

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Tereza Janderková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Cytotoxicita rtuti
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Cytotoxicity of Mercury
Bachelor Thesis

2024

Tereza Janderková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Janderková**
Osobní číslo: **C21180**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Cytotoxicita rtuti**
Téma práce anglicky: **Cytotoxicity of Mercury**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma cytotoxické působení rtuti. V úvodní části bakalářské práce se zaměřte na definici tohoto těžkého kovu a popište základní vlastnosti jednotlivých forem rtuti. Vyzdvihněte také současný význam rtuti a nejčastější způsoby, jak se rtuť dostává do lidského organismu.
2. V hlavní části práce se zaměřte na mechanismus cytotoxického působení rtuti. Podrobněji se věnujte zejména neurotoxicitě a nefrotoxicitě rtuti. Zároveň porovnejte toxicitu rtuti s cytotoxicitou jiných těžkých kovů. V závěrečné části práce se pokuste shrnout výsledky aktuálních studií, které se zabývají primárně testováním neurotoxicity rtuti *in vitro*.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lenka Tichá**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem cytotoxicita rtuti jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2024

Tereza Janderková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych velmi poděkovat panu RNDr., Jířímu Handlovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas a velice dobrou komunikaci během vypracování této závěrečné práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřená na rtuť, její využití, formy a toxické účinky na jednotlivé orgány. V úvodu práce jsou obecně popsány těžké kovy, na které navazuje samotná rtuť, její vlastnosti a emise rtuti v České republice. Následně jsou popsány příklady využití rtuti v lékařství a přítomnost rtuti v přírodě. Součástí práce jsou mechanismy účinku rtuti na orgány jako jsou krev, nervová soustava a ledviny. V závěru práce jsou uvedeny další těžké kovy a jejich cytotoxické účinky na organismus.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rtuť, toxicita, reaktivní formy kyslíku buněčná linie, SH-SY5Y

TITLE

Cytotoxicity of Mercury

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on mercury, its uses, forms, and toxicity to individual organs. The introduction provides a general overview of heavy metals, followed by a detailed discussion on mercury itself, its properties, and mercury emissions in the Czech Republic. Subsequently, the properties and medical uses of mercury and its presence in nature are described. The thesis also includes the mechanisms of mercury's effects on various organs such as blood, the nervous system, and kidneys. In the conclusion, other heavy metals and their cytotoxic effects on organisms are discussed.

KEYWORDS

Mercury, toxicity, reactive oxygen species, cell line, SH-SY5Y

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	12
1 Těžké kovy.....	13
1.1 Rtuť.....	14
1.1.1 Vlastnosti rtuti.....	14
1.1.2 Emise rtuti v České republice	15
1.2 Hlavní sloučeniny rtuti.....	15
1.3 Využití rtuti v lékařství.....	16
1.4 Přítomnost rtuti v přírodě.....	16
1.4.1 Přítomnost rtuti ve sladkovodních rybách	18
1.4.2 Přítomnost rtuti v mořských rybách.....	19
2 Toxicita a kontaminace organismu rtutí	21
2.1 Anorganická rtuť.....	21
2.1.1 Sloučeniny anorganické rtuti	21
2.1.2 Elementární a kovová rtuť	22
2.2 Organická rtuť.....	22
2.3 Kontaminace organismu rtutí.....	23
2.3.1 Akutní otrava	23
2.3.2 Chronická otrava.....	25
2.4 Případy otravy akutní elementární rtutí	26
2.4.1 Pacient 1.....	26
2.4.2 Pacient 2.....	26
2.4.3 Pacient 3.....	27
2.4.4 Léčba a sledování pacientů.....	27
3 Mechanismus účinku rtuti v orgánech	28
3.1 Krev	28
3.1.1 Materiály a metody	28
3.1.2 Výsledky	30
3.2 Nervová soustava.....	30

3.2.1 Buněčná linie SH-SY5Y	31
3.2.1 Anorganická rtuť a diferenciacie buněk SH-SY5Y	32
3.2.1.1 Buněčná kultura	32
3.2.1.2 Cytotoxické účinky současné expozice RA a Hg	32
3.3 Ledviny	33
4 Ostatní těžké kovy	35
4.1 Měď	35
4.2 Olovo	37
4.3 Kadmium	39
4.3.1 Kadmium a vaskulární endotel	40
4.3.2 Kadmium a mitochondrie	40
4.3.3 Imunotoxicita kadmia	41
ZÁVĚR	42
POUŽITÁ LITERATURA	43

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Kapaln� kuličky rtuti.....	15
Obrázek 2 - Cesty expozice rtuti u lidí.....	17
Obrázek 3 - Rentgenov� snímek hrudníku při přijmu ukazuje oboustrannou rozsáhlou nerovnoměrnou konsolidaci vzdušného prostoru.....	24
Obrázek 4 - HRCT sken po�rozen� 2 dny po expozici ukazuje bilater�ln� konsolidaci vzdušného prostoru, zejména v závislých �astech.....	24
Obrázek 5 - Kontrolní rentgen hrudníku ukazuje, že oboustrann� konsolidace se v�razn� zlepšila se zbytkovou opacitou v prav�m dolním plicním poli.....	25
Obrázek 6 - Kontrolní HRCT sken ukazuje m�rn� peribronchovaskul�rn� intersticiální ztlušt�n� a m�rn� interlobulární ztlušt�n� septa, zejména v z�visl� časti.....	25
Obrázek 7 - Vliv HgCl ₂ na lidsk� erytrocyty.....	29
Obrázek 8 - Snímky kontrolních a HgCl ₂ ošetřených erytrocytů ze skenovací elektronov� mikroskopie (SEM) při 5000x zvětšení.....	30

SEZNAM ZKRATEK

A-549	Buněčná linie plic
ALP	Akutní promyelocytární leukémie
ARDS	Syndrom akutní respirační dechové tísně
BCAM-Lu	Basal Cell Adhesion Molecule – Lutetium
DMSA	Kyselina dimerkaptosukcinová
EA	Kyselina ellagová
ESP	Eleskrostatický odlučovač
GABAA	Kyselina gama-aminomáselná typu A
GC	Plynová chromatografie
GC/ECD	Plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu
HepG2	Buněčná linie jater
HL-60	Buňky lidské leukémie
HRCT	Počítačová tomografie hrudníku s vysokým rozlišením
LCP	Velká spalovací zařízení
MRI	Magnetická rezonance
PBS	Fosfátový pufr
RA	Kyselina retinová
RBC	Erytrocyty
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutáza
TCP	Celkové množství buněčných proteinů
THg	Celková koncentrace rtuti

ÚVOD

Těžké kovy jsou přírodní prvky, které se vyskytují v poměrně nízké koncentraci. V periodické tabulce prvků zauímají podíl sloupců 3-16, zahrnující přechodné kovy, postpřechodné kovy a lanthanoidy. Mezi těžké kovy řadíme olovo, kadmium, rtuť, arsen, chrom, měď, selen, nikl, stříbro a zinek. Některé těžké kovy jsou pro člověka důležité, neboť mají biochemické a fyziologické funkce. Mezi tyto těžké kovy řadíme měď, selen nebo zinek.

Rtuť je v periodické tabulce prvků označena chemickou značkou Hg, z latinského názvu *hydrargyrum*. Jedná se o přirozeně vyskytující se prvek, který v přírodě nalézáme nejčastěji ve formě rumělky. Jedná se o stříbrně zabarvený kov a také o jediný kov, který je za pokojové teploty kapalný. Rtuť nalézáme celkem ve třech formách, a to jsou elementární, anorganické a organické. Všechny tyto formy vyvolávají toxické účinky a liší se například mechanismem transportu, místem účinku nebo metabolickým osudem v těle. Rtuť nalézáme také v mnoha sloučeninách, jako je chlorid rtuťnatý (kalomel), oxid rtuťnatý a sulfid rtuťnatý. Velké využití má například v lékařství, kde se využívá v manuálním tlakoměru, nebo v zubním lékařství jako dentální amalgám. Do životního prostředí se rtuť uvolňuje při vulkanické činnosti, při spalování fosilních paliv nebo přirozenými procesy. Díky uvolňování rtuti do životního prostředí se rtuť vyskytuje například v rybách.

Po požití se rtuť vstřebává do krevního řečiště a je distribuována do celého těla, kde se následně kumuluje v jednotlivých orgánech. V krevním řečišti ovlivňuje stabilitu proteinů, v nervové soustavě ionty rtuti narušují antioxidační potenciál glutathionu a podporují tvorbu reaktivních forem kyslíku, což je nejčastěji prokazováno na buněčné linii SH-SY5Y. V posledním případě jsou zmíněny ledviny, kde rtuť přispívá k proteinurii, dále může poškozovat proximální tubulární buňky a zároveň může ovlivňovat senzitivitu lysozomu.

Měď je těžký kov, který má biochemickou funkci v lidském organismu a je nezbytný pro život. Patří mezi skupinu metaloenzymů zapojených do tvorby hemoglobinu, metabolismu sacharidů a další. Olovo je jedním z nejrozšířenějších kovů v historii lidstva. Olovo se řadí mezi víceúčelové toxické látky a ovlivňuje mnoho orgánových systémů včetně gastrointestinálního traktu, hematopoetického systému a další. Kadmium je těžký kov bez biologické funkce u lidí. Přestože kadmium představuje velký environmentální zdravotní problém, konkrétní mechanismy, kterými vyvolává své účinky, nebyly doposud plně objasněny.

1 Těžké kovy

Těžké kovy jsou přírodní prvky charakterizované poměrně vysokou atomovou hmotností a vysokou hustotou. Vzhledem k tomu že se typicky vyskytují v poměrně nízké koncentraci, lze je nalézt v celé kůře naší planety. V periodické tabulce prvků těžké kovy *sensu stricti* (podle kritéria hustoty) zaujímají část sloupců 3-16, zahrnující přechodné kovy, post-přechodné kovy a lanthanoidy (Koller a Saleh, 2018). Jakýkoliv toxický kov je považován za kontaminant, pokud se vyskytuje ve formě či koncentraci, která má škodlivý účinek na člověka nebo životní prostředí. Mezi těžké kovy se řadí olovo (Pb), kadmium (Cd), rtuť (Hg), arsen (As), chrom (Cr), měď (Cu), selen (Se), nikl (Ni), stříbro (Ag) a zinek (Zn). Mezi méně obvyklé těžké kovy patří hliník (Al), cesium (Cs), kobalt (Co), mangan (Mn), molybden (Mo), stroncium (Sr) a uran (U) (Singh et al., 2011). Těžké kovy jsou považovány za stopové prvky, protože jsou přítomny ve stopových koncentracích v různých enviromentálních matricích. Každý kov má jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, které zodpovídají za jeho toxikologické mechanismy působení. Biologická dostupnost těžkých kovů je ovlivněna fyzikálními faktory, jako je teplota, fázová asociace, adsorpce a sekvestrace. Dále je ovlivněna chemickými faktory, které ovlivňují vlastnosti při termodynamické rovnováze, kinetiku komplexace, rozpustnost lipidů a rozdělovací koeficienty oktanol/voda (Tchounwou et al., 2014).

Některé těžké kovy jsou pro člověka velmi důležité, protože mají v lidském organismu biochemické a fyziologické funkce. Mezi tyto těžké kovy řadíme například měď, selen nebo zinek, což jsou esenciální stopové prvky, jejichž funkce jsou nepostradatelné pro správnou funkci celého metabolismu. Dále se může jednat třeba o kobalt, který je centrálním atomem komplexní struktury vitamínu B12 a je klíčovým prvkem v redukční větvi fermentační cesty kyseliny propionové (Koller a Saleh, 2018). Stopové prvky jsou zároveň důležitými složkami několika klíčových enzymů a hrají důležitou roli v různých oxidačně-redukčních reakcích, avšak nadměrné množství těchto kovů způsobuje poškození buněk a tkání, což vede k řadě nepříznivých účinků a onemocnění. V biologických systémech bylo popsáno, že těžké kovy ovlivňují buněčné organely a další kompartmenty, jako je buněčná membrána, mitochondriální lysozom, endoplazmatické retikulum, jádro a některé enzymy zapojené do metabolismu, detoxikace a oprav buněčných poškození. Ionty těžkých kovů mohou interagovat s buněčnými složkami včetně DNA. V důsledku této interakce dochází k indukci konformačních změn, které mohou vést k modulaci buněčného

cyklu, karcinogenezi nebo apoptóze. Toxicita a karcinogenita způsobená těžkými kovy zahrnuje mnoho metabolických aspektů, z nichž některé nebyly dosud zcela objasněny a pochopeny (Tchounwou et al., 2014).

1.1 Rtuť

Rtuť je pojmenovaná podle Merkura – posla bohů v římské mytologii. V periodické tabulce prvků je označena chemickou značkou Hg, což je odvozeno z latinského názvu *hydrargyrum* (Greenwood et al., 1993). Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek, který se ve volné přírodě nejčastěji nachází ve formě canabaritu neboli rumělky. Vyskytuje se v koncentracích 80 mg/kg v zemské kůře a 0,3 ng/l v mořské vodě (Gonzalez-Raymat et al., 2017). V geologii rtuť nacházíme nejčastěji ve formě rumělky, ale také ho lze najít ve formách minerálů, jako je například livingstonit (HgSb_4S_8) neb corderolit ($\text{Hg}_3\text{S}_2\text{Cl}_2$). Na Zemi existují místa, která jsou označována jako rtuťnaté pásy. Přezdívá se jim tak, protože jsou největšími nalezišti rtuti. Zároveň se jedná o oblasti spojené se sopečnou činností. Jedno z největších nalezišť je ve Španělsku v oblasti Almaden, kde se v minulosti rtuť vyráběla zhruba 2000 let (Gonzalez-Raymat et al., 2017).

Z historie je rtuť známá, protože ve Středozeří ji používali pro extrakci kovů amalgamací zhruba 500 let př. n. l. Dále se rumělka ve středověku používala jako pigment. Přes 1000 let se rtuť využívala k trasmutacím obyčejných kovů na zlato, což bylo využíváno k imitacím zlata a stříbra. Toto se používalo až do 16. století (Gonzalez-Raymat et al., 2017).

Rtuť se slučuje s mědí, cínem a zinkem za vzniku amalgámů nebo kapalných slitin. Rtuť nesmáčí sklo ani na něm neulpívá. Další vlastností rtuti je rychlá a rovnoměrná objemová expanze v celém objemu, což je užitečné v teploměrech nebo barometrech. Ve 20. století se používala při výrobě chloru a hydroxidu sodného elektrolýzou solanky, kde se používala jako katoda neboli záporný pól, který rozpouští uvolněný sodík za vzniku kapalného amalgámu (Tikkanen et al., 2008).

1.1.1 Vlastnosti rtuti

Rtuť je leskle stříbrně zbarvená a jedná se o jediný kov, který je za pokojové teploty kapalný. Proto se jí také přezdívá kapalně stříbro. Kromě vzácných plynů je to jediný prvek, který po vypaření tvoří jednoatomové páry. Má zhruba 6x vyšší povrchové napětí než voda a při spadnutí z výšky na pevný povrch se rozdělí do malých stříbrných kapek (kuliček). Jedná se o dobrý vodič elektrického proudu, ale špatný vodič tepla (Greenwood et al., 1993). I když má rtuť široké využití, pro člověka je toxická. Jednou z nejtoxičtějších forem rtuti je organická methylrtuť (MeHg). V roce 1956 byl zaznamenán první případ těžké otravy

methylyrtutí v Minamatě v Japonsku, kdy došlo k požití ryb žijících ve znečištěných vodách odpady z chemických továren (Bernhoft, 2011).



Obrázek 1 - Kapalně kuličky rtuti (Tikkanen, A.; et al., 2008).

1.1.2 Emise rtuti v České republice

V posledních letech byly globální problémy se rtutí řešeny z hlediska prokázané ekotoxicity a akumulace. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů emisí rtuti jsou jednotky spalování fosilních paliv (Vávrová et al., 2017). Spalování uhlí, zejména lignitu, je významným zdrojem emisí rtuti. Rtuť obsažená v uhlí se při vysokých teplotách v kotli uvolňuje jako elementární rtuť (Hg^0). Část této rtuti po ochlazení oxiduje a reaguje s halogenidy (Br, I, Cl), čímž vznikají oxidované sloučeniny rtuti (Hg^{2+}). Tyto sloučeniny jsou částečně zachycovány čistícími systémy, jako jsou elektrostatické odlučovače (ESP) a odsiřovací zařízení. Rtuť, která není zachycena, se uvolňuje do atmosféry jako Hg^0 , která je nerozpustná ve vodě a může být transportována na velké vzdálenosti. V atmosféře se může Hg^0 přeměnit na Hg^{2+} , která se pak dostává s deštěm do vodních nádrží. Emise rtuti ze spalování uhlí závisí na obsahu rtuti v uhlí, který se liší podle země původu. Například v Číně se obsah rtuti pohybuje mezi 0,03 a 45,0 mg/kg, zatímco v České republice mezi 0,01 a 1,0 mg/kg (Pilar et al., 2021). V České republice nebyly emise rtuti legislativně stanoveny do druhé poloviny roku 2021, kdy vešly v platnost nové legislativní předpisy pro velká spalovací zařízení (LCP). Emise rtuti jsou nyní velmi diskutovaným tématem na všech úrovních v České republice (Vávrová et al., 2017).

1.2 Hlavní sloučeniny rtuti

V přírodě existuje poměrně málo sloučenin rtuti. Nalezneme je buď v oxidačním stavu I nebo II. Iont rtuti, Hg_2^{2+} je dvouatomový, a tudíž i poměrně stabilní. Jednou z nejdůležitějších a nejznámějších sloučenin je kalomel, chemicky chlorid rtuťný Hg_2Cl_2 . Jedná se o jednu z bivalentních sloučenin bez barvy a zápachu. Chlorid rtuťný

je extrémně toxický, ale zároveň má širokou škálu použití. V zemědělství se používá jako fungicid, v lékařství v nízké koncentraci jako lokální antiseptikum a v chemickém průmyslu slouží jako katalyzátor při výrobě vinylchloridu. HgO neboli oxid rtuťnatý, poskytuje elementární rtuť pro přípravu organických sloučenin rtuti a určitých anorganických solí rtuti. Jedná se o pevnou krystalickou látku červené nebo žluté barvy. Používá se jako elektroda (ve směsi s grafitem) a s oxidem rtuťnatým ve rtuťových bateriích. Sulfid rtuťnatý, HgS, je pevná krystalická látka černé nebo červené barvy. Používá se hlavně jako pigment v barvách, gumě a plastech (Tikkanen et al., 2008).

1.3 Využití rtuti v lékařství

Rtuť má své využití i v lékařství, kde se používala například v manuálním tlakoměru, který však byl již ve většině případů nahrazen automatickými manometry. Celkový obsah elementární rtuti ve tlakoměru bylo 64-85 g, avšak skutečné množství se lišilo, neboť rtuť podléhala oxidaci, vypařování anebo se mohla z přístroje vylít. Na toto byla provedena studie, kdy se zkoumalo, zda vypařování rtuti nemá vliv na zdraví nemocničního personálu, který s přístroji pracoval denně a byl tak vystaven rtuťovým parám dlouhodobě. Závěrem studie bylo, že existuje málo důkazů pro toto tvrzení. Zdravotní problémy byly však zaznamenány v případech vylití rtuti v malých uzavřených prostorech s nedostatečnou vzdušnou ventilací, často v dobře vyhřáté místnosti, kde vylitá rtuť nebyla adekvátně odstraněna. Manuální tlakoměr není však jediný přístroj v lékařství, který využívá rtuť pro své vlastnosti. Další vysoce využívaným přístrojem je rtuťový teploměr. V zubním lékařství se rtuť využívá jako součást dentálního amalgámu (Langford et al., 1999).

1.4 Přítomnost rtuti v přírodě

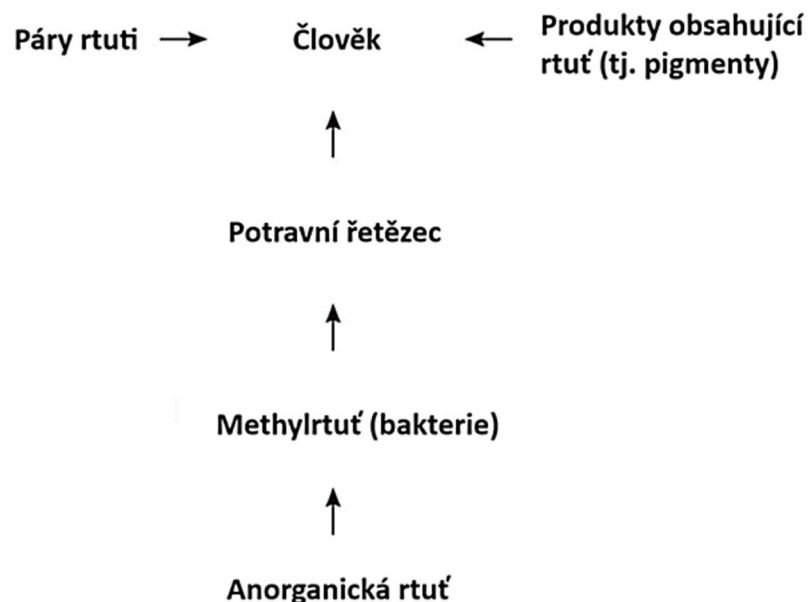
Rtuť se do životního prostředí dostává třemi způsoby. V prvním případě se rtuť přirozeně uvolňuje do vzduchu z vulkánů, zvětráváním skla nebo při lesních požárech. V druhém případě se rtuť uvolňuje do vzduchu spalováním fosilních paliv a komunálního nebo lékařského odpadu. V posledním případě je rtuť do životního prostředí uvolňována přirozenými procesy, což může být například odpařování mořské vody. Podle výzkumu a zprávy *Národního inventáře Spojených států amerických* z roku 2014 jsou největším zdrojem znečištění elektrárny spalující uhlí pro výrobu elektřiny. Tyto elektrárny představují zhruba 42 % všech antropogenních emisí rtuti (Drive et al., 2019).

Jakmile je rtuť uvolněna do atmosféry může cestovat díky větru až stovky kilometrů daleko od zdroje, než se usadí na povrchu Země. Usazování rtuti na povrch trvá několik dnů, ale třeba i několik let. Rtuť totiž může zůstat ve vzduchu a cestovat kolem země. Poté, co se

usadí, může být rtuť splavena deštěm a táním sněhu do povrchových vod. Rtuť setrvává v životním prostředí po dlouhou dobu a cyklicky cestuje mezi vzduchem a půdou. V průběhu tohoto koloběhu rtuť může měnit své chemické formy. Samotná rtuť není nikdy odstraněna z životního prostředí, je pouze přemísťována na jiná místa, a nakonec je překryta půdami a sedimenty (Drive et al., 2019).

Hladina rtuti v povrchových vodách se od počátku průmyslové revoluce téměř ztrojnásobila. Také v mořských vodách je koncentrace rtuti vyšší, což se projevuje především u mořských plodů, které mají v plné krvi nepříjemně vysoké množství rtuti (Yang et al., 2019). Díky lidské činnosti množství rtuti v atmosféře každý rok roste zhruba o 1,5 % (Rice et al., 2012).

V americkém vládním registru toxických látek a nemocí je rtuť na třetím místě mezi nejtoxičtějšími prvky nebo látkami na planetě hned po arsenu a olovu. Půda kontaminovaná rtutí nebo redistribuce kontaminované vody má potenciál vstoupit do potravinového řetězce prostřednictvím rostlin a hospodářských zvířat. Pokud se rtuť dostane do potravního řetězce, dochází k bioakumulaci, která má nepříznivé dopady na lidské zdraví. Přesný mechanismus vstupu rtuti do potravního řetězce je do značné míry stále neznámý a v jednotlivých ekosystémech se pravděpodobně liší (Rice et al., 2012).



Obrázek 2 - Cesty expozice rtuti u lidí (přeloženo z obrázku v angličtině) (Rice et al. 2012).

1.4.1 Přítomnost rtuti ve sladkovodních rybách

Rtuť se díky své toxicitě stala mezinárodním veřejným zájmem. Vyskytuje se v různých formách a bioakumuluje se v potravních sítích (Suhendrayatna et al., 2019). Je jednou z hlavních znečišťujících látek ve vodním prostředí. Rtuť se bioakumuluje ve vodních organismech, dlouhodobě setrvává v sedimentech dna a je uvolňována do životního prostředí z přírodních i antropogenních zdrojů (Havelková et al., 2008). Mezi významné indikátory znečištění vodního prostředí rtutí patří ryby, u kterých se nejvyšší koncentrace rtuti nachází především ve svalové tkáni (Čelechovská et al., 2007). Nejčastější cestou vstupu rtuti do lidského těla je konzumace ryb z oblastí znečištěných rtutí. Účinky methylrtuti nepříznivě účinkují na nervový, kardiovaskulární a imunitní systém (Miero et al., 2009). Vzhledem k tomu, že jsou ryby nedílnou součástí lidské stravy, je nutné sledovat hladinu rtuti ve svalových tkáních ryb (Sedláčková et al., 2014).

V roce 2011 byla věnována pozornost především výtokovému úseku několika velkých řek v České republice (ČR), kde byly pozorovány zvýšené hodnoty kontaminace ryb rtutí a zároveň bylo pozorováno znečištění řek před odtokem z ČR. Cílem studie bylo zjistit hladiny celkové rtuti a methylrtuti ve svalových tkáních indikátorového druhu, kterým je například jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) na 12 velkých tocích v ČR a zhodnotit zdravotní rizika spojená s konzumací ryb ze studovaných lokalit (Sedláčková et al., 2014).

Vzorky byly odebrány na 12 místech na 11 řekách v ČR. Pro sledování obsahu rtuti a methylrtuti byly vybrány řeky: Labe, Odra a Morava. Dále byly vzorky odebrány v lokalitách přítoků hlavních řek, proti proudu migrační bariéry. Sledované byly přítoky Labe: Vltava a Ohře, přítoky Vltavy: Berounka, Otava, Lužice a Sázava, přítok Moravy: Dyje. Odběry sedimentů byly prováděny podle metodiky přijaté a používané v Českém hydrometeorologickém ústavu (ČHMÚ) v rámci státního monitoringu jakosti vod v souladu se směrnicemi EU. Z každé lokality bylo odebráno celkem 8 vzorků. Při odběru se odebíraly vzorky tzv. „čerstvých sedimentů“, které se v průběhu roku mění. Vzorky byly odebírány z povrchové vrstvy sedimentu v hloubce 3-10 cm minimálně ze 3 odběrových míst v rámci jedné lokality. Po odběru vzorku byly sedimenty promíchány, homogenizovány a skladovány v plastových, skleněných nebo nerezových vzorkovacích nádobách při teplotě do 4 °C. Následně byly transportovány na pracoviště, kde byly zmrazeny a přeneseny do laboratoří (Sedláčková et al., 2014).

Celkem bylo uloveno 130 indikátorových ryb (*Leuciscus Cephalus*) Ryby byly uloveny roku 2011 během května a června na 12 lokalitách na jedenácti řekách v ČR. V každé lokalitě bylo odchyceno 9-12 jeliců, kromě místa Ohře, kde bylo odchyceno pouze 6 jeliců.

Následně byly ryby zváženy a byl odebrán vzorek váhy pro ověření věku a vzorek svalové tkáně na obsah rtuti. Vzorky svalové tkáně byly odebírány z lebeční oblasti dorzálně k laterální linii. Vzorky svalů byly umístěny do polyethylenových sáčků, označeny a následně skladovány při -18 °C až do analýzy (Sedláčková et al., 2014).

Celková koncentrace rtuti (THg) ve vzorcích rybí svaloviny a sedimentu byla stanovena pomocí jednoúčelového atomového absorpčního spektrofotometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyzer), kde lze rtuť stanovit bez předběžné úpravy vzorku (Kružíková et al., 2008). Koncentrace methylrtuti byla stanovena plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD). Vzorky byly připraveny kyselou digescí a extrakcí toluenem (Maršálek et al., 2006). Hodnocení bylo provedeno pomocí softwaru GC Solution a softwaru MS Excel. Průměrné koncentrace THg a MeHg ve svalovině ryb ulovených v řekách v ČR nepřesáhly platný hygienický limit 0,5 mg/kg⁻¹. Konzumace ryb z těchto oblastí nepředstavuje pro člověka zdravotní riziko z hlediska kontaminace rtutí (Sedláčková et al. 2014).

1.4.2 Přítomnost rtuti v mořských rybách

Kontaminace sloučenin Hg v mořském prostředí souvisí s antropogenním vypouštěním, které přispívá ke zvýšení toku Hg a změně jejích chemických forem (Suhendrayatna et al., 2019). Obavy ze znečištění a dopad, který toto znečištění může mít na mořské prostředí byly intenzivně sledovány od případu Minamata v 60. letech 20. století. Tato studie poukazuje na cyklus rtuti a methylrtuti v mořském prostředí a bioindikátory, které odrážejí úroveň expozice (Al-Sulaiti et al., 2022).

Ve vodním prostředí se působením mikroorganismů přeměňuje na toxičtější formu methylrtuť v sedimentu. Methylrtuť je nejčastěji se vyskytující organickou sloučeninou v biologických materiálech a má silnou tendenci akumulovat se ve vodním potravním řetězci (Housrová et al., 2007). Vodní organismy ze svého okolí MeHg snadno absorbují. Bioakumulace znamená zvýšení koncentrace rtuti prostřednictvím opakovaného příjmu u stejné ryby. Biomagnifikace znamená nárůst koncentrace rtuti v různých druzích ryb napříč trofickými úrovněmi potravního řetězce, tj. čím vyšší je trofická úroveň rybiho druhu, tím vyšší je koncentrace rtuti. Koncentraci rtuti a MeHg v rybách mohou ovlivnit různé faktory, jako například trofická úroveň, druh ryby, velikost, věk, pohlaví nebo stanoviště. Mezi abiotické faktory, které mohou ovlivnit hladiny rtuti, mezi které patří hladina vodního sloupce, teplota, slanost a depozice z antropogenních emisí z průmyslových zón a ropných činností (Al-Sulaiti et al., 2022).

Vysoce kontaminované ryby mohou představovat zdravotní riziko pro člověka (Hájeb et al., 2009). Zároveň jsou ryby považovány za jeden z nejdůležitějších zdrojů esenciálních bílkovin a jsou základní potravinou pro mnoho komunit po celém světě. Ryby jsou zároveň bohaté na omega 3 mastné kyseliny, kyselinu dokosaheptaenovou, kyselinu linolenovou, nenasycené mastné kyseliny, mikro- a makroživiny a různé vitamíny. Zároveň je dokázáno, že konzumace ryb je vysoce účinná při snižování rizika nepřenositelných onemocnění, zejména kardiovaskulárních onemocnění, revmatoidní artritidy a je nezbytná pro normální vývoj neuronů u dětí (Al-Sulaiti et al., 2022).

Kontaminace ryb Hg a MeHg představuje významnou výzvu pro veřejné zdraví. Hladinu Hg ve vodním prostředí v oblasti Arabského zálivu ovlivňuje celá řada faktorů. Za běžných podmínek má Arabský záliv suché prostředí, horké klima, vysokou slanost vody a špatnou cirkulaci, což má za následek dlouhou dobu zadržení vody. Jedná se o polouzavřený záliv, který přijímá omezené množství sladké vody z řek v severní části a nízké úrovně srážek. Zároveň je nutné upozornit na ropný průmysl a průmysl zemního plynu, který tvoří páteř ekonomiky v oblasti Perského zálivu. Region spoléhá na odsávání vody, čističky odpadních vod a elektrárny založené v pobřežních oblastech. Toto zvýšení úrovně rtuti může představovat riziko pro populaci v Perském zálivu, neboť ryby jsou v tomto regionu hlavním zdrojem potravy díky jejich hojnosti a snadné dostupnosti (Al-Sulaiti et al., 2022).

Trofický řetězec začíná od spodní části potravního řetězce nahoru a postupuje od: heterotrofních organismů (zooplankton a bentičtí bezobratlí) až k býložravým a masožravým rybám. Toto je hlavním důvodem vyššího obsahu Hg ve dravých rybách. Například bentické druhy mají vyšší hladinu Hg než pelagické druhy (sardinky a makrely). Zároveň medopelagické ryby (planktožravé) mají nižší hladinu Hg než masožravé ryby, což poukazuje na to, že hladina Hg je ovlivněna trofickou vrstvou, a ne hloubkou vody (Al-Sulaiti et al., 2022).

MeHg má ve srovnání s jinými formami Hg nejvyšší bioakumulační schopnost ve tkáních. Hg se v rybách vyskytuje ve formě MeHg mezi 70-100 %. Koncentrace těžkých kovů a metaloidů v rybách je vysoce spojena s rostoucí velikostí ryb. Toto může souviset s prodloužením délky života a velikosti ryb. U některých druhů ryb bylo zaznamenáno, že vyšší teplota zvyšuje rychlost krmení, u jiných nikoli. Vyšší teploty však mohou zvýšit rychlost růstu, což zředí obsah kovů. Koncentrace Hg tak souvisí s druhem potravy, kterou ryby konzumují a složením vody. Funkční proteiny ve svalovině ryb mají nejvyšší hladinu Hg. Hladiny Hg byly pozorovány také v rybích játrech, svalech a gonádě. Zároveň rybí samice mají vyšší hladiny Hg ve srovnání se samci (Al-Sulaiti et al., 2022).

2 Toxicita a kontaminace organismu rtuť

Rtuť existuje celkem ve třech formách. V elementární, anorganické a ve formě organické rtuť. Všechny tyto formy vyvolávají toxické účinky a liší se například mechanismem transportu, místem účinku a metabolickým osudem v těle. Ačkoliv se rtuť uvolňuje přirozeně v přírodě, existují studie, které naznačují, že k významné kontaminaci životního prostředí dochází vlivem lidské činnosti. Nejtoxičtější formou je organická rtuť, která způsobuje častěji neurologické příznaky než anorganická forma (Yang et al., 2019). Průměrný celotělový biologický poločas inhalované rtuť je přibližně 60 dní. Páry rtuť se ovšem mohou stát rozpustnými v tucích, jakmile jsou oxidovány. Existuje potenciál pro bioakumulaci v kůře nadledvin, játrech a zejména mozku. V tomto případě se odhaduje, že poločas rozpadu rtuť v mozku může být až 20 let (Rice et al., 2012).

Mezi hlavní fyzikální formy rtuť, které jsou lidé vystavováni patří páry rtuť, z organické formy se jedná především o methylrtuť. Rtuťové výpary vznikají jak z přírodního zdroje, tak i z průmyslového (Clarkson et al., 1998). Vstupují do atmosféry, kde se distribuují a vracejí se zpět na zem s deštěm, čímž se rtuť dostává do sladkovodních i mořských vod. Zároveň se dostávají i do jezer a oceánů z odtoků půd (Clarkson et al., 2007).

2.1 Anorganická rtuť

Elementární rtuť nebo kovové sloučeniny rtuť se v kapalné formě Hg^0 špatně vstřebávají a představují malé zdravotní riziko. Kovová rtuť ve formě páry se však snadno absorbuje plicemi a může způsobit poškození organismu. Elementární rtuť je díky svým rozpustným vlastnostem vysoce difúzní a je schopna procházet buněčnými membránami. Rizikovým je především přestup přes hematoencefalickou a placentární bariéru (Azevedo et al., 2012). Ve vodě je rtuť přítomna převážně ve vodních sedimentech. Ty podléhají bakteriální přeměně, při které vzniká methylrtuť. Methylrtuť se následně bioakumuluje v potravním řetězci, s nejvyšším zastoupením u dravých ryb (Clarkson et al., 2007).

2.1.1 Sloučeniny anorganické rtuť

Anorganické sloučeniny rtuť se v minulosti celosvětově používaly jako antiseptická konzervační činidla, mercurchrom a konzervační antibakteriální činidla. V dnešní době používají ženy kosmetiku pro zesvětlení pleti, která obsahuje anorganické sloučeniny rtuť. Přibližně 7-15 % dávek anorganických sloučenin rtuť je po požití absorbováno v gastrointestinálním traktu (Park et al., 2012).

Sůl rtuť ve formě Hg_2Cl_2 , které se přezdívá kalomel, je špatně rozpustná ve vodě a špatně se vstřebává střevem, ačkoli se předpokládá, že určitá část podléhá oxidaci na snáze

vstřebatelné formy. Mezi značně pochybné informace patří, že rtuťová rtuť Hg^+ zůstává v těle v jiné formě než jako přechodná forma mezi kovovou a rtuťovou rtuť (Bernhoft, 2011).

2.1.2 Elementární a kovová rtuť

Elementární rtuť je lipofilní a vysoce těkavá, což znamená že 70 až 85 % dávky se vstřebá plicemi. Po vdechnutí elementární rtuti prochází alveolární membránou v plicích a je rychle absorbována a distribuována v hlavních orgánech. Po absorpci se část rtuti vstřebá do erytrocytů a druhá část zůstává v krevním oběhu, čímž se dostává do celého těla včetně centrálního nervového systému. V erytrocytech, játrech a centrálním nervovém systému je rtuť oxidovaná prostřednictvím katalyzované peroxidové dráhy na oxid rtuťnatý (Lamgfrod et al., 1999). Ze zubních amalgámů se uvolňuje zhruba 80 % páry kovové rtuti, která se absorbuje inhalací. Při vstupu do těla mají kovové páry velkou afinitu k sulfhydrylovým skupinám a tím pádem se vážou na aminokyseliny, které obsahují síru (Bernhoft, 2011). Rychlost reakce je omezena přítomností inhibitorů katalázy a substráty, kterým je například ethanol. Orálně požitá elementární rtuť zřídka způsobuje akutní toxické účinky, neboť gastrointestinální absorpce je nízká – méně než 0,01% dávky (Lamgfrod et al., 1999).

Kovová rtuť je z velké části vylučována jako rtuťová rtuť Hg^+ . Vylučovací poločasy kovové a rtuťové rtuti se liší, a to hlavně díky závislosti na orgánu, depozici a redoxním stavu, přičemž hodnoty se pohybují od několika dnů do několika měsíců. Centrální nervová soustava je jedním ze systémů, který má poločas vyloučení překračující několik let (Bernhorf, 2011).

2.2 Organická rtuť

Organické sloučeniny rtuti, které jsou též nazývané jako organokovové sloučeniny, jsou výsledkem kovalentní vazby mezi rtuť a atomem uhlíku organické funkční skupiny, jako je methylová, ethylová nebo fenylová skupina (Azevedo et al., 2012). Většina dostupných informací o organických sloučeninách rtuti se týká methylrtuti, která je hlavním zdrojem expozice člověka rtuť (Bernhorf, 2011). CH_3Hg^+ neboli methylrtuť je zdaleka nejběžnější forma organické rtuti, které jsou lidé a zvířata vystaveni. Methylrtuť vzniká methylovací anorganických rtuťových iontů mikroorganismy, které jsou přítomné v půdě a vodě. Mnohé z organických sloučenin rtuti lze využít jako pesticidy (Azevedo et al., 2012).

Thimerosal je jednou z organických rtuťových sloučenin, která se od roku 1930 široce využívá jako konzervační látka v biologickém materiálu jako jsou vakcíny a séra používaná k prevenci mikrobiologického růstu (Azevedo et al., 2012). Skládá se z organického radikálu ethylrtuti (EtHg), vázaného na atom síry thiolové skupiny kyseliny salicylové.

Ethylrtuť je krátkořetězcová alkylová sloučenina rtuti (Erdemil-Köse et al., 2021). Po tkáňové absorpci EtHg rychle disociuje z thiosalicylové skupiny a váže se na thiolové ligandy v tkáňových proteinech (Havarinasab a Hultmana, 2004). Tato látka se v těle metabolizuje a rozkládá se na ethylrtuť a thiosalicát (Azevedo et al., 2012). Rtuť tvoří přibližně 50 % molekulové hmotnosti thimerosalu (Erdemil-Köse et al., 2021).

2.3 Kontaminace organismu rtutí

Lidé jsou vystaveni rtuti prakticky každý den. Převážná část lidí je vystavena rtuťovým výparům ze zubních amalgámů nebo při práci v průmyslových odvětvích, kde se využívá rtuť (Clarkson et al., 2007).

Od starověku jsou známy negativní zdravotní účinky rtuťových par. Silná expozice má za následek četné množství symptomů, mezi které patří erethismus (toxická organická psychóza), zánět dásní a třes. V dnešní době jsou však předmětem zájmu účinky mírnější expozice, mezi které patří změny ve funkci ledvin a behaviorální a kognitivní změny spojené s centrální nervovou soustavou (Gonzalez-Raymat et al., 2017).

Methylrtuť je takzvaný neurologický jed, který postihuje především nervovou tkáň. U dospělých lidí je poškození mozku ohniskové, což znamená, že postihuje pouze určité oblasti, jako je například mozeček a zraková kůra. U lidí, kteří mají mozek stále ve vývoji může methylrtuť ve vysoké dávce způsobit závažné a nevratné poškození vývoje (Clarkson et al., 2007).

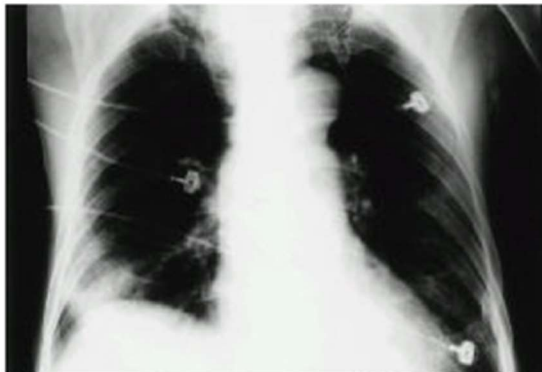
2.3.1 Akutní otrava

Tento typ otravy je částečně způsobován výparů rtuti. Jedná se především o ohřev kapalné rtuti ve špatně větraném prostoru (Clarkson et al., 1998). Projevuje se těžkým postižením plicní tkáně, kdy vzniká chemický zápal plic. Stav poté může přejít i v nebezpečný a život ohrožující plicní edém. Hlavními objektivními příznaky jsou kašel a dušnost. Při postižení trávicího traktu se objevuje bolest břicha, zvracení a průjem s příměsí krve. Postižení ledvin vede nejdříve k polyurii, která následně přechází do oligurie až anurie. Mezi další projevy akutní otravy patří též gingivitis. Pacienty s akutní otravou je většinou nutné hospitalizovat na jednotkách intenzivní péče s nutností zajištění dýchacích cest a antibiotickou terapií (Vojtíšek et al. 2014).

Byly popisovány toxické účinky akutní inhalace rtuťových par. Vývoj klinického obrazu lze rozdělit do 3 fází. Počáteční fáze se projevuje jako onemocnění podobné chřipce. Střední fáze zahrnuje období, ve kterém se mohou projevit závažné multiorgánové symptomy. Pozdní fáze se skládá z období, kdy přetrvávají centrální nervové symptomy. Příčinou smrti

ve všech letálních případech je progresivní respirační selhání. Patologické nálezy v plicích po pitvě odhalují různá stadia akutního poškození plic, podobné těm, které jsou nalézány u syndromu akutní respirační dechové tísně (ARDS) (Euy Lim et al., 1998).

72letý muž se pokusil o nedovolené použití rtuťového amalgámu k léčbě hemeroidů. Tento postup byl proveden v uzavřené místnosti jeho domu. Onemocněl záchvatovitým kašlem, dušností, bolestí na hrudi, nevolností a zvracením, ale nevěděl o příčině své nemoci. Po přijetí se progresivně rozvinula dušnost a respirační selhání. Jeho počáteční rentgenogram hrudníku byl normální, druhý den po expozici rentgenové vyšetření hrudníku odhalilo bilaterální difuzní plicní infiltráty (Obr. 3) a bilaterální konsolidace vzdušného prostoru na počítačové tomografii hrudníku s vysokým rozlišením (HRCT), zejména v závislé části (Obr. 4). Transbronchiální plicní biopsie odhalila chemickou pneumonitidu, naznačující plicní změnu časného akutního poškození plic vyvolané expozicí par rtuti (Euy Lim et al., 1998).



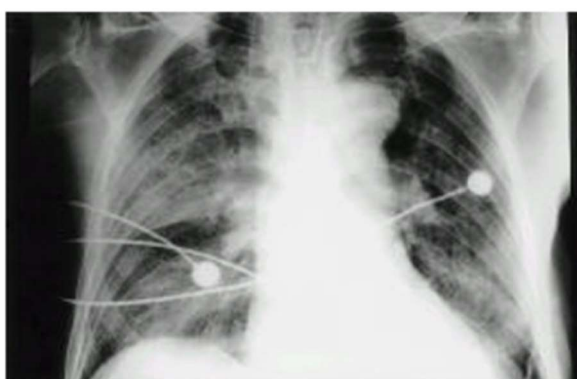
Obrázek 3 - Rentgenový snímek hrudníku při příjmu ukazuje oboustrannou rozsáhlou nerovnoměrnou konsolidaci vzdušného prostoru (Euy Lim et al., 1998).



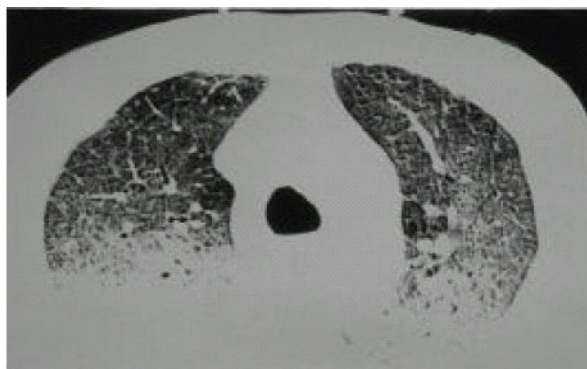
Obrázek 4 - HRCT sken pořizený 2 dny po expozici ukazuje bilaterální konsolidaci vzdušného prostoru, zejména v závislých částech (Euy Lim et al., 1998).

Počáteční koncentrace rtuti v moči byla 6402 $\mu\text{g/l}$. U muže byla zahájena terapie mechanickou plicní ventilací a intravenózním pulzem methylprednisolonu (500 mg/den) po dobu 3 dnů, poté perorálním prednisolonem (1 mg/kg) a perorálním D-penicilaminem (1500

mg/den) po dobu 7 dnů. Následný rentgen hrudníku ukázal mnohem lepší stav (Obr. 5) a koncentrace rtuti v moči byla 25,6 $\mu\text{g/l}$. 16 dní po vystavení rtuťovým parám došlo k dezorientaci. Po fyzickém vyšetření byl jeho duševní stav dezorientovaný a auskultace odhalila jemné oboustranné praskání. Magnetická rezonance mozku (MRI) odhalila starý mozkový infarkt v pravém frontálním laloku a kontrolní HRCT v hrudníku ukázalo intersticiální fibrózu obou plicních polí, zejména závislých partií (Obr. 6) Následně byl léčen druhým intravenózním pulzem methylprednisolonu (500 mg/den) po dobu 3 dnů a poté perorálním prednisolonem (1 mg/kg). Po tomto pulzu léčby se dušnost pacienta mírně zlepšila, ale duševní stav se zhoršil. Plicní příznaky se dále vykazovaly ustálený stav, zatímco psychický stav se nezlepšil (Euy Lim et al., 1998).



Obrázek 5 - Kontrolní rentgen hrudníku ukazuje, že oboustranná konsolidace se výrazně zlepšila se zbytkovou opacitou v pravém dolním plicním poli (Euy Lim et al., 1998).



Obrázek 6 - Kontrolní HRCT sken ukazuje mírné peribronchovaskulární intersticiální ztlustění a mírné interlobulární ztlustění septa, zejména v závislé části (Euy Lim et al., 1998).

2.3.2 Chronická otrava

Častým zdrojem této formy otravy bývá rozlitá kapalná rtuť, u které dochází k dlouhodobému uvolňování. Dále může vzniknout ze zubních amalgámů při špatné ústní hygieně. Mezi hlavní příznaky patří erethismus a stomatitida se sliněním. Tyto příznaky se projevují až po dlouhodobé expozici rtuti, když se už vysoké množství rtuti projeví

i v moči (Clakson et al., 1998). Mezi další příznaky se řadí gingivitida (krvácení z dásní, ulcerace) a tremor, zpočátku jemný, intenční, později hrubý. Intoxikaci provází i řada nespecifických projevů jako je anémie, úbytek hmotnosti nebo vypadávání vlasů. Těžké otravy rtuťí končí fatálně. Doposud není známa účinná protilátka, na kterou by se rtuť v organismu navázala a urychlila eliminaci. Při léčbě akutních i chronických otrav se uplatňují cheláty, což jsou komplexní sloučeniny, které vyvazují těžké kovy a zabudovávají je do své struktury s následným odstraněním z organismu (Vojtíšek et al., 2014).

2.4 Případy otravy akutní elementární rtuťí

Tato studie zahrnovala tři děti ve věku 9, 11, 14 let po expozici elementární rtuťí. Dvě z dětí byly předány na pohotovost. Původně diagnóza nebyla stanovena a pacienti byli posláni domů s typickým pediatrickým projevem virového onemocnění. Třetí dítě začalo být symptomatické následující den, což vedlo k návratu všech tří dětí na stejnou pohotovost. Při druhé návštěvě pohotovosti nejstarší dítě přineslo nádobu s elementární rtuťí. Po následujícím výslechu bylo zjištěno, že si děti hrály se rtuťí a vyvstaly obavy o environmentální toxické expozici způsobující nemoci dětí (C. Young et al., 2020).

2.4.1 Pacient 1

14letý chlapec s anamnézou astmatu se dostavil na pohotovost s horečkou po dobu 1 dne a se svědivou vyrážkou po dobu několika hodin. Pacientovi byl podán ibuprofen a poslán domů z pohotovosti s diagnózou virového syndromu. Tento pacient se následující den vrátil na stejnou pohotovost s přetrvávající horečkou 40 °C, krevním tlakem 125/74 mmHg a vyrážkou. Dalšími příznaky byly suchý kašel, malátnost, bolest v krku a celková bolest hlavy. Fyzikální vyšetření odhalilo difúzní splývající erytematózní makulopapulární svědivou vyrážku bez deskvamace, petechie lokalizované na oboustranných dolních končetinách, oboustranná injekční spojivka (spojivky v oku jsou zánětlivé a prokrvené), erytematózní orofarynx bez exsudátu, hrubý dechový zvuk a pružný krk (C. Young et al., 2020).

2.4.2 Pacient 2

9letá dívka s anamnézou astmatu se dostavila na pohotovost s pacientem 1, která si stěžovala na horečku, vyrážku, bolest hlavy a bilaterální bolesti nohou po dobu jednoho dne. Pacientka 2 byla též poslána domů z pohotovosti s diagnózou virového syndromu. Další den se pacientka 2 vrátila na pohotovost s příznaky podobnými jako u pacienta 1, včetně horečky, difúzní bolesti hlavy, přetrvávajícího suchého kašle, bolesti v krku, nekrvavého průjmu, zvracení, křečí v břiše, svědivé vyrážky a anorexie. Při fyzikálním vyšetření byla zjištěna teplota 37,9 °C a krevní tlak 117/62 mmHg. Pacientka 2 měla obdobnou vyrážku bez petechií,

oboustranná injekční spojivka, hrubé dechové zvuky, oboustranně necitlivé břicho, erytematózní orofarynx bez exudátu, pružný krk a normální neurologické vyšetření bez třesu (C. Young et al., 2020).

2.4.3 Pacient 3

11letá dívka bez předchozí anamnézy se dostavila na pohotovost 2 dny po první návštěvě pohotovosti ostatních dvou sourozenců, s vyrážkou a horečkou. Pacientka 3 měla podobnou svědivou vyrážku bez petechií, horečky, difúzní bolesti hlavy, konjunktivitidy, bolesti v krku, bolesti břicha nebo bolesti krku. Pacientka neměla kašel. Při fyzikálním vyšetření u pacientky zjistili teplotu 38,4 °C a krevní tlak 116/73 mmHg. Pacientka 3 měla čisté plicní ozvy, pružný krk, necitlivé břicho, oboustrannou injekční spojivku, erytematózní orofarynx bez exsudátu, normální neurologické vyšetření bez třesu a difúzní svědivou splývající blednoucí erytematózní makulopapulární vyrážku bez petechií (C. Young et al., 2020).

2.4.4 Léčba a sledování pacientů

Všechny 3 děti byly hospitalizovány pro toxicitu rtuti. Žádné z dětí nemělo pneumonitidu spojenou s vysokou dávkou elementární rtuti. Rentgenové snímky hrudníku byly normální. Hemokultury a virové respirační testy byly u všech třech dětí negativní. Všechny tři děti měly zvýšenou teplotu, která dosahovala maxima 2. nebo 3. den pobytu v nemocnici, kdy teploty dosahovaly 40,8-41,8 °C (C. Young et al., 2020).

Po potvrzení expozice rtuti v moči a krvi, byla u všech tří dětí zahájena chelatační terapie s kyselinou dimerkaptosukcinovou (DMSA), aby se zvýšila eliminace rtuti. Léčba byla zahájena 4. den pobytu v nemocnici, probíhala další 4 dny a po propuštění dalších 38 dnů. Během hospitalizace byl zároveň pacientům intravenózně podáván N-acetylcystein, který může poskytovat určitý rtuťový detoxikační účinek. N-acetylcystein slouží jako donor cysteinu a zvyšuje koncentraci glutathionu (C. Young et al., 2020).

3 Mechanismus účinku rtuti v orgánech

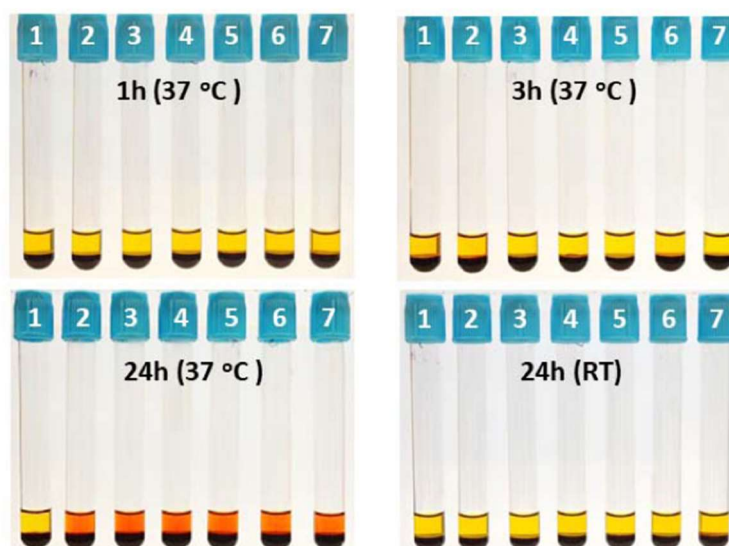
3.1 Krev

Po požití se rtuť vstřebává do krevního řečiště, v němž ovlivňuje stabilitu proteinů, způsobuje ztrátu minerálů a vede k denaturaci enzymů aktivaci krevních destiček a adhezi erytrocytů k endotelu (Akkaya et al., 2019). Rtuť se v krevním řečišti oxiduje prostřednictvím katalázy a peroxidázy v erytrocytech a tkáních a přemění se na anorganickou rtuť Hg^{2+} a rtuťovou rtuť Hg^+ , což je proces, který omezuje její absorpci (Azevedo et al., 2012).

Základní mechanismy, kterými Hg^{2+} přispívá ke kardiovaskulárním onemocněním jsou spojeny s reaktivními formami kyslíku (ROS) a také se sníženou aktivitou antioxidantních enzymů a lipoproteinů o nízké hustotě. Zvýšená adheze erytrocytů v důsledku působení rtuti vede k rozvoji kardiovaskulárních problémů. Na zprostředkování této adheze se mohou podílet různě změny buněčného povrchu a membrány. Mezi tyto změny řadíme například zvýšenou expozici fosfatidylserinu na vnějším cípu membrány erytrocytů. Tato zvýšená expozice byla ve studii Akkaya et al., 2019 spojena s abnormální adhezí erytrocytů k endoteliálním buňkám *in vitro* v přítomnosti Hg^{2+} (Akkaya et al., 2019). Expozice rtuti zvyšuje produkci volných radikálů, potenciálně kvůli úloze rtuti ve Fentonově reakci a snížení aktivity antioxidantních enzymů, jako je glutathionperoxidáza. Reakce MeHg s glutathionperoxidázou probíhá prostřednictvím thiolových (-SH) anebo selenolových (-SeH) skupin z endogenních molekul (Azevedo et al., 2012).

3.1.1 Materiály a metody

Vzorky krve byly získány vakutainery s citrátem sodným. Vzorky plné krve byly odebrány celkem od osmi zdravých jedinců. Veškeré experimenty byly provedeny do 24 hodin po venepunkci s použitím vzorků volné plné krve před zpracováním. Pro přípravu vzorků krve ošetřených rtutí byl nejprve připraven zásobní roztok $500 \mu\text{M}$ Hg^{2+} ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrém. Zásobní roztok byl nadále přidán do plné krve, aby se ve vzorcích získaly konečné koncentrace 0,5, 1,5 a $50 \mu\text{M}$ Hg^{2+} . Následně byly vzorky inkubovány při teplotě 37°C po dobu jedné až tří hodin nebo při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin (Akkaya et al., 2019).



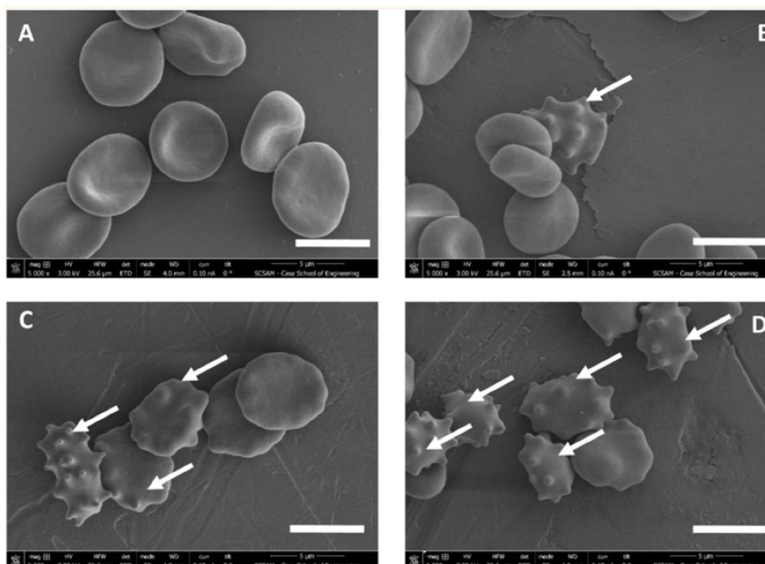
Obrázek 7 - Vliv HgCl₂ na lidské erythrocyty – Při hemolýze se barva plazmy mění na červenou. Zkumavky č. 1 obsahují vzorky čerstvé krve (bez inkubace), zkumavky č. 2 obsahují kontrolní krevní vzorky, které byly inkubovány při specifických teplotách bez přidání HgCl₂, zkumavky č. 3-7 byly inkubovány při laboratorní teplotě nebo 37 °C v přítomnosti HgCl₂ v koncentracích 0,1, 0,5, 1,5 a 50 μM (Akkaya et al., 2019).

Pro experimenty inhibice adheze byly použity celkem dvě strategie: inhibice specifické molekuly na membráně erythrocytů nebo inhibice specifického místa adheze na imobilizovaném lamininu. V první strategii byl přidán heparin nebo laktaherin přímo do kontrolních vzorků i vzorků ošetřovaných HgCl₂, následně byla provedena inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Při druhé strategii byla specifická adhezivní místa na imobilizovaném lamininu blokována inkubací mikrokanálů s bovinním sulfatidem, heparin sulfátem nebo BCAM-Lu (Basal Cell Adhesion Molecule – Lutetium), což je látka pro imunoterapii, po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě (Akkaya et al., 2019).

Rastrovací elektronová mikroskopie se provádí u čerstvé lidské krve, která byla odebrána do Na-citrátových zkumavek. Krev byla centrifugována 5 minut při 500 g. Následně byla odstraněna plazma a *buffy coat*. Peletované erythrocyty byly dvakrát promyty PBS a suspendovány v 0,1 M fosfátovém pufru při hematokritu 40 %. Dále byly erythrocyty ve fosfátovém pufru fixovány 2,5 % glutaraldehydem po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Suspenze byla poté odstředována při 500g po dobu 5 minut, aby se shromáždily erythrocyty, které byly resuspendovány a inkubovány v 0,1 M kakodylátovém pufru. Nakonec byly vzorky vysušeny hexamethyldisilazánem a následně fixovány a potaženy palladiem a zkoumány (Akkaya et al., 2019).

3.1.2 Výsledky

Hg^{2+} způsobuje morfologické změny ve struktuře erytrocytů. Expozice Hg^{2+} změnila morfologii erytrocytů, což vedlo ke ztrátě charakteristického bikonkávního tvaru a tvorbě echinocytů. Počet erytrocytů adherujících k imobilizovanému lamininu se postupně zvyšoval se zvyšujícími se koncentracemi Hg^{2+} (Akkaya et al., 2019).



Obrázek 8 - Snímky kontrolních a HgCl_2 ošetřených erytrocytů ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) při 5000x zvětšení, měřítko: 5 μm – (A) kontrolní erytrocyty, (B) 50 μM HgCl_2 po dobu 1 hodiny při 37 $^\circ\text{C}$, (C) 50 μM HgCl_2 3 hodiny při 37 $^\circ\text{C}$, (D) 0,5 μM HgCl_2 po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě; bílé šipky: morfologické změny, echinocyty (Akkaya et al., 2019).

3.2 Nervová soustava

Rtuť (Hg) je rozšířený environmentální a průmyslový znečišťovatel, který může způsobit vážné poškození tkání v různých částech těla. Neurotoxické účinky rtuti jsou dobře známy. V posledním desetiletí se nahromadily důkazy o roli reaktivních kyslíkových metabolitů jako mediátorů poškození tkání v několika zvířecích modelech. Pro-oxidační vlastnosti rtuti byly v průběhu času dobře dokumentovány. Výzkum podporuje názor, že ionty rtuti (Hg^{2+}) narušují antioxidační potenciál glutathionu a podporují tvorbu reaktivních druhů prostřednictvím komplexace thiolů. Rtuť také indukuje peroxidaci lipidů. Neurotoxita rtuti se zdá být spojena s indukcí ROS a vyčerpáním antioxidačních enzymů. Navíc, výsledky některých studií ukázaly, že kyselina ellagová (EA) může zmírnit škodlivé účinky rtuti na lidský organismus. EA vykazuje antioxidační účinky, které mohou zahrnovat schopnost snižovat tvorbu reaktivních druhů kyslíku a chránit buňky před oxidačním stresem indukovaným rtutí. Tímto způsobem EA přispívá k ochraně před neurotoxicitou rtuti (Mallamaci et al. 2024).

Mezi sloučeninami rtuti je za neurologické změny přítomné u lidí a pokusných zvířat primárně zodpovědná methylrtuť (Azvedo et al., 2012). Organické sloučeniny rtuti se vyskytují ve třech formách obsahující arylový kruh, krátké řetězce alkylů a dlouhé řetězce alkylů. Zatímco arylové skupiny a dlouhořetězcové formy se rychle mění na anorganickou rtuť, krátkořetězcové formy (methylrtuť a ethylrtuť) jsou rychle a téměř úplně absorbovány z gastrointestinálního traktu a mohou být distribuovány po celém těle, přičemž si zachovávají své organické formy (Broussard et al. 2002). Předpokládá se, že tyto mechanismy souvisejí s toxickým zvýšením ROS. Oxidační stres je spojen s etiologií neurodegenerativních onemocnění, jako je například amyotrofická laterální skleróza, Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba. Zároveň je nutné zdůraznit, že tyto mechanismy nebyly ještě plně rozpoznány (Azevedo et al., 2012).

Methylrtuť je díky své vysoké afinitě k sulfidovým skupinám v tubulinu schopná inhibovat organizaci mikrotubulů, které jsou důležité pro vývoj centrální nervové soustavy. Vazba na SH skupiny také interferuje s intracelulární signalizací muskarinových, nikotinových a dopaminergních receptorů a podporuje blokádu Ca^{2+} kanálků v neuronech. Anorganická rtuť má schopnost zvyšovat permeabilitu chloridových kanálů receptorů GABAA (kyselina gama-aminomáselná typu A) v gangliu dorzálních kořenů, což je spojeno s neuronální hyperpolarizací (Azevedo et al., 2012).

3.2.1 Buněčná linie SH-SY5Y

Neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y byla po několik desetiletí široce využívána jako *in vitro* model, pro neurobiologické analýzy. Schopnost výzkumníků diferencovat buňky neuroblastomu SH-SY5Y na buňky mající zralejší fenotyp podobný neuronu prostřednictvím manipulace s kultivačním médiem poskytla řadu výhod v oblasti neurovědeckého výzkumu. Mezi výhody patří schopnost rozsáhlé expanze před diferenciací s relativní snadností a nízkým náklady na kultivaci ve srovnání s primárními neurony. Etické obavy spojené s primární kulturou lidských neuronů se jí netýkají, neboť se jedná o buněčnou linii. Buňky SH-SY5Y jsou lidského původu a exprimují řadu proteinů a proteinových izoform specifických pro člověka, které by nebyly přirozeně přítomny v primárních kulturách hlodavců (Kovalevich a Langford, 2013).

Nediferencované buňky SH-SY5Y jsou morfologicky charakterizovány nepolarizovanými buněčnými těly podobnými neuroblastům s několika zkrácenými výběžky. Buňky mají tendenci růst ve shlucích. Nediferencované buňky SH-SY5Y nepřetržitě proliferují, exprimují nezralé neuronální markery a postrádají zralé neuronální markery.

Nediferencované buňky jsou považovány za nejvíce připomínající nezralé katecholaminergní neurony (Kovalevich a Langford, 2013).

3.2.1 Anorganická rtuť a diferenciaci buněk SH-SY5Y

MeHg vyvolává poškození neurální diferenciaci prostřednictvím různých mechanismů cílením na více neuronových markerů včetně tubulinu- β III, proteinu 2 spojeného s mikrotubuly (MAP2), tyrosinhydroxylázy (TH). Účinkům expozice anorganické rtuti (I-Hg) na neuronální diferenciaci je věnována menší pozornost. Různé formy Hg se přeměňují na I-Hg v mozku, kde zůstává po dlouhou dobu. Je důležité studovat účinky a toxické mechanismy expozice I-Hg na neuronální diferenciaci. Cílem studií je průzkum vlivu expozice I-Hg na diferenciaci buněk SH-SY5Y indukovanou kyselinou retinovou (RA) (Chin Chan et al., 2017).

3.2.1.1 Buněčná kultura

Byla použita buněčná linie SH-SY5Y, protože jde o dobře zavedený *in vitro* model pro studium neuronální diferenciaci. Buňky byly kultivovány v kompletním médiu *Dulbecco's Minimum Esenciální Médium* (DMEM) doplněném 10 % teplem inaktivovaného fetálního bovinního séra. Buňky byly udržovány ve zvlhčeném prostředí 5 % CO₂ a při 37 °C. Buňky byly diferenciovány pomocí RA po dobu jednoho týdne nebo společně ošetřeny RA a HgCl₂ po dobu jednoho týdne s výměnou média každé 3 dny. Podle studie *in vitro* je buněčný příjem Hg po inkubaci s mikromolárními koncentracemi HgCl₂ v rozmezí koncentrací Hg zjištěných ve vzorcích lidských vlasů (Chin Chan et al., 2017).

3.2.1.2 Cytotoxické účinky současné expozice RA a Hg

Test MTT byl proveden za účelem zjištění účinku expozice různých koncentrací I-Hg na životaschopnost diferencovaných buněk SH-SY5Y stimulovaných 10 μ M RA, RA byla rozpuštěna v DMSO a konečná koncentrace (0,01 % v médiu) DMSO neovlivnila růst buněk SH-SY5Y. Dříve bylo pozorováno, že expozice 10 μ M RA po dobu 7 dnů neindukovala cytotoxicitu u buněk SH-SY5Y. Společná expozice RA a 5 nebo 10 μ M I-Hg nevyvolala významný účinek na životaschopnost buněk, ale u buněk ošetřených RA + 20 μ M I-Hg bylo pozorováno významné 50 % snížení životaschopnosti. Pro potvrzení tohoto účinku byly hodnoceny hladiny fosforylovaného AKT proteinu zapojeného do přežití buněk (Chin Chan et al., 2017).

3.3 Ledviny

Všechny tři zmíněné formy rtuti mají známé účinky na orgány včetně ledvin. Člověk může být vystaven rtuti mnoha způsoby, jako jsou kontaminované potraviny, průmysl baterií nebo zubní amalgám. Při toxickém onemocnění ledvin způsobeným rtutí byla hlášena proteinurie. Experimentální studie odhalila, že ženy vystavené Hg jsou náchylnější k toxicitě ledvin a předpokládá se, že vliv na buňky *pars recta* tubulu přispívá k proteinurii. Dále může dojít k poškození proximální tubulární buňky volně přístupné přes glomerulární filtr, zároveň i senzitivitu lysozomu se může přisuzovat proteinurii (Nasiruddin Rana et al., 2018). Většina I-Hg které se vyskytuje v těle po požití rtuti se ukládá v ledvinách, zatímco MeHg je v těle včetně ledvin, distribuován rovnoměrněji. K eliminaci I-Hg dochází močí a stolicí a vylučování rtuti močí se široce používá k posouzení dlouhodobé expozice a tělesné zátěže I-Hg (Akerstrom et al., 2017).

Díky pokrokům v moderní medicíně se délka života jedinců prodlužuje a vede k nárůstu populace starších jedinců. Proces stárnutí vede k významným změnám v mnoha orgánových systémech, přičemž ledviny jsou zvláště citlivé na změny související s věkem. V ledvinách s rostoucím věkem dochází k ultrastrukturálním změnám, jako je například glomerulární a tubulární hypertrofie, glomeruloskleróza a mnoho dalších. Tyto změny mohou ohrozit renální plazmatický průtok a rychlost glomerulární filtrace. Zároveň tyto změny mohou snížit funkční rezervu ledvin, což je činí náchylnější k patologickým příhodám, když jsou vystaveny stresu a zátěži, jako je expozice nefrotickým látkám. Mezi nejdůležitější environmentální látky způsobující toxicitu patří rtuť, která způsobuje nefrotoxické účinky. Vzhledem k tomu že vystavení normálních zdravých ledvin iontům rtuti může způsobit glomerulární a tubulární poškození, staré ledviny, které již nemusí fungovat na plnou kapacitu, mohou být citlivější na účinky Hg (Bridges et al., 2017).

Účastníci studie autorů Abdeladaye et al. byli vybráni ze dvou oblastí Dakahlia Governorate, což jsou oblasti, které ukazují významné rozdíly mezi vzorky pacientů s onemocněním ledvin a nepacientů. Studie proběhla na 100 účastnících na jaře roku 2019 ve dvou hlavních oblastech, které přiléhají k jezeru Manzala. Reprezentativní vzorky 100 účastníků v době studie tvořili ze 70 % muži a z 30 % ženy. Z první oblasti bylo vybráno 65 rybářů s onemocněním ledvin a z druhé oblasti bylo vybráno 35 účastníků bez onemocnění ledvin (Abdeladaye, 2022).

Pro každého účastníka se odebral vzorek vody (100 ml). Koncentrace studovaného těžkého kovu rtuti byla odhadnuta pomocí atomové absorpční spektrometrie s grafitovou

píčkou s využitím technik rozkladu vzorku založené na standardu APHA. Následně bylo účastníkům s onemocněním ledvin odebráno 40 ml moči a 10 ml vzorku krve, zároveň to samé bylo odebráno i od zdravých účastníků stejného věku a pohlaví sloužící jako kontrolní skupina. Tyto vzorky byly zpracovány a analyzovány ve stejné laboratoři na výskyt aktivních onemocnění ledvin (Abdeladayem, 2022).

Akumulace Hg^{2+} v renálních tubulárních buňkách, především v proximálních tubulech, probíhá rychle, takže se pravděpodobně jedná o nejcitlivější místo k toxickým účinkům rtuti a je obvykle prvním segmentem nefronu ovlivněným expozicí sloučeninami rtuti. Poškození ledvin související s rtutí bude provázeno renální tubulární dysfunkcí se zvýšenými hodnotami albuminu, metastázemi a nefrotickým syndromem se vzorem membránózní nefropatie. Zprávy také naznačují, že rtuť může způsobit různá poškození ledvin, včetně proteinurie, glomerulárního onemocnění a membránózní glomerulonefritidy (Abdeladayem, 2022).

Výsledky potvrdily, že u pacientů s onemocněním ledvin byly kompatibilní hodnoty rtuti ve vodě a moči překročeny nad přípustné hodnoty WHO. Průměrné hladiny (mg/l) rtuti ve vzorcích vody byly 0,007 mg/l. Ze skupiny účastníků, kteří mají více než 60 let s onemocněním ledvin překročili přípustné limity WHO 0,006 mg/l pro rtuť. Obecně byly koncentrace rtuti vysoké ve vodních útvech, které byly v blízkosti rybolovných oblastí této komunity. Dalo by se říci, že hlavním zdrojem lidské otravy methylrtutí jsou ryby. Prostřednictvím nejasných mechanismů mají různé druhy ryb tendenci k vysoké míře bioakumulace methylrtuti (Abdeladayem, 2022).

4 Ostatní těžké kovy

Těžké kovy jsou významnými znečišťujícími látkami životního prostředí a jejich toxicita je stále větším problémem z ekologických, evolučních a nutričních důvodů. Mezi nejčastěji se vyskytující těžké kovy v odpadních vodách patří arsen, kadmium, chrom, měď, olovo, nik a zinek, což jsou kovy, které představují riziko pro lidské zdraví a životní prostředí. Zároveň mají některé z těchto kovů zásadní biologické funkce v rostlinách a zvířatech. Někdy jejich chemická koordinace a oxidačně-redukční vlastnosti poskytují výhodu, takže mohou uniknout homeostáze, transportu a vazbě na požadované buněčné složky. Kovy se navážou na proteinová místa, tím vytěsní původní kovy, což zapříčiní špatné fungování buněk a nakonec toxicitu (Jaishankar et al., 2014).

4.1 Měď

Měď se řadí mezi těžké kovy, které mají biochemickou funkci v lidském těle a je nezbytná pro život. Je začleněna do řady metaloenzymů zapojených do tvorby hemoglobinu, metabolismu sacharidů, biosyntézy katecholaminů a zesíťování kolagenu, elastinu a vlasové kreatinu. Slouží jako nezbytný kofaktor pro několik enzymů souvisejících s oxidačním stresem, včetně katalázy, supeoxidodismutázy, peroxidázy, cytochrom c oxidázy, ferroxidázy, monoanimooxidázy a dopamin- β -monoxygenázy. Schopnost mědi cyklovat mezi oxidovaným stavem Cu(II) a redukovaným stavem Cu(I) využívají měďnaté enzymy účastníci se redoxních reakcí. Tato vlastnost však činí měď potenciálně toxickou, protože přechody mezi Cu(II) a Cu(I) mohou vést ke vzniku superoxidových a hydroxylových radikálů. (Tchounwou et al., 2012).

Měď je kompetitivní kov pro vazbu na proteiny a další biomolekuly. Měďnatý iont, který vstoupí do buňky, vyplní všechna dostupná místa pro vazbu mědi v této buňce. Živina Cu se bude vázat na příbuzná, vysoce afinitní, specifická místa, například v kuproenzymech, kde Cu hraje funkční roli. Po naplnění nutričních míst Cu se nadbytek intracelulární Cu váže na příbuzná, vysoce afinitní místa v transkripčních senzorech snímající Cu. Tyto senzory zase upregulují expresi genů homeostázy Cu, jejichž proteinové produkty zajišťují, sekvestrují a vylučují jakýkoliv přebytek Cu z buňky (IZ O'Hern a Y. Djoko, 2022). Studie na laboratorních zvířatech prokázaly, že měď způsobuje středně akutní toxicitu. Ze získaných údajů na laboratorních zvířatech a lidech bylo zjištěno, že po vystavení velkému množství mědi dochází k negativním respiračním, gastrointestinálním, hematologickým, jaterním, endokrinním a očním účinkům. Poškození jater bylo hlášeno u jedinců, kteří požíli smrtelné dávky síranu měďnatého. Zároveň účinky na játra byly pozorovány u jedinců

s diagnostikovanou Wilsonovou chorobou, indickou dětskou obrnou nebo idiopatickou toxikózou mědi (Tchounwou et al., 2011).

Cílem studie Arnal et al., bylo charakterizovat roli přetížení Cu v přežití lidských buněk pomocí systému *in vitro*. Kultivované buňky se často používají ke zkoumání škodlivých účinků. Pro tuto studii byly proto vybrány dvě lidské buněčné linie odvozené z jater (HepG2) a plic (A-549) jako reprezentativní buňky vystavené exogennímu nebo endogenní působení Cu v živých organismech ke studiu (i) účinků různých stupňů přežití Cu v těchto dvou buněčných liniích stanovením různých indexů buněčné proliferace a poškození; (ii) produkce ROS jako možného příčinného faktoru poškození; (iii) aktivace dvou hlavních proteázových systémů zapojených do programované buněčné smrti (kapsáza-3 a calpainy) (Arnal et al., 2012).

Buněčné linie použité v této studii byly získány z lidských jater (HepG2) a plic (A-549) z *American Type Culture Collection*. Jednovrstvé kultury byly pěstovány v mikrobiologicky testovaném Eagleově minimálním základním médiu (MEM) doplněného o HEPES, 10 % inaktivovaného fetálního telecího séra, bez antibiotik (Arnal et al., 2012).

Buněčné linie HepG2 a A-549 byly kultivovány v jednorázových miskách ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂ při 37 °C až do dosažení 50 % konfluence. Jakmile buňky dosáhly logaritmické fáze růstu, byly ošetřeny čerstvým médiem obsahujícím sterilní roztoky CuSO₄ v různých koncentracích (20–160 μM), připravených ultrafiltrací. Koncentrace kolem 80 μM Cu snížily životaschopnost buněk o 50 % ve srovnání s kontrolními kulturami. Tato dávka byla použita na základě předchozích testů a literatury. Ošetření nemělo vliv na pH média. Kontrolní kultury byly ošetřeny ekvivalentním množstvím PBS. Po 24 hodinách expozice byly některé kultury promyty studeným sterilním PBS (5 ml, třikrát), sklizeny mechanicky a centrifugovány při 4 °C (10 minut při 2000 g). Pelety byly homogenizovány na ledu se 4 ml PBS pomocí ručního nerezového homogenizátoru k dokončení buněčné lýze. Homogenáty byly použity pro analýzu markerů. Kromě životaschopnosti buněk, která byla vypočítána na základě celkového množství buněčných proteinů (TCP). V tomto případě byly buňky ošetřeny Cu po dobu 24 a 48 hodin a poté zpracovány jako dříve. Byly provedeny tři nezávislé experimenty, přičemž každé stanovení bylo opakováno minimálně třikrát (Arnal et al., 2012).

Bylo pozorováno, že vystavení HepG2 a A-549 přežití Cu významně zvýšilo koncentraci tohoto kovu uvnitř buněk způsobem závislým na dávce, se současným zvýšením produkce ROS, konkrétněji peroxidu vodíku. Tento účinek byl také pozorován u nepřímých

parametrů produkce ROS, jako je zvýšená peroxidace lipidů a významný pokles celkového obsahu thiolů (Arnal et al., 2012).

4.2 Olovo

Olovo je jedním z prvních objevených a nejrozšířenějších kovů v historii lidstva, a proto je jedním z kovů, s nimiž se v životním prostředí nejčastěji setkáváme (Shotyk et al., 1998). Jeho pokračující uvolňování do životního prostředí jako produkt výfukových emisí, stejně jako jeho rozšířené průmyslové použití, učinilo z olova vážnou hrozbu pro lidské zdraví (Juberg et al., 1997). Olovo se řadí mezi víceúčelové toxické látky, které ovlivňují mnoho orgánových systémů včetně gastrointestinálního traktu, hematopoetického systému, kardiovaskulárního systému, centrálního a periferního nervového systému, imunitního systému a reprodukčního systému. Olovo je považováno za klinicky nejdůležitější těžký kov, neboť vyvolává širokou škálu fyziologických, biochemických a behaviorálních dysfunkcí. Jedním z hlavních mechanismů, kterými olovo uplatňuje svůj toxický účinek, jsou biochemické procesy, které zahrnují schopnost olova inhibovat nebo napodobovat účinky vápníku a interagovat s proteiny (Yedjou et al., 2003).

Rostoucí počet důkazů naznačuje, že poškození buněk zprostředkované reaktivními formami kyslíku (ROS) může být zapojeno do patologie spojené s intoxikací olovem (Behra et al., 1983; Hermes-Lima et al., 1991). V erythrocytech pracovníků vystavených olovu v zaměstnání byly aktivity antioxidantních enzymů, superoxiddismutázy (SOD) a glutathionperoxidázy, pozoruhodně vyšší než u pracovníků, kteří nebyli vystaveni působení olova (Monteiro et al., 1985). Ačkoli existuje mnoho studií, které prokazují, že olovo je víceúčelová toxická látka, která působí na gastrointestinální trakt, kardiovaskulární systém, centrální a periferní nervový systém, imunitní systém a reprodukční systém, o účinku olova na hematopoetiku je známo jen velmi málo (Yedjou et al., 2003).

Ke zjištění zvýšených hladin olova v krvi se používá několik metod. Přítomnost změn v krevních buňkách viditelných pod mikroskopem nebo delece hustých linií v kostech dětí pozorovaných na rentgenovém snímku jsou příznaky používané pro detekci otravy olovem. Hlavním nástrojem pro detekci zvýšených hladin olova v těle je však měření hladiny olova v krvi. Tento test je avšak pouhým ukazatelem přítomnosti olova v cirkulující krvi, ale nemůže ukázat, kolik olova je celkově v těle uloženo. Od roku 2012 centra pro kontrolu a prevenci nemocí stanovila standardní zvýšenou hladinu olova v krvi pro dospělé na 10 $\mu\text{l/dl}$ a pro děti 5 $\mu\text{g/dl}$ plné krve. Vzhled klinických projevů se u jednotlivých jedinců liší v závislosti na dalších faktorech prostředí. U některých jedinců je zřetelný výskyt klinických

příznaků i při nižších hladinách olova, zatímco u jiných jedinců jsou asymptomatické i u vyšších hladin olova přítomného v tělních tekutinách. Děti jsou mnohem náchylnější k účinkům olova než dospělí jedinci, protože jejich orgány jsou obvykle ve fázi vývoje (Latif Wani et al., 2015).

Olovo se může dostat do těla plícemi vdechováním, kůží nebo přímým polykáním a požitím. Absorpce anorganického olova probíhá v celém dýchacím a gastrointestinálním traktu. Respirační absorpce olova je primárně závislá na velikosti částic. Procento inhalovaného olova, které se dostane až do krevního řečiště je odhaduje na 30-40 %. Rychlost absorpce v gastrointestinálním traktu závisí na nutričním stavu a věku daného jedince. Zatímco dospělí absorbují v průměru 10-15 % přijatého množství, u kojenců, malých dětí a těhotných žen se toto množství může zvýšit až na 50 %. Při aplikaci anorganických sloučenin olova, jako jsou ty, které se nacházejí například v barvách, na kůži dochází k malé transkutánní absorpci olova. Oproti tomu organické olovo (tetraethyl), které se nachází v benzínu, může být absorbováno kůží (Bhasin et al., 2023).

Předmětem této studie bylo použití buňky lidské leukémie (HL-60) jako modelu k určení, zda je expozice olova spojena s prevalencí akutní promyelocytární leukémie (ALP), a ke stanovení, zda oxidační stres hraje klíčovou roli u olova. Jako referenční roztok byl použit dusičnan olovnatý o čistotě 100 % a byl zakoupen od *Fisher Scientific* ve Fair Lawn, New Jersey. Růstové médium RMPI 1640 obsahující 1 mmol/l L-glutaminu bylo zakoupeno od *Gibco BRL products*. Fetální bovinní sérum (FBS), antibiotika (penicilin G a streptomycin), fyziologický roztok pufovaný fosfátem (PBS) a testovací souprava MTT byly získány od *Sigma Chemical Company*. Jako poslední byl zakoupen kit pro peroxidaci lipidů od firmy *Calbiochem-Novabiochem* (Yedjou et al., 2003).

Tkáňové kultury (buňky) byly v laboratoři až do použití skladovány v kapalném dusíku. Byly rozmrazeny jemným protřepáváním jejich nádobek po dobu 2 minut ve vodní lázni při 37 °C. Po rozmrazení byl obsah každé lahvičky přenesen do 25 cm³ baňky pro tkáňové kultury. Obsah v lahvičkách byl zředěn 10 ml RMPI 1640 obsahující 1 mmol/l L-glutaminu a doplněn 10 % fetálního bovinního séra a 1 % penicilin/streptomycin. Kultivační baňky o objemu 25 cm³ obsahující 2 · 10⁶ životaschopných buněk byly pozorovány pod inverzním mikroskopem. Následně byly kultivační lahvičky inkubovány ve zvlhčeném 5 % CO₂ inkubátoru při 37 °C. Životaschopnost buněk byla hodnocena vylučovacím testem tropanové modři a ručně počítána pomocí hemocytometru (Yedjou et al., 2003).

Buňky lidské leukémie HL-60 byly kultivovány v médiu RMPI 1640 s 1 mmol/l L-glutaminu, 10 % fetálním bovinním sérem (FBS) a 1 % penicilem/streptomycinem.

Inkubovány byly při 37 °C ve zvlhčeném inkubátoru s 5 % CO₂. Do 180 µl buněčných suspenzí (5 × 10⁵ buněk/ml) nasazených v šesti opakováních na 96-jamkové destičky bylo přidáno 20 µl zásobních roztoků dusičnanu olovnatého (Pb(NO₃)₂) tak, aby konečné koncentrace byly 0,8, 3,12, 12,50 a 50,00 µg/ml. Kontrolní buňky dostaly 20 µl destilované vody. Buňky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C ve zvlhčeném 5 % CO₂ inkubátoru. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 20 µl MTT roztoku (5 mg/ml v PBS) a inkubace pokračovala další 4 hodiny při 37 °C. Poté byly buňky centrifugovány při 800 ot/min po dobu 5 minut. Supernatant (200 µl) byl odsát a do každé jamky bylo přidáno 200 µl dimethylsulfoxidu (DMSO) k rozpuštění formazanových krystalů. Jamky byly inkubovány 10 minut k odstranění vzduchových bublin. Nakonec byla změřena absorbance při 550 nm pomocí *Biotek micro-plate readeru* (Yedjou et al., 2003).

Výsledky této studie naznačují, že na buněčné úrovni dusičnan olovnatý významně snižuje životaschopnost buněk lidské leukémie (HL-60) v závislosti na dávce. Na molekulární úrovni vedla léčba olovem k významnému zvýšení tvorby lipidového hydroperoxidu v buňkách HL-60. Závěrečným zjištěním této studie bylo, že dusičnan olovnatý je vysoce cytotoxický pro buňky HL-60 a zároveň bylo zjištěno, že tato cytotoxicita je zprostředkována oxidativním stresem, biomarkerem buněčného poškození (Yedjou et al., 2003).

4.3 Kadmium

Kadmium (Cd) je toxický těžký kov bez známé biologické funkce u lidí. Je přítomen v domácím prachu a tabákovém kouři (Hogervorst et al., 2007) a z tohoto důvodu jsou dýchací cesty považovány za primární vstup Cd do těla. Zároveň kadmium vstupuje do životního prostředí prostřednictvím průmyslových odpadních plynů, odpadních vod a kalů a způsobuje znečištění vody a půdy (Liao et al., 2021). V nedávné době bylo prokázáno na modelu tkáně lidských dýchacích cest (Xiong et al., 2019), jak Cd narušuje funkce řasinek a dostává se do plic, kde může indukovat apoptózu produkcí ROS a změnou sníženého glutathionu (GSH)/ oxidovaná glutathion (GSSG) redoxní rovnováhu. Jakmile se Cd dostane do plicních alveol, difunduje do krevního řečiště a je transportován do celého těla. Díky nízké rychlosti vylučování může hluboce ovlivnit funkční integritu ledvin (Gonick, 2008). Přestože Cd představuje velký environmentální zdravotní problém, konkrétní mechanismy, kterými vyvolává své nepříznivé účinky, nebyly dosud plně objasněny. Studie zabývající se tímto problémem ukázaly, že Cd může způsobit různé biochemické, metabolické a cytotoxické účinky. Ve většině případů však vztahy mezi těmito účinky a specifickými toxickými účinky Cd v různých cílových orgánech nebyly pevně stanoveny.

4.3.1 Kadmium a vaskulární endotel

Cévní endotel se skládá ze specializovaných buněk podobných endotelu, které lemují lumenální povrch všech krevních cév a tvoří kapilární síť, které zprostředkovávají dodávku kyslíku a živin do tkání celého těla. Kromě toho hraje vaskulární endotel klíčovou roli v celé řadě fyziologických a patologických procesů, jako je regulace krevního tlaku, angiogeneze, ateroskleróza, zánět, tvorba nádorů a metastázy nádorů. V 50. a 60. letech 20. století ze studií vyplynulo, že vaskulární endotel může být důležitým cílem toxicity Cd, které ukázaly, že akutní expozice Cd u mnoha savců nesoucích šourku vedla k edému a krvácení ve varlatech. Pozdější studie ukázaly, že Cd způsobuje zhroucení mezi endoteliálními buňkami kapilár a venul, což vedlo ke zvýšení vaskulární permeability (Sacerdote a Cavichia, 1983), následované edémem, krvácením a nekrózou varlat. Zároveň další studie ukázaly, že podobné změny endotelní integrity vyvolané Cd se mohou vyskytovat také v jiných tkáních včetně: plic, dělohy, nervového systému, placenty a jater (Prozialeck et al., 2006).

Při zvažování účinku Cd na vaskulární endotel je nejprve nutné vzít v úvahu různé způsoby, kterými jsou lidé a zvířata vystaveni Cd a formu Cd, které existují *in vivo*. U lidí je expozice obvykle důsledkem vdechování vzduchem přenášeného Cd nebo požitím Cd-kontaminovaných potravin nebo vody. Každá z těchto situací typicky zahrnuje chronickou expozici relativně nízkým hladinám Cd. Cd má dlouhý biologický poločas v těle, odhaduje se na 15-30 let. Díky tomu může celková tělesná zátěž Cd v průběhu času postupně narůstat, přičemž se hromadí ve specifických orgánech, jako jsou játra, ledviny a srdce (Nordberg et al., 1986).

4.3.2 Kadmium a mitochondrie

Mitochondrie jsou orgány bakteriálního původu zapojené do několika buněčných procesů, jako je energetická homeostáza, buněčná proliferace, metabolismus a buněčná smrt. Mitochondrie zároveň hrají důležitou roli v metabolismu eukaryotních buněk, produkují energii aerobním dýcháním. Metabolická energie odvozená z oxidace sacharidů, lipidů a aminokyselin se používá k vytvoření adenosintrifosfátu (ATP) prostřednictvím procesu zvaného oxidativní fosforylace (Milenkovic et al., 2017). Belyaeva a kol. (2004b) uvedli, že jak mitochondriální elektronový transportní řetězec (ETC), tak permeabilita membrány jsou primárními cíli mitochondriální dysfunkce indukované Cd. Na druhou stranu Ciapaite et al. (2009) prokázali v mitochondriích izolovaných z jater samečů potkanů Wistar, že Cd interferuje s mitochondriálním dýcháním pouze prostřednictvím inhibičního účinku downstream Q, což vede ke snížení rychlosti dýchání a fosforylace. Účinek Cd

na mitochondriální dýchání však souvisí s koncentrací: zatímco vysoká koncentrace Cd inhibuje bazální dýchání, nízká dávka stimuluje dýchání v klidovém stavu (Belyaeva a Korotkov, 2003).

4.3.3 Imunotoxicita kadmia

Hodnocení účinku kadmia na imunitní systém bylo studováno pomocí *in vitro* experimentů a zvířecích modelů, zejména hlodavců. Kadmium může přímo interagovat s buňkami imunitního systému, což vede k různým změnám ve funkci těchto buněk, které lze měřit *in vitro*. Přímé účinky zahrnují buněčnou smrt a narušení signálních drah, což vede k změněné produkci cytokinů, změněné expresi povrchových markerů, aktivaci a diferenciaci buněk, což může způsobit imunosupresi nebo imunostimulaci. Přestože *in vitro* studie nemohou napodobit složitost imunitní odpovědi v celém organismu, často se používají k hodnocení imunotoxického potenciálu chemických látek a jsou užitečné při studiu základních mechanismů imunomodulace vyvolané Cd. Použití lidských imunitních buněk *in vitro* je jedním ze způsobů, jak zkoumat účinky Cd na lidský imunitní systém (Mirkový et al. 2021).

Nejvíce informativní metodou zkoumání imunotoxicity Cd je však použití zvířecích modelů, kde lze napodobit přirozené cesty expozice a vyhodnotit účinky na fyziologii tkání a orgánů. Studie imunotoxicity Cd byly prováděny s různými dávkami (vysoké, střední, nízké), cestami (systémové, plicní, perorální) a trváním expozice (akutní, subchronické, chronické). Hodnotily se různé imunitní koncové body, jako je aktivace imunitních buněk, jejich proliferace, efektorová aktivita a přežití. Výsledky těchto studií se lišily podle typu buňky nebo aktivity (stimulace, inhibice, žádný účinek), což je způsobeno rozdíly mezi experimentálními systémy a druhovou citlivostí imunitních systémů (zvířata versus lidé). Tyto rozdíly přispěly k nejednotným výsledkům studií na imunotoxicitu Cd, jak *in vitro*, tak *in vivo*. Je však jasné, že Cd může ovlivnit buňky imunitního systému a modulovat některé imunitní reakce. Kvůli složitosti imunitního systému a jeho reakcí nejsou základní mechanismy imunotoxicity Cd stále plně objasněny (Mirková et al., 2021).

ZÁVĚR

V dnešní době je rtuť poměrně velkým tématem, a to hlavně z důvodu jejího neustálého uvolňování do životního prostředí. Rtuť není jediný těžký kov, který je uvolňován do životního prostředí způsobující zdravotní problémy lidem. Mezi tyto kovy můžeme řadit obecně všechny těžké kovy, převážně olovo, kadmium a měď. Rtuť se dostává do těla nejčastěji vdechnutím, neboť díky své kapalně formě se snadno vypařuje a dokáže pronikat do plic, skrz které se následně dostane do celého těla. V těle následně prochází nejen do většiny orgánů, ale dokáže procházet i přes hematoencefalickou bariéru a díky tomu se dostává i do mozku. V jednotlivých orgánech se rtuť hromadí a způsobuje poškození. I přesto že se v dnešní době snažíme zamezit uvolňování rtuti do životního prostředí, nelze tomuto uvolňování zamezit úplně.

Rtuť představuje spolu s dalšími zmíněnými těžkými kovy velké zdravotní riziko, protože příznaky otrav často bývají nesourodé anebo naznačují jiné onemocnění, které následně lékaři léčí s neúspěchem. V dnešní době mohou snadno přijít k otravě rtutí hlavně lidé z přímořských a oceánských států díky již poměrně vysokému obsahu rtuti v mořských, ale i sladkovodních rybách. Při konzumaci ryb lidé zároveň konzumují i rtuť ve formě methylrtuti, která je zároveň nejtoxičtější formou rtuti. Ta se ukládá například v ledvinách či mozku, ale také zároveň postihuje i krevní řečiště, které pro rtuť představuje transportní médium. Léčba otravy rtutí a dalších těžkých kovů je velmi náročná a bohužel často bývá neúspěšná. Po vyléčení ve většině případů bohužel zůstávají trvalé následky, mezi které řadíme například deprese, zhoršenou funkci ledvin a mnoho dalších. Toto jsou následky, které si člověk nese až do konce života.

I přes moderní medicínu ještě stále nejsou plně objasněny některé mechanismy toxicity těžkých kovů a bohužel u některých těžkých kovů nejsou mechanismy toxicity známy vůbec. Vzhledem k závažnosti expozice těžkých kovů do životního prostředí je nutné objasnit tyto mechanismy možná co nejdříve, a i díky tomu začaly probíhat studie na buněčných liniích, které nám dávají jasnou představu o mechanismu působení. Po porozumění toxicity těžkého kovu by bylo možné nastavit efektivnější léčbu, která by popřípadě mohla zmírnit, popřípadě úplně zamezit vzniku trvalých následků, které by těžké kovy mohly svojí toxicitou způsobit.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Abdeldayem, Domestic water and the accumulative toxicity of mercury in the kidney. *Applied Water Science*, **2022**, 12(6). ISSN 2190-5487, DOI: 10.1007/s13201-021-01551-w
2. Akerstrom, Barregard, Lundh et al. Relationship between mercury in kidney, blood, and urine in environmentally exposed individuals, and implications for biomonitoring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2017**, 320(6), ISSN 0041008X, DOI: 10.1016/j.taap.2017.02.007
3. Akkaya, Kucukal, Little et al. Mercury leads to abnormal red blood cell adhesion to laminin mediated by membrane sulfatides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2019**, 1861(6), ISSN 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.03.008
4. Al-Ghafari, Elmorsy, Fikry et al. The heavy metals lead and cadmium are cytotoxic to human bone osteoblasts via induction of redox stress. *PLOS ONE*. **2019**, 14(11), ISSN 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0225341
5. Al-Sulaiti, Soubra, Al-Ghouti et al., Causes and effects of mercury and methylmercury contamination in the marine environment, *Current Pollution Reports*, **2022**, 8(3), ISSN: 2198-6592, DOI: 10.1007/s40726-022-00226-7
6. Arnal, De Alaniz, Marra et al. Cytotoxic effects of copper overload on human-derived lung and liver cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **2012**, 1820(7), ISSN 03044165, DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.03.007
7. Aykin-Burns, Laegeler, Kellogg et al. Oxidative Effects of Lead in Young and Adult Fisher. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **2003**, 44(3), ISSN 0090-4341. DOI: 10.1007/s00244-002-2023-4
8. Beldowska a Falkowska. Mercury in marine fish, mammals, seabirds, and human hair in the coastal zone of the southern Baltic. *Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool hel in Stockholm*, **1999**, 227(2), ISSN 0049-6979, DOI: 10.1007/s11270-015-2735-5
9. Beldowska, Falkowska, Kellogg et al. Mercury in marine fish, mammals, seabirds, and human hair in the coastal zone of the southern Baltic. *Archives of environmental contamination and Toxicology*, **2016**, 227(2), ISSN 0049-6979, DOI: 10.1007/s11270-015-2735-5
10. Bernhoft a Falkowska. Mercury Toxicity and Treatment, *Journal of Environmental and Public Health*, **2011**, 2012(4), ISSN 1687-9805, DOI: 10.1155/2012/460508

11. Branca, Pacini, Gulisano et al. Cadmium-Induced Cytotoxicity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **2020**, 8(2), ISSN 2296-634X, DOI: 10.3389/fcell.2020.604377
12. Bridges, Zalups, Gulisano et al. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. Totowa, **2017**, 20(2), ISSN 1093-7404. DOI: 10.1080/10937404.2016.1243501
13. Clarkson, Human toxicology of Mercury, 1998. Wiley - online library. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **1998**, 11(2), DOI: 10.1002/(SICI)1520-670X
14. Clarkson, Yirün, Balci-Özyurt et al., The toxicology of Mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **2007**, 34 (4), ISSN 1040-8363, DOI: 10.3109/10408369708998098
15. Drive. Mercury: Sources, Transport, Deposition and Impacts. *New Hampshire department of Enviromental Services*, **2019**
16. Erdemli-Köse, Yirün, Balci-Özyurt et al., Modification of the toxic effects of methylmercury and thimerosal by testosterone and estradiol in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Journal of Applied Toxicology*. **2021**, 42(6), ISSN 0260-437X, DOI: 10.1002/jat.4269
17. Fahmy, Ebrahim, Gaber et al. In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **2020**, 60(6), ISSN 0946672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126481
18. Feles, Overath, Reichardt et al. Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. *Methods and Protocols*. **2022**, 5(4), ISSN 2409-9279. DOI: 10.3390/mps5040058
19. Fernandes Azevedo, Barros Furieri, Peçanha et al. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**, 2012(4), ISSN 1110-7243. DOI: 10.1155/2012/949048
20. Gonzalez-Raymat, Liu, Liriano et al. Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. *Environmental Pollution*. **2017**, 229(4), ISSN 02697491. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.04.101
21. Greenwood, Earnshaw, **1993**, *Chemie prvku*, IIth ed.; Informatorium: Praha, ISBN: 365882427

22. Hajeb, Jinap, Ismail et al. Assessment of mercury level in commonly consumed marine fishes in Malaysia. *Food Control*. **2009**, 20(1), ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.02.012
23. Havarinasab, Hultman, Ismail et al. Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. **2005**, 4(5), ISSN 15689972. DOI: 10.1016/j.autrev.2004.12.001
24. Chan, Bautista, Alvarado-Cruz et al. Inorganic mercury prevents the differentiation of SH-SY5Y cells: Amyloid precursor protein, microtubule associated proteins and ROS as potential targets. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **2017**, 41(5), ISSN 0946672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.02.002
25. Chen, Bautista, Alvarado-Cruz et al., Tea Catechins Protect against Lead-Induced Cytotoxicity, Lipid Peroxidation, and Membrane Fluidity in HepG2 Cells. *Toxicological Sciences*. **2017**, 69(1), ISSN 10960929, DOI: 10.1093/toxsci/69.1.149
26. Chin-Chan, Segovia, Quintanar et al. Mercury Reduces the Enzymatic Activity of Nephilysin in Differentiated SH-SY5Y Cells. *Toxicological Sciences*. **2017**, 145(1), ISSN 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfv037
27. Jaishankar, Tseten, Anbalagan et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals: Molecular evidence. *Interdisciplinary Toxicology*. **2014**, 7(2), ISSN 1337-9569. DOI: 10.2478/intox-2014-0009
28. Koller, Saleh, Quintanar et al. Introductory Chapter: Introducing Heavy Metals. *Heavy Metals*. **2018**, 145(1), ISSN 1096-6080. DOI: 10.5772/intechopen.74783
29. Kovalevich, Langford, Quintanar et al., Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Culture*. **2013**, ISSN 1096-6080, DOI: 10.1007/978-1-62703-640-5_2
30. Langford, Ferner. Toxicity of mercury. *Journal of Human Hypertension*. **1999**, 13(10), ISSN: 0950-9240, DOI: 10.1038/sj.jhh.1000896
31. Liao, Zheng, Wu et al. Cadmium cytotoxicity and possible mechanisms in human trophoblast HTR -8/ SVneo cells: Introducing Heavy Metals. *Environmental Toxicology*. **2013**, 36(6), ISSN 1520-4081. DOI: 10.1002/tox.23110
32. Lide, ed., **1991** CRC Handbook of Chemistry and Physics, 72. vydání, CRC Press, str. 2472 ISBN (10): 0849305659, ISBN (13): 978-0849305658

33. Lim, Shim, Lee et al. Mercury inhalation poisoning and acute lung injury. *The Korean Journal of Internal Medicine*. **1998**, 13(2), ISSN 1226-3303. DOI: 10.3904/kjim.1998.13.2.127
34. Magos, Clarkson. Overview of the clinical toxicity of mercury. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. **2006**, 43(4), ISSN 0004-5632. DOI: 10.1258/000456306777695654
35. Mallamaci, Barbarossa, Carocci et al. Evaluation of the Potential Protective Effect of Ellagic Acid against Heavy Metal (Cadmium, Mercury, and Lead) Toxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Foods*. **2013**, 13(3), ISSN 2304-8158. DOI: 10.3390/foods13030419
36. Mirkov, Popov A, Aleksandrov, Ninkov et al. Immunotoxicology of cadmium: Cells of the immune system as targets and effectors of cadmium toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. **2021**, 149(3), ISSN 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112026
37. O'Hern, Djoko, Ninkov et al. Copper Cytotoxicity: Cellular Casualties of Noncognate Coordination Chemistry. *MBio*. **2022**, 13(3), ISSN 2150-7511. DOI: 10.1128/mbio.00434-22
38. Park, Zheng, Ninkov et al. Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury. *MBio*. **2012**, 45(6), ISSN 1975-8375. DOI: 10.3961/jpmph.2012.45.6.344
39. Pilar, Borovec, Szeliga et al. Mercury emission from three lignite-fired power plants in the Czech Republic. *Fuel Processing Technology*. **2021**, 212(6), ISSN 03783820. DOI: 10.1016/j.fuproc.2020.106628
40. Prozialeck, Edwards, Woods et al. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sciences*. **2006**, 79(16), ISSN 00243205. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.05.007
41. Raffee, Alawneh, Alassaf et al. Effects of Elemental Mercury Vapor Inhalation on Arterial Blood Gases, Lung Histology, and Interleukin-1 Expression in Pulmonary Tissues of Rats. *The Scientific World Journal*. **2021**, 2021(16), ISSN 1537-744X. DOI: 10.1155/2021/4141383
42. Rana, Tangpong, Rahman et al. Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. *Toxicology Reports*. **2018**, 5(16), ISSN 22147500. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.05.012
43. Rice, Walker, Wu et al. Environmental Mercury and Its Toxic Effects: An overview. *Toxicology Reports*. **2012**, 47(2), ISSN 1975-8375. DOI: 10.3961/jpmph.2014.47.2.74

44. Sedláčková, Kružíková, Svobodová et al. Mercury speciation in fish muscles from major Czech rivers and assessment of health risks. *Food Chemistry*. **2014**, ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.041
45. Simon, Jönk, Wühl-Couturier, Daunderer, **1990**, Merkur, slitiny rtuti a sloučeniny rtuti. In: Elvers, B., Hawkins, S. & Schulz, G., ed., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, sv. A16, *Magnetic Materials to Mutagenic Agents*, New York VCH Publishers, str. 269–298.
46. Singh, Gautam, Mishra et al. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*. **2011**, 43(3), ISSN 0253-7613, DOI: 10.4103/0253-7613.81505
47. Sudo, Van Dao, Miyamoto et al. Comparative analysis of „in vitro“ neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. **2013**, 81(6), ISSN 0916-7250. DOI: 10.1292/jvms.19-0059
48. Suhendrayatna, Arahman, Sipahutar et al. Toxicity and Organ Distribution of Mercury in Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) after Exposure to Water Contaminated Mercury (HgII). *Toxics*. **2019**, 7(4), ISSN 2305-6304. DOI: 10.3390/toxics7040058
49. Tang, Wang (H.), Wang (Q.) et al. Amelioration of cadmium cytotoxicity to human cells by nutrient cation contents and the building of a biotic ligand model. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2013**, 253(4), ISSN 01476513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114690
50. Tchounwou, Newsome, Williams et al. Copper-Induced Cytotoxicity and Transcriptional Activation of Stress Genes in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells, Metal ions in Biological Systems, **2012** s. 285-290 ISSN 21423838
51. Tchounwou, Yedjou, Patlolla et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment: A mini review. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. **2014**, 253 (4), ISSN 01476513. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6
52. Tchounwou, Yedjou, Patlolla et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment: A mini review. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. **2003**, 253 (4), ISSN 01476513. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6
53. Tikkanen, Lotha, Gregersen et al Mercury. *Britannica*. 7. března 2008
54. Vávrová, Palička, Dvořák et al., Reduction of mercury emissions from coal combustion in the Czech Republic: Molecular evidence. *IOP Conference Series*:

- Earth and Environmental Science*, **2017**, 92(5), ISSN 1755-1307, DOI: 10.1088/1755-1315/92/1/012071
55. Vojtíšek, J.; Suchý, D. Otrava rtutí jako vyústění neobvyklé symptomatologie. *Klinická farmakologie a farmacie*. **2014**, 28(2)
56. Vupputuri, Longnecker, Daniels et al. Blood mercury level and blood pressure among US women: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Environmental Research*, **2012**, 97(2), ISSN 00139351. DOI: 10.1016/j.envres.2004.05.001
57. Wani, Ara, Usmani et al. Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary Toxicology*. **2015**, 8(2), ISSN 1337-9569. DOI: 10.1515/intox-2015-0009
58. WHO, Anorganická rtuť, *Environmental Health Criteria* 118, Ženeva, **2017**
59. Yang, Zhang, Wang et al. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Chemosphere* [online]. Basel: Springer Basel, **2019**, 245(2), ISSN 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125586
60. Young, Wax, Feng et al. Acute Elemental Mercury Poisoning Masquerading as Fever and Rash: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Journal of Medical Toxicology*, **2020**, 16(4), ISSN 1556-9039. DOI: 10.1007/s13181-020-00792-6
61. Zahir, Rizwi, Haq et al. Low dose mercury toxicity and human health: A Review of the Literature. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2005**, 20(2), ISSN 13826689. DOI: 10.1016/j.etap.2005.03.007
62. Zheng, Wang, Dong et al., The Toxicological Effects of Mercury Exposure in Marine Fish: Molecular Evidence. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **2019**, 102(5), ISSN 0007-4861, DOI: 10.1007/s00128-019-02593-2