pro dediferenciaci buněk. Tyto buněčné linie se používají jak pro testování účinků xenobiotik a kovů, tak pro pozorování regenerace toxicky poškozených buněk (Vrbová *a kol.*, 2016).

Homogenní buněčná linie JTC-12 je vyizolovaná z opičích ledvin. Tyto buňky mají na membráně přítomné desmozomy, reagující na parathormon a prostaglandin E1 a tvoří alkalickou fosfatázu a GGT. Rovněž u nich byla zjištěna schopnost transportu aminokyselin a hexózy. Hlavním důvodem, proč se tato buněčná linie běžně nepoužívá je, že po několika pasážích dochází k částečné nediferenciaci buněk (Vrbová *a kol.*, 2016).

3.4 Nejpoužívanější lidské buněčné linie

Často používanou buněčnou linií při studiu nefrotoxických účinků těžkých kovů jsou HK-2 buňky. Jedná se o imortalizované epitelové buňky dospělých lidských proximálních tubulů. Tato linie vznikla vystavením epitelových buněk proximálního tubulu rekombinantnímu retroviru HPV 16 obsahujícímu gen E6/E7 (Ryan *a kol.*, 1994), který reguluje replikaci DNA a buněčnou proliferaci (Vrbová *a kol.*, 2016). HK-2 buňky nerostou v měkkém agaru, v suspenzi ani v methylcelulóze, naopak v keratinocytovém růstovém médiu bez přítomnosti séra a glukózy rostou pomalu

a v médiích bez séra obohacených o epidermální růstový faktor rostou kontinuálně. Tato linie tvoří monovrstvu s těsnými spoji a mikrovily. HK-2 buňky si zachovávají fenotyp a fyziologicko-chemické funkce normálních epitelových buněk proximálních tubulů. V buňkách se vyskytují GGT, kyselá a alkalická fosfatáza, cytokeratin, vimentin a integrin Anti- $\alpha_3\beta_1$ (Ryan a kol., 1994), reagují na parathormon, nereagují na vazopresin, produkují glukózu a hexokinázu. Na membráně se vyskytují nespecifické membránové transportéry xenobiotik a jejich metabolitů, tzv. P-glykoproteiny, dále pak H^+ dependentní transportéry mastných kyselin a Na^+ dependentní transportéry glukózy. HK-2 buňky jsou v praxi využívány pro studium mechanismu nefrotoxicity a transportu glukózy (Vrbová a kol., 2016).

Zdravé epitelové buňky proximálních tubulů dospělého muže immortalizované katalytickou podjednotkou lidské telomerázové reverzní transkriptázy (hTERT) tvoří buněčnou linii RPTEC/TERT1. Výhodou této linie je, že k immortalizaci buněk je použit endogenní enzym, a tedy u nich nedochází ke změnám mechanismů oprav DNA a ke zvýšení genetické nestability účinkem virů. Buňky linie RPTEC/TERT1 si zachovávají genomovou stabilitu a charakter normálních buněk proximálních tubulů (Simon-Friedt a kol., 2015). Reagují na parathormon, dochází v nich k amoniogenezi a paracelulárnímu transportu vody. Na povrchu buněk se vyskytují OAT a OCT (Aschauer a kol., 2015). Díky své citlivosti jsou buňky této linie vhodné pro toxikologické studie a studie výskytu rakoviny vlivem expozice toxickým látkám. Jsou podstatné při studiích týkajících se metabolismu ledvin, biotransformace, rovnováhy pH, reabsorpce živin, příjmu těžkých kovů a rakoviny ledvin. Naopak pro dobře zavedený test genové mutace HPRT1 je nutné tuto linii ještě optimalizovat (Simon-Friedt a kol., 2015). Kultivují se v hormonálně definovaném médiu bez séra (Aschauer a kol., 2015).

Sekvenčním zaváděním SV40 velkého T antigenu a lidské telomerázy do buněk lidského angiomyolipomu vzniká lidská buněčná linie SV7tert. Angiomyolipomy jsou benigní nádory ledvin pocházející z perivaskulárních epiteloidních buněk schopných diferencovat na buňky s vlastnostmi melanocytů, hladkého svalstva a tuku. Nejprve je do životaschopné tkáně angiomyolipomů získané nefrektomií transfekcí zaveden genom SV40 velkého T antigenu. Z transfekovaných buněk byl na základě ultrastrukturálních podobností s původními angiomyolipomy vybrán klon značený SV7 pro zavedení telomerázy. Ta zamezuje stárnutí a způsobuje stabilizaci populace buněk.

Buňky nevykazující pokles aktivity po 40násobném zdvojnásobení populace po aktivaci telomerázy jsou známé jako SV7tert (*Arbiser a kol., 2001*).

Buněčná linie HEK293 pochází z lidských embryonálních ledvin transfekovaných adenovirem. Tyto buňky vykazují epiteliální morfologii, ale nevykazují podobný růst. Byla zjištěna přítomnost mRNA nervové enolázy 2, produkce cytoskeletálních vláken a produkce neurograninu. Tyto skutečnosti jsou specifické pro nervovou tkáň, proto není jisté, zda je tato linie vhodná pro testování renálních funkcí (*Vrbová a kol., 2016*).

4 Závěr

Těžké kovy jsou široce rozšířené kontaminanty životního prostředí mající značné toxické účinky na organismy, mezi které řadíme vliv na ledviny, játra, nervový systém, stavbu kostí, imunitní systém, krevní obraz a plodnost. Mechanismy nefrotoxického působení kadmia, olova a rtuti jsou si velmi podobné. Stejně tak i ke vstupu do buněk využívají řadu stejných transportérů a transportních mechanismů.

V dnešní době se při výzkumu nejčastěji používá buněčná linie HK-2 immortalizovaná retrovirem. Její výhodou je, že pochází z lidských epitelových buněk proximálních tubulů. Výsledky získané *in vitro* pomocí této linie jsou aplikovatelné na lidský organismus. Značnou výhodou je možnost neomezené kultivace, podobně jako u nádorových buněk. Zásadní nevýhodou virem immortalizovaných buněk je, že dochází ke zvýšení genetické nestability a ke změně mechanismů opravy DNA. Z tohoto důvodu je pro testování teoreticky výhodnější například RPTEC/TERT1 buněčná linie, kde jsou buňky immortalizované endogenním enzymem, díky čemuž nedochází ke změně genomu buňky. I přesto jsou ale častěji využívány buněčné linie immortalizované pomocí virů.

Při užití zvířecí *in vitro* buněčné linie je nutné si uvědomit, že výsledky platí pro daný zvířecí druh, nikoliv pro člověka, proto je vhodnější používat buněčné linie odvozené od lidí. Zvířecí buněčné linie jsou vhodné pro studium mechanismu toxicity, kdy neřešíme, zda cílem toxicity je člověk nebo zvíře, ale pouze to, jakým způsobem toxicita probíhá. Dále se užívají pro prvotní testování toxicity těžkých kovů. Neimmortalizované zvířecí linie po pár týdnech umírají, jelikož je nelze dlouhodobě kultivovat. Výsledky získané na zvířecích a lidských buněčných liniích jsou porovnatelné a lze tedy zjistit rozdíly mechanismu působení u jednotlivých živočišných druhů.

Buněčné linie odvozené z nádorových buněk nejsou příliš vhodné pro testování nefrotoxicity, proto se s nimi v praxi ani v literatuře často neseťkáváme.

Seznam použité literatury

1. Abernethy D. R., Destefano A. J., Cecil T. L., Zaidi K., et al.: *Metal Impurities in Food and Drugs*. *Pharmaceutical Research*, **2010**, 27(5), p. 750-755.
2. Ahmad I., Khan B., Khan S., Khan M. T., et al.: *Assessment of Lead Exposure Among Automobile Technicians in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan*. *Science of the Total Environment*, **2018**, 633, p. 293-299.
3. Arbiser J. L., Yeung R., Weiss S. W., Arbiser Z. K., et al.: *The Generation and Characterization of a Cell Line Derived from a Sporadic Renal Angiomyolipoma: Use of Telomerase to Obtain Stable Populations of Cells from Benign Neoplasms*. *American Journal of Pathology*, **2001**, 159(2), p. 483-491.
4. Aschauer L., Limonciel A., Wilmes A., Stanzel S., et al.: *Application of RPTEC/TERT1 Cells for Investigation of Repeat Dose Nephrotoxicity: A Transcriptomic Study*. *Toxicology in Vitro*, **2015**, 30(1, část A), p. 106-116.
5. ATSDR: *Toxicological Profile for Mercury*. Atlanta, **1999**.
6. Baker E. L., Feldman R. G., White R. A., Harley J. P., et al.: *Occupational Lead Neurotoxicity: a Behavioural and Electrophysiological Evaluation Study Design and Year One Results*. *British Journal of Industrial Medicine*, **1984**, 41(3), p. 352-361.
7. Bannon D. I., Portnoy M. E., Olivi L., Lees P. S. J., et al.: *Uptake of Lead and Iron by Divalent Metal Transporter 1 in Yeast and Mammalian Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 295(4), p. 978-984.
8. Baranowski J., Norska-Borówka I., Baranowska I.: *Determination of Heavy Metals in the Bones and Livers of Deceased Neonatal Humans*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **2002**, 69(1), p. 1-7.
9. Barbier O., Jacquillet G., Tauc M., Cougnon M., et al.: *Effect of Heavy Metals on, and Handling by, the Kidney*. *Nephron Physiology*, **2005**, 99(4), p. 105-110.
10. Bassil M., Daou F., Hasein H., Yamani O., et al.: *Lead, Cadmium and Arsenic in Human Milk and Their Sociodemographic and Lifestyle Determinants in Lebanon*. *Chemosphere*, **2018**, 191, p. 911-921.

11. Bradman A., Eskenazi B., Sutton P., Athanasoulis M., et al.: *Iron Deficiency Associated with Higher Blood Lead in Children Living in Contaminated Environments*. Environmental Health Perspectives, **2001**, 109(10), p. 1079-1084.
12. Branca J. J. V., Morucci G., Maresca M., Tenci B., et al.: *Selenium and Zinc: Two Key Players Against Cadmium-Induced Neuronal Toxicity*. Toxicology in Vitro, **2018**, 48, p. 159-169.
13. Bridges Ch. C., Zalups R. K.: *Molecular and Ionic Mimicry and the Transport of Toxic Metals*. Toxicology and Applied Pharmacology, **2005**, 204(3), p. 274-308.
14. Contrino J., Marucha P., Ribaldo R., Ference R., et al.: *Effects of Mercury on Human Polymorphonuclear Leukocyte Function in Vitro*. The American Journal of Pathology, **1988**, 132(1), p. 110-118.
15. Elinder C. G., Kjellström T., Hogstedt C., Andersson K., et al.: *Cancer Mortality of Cadmium Workers*. British Journal of Industrial Medicine, **1985**, 42(10), p. 651-655.
16. Elinder C. G., Lind B., Kjellström T., Linnman L., et al.: *Cadmium in Kidney Cortex, Liver, and Pancreas from Swedish Autopsies. Estimation of Biological Half Time in Kidney Cortex, Considering Calorie Intake and Smoking Habits*. Archives of Environmental Health, **1976**, 31(6), p. 292-302.
17. EL-Safty I. A. M., Afifi A. M. H., Shouman A. E., EL-Sady A. K. R.: *Effects of Smoking and Lead Exposure on Proximal Tubular Integrity Among Egyptian Industrial Workers*. Archives of Medical Research, **2004**, 35(1), p. 59-65.
18. Fouad A. A., Jresat I.: *Protective Effect of Telmisartan Against Cadmium-Induced Nephrotoxicity in Mice*. Life Sciences, **2011**, 89(1-2), p. 29-35.
19. Fujiwara Y., Lee J. Y., Tokumoto M., Satoh M.: *Cadmium Renal Toxicity via Apoptotic Pathways*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, **2012**, 35(11), p. 1892-1897.
20. Garza A., Vega R., Soto E.: *Cellular Mechanisms of Lead Neurotoxicity*. Medical Science Monitor, **2006**, 12(3), p. 57-65.
21. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup Ch., Esche V., et al.: *The Toxicity of Cadmium and Resulting Hazards for Human Health*. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, **2006**, 1(22), p. 1-6.
22. Gonick H. C.: *Nephrotoxicity of Cadmium & Lead*. Indian Journal of Medical Research, **2008**, 128(4), p. 335-352.

23. Goyer R. A., Liu J., Waalkes M. P.: *Cadmium and Cancer of Prostate and Testis*. *Biometals*, **2004**, 17(5), p. 555-558.
24. Grau-Perez M., Pichler G., Galan-Chilet I., Briongos-Figuero L. S., et al.: *Urine Cadmium Levels and Albuminuria in a General Population from Spain: A Gene-Environment Interaction Analysis*. *Environment International*, **2017**, 106, p. 27-36.
25. Guo F., Ding C., Zhou Z., Huang G., et al.: *Effects of Combined Amendments on Crop Yield and Cadmium Uptake in Two Cadmium Contaminated Soils under Rice-Wheat Rotation*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**, 148, p. 303-310.
26. Henderson P. J., McMartin I., Hall G. E., Percival J. B., et al.: *The Chemical and Physical Characteristics of Heavy Metals in Humus and Till in the Vicinity of the Base Metal Smelter at Flin Flon, Manitoba, Canada*. *Environmental Geology*, **1998**, 34(1), p. 39-58.
27. Huang M., Su L., Yang L., Zhu L.: *Effect of Exogenous TGF- β 1 on the Cadmium-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Apoptosis of Proximal Tubular Cells through PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway*. *Chemico-Biological Interactions*, **2017**, 269, p. 25-32.
28. Chwalba A., Maksym B., Dobrakowski M., Kasperczyk S.: *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, p. 174-179.
29. Il'yasova D., Schwartz G. G.: *Cadmium and Renal Cancer*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2005**, 207(2), p. 179-186.
30. IPCS: *Cadmium-Environmental aspects*. Geneva, **1992**, (Environmental Health Criteria 135).
31. Jain R. B.: *Factors Affecting the Variability in the Observed Levels of Urinary Cadmium Among Children and Nonsmoker Adolescents*. *Environmental Science and Pollution Research*, **2017**, 24(3), p. 2515-2526.
32. Jean J., Sirot V., Hulin M., Le Calvez E., et al.: *Dietary Exposure to Cadmium and Health Risk Assessment in Children - Results of the French Infant Total Diet Study*. *Food and Chemical Toxicology*, **2018**, 115, p. 358-364.
33. Jin T., Nordberg M., Frech W., Dumont X., et al.: *Cadmium Biomonitoring and Renal Dysfunction Among a Population Environmentally Exposed*

- to Cadmium from Smelting in China (ChinaCad)*. *Biometals*, **2002**, 15(4), p. 397-410.
34. Khan F., Hussain S., Tanveer M., Khan S., et al.: *Coordinated Effects of Lead Toxicity and Nutrient Deprivation on Growth, Oxidative Status, and Elemental Composition of Primed and Non-Primed Rice seedlings*. *Environmental Science and Pollution Research*, **2018**, 25(21), p. 21185-21194.
 35. Kim K. S., Lim H., Lim J. S., Son J. Y., et al.: *Curcumin Ameliorates Cadmium-Induced Nephrotoxicity in Sprague-Dawley Rats*. *Food and Chemical Toxicology*, **2018**, 114, p. 34-40.
 36. Kim R. Y., Yoon J. K., Kim T. S., Yang J. E., et al.: *Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation - a Critical Review*. *Environmental Geochemistry and Health*, **2015**, 37(6), p. 1041-1061.
 37. Kuang W., Zhang X., Zhu W., Lan Z.: *Ligustrazine Modulates Renal Cysteine Biosynthesis in Rats Exposed to Cadmium*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2017**, 54, p. 125-132.
 38. Larsson Jönsson E.H., Asp H.: *Effects of pH and Nitrogen on Cadmium Uptake in Potato*. *Biologia Plantarum*, **2013**, 57(4), p. 788-792.
 39. Li S., Guo S., Huang X., Huang T., et al.: *Research on Characteristics of Heavy Metals (As, Cd, Zn) in Coal from Southwest China and Prevention Method by Using Modified Calcium-Based Materials*. *Fuel*, **2016**, 186, p. 714-725.
 40. Lin Y.-S., Ho W.-Ch., Caffrey J. L., Sonawane B.: *Low Serum Zinc is Associated with Elevated Risk of Cadmium Nephrotoxicity*. *Environmental Research*, **2014**, 134, p. 33-38.
 41. McConchie D. M., Lawrance L. M.: *The Origin of High Cadmium Loads in Some Bivalve Molluscs from Shark Bay, Western Australia: A New Mechanism for Cadmium Uptake by Filter Feeding Organisms*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **1991**, 21(2), p. 303-310.
 42. Miao A.-J., Wang W.-X., Juneau P.: *Comparison of Cd, Cu, and Zn Toxic Effects on Four Marine Phytoplankton by Pulse-Amplitude-Modulated Fluorometry*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2005**, 24(10), p. 2603-2611.
 43. Morales A. I., Vicente-Sánchez C., Santiago Sandoval J. M., Egido J., et al.: *Protective Effect of Quercetin on Experimental Chronic Cadmium*

- Nephrotoxicity in Rats is Based on its Antioxidant Properties*. Food and Chemical Toxicology, **2006**, 44(12), p. 2092-2100.
44. Mori M., Kotaki K., Gunji F., Kubo N., et al.: *Suppression of Cadmium Uptake in Rice Using Fermented Bark as a Soil Amendment*. Chemosphere, **2016**, 148, p. 487-497.
45. Munksgaard N. C., Burchert S., Kaestli M., Nowland S. J., et al.: *Cadmium Uptake and Zinc-Cadmium Antagonism in Australian Tropical Rock Oysters: Potential Solutions for Oyster Aquaculture Enterprises*. Marine Pollution Bulletin, **2017**, 123(1-2), p. 47-56.
46. Myers G. J., Davidson P. W., Cox C., Shamlaye C., et al.: *Twenty-Seven Years Studying the Human Neurotoxicity of Methylmercury Exposure*. Environmental Research, **2000**, 83(3), p. 275-285.
47. Nalefski E. A., Falke J. J.: *The C2 Domain Calcium-Binding Motif: Structural and Functional Diversity*. Protein Science, **1996**, 5(12), p. 2375-2390.
48. Nielsen R., Birn H., Moestrup S. K., Nielsen M.: *Characterization of a Kidney Proximal Tubule Cell Line, LLC-PK1, Expressing Endocytotic Active Megalin*. Journal of the American Nephrology Society, **1998**, 9(10), p. 1767-1776.
49. Norton G. J., Deacon C. M., Mestrot A., Feldman J., et al.: *Cadmium and Lead in Vegetable and Fruit Produce Selected from Specific Regional Areas of the UK*. Science of The Total Environment, **2015**, 533, p. 520-527.
50. Park J.-D., Zheng W.: *Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury*. Journal of Preventive Medicine & Public Health, **2012**, 45(6), p. 344-352.
51. Pauget B., Gimbert F., Coeurdassier M., Scheifler R., et al.: *Use of Chemical Methods to Assess Cd and Pb Bioavailability to the Snail *Cantareus Aspersus*: A First Attempt Taking into Account Soil Characteristics*. Journal of Hazardous Materials, **2011**, 192(3), p. 1804-1811.
52. Pfaller W., Gstraunthaler G.: *Nephrotoxicity Testing in Vitro-What We Know and What We Need to Know*. Environmental Health Perspectives, **1998**, 106 (2.doplňek), p. 559-569.
53. Pounds J. G., Long G. J., Rosen J. F.: *Cellular and Molecular Toxicity of Lead in Bone*. Environmental Health Perspectives, **1991**, 91, p. 17-32.

54. Prozialeck W. C., Edwards J. R., Vaidya V. S., Bonventre J. V.: *Preclinical Evaluation of Novel Urinary Biomarkers of Cadmium Nephrotoxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology, **2009**, 238(3), p. 301-305.
55. Prozialeck W. C., Edwards J. R.: *Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **2012**, 343(1), p. 2-12.
56. Prozialeck W.C., Vaidya V. S., Liu J., Waalkes M. P., et al.: *Kidney Injury Molecule-1 is an Early Biomarker of Cadmium Nephrotoxicity*. Kidney International, **2007**, 72(8), p. 985-993.
57. Quraishi S. M., Adams S. V., Shafer M., Meliker J. R., et al.: *Urinary Cadmium and Estimated Dietary Cadmium in the Women's Health Initiative*. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, **2016**, 26(3), p. 303-308.
58. Razzuoli E., Mignone G., Lazzara F., Vencia W., et al.: *Impact of Cadmium Exposure on Swine Enterocytes*. Toxicology Letters, **2018**, 287, p. 92-99.
59. Rorat A., Vandebulcke F., Gałuszka A., Klimek B., et al.: *Protective Role of Metallothionein During Regeneration in Eisenia Andrei Exposed to Cadmium*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, **2017**, 203, p. 39-50.
60. Ryan M. J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S. M., et al.: *HK-2: An Immortalized Proximal Tubule Epithelial Cell Line from Normal Adult Human Kidney*. Kidney International, **1994**, 45(1), p. 48-57.
61. Sánchez-Martín M. J., Sánchez-Camazano M., Lorenzo L. F.: *Cadmium and Lead Contents in Suburban and Urban Soils from Two Medium-Sized Cities of Spain: Influence of Traffic Intensity*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **2000**, 64(2), p. 250-257.
62. Sarmiento-Ortega V. E., Treviño S., Flores-Hernández J. A., Aguilar-Alonso P., et al.: *Changes on Serum and Hepatic Lipidome After a Chronic Cadmium Exposure in Wistar Rats*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **2017**, 635, p. 52-59.
63. Satarug S., Moore M. R.: *Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke*. Environmental Health Perspectives, **2004**, 112(10), p. 1099-1103.

64. Sears M. E., Kerr K. J., Bray R. I.: *Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury in Sweat: A Systematic Review*. Journal of Environmental and Public Health, **2012**, 2012, p. 1-10.
65. Shaikh Z. A., Vu T. T., Zaman K.: *Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants*. Toxicology and Applied Pharmacology, **1999**, 154(3), p. 256-263.
66. Shaikh Z. A., Zaman K., Tang W., Vu T.: *Treatment of Chronic Cadmium Nephrotoxicity by N-acetyl Cysteine*. Toxicology Letters, **1999**, 104(1-2), p. 137-142.
67. Schell L. M., Denham M., Stark A. D., Gomez M., et al.: *Maternal Blood Lead Concentration, Diet During Pregnancy, and Anthropometry Predict Neonatal Blood Lead in a Socioeconomically Disadvantaged Population*. Environmental Health Perspectives, **2003**, 111(2), p. 195-200.
68. Silbergeld E. K.: *Lead in Bone: Implications for Toxicology During Pregnancy and Lactation*. Environmental Health Perspectives, **1991**, 91, p. 63-70.
69. Simon-Friedt B. R., Wilson M. J., Blake D. A., Yu H., et al.: *The RPTEC/TERT1 Cell Line as an Improved Tool for In Vitro Nephrotoxicity Assessments*. Biological Trace Element Research, **2015**, 166(1), p. 66-71.
70. Staessen J. A., Roels H. A., Emelianov D., Kuznetsova T., et al.: *Environmental Exposure to Cadmium, Forearm Bone Density, and Risk of Fractures: Prospective Population Study*. The Lancet, **1999**, 353(9159), p. 1140-1144.
71. Storelli M. M., Giacomini-Stuffler R., Storelli A., Marcotrigiano G. O.: *Accumulation of Mercury, Cadmium, Lead and Arsenic in Swordfish and Bluefin Tuna from the Mediterranean Sea: A Comparative Study*. Marine Pollution Bulletin, **2005**, 50(9), p. 100-1007.
72. Tellez-Plaza M., Guallar E., Howard B. V., Umans J. G., et al.: *Cadmium Exposure and Incident Cardiovascular Disease*. Epidemiology, **2013**, 24(3), p. 421-429.
73. Thun M. J., Osorio A. M., Schober S., Hannon W. H., et al.: *Nephropathy in Cadmium Workers: Assessment of Risk from Airborne Occupational Exposure to Cadmium*. British Journal of Industrial Medicine, **1989**, 46(10), p. 689-697.
74. Viden I.: *Chemie ovzduší*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, **2005**, 1. vydání, ISBN 80-7080-571-4.

75. Vrbová M., Dastychová E., Roušar T.: *Renal Cell Lines for Study of Nephrotoxicity in Vitro*. Military Medical Science Letters, **2016**, 85(2), p. 69-74.
76. Wang H., Wang Y., Bo Q.-L., Yi J., et al.: *Maternal Cadmium Exposure Reduces Placental Zinc Transport and Induces Fetal Growth Restriction in Mice*. Reproductive Toxicology, **2016**, 63, p. 174-182.
77. Wang S., Dong Q., Wang Z.: *Differential Effects of Citric Acid on Cadmium Uptake and Accumulation between Tall Fescue and Kentucky Bluegrass*. Ecotoxicology and Environmental Safety, **2017**, 145, p. 200-206.
78. WHO: *Cadmium in Drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality*. Geneva, **2011**, WHO/SDE/WSH/03.04/80/rev1.
79. WHO: *Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern*. Geneva, **2010**.
80. WHO: *Exposure to Lead: A Major Public Health Concern*. Geneva, **2010**.
81. WHO: *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva, **1996**, ISBN 92-4-156173-4.
82. Widziewicz K., Loska K.: *Metal Induced Inhalation Exposure in Urban Population: A Probabilistic Approach*. Atmospheric Environment, **2016**, 128, p. 198-207.
83. Woost P. G., Orosz D. E., Jin W., Frisa P. S., et al.: *Immortalization and Characterization of Proximal Tubule Cells Derived from Kidneys of Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats*. Kidney International, **1996**, 50(1), p. 125-134.
84. Yu S.-S., Jiang L. R., Ling Y., Qian Z. M.: *Nifedipine Increases Iron Content in WKPT-0293 Cl.2 Cells via Up-Regulating Iron Influx Proteins*. Frontiers in Pharmacology, **2017**, 8(článek 60), p. 1-9.
85. Zahir F., Rizwi S. J., Haq S. K., Khan R. H.: *Low dose mercury toxicity and human health*. Environmental Toxicology and Pharmacology, **2005**, 20(2), p. 351-360.
86. Zalups R. K., Ahmad S.: *Homocysteine and the Renal Epithelial Transport and Toxicity of Inorganic Mercury: Role of Basolateral Transporter Organic Anion Transporter 1*. Journal of the American Society of Nephrology, **2004**, 15(8), p. 2023-2031.

87. Zalups R. K., Ahmad S.: *Molecular Handling of Cadmium in Transporting Epithelia*. Toxicology and Applied Pharmacology, **2003**, 186(3), p. 163-188.
88. Zalups R. K.: *Evidence for Basolateral Uptake of Cadmium in the Kidneys of Rats*. Toxicology and Applied Pharmacology, **2000**, 164(1), p. 15-23.
89. Zhang X. Z., Yang H., Cui Z.: *Evaluation and Analysis of Soil Migration and Distribution Characteristics of Heavy Metals in Iron Tailings*. Journal of Cleaner Production, **2018**, 172, p. 475-480.