

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Otrava olovem u supa hnědého - vývoj biochemických parametrů

Diplomová práce

Bc. Veronika Tichá

Brno, 2011

**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie**

Otrava olovem u supa hnědého - vývoj biochemických parametrů

Diplomová práce

**Autor práce:
Bc. Veronika Tichá**

**Vedoucí práce:
Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.**

Brno, 2011

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce Prof. MVDr. Jiřího Pikuly, Ph.D. a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházela, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně dne 15.3. 2011

Veronika Tichá

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Prof. MVDr. Jiřímu Pikulovi, Ph.D. za odborné vedení, podnětné připomínky a poskytnutí metodických rad při zpracování mé diplomové práce. Tato práce byla podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“, Grant č. 6215712402.

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 CHARAKTERISTIKA OLOVA	8
2.1 Sloučeniny	8
2.2 Izotopy olova	10
2.3 Výroba a použití	10
2.4 Výskyt v životním prostředí, transport a distribuce	11
2.4.1 <i>Vzduch</i>	12
2.4.2 <i>Voda</i>	12
2.4.3 <i>Půda</i>	13
2.4.4 <i>Potraviny</i>	14
2.5 Zdravotní rizika	14
2.5.1 <i>Nepříznivé efekty</i>	16
2.5.1.1 Poškození nervové soustavy (neurotoxicita).....	16
2.5.1.2 Poškození krevního systému (hematotoxicita).....	16
2.5.1.3 Poškození endokrinního systému.....	16
2.5.1.4 Poškození ledvin (nephrotoxicita).....	17
2.5.1.5 Vývojová a reprodukční toxicita.....	17
2.5.1.6 Poškození imunitního systému (imunotoxicita).....	17
2.5.1.7 Vznik rakoviny (kancerogenita).....	17
2.6 Ekologická rizika	18
3 SUP HNĚDÝ (<i>AEGYPIUS MONACHUS</i>)	18
3.1 Taxonomie	18
3.2 Charakteristika	19
3.3 Způsob života	19
3.4 Prostředí a biogeografické regiony	20
3.5 Parametry	20
3.6 Sociální organizace	20
3.7 Rozmnožování	20
3.8 Ochrana druhu	21

4	OTRAVY OLOVEM U PTÁKŮ	21
4.1	Etiologie, mechanismus účinku a toxicita.....	21
4.2	Klinické příznaky	25
4.3	Patologickomorfologický nález	25
4.4	Diagnostika	26
4.5	Terapie	27
4.6	Prevence	29
5	MATERIÁL A METODIKA	30
6	VÝSLEDKY	36
7	DISKUZE.....	44
8	ZÁVĚR.....	46
9	ABSTRAKT A KLÍČOVÁ SLOVA.....	47
10	SEZNAM LITERATURY	49
11	SEZNAM ZKRATEK, VYSVĚTLIVKY	56
12	PŘÍLOHA	59
	Sup hnědý (<i>Aegypius monachus</i>).....	59

1 Úvod

Olovo je velmi toxický kov, který se může vyskytovat ve všech složkách životního prostředí. Anorganické sloučeniny olova jsou součástí nátěrových hmot (minium, Pb_3O_4) a pigmentů ($PbCrO_4$), nebo se používají při výrobě olovnatého skla (PbO). Největší spotřeba olova byla na výrobu nosných mřížek do akumulátorů. Organokovové sloučeniny olova tetraethylolovo $Pb(CH_2CH_3)_4$ a tetramethylolovo $Pb(CH_3)_4$, se používaly v benzínu jako antidetonační přísady. Ročně se ve světě vyrobí asi 5 milionů tun tohoto kovu.

Cesta vstupu olova do organismu může být inhalační, alimentární i kontaktem, jeho vstřebávání však ovlivňují i vnitřní faktory organismu, zejména hladiny železa a vápníku. Olovo poškozuje ledviny, játra, krev, nervový a kardiovaskulární systém. Váže se na sulfhydrylové skupiny různých enzymů a zasahuje do metabolismu krevních bílkovin, do systému kyseliny nikotinové, do imunobiologických procesů, do tvorby hemoglobinu i do minerálního metabolismu.

Otravy olovem patří mezi nejčastější otravy těžkými kovy u ptáků a pravděpodobně jsou tyto otravy nejčastější formou intoxikace u ptačích druhů na celém světě. Otravou olovem jsou ohroženi jak volně žijící ptáci, tak ptáci chovaní v zajetí. Vodní i suchozemští ptáci mohou být vystaveni olovu například požitím olovených broků nebo rybářského olůvka. Další významné nebezpečí pro ptáky představuje kontaminace půdy tímto kovem. Olovo se vlivem nízkého pH v žaludku dravců rychle rozpouští a následně absorbuje. Když je rychle absorbováno velké množství olova, může nastat akutní otrava a smrt ptáků zřejmě i když jsou v dobré kondici.

Mezi ptáky ohrožené požitím olovených broků patří často dravci živící se mrtvou či postřelenou zvěří. Otravy olovem byly zaznamenány u mnoha druhů dravců, jako například u kriticky ohroženého kondora kalifornského (*Gymnogyps californianus*), a také u celosvětově ohroženého supa hnědého (*Aegypius monachus*), jehož populace byla v poslední době devastována toxickými účinky veterinárního léčiva diclofenac.

Sup hnědý (*Aegypius monachus*) je největším zástupcem tzv. starosvětských supů a současně největším ptákem Evropy. Je to dravý pták, který se živí mršinami, a tím je prospěšný odklizením mrtvých zvířat. Vzácně loví i živou kořist - hlavně nemocné kusy. Sup hnědý je zařazen na listinu ohrožených druhů IUCN.

Cílem práce bylo sledování intoxikace olovem u skupiny supů chovaných v Zoologické zahradě hlavního města Prahy a získání dat týkajících se biochemických a toxikologických parametrů a analýzy oxidativního stresu. Účinky terapie byly hodnoceny na celé řadě parametrů. Výsledky naměřené u intoxikovaných ptáků jsou srovnávány s výsledky zjištěnými u zdravých ptáků, kteří olovu vystaveni nebyli.

2 Charakteristika olova

Chemická značka olova je Pb (*Plumbum*). Olovo je těžký toxický kov, který je znám lidstvu již od starověku. Má velmi nízký bod tání a je dobře kujné a odolné vůči korozi (URL 1, 2010). Je rozpustné v kyselině dusičné a horké kyselině sírové (URL 11, 2004). Má poměrně velkou hustotu ($11,34 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) (URL 4, 2010).

Ve sloučeninách se olovo vyskytuje v mocenství: Pb^{2+} a Pb^{4+} . Nejstálejší jsou přítom sloučeniny dvojmocného olova (URL 4, 2010), čtyřmocné olovo je vesměs oxidačním činidlem (URL 1, 2010). Za normálních podmínek je olovo odolné a neomezeně stále vůči atmosférickým vlivům. V kompaktním stavu se na vlhkém vzduchu příliš nemění, pouze zvolna ztrácí lesk a tvoří se na něm šedobílá vrstva oxidů, hydroxidů a uhličitanů (URL 1, 2010).

Olovo tvoří řadu organických sloučenin. Mezi používané patří soli organických kyselin – laktát, acetát, tetrametyl- a tetraetyl-olovo (URL 11, 2004).

Průměrný obsah olova v zemské kůře je $13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. V přírodě se vyskytují především v sulfidových a karbonátových rudách (Velíšek, 2002).

2.1 Sloučeniny

Z velké řady sloučenin mají největší praktický význam:

- a) Oxid olovnatý, PbO , se vyskytuje ve dvou barevných formách – červená tetragonální (starší název olovnatý klejt) a forma žlutá. Oxid olovnatý lze nejnázev připravit přímou oxidací roztaveného olova vzdušným kyslíkem. Hlavní uplatnění nalézá při výrobě těžkého olovnatého skla, křišťálu s vysokým indexem lomu a leskem. Další uplatnění nalézá tato látka jako složka keramických glazur a emailů (URL 1, 2010).
- b) Oxid olovnato-olovičitý, suřík, Pb_3O_4 , složený oxid $2\text{PbO} + \text{PbO}_2$, nalézá využití jako nerozpustný červený pigment. Slouží k výrobě antikoročních nátěrů železných a ocelových konstrukcí a jako součást keramických glazur. Uplatňuje se i při výrobě syntetického kaučuku jako aktivátor vulkanizace (URL 1, 2010).

- c) Oxid olovičitý, PbO_2 je hnědá látka s oxidačními vlastnostmi. Jeho využití při výrobě zápalek je založeno na faktu, že jeho směsi se snadno zápalnými látkami (fosfor, síra) se samovolně vzněcují. Tato vlastnost se uplatní i při výrobě pyrotechnických materiálů (URL 1, 2010).
- d) Sulfid (sirník) olovnatý, PbS , je černá, silně nerozpustná sloučenina kovového lesku, velmi dobře štěpná. V přírodě se s ním setkáváme jako s minerálem a olověnou rudou galenitem. Velmi čistý PbS je citlivým detektorem infračerveného záření a vykazuje fotoelektrickou vodivost (podobně se chová i selenid olovnatý a telurid olovnatý PbSe a PbTe). Tato vlastnost se využívá např. při výrobě fotografických expozimetrů a fotočlánků (URL 1, 2010).
- e) Uhličitan olovnatý PbCO_3 je ve vodě nerozpustná látka, snadno se rozkládá zahřátím. Je součástí barviva – olovnaté běloby - $\text{Pb}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$. Tento malířský pigment má výbornou krycí schopnost a smíšen s olejovitými látkami slouží jako malířská barva. Nevýhodou tohoto pigmentu je fakt, že v přítomnosti sirovodíku tmavne za vzniku sirníku olovnatého PbS (URL 1, 2010).
- f) K dalším velmi významným malířským pigmentům patří žlutý chroman olovnatý PbCrO_4 , známý jako chromová žluť (URL 1, 2010).
- g) Síran olovnatý, PbSO_4 je velmi obtížně rozpustná bílá krystalická sloučenina. Krystaly čistého síranu olovnatého jsou čiré jako sklo (označují se někdy jako olovnaté sklo). V chemických výrobcích se někdy používá přídavek síranových iontů k roztoku pro odstraňování toxických iontů olova (URL 1, 2010).
- h) Dusičnan olovnatý, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ je jedna z nejlépe rozpustných sloučenin olova. Vzniká velmi snadno přímo reakcí elementárního olova s kyselinou dusičnou za intenzivního vývoje oxidů dusíku. Slouží často jako výchozí látka pro výrobu jiných sloučenin olova (URL 1, 2010).
- i) Tetraethylolovo, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$, je organokovová sloučenina, která se přidávala do benzínu, aby zpomalovala rychlost jeho hoření a zvyšovala oktanové číslo paliva. Zároveň usazené olovo sloužilo jako mazadlo sedel ventilů spalovacích motorů a utěšňovadlo spalovacích prostor. Pro typy spalovacích motorů, které musí využívat tento typ paliva je dnes tato příměs nahrazována organokovovými sloučeninami manganu. Ve vyspělých zemích byly zavedeny trojcestné katalyzátory výfukových plynů, které vedly k zavedení bezolovnatých benzínů (URL 1, 2010).

2.2 Izotopy olova

Olovo, vyskytující se v přírodě, se skládá ze čtyř stabilních izotopů:

- ^{204}Pb , v množství přibližně 1,4 %, které je zástupcem olova vzniklého mimo radioaktivní rozpadové řady.
- ^{206}Pb , v množství přibližně 24,1 %, které vzniklo jako finální produkt rozpadu uranu ^{238}U (Uran-radiová rozpadová řada).
- ^{207}Pb , v množství přibližně 22,1 %, které vzniklo jako finální produkt rozpadu uranu ^{235}U (Aktiniová rozpadová řada).
- ^{208}Pb , v množství přibližně 52,4 %, které vzniklo jako finální produkt rozpadu thoria ^{232}Th (Thoriová rozpadová řada) (URL 1, 2010).

Olovo, které se vyskytuje v přírodních rudách, vykazuje tedy odlišný vzájemný poměr jednotlivých izotopů v závislosti na svém původu. Této skutečnosti lze v jistých případech využít k vysledování původu olova (obvykle archeologické vzorky) metodou hmotnostní spektrometrie. Uvedená technika určí velmi přesně vzájemné zastoupení jednotlivých izotopů olova a porovnáním s tabelovanými hodnotami pro známé starověké lokality těžby olověných rud lze s velkou mírou pravděpodobnosti určit původ vyšetřovaného olověného předmětu (URL 1, 2010).

2.3 Výroba a použití

Olovo se obvykle získává z PbS , který se koncentruje z rudy, dále se praží a vzniklý PbO se redukuje v šachtové peci (URL 11, 2004).

Olovo začali lidé používat již v dávnověku, protože jeho rudy jsou poměrně dobře dostupné. Kdy a kde bylo olovo získáno poprvé není dosud známo, nejstarší dochovaný předmět pochází z období mezi lety 3000 př.n.l. a 2000 př.n.l. a byl nalezen v Malé Asii (URL 1, 2010).

Kovové olovo velmi dobře pohlcuje rentgenovo záření a slouží proto k odstínění zdrojů tohoto záření v chemických a fyzikálních aparaturách a především v lékařství při ochraně obsluhy běžných medicinálních rentgenů, a také k výrobě elektrických akumulátorů, vodovodních rozvodů a parních kotlů. Polotloušťka olova je závislá na energii a typu záření, například pro stínění beta záření je olovo naprosto nevhodné z důvodu silného druhotného záření, které vzniká při interakci beta záření s atomy olova.

Jeho slitiny s cínem, antimonem nebo stříbrem vykazují výborné vlastnosti při mechanickém spojování kovových předmětů pájením a jako pájky jsou doposud široce používány (URL 1, 2010).

Olovo je stále převažujícím materiálem pro výrobu střeliva a to především pro svoji vysokou specifickou hmotnost, která poskytuje olověné střele vysokou průraznost. Většina nábojů do lehkých palných zbraní (pistole, revolvery, pušky, samopaly) se skládá z olověného jádra, které je kryto ocelovým, nebo měděným pláštěm. Střelivo pro brokové zbraně tvoří obvykle broky z čistého olova, případně slitiny olova s antimonem (URL 1, 2010).

Největší spotřeba olova byla na výrobu nosných mřížek do akumulátorů (URL 11, 2004). Anorganické sloučeniny olova jsou součástí nátěrových hmot (minium, Pb_3O_4) a pigmentů ($PbCrO_4$), nebo se používají při výrobě olovnatého skla (PbO). Organokovové sloučeniny olova tetraethylolovo $Pb(CH_2CH_3)_4$ a tetramethylolovo $Pb(CH_3)_4$, se používaly v benzínu jako antidetonační přísady. Ročně se ve světě vyrobí asi 5 milionů tun olova (Velíšek, 2002).

Ještě před nedávnou dobou byla hojně užívanou slitinou liteřina - směs olova, cínu a antimonu. Odlévala se z ní jednotlivá písmena, která se v tiskárnách skládala do stránek a sloužila k tisku knih, novin a časopisů. Po vytištění potřebného textu se stránka rozmetala a byly odlity nové litery. V současné době je tento typ tisku překonán a opuštěn (URL 1, 2010).

V posledních letech kvůli negativnímu působení na životní prostředí došlo k výraznému snížení využívání olova v benzínech, barvách, keramických výrobcích a potrubních slitinách (URL 11, 2004).

2.4 Výskyt v životním prostředí, transport a distribuce

Přírodními zdroji emisí olova do prostředí jsou vulkanické erupce a geologické zvětrávání. Roční emise z přírodních zdrojů se odhadují na 19000 tun olova (URL 11, 2004).

2.4.1 Vzduch

Obsah olova v ovzduší je místně proměnlivý (Velíšek, 2002). V nekontaminovaných oblastech by neměla koncentrace Pb ve vzduchu přesahovat 1 ng/m^3 (URL 11, 2004). V málo znečištěných oblastech vzduch obsahuje $0,005\text{--}0,3 \text{ } \mu\text{g.m}^{-3}$ olova. Naproti tomu ve velkých městech byl zjištěn obsah $0,2\text{--}5 \text{ } \mu\text{g.m}^{-3}$ (Velíšek, 2002). Během dopravních špiček lze naměřit i $20 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ (URL 11, 2004).

Olovo se do vzduchu dostává z bodových zdrojů (výroba olova, akumulátorů, skla, skládek) a z liniových zdrojů (doprava). Olovo z výfukových plynů se usazuje na vegetaci a v půdě okolo silnic ve formě halogenidů, síranu a oxidu, který se mění na síran. V těchto formách také přetrvává olovo v atmosféře. Olovo se ve vzduchu váže na prachové částice, které mohou být inhalovány nebo smyty deštěm do půdy či vody. Přibližná doba setrvání olova v atmosféře je asi 10 dní (URL 11, 2004).

Nezanedbatelné mohou být koncentrace přímo v lidských obydlích. Prach obsahující olovo se může usazovat na kobercích, podlahách a nábytku. Olovo se může uvolňovat z nábytku, hraček, porcelánu a keramiky (a tak do potravin v nich uložených), jsou-li natřené barvami s obsahem olova. Zvýšeným dávkám olova jsou také vystaveni aktivní či pasivní kuřáci (URL 11, 2004).

Dnešní metody běžně detekují $5\text{--}10 \text{ mg/dm}^3$. Stanovení olova je často zatíženo chybami při přípravě vzorku a jeho zpracování (URL 11, 2004).

2.4.2 Voda

V přírodních vodách jsou obsaženy jen stopy olova. Koncentrace olova v nekontaminovaných říčních a jezerních vodách se pohybuje v rozmezí $0,1\text{--}5 \text{ } \mu\text{g.dm}^{-3}$. Podstatně vyšší koncentrace se nacházejí v sedimentech nekontaminovaných vodních toků a nádrží, a to $10\text{ až }30 \text{ mg.kg}^{-1}$, přitom obsah v sedimentech z kontaminovaných míst může být až o několik řádů vyšší (Velíšek, 2002).

Ke kontaminaci vody olovem dochází obvykle v distribuční síti. Olovo se může vymývat ze vzduchu do podzemní či pitné vody. Při pH 5,4 může tvrdá voda obsahovat $30 \text{ } \mu\text{g olova/l}$, měkká až $500 \text{ } \mu\text{g olova/l}$. Koncentrace olova ve spodní i povrchové vodě jsou nízké a nejsou hlavním expozičním zdrojem (URL 11, 2004).

V neznečištěných vodách je koncentrace olova poměrně nízká z důvodu malé rozpustnosti sloučenin olova. V přítomnosti jílu za pH 5–7 se většina olova sráží a sorbuje ve formě rozpustných hydroxidů. Rozpuštěné olovo také může vytvářet organické komplexní sloučeniny, které se sorbují na huminových materiálech (URL 4, 2010).

Olovo je toxické pro zooplankton a zoobenthos. U ryb dochází po akutní intoxikaci k poškození žaber a následně k úhynu udušením (URL 4, 2010).

2.4.3 Půda

Obsah olova v nekontaminovaných půdách se pohybuje v rozmezí 5–40 mg.kg⁻¹ sušiny. Ve znečištěných lokalitách mohou být tyto koncentrace podstatně vyšší. Z hlediska vstupu toxických prvků do potravních řetězců je důležitý nejenom obsah v půdě, ale také přístupnost pro rostliny. Kontaminace prostředí rizikovými prvky zvyšuje jejich obsah v orgánech a tkáních živočichů. Do těl živočichů vstupují toxické prvky především orální cestou v konzumované potravě. U volně žijící zvěře obsah olova v játrech a ledvinách vypovídá o zatížení zvířete kontaminovanou potravou a o stupni znečištění biotopu, ve kterém zvíře žije. Za normálních podmínek je obsah olova ve svalovině velmi nízký (tisíciny mg.kg⁻¹) na rozdíl od koncentrace v ledvinách a játrech, které jsou někdy až o 2–3 řády vyšší, protože se zde olovo výrazně hromadí (Velíšek, 2002).

Do půdy a prachu se olovo dostává z primárních zdrojů (olovnatý benzín, barvy, průmyslová výroba). Dále je půda kontaminována olovem hlavně ze vzduchu, z domovních odpadů (ze špatně zabezpečených skládek) a hnojivy, která obsahují odpadní kaly. V půdě se olovo váže (chelatace organickými látkami) na půdní částice v povrchové vrstvě (2-5 cm), orbou se mohou dostat hlouběji (URL 11, 2004). Transport do nižších vrstev se ale příliš neuskutečňuje, pokud není překročena pufrací schopnost půdy. Nejvyšší obsahy olova se proto nacházejí ve svrchních vrstvách půd (URL 4, 2010).

Přítomnost olova v půdě je zdrojem expozice (orální i inhalační) pro rostliny a zvířata. Biomagnifikace olova v potravním řetězci je nízká (URL 11, 2004).

Olovo má vysoký akumulací koeficient a významně se proto hromadí nejenom v sedimentech a kalcích, ale i v biomase organismů. Přítomnost olova v půdě je proto zdrojem expozice pro rostliny a zvířata (URL 4, 2010).

2.4.4 Potraviny

Olovo se může dostat do potravin kontaminací surovin (pěstování ve znečištěných oblastech), nebo kontaminací z obalů (konzervy, smalt, olovnaté sklo - zvláště vykazuje-li obsah kyselou reakci) (URL 11, 2004), nebo použitím kontaminované vody při přípravě (URL 4, 2010).

Předpokládá se, že u dospělých osob se absorbuje asi 10 % olova obsaženého v potravinách, zatímco u dětí to může být až 25–53 %. Mezi nejdůležitější expoziční zdroje patří především běžné pečivo a jiné cereálie, brambory a plodová zelenina. Nejvyšší koncentrace olova byly zjištěny (s výjimkou pochutin) u hroznů, bobulového ovoce, běžného pečiva a plodové zeleniny. Přestože se expoziční dávka odhadovaná pro populaci v ČR zdá relativně přijatelná, vyžaduje olovo trvalou pozornost kontrolního systému. Péči je nutno věnovat především kontrole cereálních potravin a vybraných druhů zeleniny, jako jsou např. plodová zelenina, rajčata a brambory (URL 3, 2000).

Existují naopak potraviny, které pomáhají při detoxikaci olova, např. dýňová semínka, ibišek jedlý, kořen rebarbory, máta peprná, mořské řasy a ovoce (URL 4, 2010).

2.5 Zdravotní rizika

Cesta vstupu olova do organismu může být inhalační, alimentární i kontaktem, jeho vstřebávání však ovlivňují i vnitřní faktory organismu, zejména hladiny železa a vápníku (Pfeifer et al., 1998).

Předpokládá se, že asi 35-50 % inhalovaného množství zůstává deponováno v plicích. Depozice je ovlivněna velikostí vdechovaných částic a chemickou formou olova (URL 11, 2004). Resorpce olova je závislá na věku, složení stravy, zdravotním stavu (Velíšek, 2002), chemické formě olova, dietě - zejména na obsahu Ca, P, Fe, Zn a metabolismu jednotlivce (URL 11, 2004). Vstřebané olovo je transportováno krví do jater a ledvin, kde se kumuluje (Velíšek, 2002). V krvi se olovo z 99 % váže

na povrch erytrocytů, zbývající 1 % váže plasma (URL 11, 2004). Část olova v játrech se vylučuje žlučí do střeva. Malý podíl olova se vylučuje močí. Při dlouhodobé expozici se olovo hromadí v kostech. Olovo poškozuje ledviny, játra, krev, nervový a kardiovaskulární systém (Velíšek, 2002).

Potenciálním zdrojem nebezpečí je depozice v kostech, odkud olovo snadno přechází zpět do krve - zejména při změně fyziologického stavu (gravidita, laktace, chronická onemocnění). Z organismu je olovo vylučováno hlavně močí a stolicí. Ostatní cesty vylučování nejsou významné (sliny, pot, odlupující se kůže, nehty) (URL 11, 2004).

Olovo přechází placentou a proto při expozici matky bude exponován i plod (URL 11, 2004).

Olovo také inhibuje syntézu porfyrinů, takže při chronické otravě klesá množství hemoglobinu v erythrocytech a objevuje se anémie. Olovo je inhibitorem dvou enzymů důležitých pro syntézu hemu. Jsou to dehydratasa δ -aminolevulové kyseliny, která katalyzuje kondenzaci dvou molekul δ -aminolevulové kyseliny za vzniku porfobilinogenu, a ferrochelataasa, která katalyzuje vstup železa do protoporfyrinu IX za vzniku hemu (Velíšek, 2002).

Expozice organismu olovu může poškodit centrální i periferní nervový systém. V některých případech dochází při otravě olovem k poruchám motoriky končetin, zpomalení pohybových reakcí a podobným symptomům. Neurotoxické účinky olova jsou zvláště nebezpečné pro mladší jedince (Velíšek, 2002).

V posledních letech jsou popisovány případy intoxikace osob olovem z poranění střelnými zbraněmi, především brokovnicemi. Perzistující náboje v organizmu pozvolna uvolňují dostatečné dávky olova, které mohou navodit symptomatologii otravy olovem. Historie intoxikace tohoto druhu je starší než 500 let. Intoxikace z nábojů střelných zbraní byla značným rizikem u poraněných především po první světové válce a dříve. Nově jsou popisované intoxikace olovem u rybářů, po spolknutí zatěžovacího olůvka s typickou paletou klinických projevů až po encefalopatii, které ustoupily po odpovídající léčbě. Tyto zdánlivě kuriózní případy však zřejmě mohou přicházet u rybářů vzhledem k zacházení s olůvkem (riziko spolknutí při zcela obvyklém držení v zubech

při navazování) poměrně často, o čemž svědčí některé nové publikace (Pfeifer et al., 1998).

2.5.1 Nepříznivé efekty

2.5.1.1 Poškození nervové soustavy (neurotoxická)

Akutní poškození nastává při koncentraci olova v krvi v rozsahu 0,5-3 mg/l. Projevuje se podrážděností, poruchami pozornosti, bolestmi hlavy, svalovým třesem, poruchami paměti a halucinacemi. Při koncentraci olova v krvi (plumbémie) v rozsahu 0,4-0,8 mg/l byly popsány okulomotorické poruchy, prodloužení reakčního času, pokles IQ, poruchy paměti, pokles schopnosti učení. Při plumbémii v rozsahu 0,3-0,48 mg/l byl popsán pokles rychlosti vedení nervového vzruchu. To je způsobeno přechodnými degeneračními změnami axonu a jeho demyelinizace. U dětí může být plumbémie nad 0,8 mg/l příčinou akutní encefalopatie a v krajním případě může způsobit i smrt. Při nižších koncentracích 0,5-0,7 mg/l dochází k neurologickým poruchám a poškození rozpoznávacích funkcí (URL 11, 2004).

2.5.1.2 Poškození krevního systému (hematotoxicita)

V krvi olovo inhibuje řadu enzymů, které se podílejí na biosyntéze hemu. To se projevuje zvýšením koncentrace porfyrinů v moči a delta-aminolevulové kyseliny v krvi a moči. Akutní expozice vyvolává hemolytickou anémii. Chronická expozice vede k anémii způsobené snížením syntézy hemu a zkrácením životnosti erytrocytů. K porušení syntézy hemu dochází při plumbémii (prahová hodnota) 0,5 mg/l (u dětí 0,4 mg/l) (URL 11, 2004).

2.5.1.3 Poškození endokrinního systému

Olovo negativně zasahuje do metabolismu přeměny vitamínu D na jeho hormonální formu (1,25-dihydroxykalciferol). Tím dochází k poruše vývoje a zrání buněk, vývoji chrupu a kostí. Negativní následky se mohou projevit zejména při nedostatku vitamínu D ve výživě současně s dlouhodobě zvýšenou plumbémií (URL 11, 2004).

2.5.1.4 Poškození ledvin (nephrotoxicita)

U dospělých může dojít ke zvýšení krevního tlaku (hypertenzi), horečkám, poškození ledvin, imunitního systému, snížení plodnosti mužů, bolestem svalů a kloubů. Postižený má problémy s koncentrováním, zapomíná, má špatnou náladu a poruchy spánku. Při velkých dávkách dochází k oslepnutí, poškození mozku, křečím i ke smrti (URL 11, 2004).

2.5.1.5 Vývojová a reprodukční toxicita

Olovo negativně zasahuje do vývoje plodu a patrně ovlivňuje i jeho životaschopnost. Expozice plodu nízkými dávkami olova se projevuje poklesem porodní váhy, předčasnými porody, zpožděním vývoje a změnami chování dítěte. Expozice mužů olovu (> 0,66 mg/l) způsobuje velký pokles počtu spermií (patrně v souvislosti s negativním působením na metabolismus testosteronu) (URL 11, 2004).

2.5.1.6 Poškození imunitního systému (imunotoxicita)

Je pravděpodobné, že olovo nepříznivě ovlivňuje imunitní systém (buněčnou i humorální imunitní odpověď) (URL 11, 2004).

2.5.1.7 Vznik rakoviny (kancerogenita)

Důkazy o karcinogenitě pro člověka nejsou zatím dostatečné, IARC (International Agency for Research on Cancer) zařazuje olovo do skupiny 2B (tj. s možnou karcinogenitou pro člověka); jeho anorganické sloučeniny byly nedávno přeřazeny do skupiny 2A (tj. pravděpodobně karcinogenní pro člověka). Ve všech studiích chybí kvantitativní údaje o expozici i o možném příspěvku kouření cigaret (URL 11, 2004).

Údaje o karcinogenezi u zvířat jsou dostatečné. Pro krysy a myši existuje více než 10 studií, pro které je charakteristický oboustranný ledvinový karcinom. Ve většině studií nastala karcinogenní odpověď pouze při nejvyšších dávkách olova. V pokusech byly testovány pouze rozpustné soli Pb, nedostatečně byly testovány oxidy, kovové olovo a tetraalkylolovo (URL 11, 2004).

2.6 Ekologická rizika

Olovo je jako těžký kov schopný v atmosféře putovat na velké vzdálenosti. Kontaminuje půdu i tisíce kilometrů daleko od zdroje znečištění olovem. Díky jeho drastickému omezení v autobenzínech se v Evropě významně podařilo zmenšit rozsah oblastí kriticky zatížených olovem. Zatímco v roce 1990 bylo ohroženo přes 70 % sledovaných ekosystémů, v roce 2000 to bylo již jen 8 % (URL 1, 2010).

Olovo je velmi toxický kov, který se může vyskytovat ve všech složkách životního prostředí. Může se také akumulovat v biomase organismů a vykazuje vysoký bioakumulační koeficient. Uvedené vlastnosti činí z olova látku, která zasluhuje skutečně mimořádnou pozornost a monitoring emisí (URL 4, 2010).

3 Sup hnědý (*Aegypius monachus*)

3.1 Taxonomie

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Podříše: Mnohobuněční (*Metazoa*)

Kmen: Strunatci (*Chordata*)

Podkmen: Obratlovci (*Vertebrata*)

Třída: Ptáci (*Aves*)

Nadřád: Letci (*Neognathae*)

Řád: Dravci (*Falconiformes*)

Čeleď: Krahujcovití, Jestřábovití (*Accipitridae*)

Podčeleď: Supi (*Aegypiinae*) (URL 2, 2010).

3.2 Charakteristika

Supi patří do řádu dravců. V rámci skupiny, ve které najdeme nejdokonalejší ptačí predátory, se odlišují několika typickými znaky. Zatímco většina dravců má krátký krk, supi mají krk dlouhý, což jim umožňuje dosahovat dovnitř zdechlin. Krk i hlava jsou navíc opatřeny pouze krátkým opeřením, díky němuž se tyto části těla snadno očistí od krve a dalších zbytků. Jejich nohy jsou relativně slabé a tupé drápy pomáhají supům jen při chůzi, nikoliv při lovu kořisti. Další zvláštností je přizpůsobení k dokonalému plachtění, při kterém vyhledávají potravu. I proto mají společně s kondory ze všech dravců nejdelší křídla. Nejdůležitějším smyslem je vynikající zrak (URL 5, 2010).

Sup hnědý je největším zástupcem tzv. starosvětských supů (novosvětští supi jsou američtí kondoři) a současně největším ptákem Evropy (URL 5, 2010).

Sup hnědý je dravý pták, který se živí mršinami, převážně středně velkými a velkými zdechlinami savců (URL 6, 2010), občas loví i malé obratlovce (URL 7, 2009). Vzácně loví i živou kořist - hlavně nemocné kusy. Je prospěšný odklizením mrtvých zvířat (URL 12, 2010).

Z mršin dovede využít i tvrdé části - kůži, chrupavky nebo kosti. Potravu hledá na otevřených plochách, pastvinách, horských loukách včetně alpínských luk středoasijského pohoří až do 4500 m n. m. Sup hnědý dokáže spořádat neuvěřitelné množství potravy najednou - u zdechliny bývá i několik hodin (URL 5, 2010).

Opeření se u pohlaví neliší. Jedná se o částečně tažného ptáka. V současné době je rozšířen v jižní Evropě, Asii a částečně severní Africe (URL 6, 2010).

Sup hnědý může létat velmi vysoko. Má specializovaný hemoglobin, který zvyšuje využitelnost kyslíku navzdory nízkému tlaku ve vysokých nadmořských výškách svrchní troposféry (URL 8, 2010).

3.3 Způsob života

Sup hnědý nežije až tak společensky, jak je známo u jiných druhů supů. Většinou je vidět sám nebo v párech. Výjimečně byly pozorovány skupinky tvořené maximálně šesti ptáky (URL 5, 2010).

3.4 Prostředí a biogeografické regiony

Sup hnědý je druh hnízdící na stromech, pokud se však v oblasti nevyskytují vhodné stromy, jsou schopni hnízditi i na zemi. Typickým prostředím pro tyto ptáky je kopcovitá krajina s porosty křovin a několika většími stromy, řídké borovicové lesy, nebo pobřežní útesy s porosty jednotlivých borovic, avšak mohou využívat i jiné typy prostředí (URL 8, 2010). Obývá horská pásma až do výšky 4000 metrů nad mořem v oblasti střední Asie a Pyrenejského poloostrova. Zalétá ale i do střední Evropy (URL 7, 2009) a zimuje i v Africe (URL 9, 2010). Podmínkou výskytu jsou vysoké stavy dobytka nebo velké zvěře (URL 12, 2010).

3.5 Parametry

Délka těla je až 115 cm, rozpětí křídel až 285 cm a hmotnost až 12 kg. Zbarvení je čistě hnědé, jen kořen zobáku je namodralý (URL 7, 2009).

3.6 Sociální organizace

Supi jsou monogamní a semi-koloniální ptáci, nemigrují, ale zůstávají v hnízdním teritoriu po celý rok. Mladí ptáci se mohou šířit do míst vzdálených až 300 km od místa jejich vylíhnutí (URL 8, 2010).

3.7 Rozmnožování

Páření začíná v lednu. Samice klade jedno vejce od února do dubna (URL 8, 2010), které oba jedinci střídavě zahřívají 52 až 55 dní (URL 7, 2009). Doba odchovu mláďat jsou 3 až 4 měsíce (URL 5, 2010), dospívají ve věku 5-6 let (URL 12, 2010). Nejvyšší zjištěný věk je 39 let (URL 12, 2010).

Hnízdo, až metr vysoké a dva metry v průměru, si staví na stromech, kam samice snáší jediné vejce. Na hnízdě sedí tak pevně, že je nemožné jej bez násilí z hnízda vyhnat. Hnízdí většinou samostatně, vytváří dlouhodobé páry (URL 5, 2010).

3.8 Ochrana druhu

Na většině území sup hnědý mizí a celosvětově je klasifikován jako zranitelný. Důsledná ochranná opatření se zajištěním potravy však ve Španělsku vedla ke zvýšení počtu párů mezi lety 1970-1990 z původních 200 na 1000 párů (URL 5, 2010).

Několik záchranných programů probíhá nejen v Evropě, ale poslední dobou též v Asii (URL 2, 2010). Sup hnědý je zařazen na listinu ohrožených druhů IUCN (URL 5, 2010).

Světová populace dnes činí asi 7200–10000 párů. Na ochraně supů se podílí záchranné programy EEP. Na těchto programech se podílí 51 zoologických zahrad a rozmnožovacích stanic (URL 8, 2010).

Mladí supi vychovaní v zajetí představují nejmenší problémy pro reintrodukcii. Oproti dospělým ptákům se velmi snadno adaptují na jejich nové prostředí, jako kdyby se tam narodili. Z tohoto důvodu hrají v reintrodukcii tohoto druhu klíčovou roli. Vypouštění do volné přírody probíhá na Mallorce, Katalánsku a ve Francii (URL 8, 2010).

4 Otravy olovem u ptáků

4.1 Etiologie, mechanismus účinku a toxicita

Otravy olovem patří mezi nejčastější otravy těžkými kovy u ptáků a pravděpodobně jsou tyto otravy nejčastější formou intoxikace u ptačích druhů na celém světě (Samour, 2008).

Otravou olovem jsou ohroženi jak volně žijící ptáci, tak ptáci chovaní v zajetí. Vodní i suchozemští ptáci mohou být vystaveni olovu například požitím olovených broků nebo rybářského olůvka (Fisher et al., 2006). Další významné nebezpečí pro ptáky představuje kontaminace půdy tímto kovem (Mateo et al., 2006).

Zatímco evropské země provádějí obsáhlé projekty na ochranu supů (Hernandez and Margalida, 2008), z Asie máme k dispozici mnohem méně informací pokud jde o stav, demografický vývoj a bioakumulaci toxických látek, i přestože zde pobývá převaha světové populace supů (Dong–Ha and Doo–Pyo, 2008).

Příčiny, které zřejmě přispěly k úhynu supů hnědých, kteří přezimovávají v Jižní Koreji, jsou zejména: hladovění během stěhování a kontaminace životního prostředí (Dong–Ha and Doo–Pyo, 2008).

Supi, jako obligátní mrchožrouti, jsou potenciálně náchylní k požití oloveného broku. Příkladem mohou být otrávení euroasijské supi bělohlaví (*Gyps fulvus*), pocházející ze Španělska (Fisher et al., 2006).

Mezi ptáky ohrožené požitím olovených broků patří často dravci živící se mrtvou, či postřelenou zvěří (Fisher et al., 2006). Otravy olovem byly zaznamenány u mnoha druhů dravců, jako například u kriticky ohroženého kondora kalifornského (*Gymnogyps californianus*) (Pain et al., 2007), a také u celosvětově ohroženého supa hnědého (*Aegypius monachus*) (Dong–Ha and Doo–Pyo, 2008), jehož populace byla v poslední době devastována toxickými účinky veterinárního léčiva diclofenac (Green et al., 2004).

Bioakumulace olova vyvolává stále obavy o možných nepříznivých vlivech na volně žijící populace (Garcia–Fernandez et al., 2005).

Tyto otravy byly zaznamenány u řady ptáků, včetně vodních ptáků, dravců, jeřábů a ptáků v zájmovém chovu (Bailey et al., 1995).

U dravců jsou často hlášeny úhyny díky expozici olovem prostřednictvím požití olova z kontaminovaných zdrojů, nebo přímo prostřednictvím broků, nebo z úlomků broků používaných k lovu (Fisher et al., 2006). Důležitou příčinou otrav jsou ekologické havárie, v důsledku kterých se do životního prostředí dostává celá řada látek, včetně paliv a maziv obsahujících olovo (Svobodová et al., 2008).

Dalším způsobem otravy olovem u ptáků je příjem z různých environmentálních zdrojů ve stravě. Nejvíce případů otrav se vyskytuje při vystavení velmi vysokým koncentracím olova, které mohou být nalezeny například v okolí dolů, skládek odpadů a průmyslových závodů (Garcia–Fernandez et al., 1995). Kal vznikající při čištění odpadních vod je často přidáván do zemědělské půdy a může být také zdrojem olova (Patee and Pain, 2003). Bylo prokázáno, že olovo obsažené v nátěrových pilinách, otrávil jako ptáky chované v zajetí, jako tomu bylo například u jeřába kanadského (*Grus*

canadensis) (Kennedy et al., 1977), tak volně žijící druhy – jako například u albatrose laysanského (*Phoebastria immutabilis*) (Finkelstein et al., 2003). Ačkoli některé druhy jsou vystaveny vysokým dávkám olova v potravě (Darling and Thomas, 2005), ve srovnání s brokem nebo úlomkem broku je kontaminace ptáků z jiných zdrojů olova zpravidla pouze lokálně významná nebo relativně malá (Scheuhammer et al., 2003). Suchozemští ptáci jsou vystaveni olovu především při přijímání potravy. Kurovítí a holubi pravděpodobně spolknou brok s kamínky, které se jim pak udržují v žaludcích. Dravci jsou obvykle otráveni brokem, požitím uhynulé nebo postřelené kořisti, nebo jejich vnitřností, které broky obsahují (Kendall et al., 1996). Požité úlomky olova mohou být rychle vyvrhnuty, mohou být zachovány v těle v důsledku měnícího se období, anebo se úplně rozpustí na soli olova, které se poté vstřebají do krevního řečiště. Pravděpodobnost otravy ptáka souvisí s retenčním časem olova, četností, dobou expozice a dalšími faktory jako jsou například výživný stav a ekologická zátěž organismu (Patee and Pain, 2003). Část exponovaných ptáků uhynie – k úmrtnosti může totiž dojít i po požití jediného olověného náboje (Pain and Rattner, 1988).

Vzhledem k tomu, že olovo potřebuje k uvolnění z kontaminovaného předmětu působení žaludečních kyselin, představuje náboj inkorporovaný ve svalovině nebo podkoží pouze minimální riziko otravy, ačkoli u takto postižených jedinců lze v krvi naměřit poněkud vyšší koncentrace olova a nižší aktivitu ALAD (Svobodová et al., 2008).

Koncentrace olova v krvi je většinou nejvyšší přímo po absorpci, v játrech a ledvinách několik dnů až měsíců po absorpci. Olovo, které je uloženo v kostech, zde může zůstat po několik let a je odrazem celoživotní expozice (Pain, 1996).

Olovo zasahuje všechny důležité orgány. Váže se na sulfhydrylové skupiny (SH) různých enzymů. Zasahuje do metabolismu krevních bílkovin, do systému kyseliny nikotinové, do imunobiologických procesů, do tvorby hemoglobinu i do minerálního metabolismu. Metabolismus hemoglobinu a erythrocyty ovlivňuje olovo několika způsoby, zejména snižuje aktivitu dehydratázy kyseliny δ -aminolevulové (ALAD) a ferochelatázy, jejíž funkcí je zabudování železa do protoporfyrinu. To vede k akumulaci protoporfyrinu v erythrocytech, fragilitě erythrocytů, hemolýze a k anémii. Olovo zkracuje dobu života erythrocytů. Dochází rovněž k útlumu činnosti kostní dřeně. Ve vysokých dávkách interferuje olovo s GABA jako inhibičním neurotransmiterem, což má za následek

nadměrnou excitaci CNS. Tomuto efektu napomáhá i kompetice olova s vápníkem na nervosvalové ploténce (Svobodová et al., 2008).

Následkem fyziologických změn a změn chování, mohou být ptáci náchylní k predaci, hladovění, infekcím a nemocem, a tím se zvyšuje pravděpodobnost úmrtí také z jiných příčin (Scheuhammer and Norris, 1996).

Olovo se vlivem nízkého pH v žaludku dravců rychle rozpouští a následně absorbuje. Když je rychle absorbováno velké množství olova, může nastat náhlá otrava a smrt ptáků zřejmě i když jsou v dobrém tělesném stavu (Gill and Langelier, 1994).

V Kanadě a Spojených státech je odhadovaná úmrtnost otravy olovem z požití nábojů obsažených v kořisti u orlů bělohlavých (*Haliaeetus leucocephalus*) a skalních (*Aquila chrysaetos*) 5–10 % (Scheuhammer and Norris, 1996).

U evropských druhů se zjistilo zvýšené množství olova v játrech u výra velkého (*Bubo bubo*), kalouse ušatého (*Asio otus*), luňáka červeného (*Milvus milvus*), krahujce obecného (*Accipiter nisus*), káněte lesního (*Buteo buteo*) a sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*) (Kenntner et al., 2003).

Otravy olovem ale mohou hrozit u všech druhů dravců od střední velikosti, například u káňat, luňáků, ale také u vodních ptáků – příkladem mohou být kachny nebo labutě, přičemž kachně se může stát osudným pozření jediného broku. Mohou ho spolknout omylem spolu s potravou, nebo úmyslně jako takzvané gastrolity - trávící kamínky. Za normálních okolností ptáci broky rychle vyloučí (dravci je vyvrhnou) spolu s dalšími nestravitelnými částmi potravy. Jenomže jsou na olovo tolik citliví, že jim přesto stihne ublížit. Výzkumy dokazují, že nejohroženější jsou kachny, které sedí na vejcích - mají totiž větší příjem a výdej energie a na přítomnost olova v organismu jsou citlivější (URL 13, 2007).

4.2 Klinické příznaky

Klinicky se objevují dvě formy onemocnění: akutní a chronická. Závažnost klinických příznaků závisí na množství pozřených kontaminovaných předmětů, velikosti jejich povrchu, koncentraci obsaženého olova a době přítomnosti toxikantu v trávicím traktu (Svobodová et al., 2008).

Mezi běžně pozorované klinické příznaky otravy olovem u ptáků patří úbytek hmotnosti, slabost a deprese, jasně zelený průjem, polyurie, nechutenství, opakované zvracení, stažení žláznatých žaludků a různé neurologické poruchy jako například parézy nohou, ataxie, sklánění křídel a třes hlavy (Bailey et al., 1995). Může být ovlivněn metabolismus vitamínů (Baksi and Kenny, 1978) a ptáci mohou oslepnout (Patee et al., 1981).

Chronické otravy mají vágní a nespecifické klinické příznaky. Při rutinním hematologickém vyšetření postižených ptáků je nalézána hypochromní regenerativní anémie, ovšem nemusí být přítomna vždy. Často bývají nacházeny zvýšené aktivity AST a LDH jako následek nekrózy hepatocytů a rovněž CK, která se v tomto případě vyplavuje zejména při poškození neuronů (Svobodová et al., 2008).

Při otravě olovem může dojít i k situaci, kdy klinické příznaky spontánně odezní s tím, jak je zdroj eliminován z těla per vias naturales, ale po čase se obnoví kvůli mobilizaci olova uloženého v kostech. Příznaky otravy olovem mohou u volně žijících ptáků imitovat botulismus (Svobodová et al., 2008).

4.3 Patologickomorfologický nález

Makroskopický nález při otravě olovem není specifický. Kadáver může být anemický a se známkami dystrofie jater. Poměrně časté jsou známky nefrózy. Mikroskopicky lze pozorovat nekrózu epitelu GIT a svaloviny svalnatého žaludku, hemosiderózu jater a sleziny, nekrózu hepatocytů, dystrofii myokardu, fibrinoidní nekrózu arteriol a dystrofii tubulárního epitelu v ledvinách, kde se akumulují acidorezistentní intranukleární inkluze. V CNS lze pozorovat dystrofii a demyelinizaci nervové tkáně a edém mozku i míchy,

periferní nervy se vyznačují ztrátou axonů bez výraznější demyelinizace (Svobodová et al., 2008).

4.4 Diagnostika

Diagnóza může být komplikovaná vágní anamnézou a absencí radioopaktních těles v GIT. Je proto doporučováno vždy, pokud není možné diagnózu uzavřít jinak, provést stanovení hodnot olova v krvi pacienta. Diagnóza je intravitálně potvrzena laboratorně průkazem vysokých hodnot kovů v krvi, přítomností odpovídajících klinických příznaků, průkazem poškození cílových tkání (zejména krev, játra) a pozitivní reakcí pacienta na specifickou terapii (chelátová činidla). Zásadní pro intravitální diagnózu je měření koncentrace olova v krvi. Vzhledem k tomu, že až 90 % olova v krvi je vázáno na erythrocyty, vyšetřuje se zásadně plná nesrážlivá krev (Svobodová et al., 2008).

Koncentrace 0,4–0,6 mg/l je diagnostická pro otravu olovem. Někteří ptáci ovšem vykazují příznaky otravy již při hodnotách 0,1 mg/l. Koncentrace olova v krvi nemusí vždy korelovat se závažností otravy, neboť nezohledňuje množství olova v měkkých tkáních a kostech. Pro postmortální analýzu se odebírají játra a ledviny, kde hodnoty kolem 2 mg/l a více signalizují expozici olovu, ovšem množství diagnostické pro otravu je nad 6 mg/kg (Svobodová et al., 2008).

Diagnostika otravy olovem je možná i nepřímými metodami, a to zejména měřením aktivity ALAD (dehydratázy kyseliny δ -aminolevulové) a měřením množství erythrocytárního protoporfyrinu. Experimentálně bylo zjištěno, že inhibice aktivity ALAD je vysoce citlivým a spolehlivým indikátorem otravy olovem. Intenzita suprese aktivity ALAD nicméně nemá prognostický význam a se zvyšujícími se dávkami olova již od určitého množství dále neklesá. Proto se předpokládá, že měření aktivity ALAD je nejpřínosnější v situacích chronické expozice nízkým dávkám olova (Svobodová et al., 2008).

Diagnóze otravy kovy může v některých případech napomoci diagnostická terapie: zejména v akutních případech je odezva na terapii chelátovými činidly velmi výrazná již během prvních 24 hodin po počátku aplikace (Svobodová et al., 2008).

V literatuře jsou uváděny příklady, kdy byly u zdravých ptáků nalezeny tyto koncentrace olova v krvi: labuť (*Cygnus olor*): 0,06 mg/l; kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) 0,05–0,39 mg/l; berneška velká (*Branta canadensis*) 0,1–0,37 mg/l; holub skalní (*Columba livia*) 0,17–0,81 mg/l. Naopak u ptáků trpících otravou olovem byly naměřeny tyto koncentrace: husička stromová (*Dendrocygna arborea*) 1,63 mg/l (zdravý partner měl 0,32 mg/l); kondor krocanovitý (*Cathartes aura*) 3,2 mg/l, kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) a orel bělohlavý (*Haliaeetus leucocephalus*) až 5 mg/l (Svobodová et al., 2008).

Postmortálně se stanovuje olovo v játrech, méně často v ledvinách. Pro otravu olovem svědčí obsah nad 6–8 mg/kg v játrech (nativní hmotnost), resp. nad 20–30 mg/kg (v sušině) (Svobodová et al., 2008).

4.5 Terapie

Terapie otravy olovem sestává ze tří kroků:

Stabilizace pacienta:

Dominantním příznakem akutní otravy olovem je zvracení a průjem, které s sebou přinášejí související komplikace – zejména dehydrataci a dysbalanci elektrolytů. Pro stabilizaci se proto využívají standardní metody infuzní terapie (intravenózní, intraoseální, v nouzi subkutánní, není-li přítomno zvracení, lze infuzní roztoky podávat i perorálně). Jsou-li přítomny křeče, tlumí se diazepamem. V případě edému mozku se podává dexametazon. Vzhledem k anémii může být nutná i terapie železem. Klesá-li hematokrit pod 0,2 l/l, je indikovaná transfuze krve. Další podpůrnou terapii tvoří multivitamíny (zejména B-komplex), antibiotická clona a ošetrovatelská péče (teplo, klid, asistované krmení) (Svobodová et al., 2008).

Eliminace zdroje toxikantu z těla pacienta:

Drobná kovová tělíška odchází per vias naturales, čemuž lze napomoci laxativy podávanými 3x denně buď s krmivem, nebo sondou do volete. Využívají se laxativa pro kočky (proti trichobezoárům), arašídové máslo, minerální olej či psyllium. Kovová drť může být úspěšně navázána na aktivní uhlí (2–8 g/kg ž. hm. perorálně ve vodě sondou, dvě hodiny před podáním laxativa). Velká tělesa je nutné odstranit endoskopicky nebo standardním chirurgickým zákrokem (ventrikulotomie) (Svobodová et al., 2008).

Eliminace kovu z tkání:

Specifickým antidotem otrav kovy jsou léčiva, která vytvářejí komplexní chemickou vazbu mezi atomem kovu a vlastní molekulou, což vede k významnému snížení toxicity a urychlení eliminace kovu z organismu (Svobodová et al., 2008).

Nejpropracovanější terapeutické protokoly se týkají použití Ca-EDTA (komplexní sůl vápníku a kyseliny edetové). Oproti jiným typům EDTA se využívá přednostně Ca-EDTA, aby se předešlo vážné hypokalcemii při léčbě. Ca-EDTA se nevstřebává ze střeva, a proto je perorální aplikace nevhodná pro eliminaci kovu ze tkání. Zpravidla se podává intramuskulárně v dávce 10–40 mg/kg ž. hm. (obvykle 30–35 mg/kg ž. hm.) dvakrát denně po dobu pěti dní. Dvacetiprocentní roztok může způsobovat v místě aplikace bolest, proto se doporučuje jeho naředění na max. 1 %, který se podá subkutánně. Ca-EDTA eliminuje olovo přímo z kostí, ale nikoli z měkkých tkání, odkud je odstraňováno ekvilibrací s koncentrací v kostech, proto je nutná opakovaná aplikace léčiva. Vždy po pěti dnech aplikace je terapie na pět až sedm dní přerušena, aby se předešlo nežádoucím efektům (proteinurie, hematurie) a snížilo se riziko vzniku akutní nekrotizující nefrózy, která je v případech terapie EDTA popisována u savců (Svobodová et al., 2008).

Pokud pacient nezvrací, lze využít perorální léčbu D-penicillaminem (DPA) v dávce 55 mg/kg ž. hm. 1–2 x denně. Nevýhodou je, že tato léčba často způsobuje zvracení. Při výskytu zvracení se dávka redukuje na 30 mg/kg ž. hm. 1 x denně a podávají se perorálně běžná antiemetika (metoklopramid). DPA je kontraindikován u pacientů s alergií na penicilinová antibiotika. Rovněž je třeba při této léčbě monitorovat funkci ledvin (Svobodová et al., 2008).

Prognóza otravy olovem je dobrá, pokud jde o akutní otravu, jejíž léčba je zahájena včas, a nejsou přítomny známky selhávání životně důležitých orgánů. Hodnoty olova se k normálu vracejí zhruba za dva až devět měsíců. Chronické otravy mají prognózu opatrnou a dochází-li k těžkým křečím a výrazné hematurii, je prognóza opatrná až špatná (Svobodová et al., 2008).

4.6 Prevence

Zásadním preventivním opatřením je zabránit ptákům v přístupu ke zdroji olova. Při koupi klece či stavbě voliéry by měl zákazník vyžadovat od prodejce atest dosvědčující toxikologickou nezávadnost použitých materiálů, nebo dát přednost kleci vyrobené z nerezové oceli (Svobodová et al., 2008).

U volně žijících ptáků to znamená především dodržování zásad ochrany životního prostředí a správného nakládání s odpady (Svobodová et al., 2008).

5 Materiál a metodika

Ptáci chovaní v zajetí

Celkem osm supů hnědých (*Aegyptus monachus*) a dva supi mrchožraví (*Neophron percnopterus*) byli ve svých voliérách náhodně vystaveni kontaminaci olovem. Těchto pět samic a pět samců bylo ve věku od 8 do 36 let. Tělesná hmotnost u supů hnědých byla 7 až 11,5 kg (*Aegyptus monachus*) a 1,6 až 2,2 kg u supů mrchožravých (*Neophron percnopterus*). V kontrolní skupině byli použiti supi, kteří nebyli vystaveni účinkům olova (tzn. čtyři supi hnědí chovaní v zajetí).

Metody

Vzorky krve a plazmy pro hematologii a biochemii byly odebrány bezprostředně po zjištění intoxikace, před aplikací léčiv (tedy za 3 týdny po intoxikaci) a jeden měsíc po terapii a dále od kontrolních ptáků. Krev (1 ml) byla odebrána z pravé krční žíly pomocí Omnican 0,30 x 12 mm insulinového setu (Braun, Germany) a analyzována dle metodiky Skocovska et al. (2007). Krev byla umístěna do zkumavek s heparinem (Léčiva inj., Praha) a okamžitě odstředěna. Vzorek plazmy a plné krve byl zamražen (na -20 °C) až do doby laboratorního biochemického vyšetření. Plazma byla analyzována pomocí automatického analyzátoru (CobasMira, Roche) na kyselinu močovou (UAC, mmol/l), aspartát aminotransferasu (AST; mkat/l), kreatinkinázu (CK; mkat/l), laktátdehydrogenázu (LDH; mkat/l), alkalickou fosfatázu (ALP; mkat/l), a fosfor (P; mmol/l). Koncentrace vápníku v plazmě (Ca; mmol/l) byla analyzována na Atomspec analyzátoru (Hilger 1550). Hematokrit byl měřen pomocí mikrohematokritových trubiček. Červené a bílé krvinky byly stanoveny ručně pomocí haemocytometru s pomocí Nattova a Herrickova roztoku. Krevní roztěry na podložním sklíčku, připravené okamžitě po odebrání krve, byly nechány zaschnout na vzduchu a barveny dle May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. 200 leukocytů bylo počítáno pro každý roztěr a poté klasifikovány jako heterofily, eozinofily, bazofily, lymfocyty a monocyty.

Lipidní peroxidace (TBARS) a další **parametry oxidativního stresu** byly analyzovány dle metodiky Paskova et al. (2008) a měřeny v plné krvi. Vzorek krve byl homogenizován s ledem a ve fosfátovém pufru (PBS, pH 7,2) pomocí mechanického homogenizátoru, 100 mg tkáně v 1 ml PBS. Po centrifugaci byl odebrán

postmitochondriální supernatant (15 min, při 10000 otáčkách, 4 °C) a skladován až do biochemické analýzy ve zmrazeném stavu při -80 °C. Všechny biochemické látky a enzymy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR), ostatní chemické látky používané k přípravě pufrů byly nejvyšší komerční úrovně. Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) byla měřena spektrofotometricky při 340 nm pomocí 1 mM 1-chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) a 2 mM GSH v PBS. Specifická aktivita byla vyjádřena jako nmol za minutu na miligram proteinu. Koncentrace redukovaného glutathionu byla stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) jako substrátu. Tkáně byly adjustovány pomocí kyseliny trichloroctové (TCA, 2,5 % obj.) a odstředěny (10 min, 6000 otáček, 4 °C). Supernatant byl smíchán s TRIS-HCl pufrém (0,6 M TRIS; 0,015 M EDTA, pH 8,9) a 0,8 mM DTNB, poté byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Absorbance byla měřena při 420/680 nm a koncentrace (nmol GSH/mg proteinu) byly vypočteny podle standardní kalibrace s redukovaným GSH. Aktivita glutathionové peroxidázy (GPX) byla určena z míry oxidace NADPH a zaznamenána jako pokles absorbance při 340 nm. Reakční směs obsahovala 3 mM GSH, 1 U glutathion reduktázy (GR) (1 jednotka [U] sníží 1,0 μmol oxidovaného glutathion za minutu při pH 7,6 a 25 °C), 0,15 mM NADPH v 0,1 M fosforečnanu draselného/1mM EDTA pufru (pH 7). Pro stanovení byl použit substrát 1,2 mM butylhydroperoxid. Také aktivita GR byla stanovena spektrofotometrickým měřením NADPH oxidace. Testy na měření aktivity GR byly prováděny na mikrotitračních destičkách, kde reakční směs obsahovala 0,05 M fosforečnanu draselného/1 mM EDTA pufru (pH 7,0), 1 mM oxidovaného glutathionu (GSSG), 0,1 mM NADPH a supernatant (0,25 % v/v). Specifické aktivity jak GPX, tak GR byly vyjádřeny jako nmol NADPH oxidované za minutu na miligram proteinu. Úroveň peroxidace lipidů ve tkáni ptáků byla hodnocena měřením pomocí TBARS testu (thiobarbituric acid reactive substances). Extrakty byly smíchány s kyselinou trichloroctovou (TCA, 6 % w/v) a butylhydroxytoluenem (0,6 % w/v) a poté odstředěny (1500 otáček po dobu 20 min). Supernatant byl dále ve směsi s 0,06 N HCl a 40 mM TBA připravených jako 10 mM TRIS (pH 7,4). Tato směs se zahřívala ve vodní lázni 45 min a poté byla ochlazena na pokojovou teplotu. Absorbance vzorku byla měřena při 550/590 nm a koncentrace TBARS (nmol TBARS/mg proteinu) byla vypočítána dle standardní kalibrační křivky, která byla vytvořena na základě měření malondialdehydu připraveného kyselou hydrolyzou z 1,1,3,3-tetraethoxypropanu. Koncentrace proteinů byly určeny pomocí fenolového činidla, které s proteiny tvoří červeně barevný komplex

měřitelný při 680 nm. Jako standard pro kalibraci byl použit hovězí sérový albumin. Pro měření absorbance byl použit GENios spektrofotometr na mikrotitrační destičky (Tecan Group, Švýcarsko). Pro měření fluorescence byl použit POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Německo).

FRAP test (schopnost plazmy redukovat železité ionty, celková antioxidační kapacita) byl proveden v souladu s metodikou Benzie and Strain (1996).

Činidla: činidla zahrnují 300 mmol/litr acetátového pufru, pH 3,6 (3,1 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) (Riedel-de Haen, Germany) a 16 ml $C_2H_4O_2$ (BDH Laboratory Supplies, England) na litr pufráčního roztoku; 10 mmol/litr TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, Fluka Chemicals, Switzerland) na 40 mmol/litr HCl (BDH); 20 mmol/litr FeCl. Pracovní FRAP činidlo bylo připraveno smícháním 25 ml acetátového pufru, 2,5 ml TPTZ roztoku a 2,5 ml roztoku $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.

Vzorky: Pro kalibraci byly použity vodné roztoky známé koncentrace Fe^{II} v rozmezí 100-1000 $\mu\text{mol/litr}$ ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$; Riedel de Haen).

Antioxidanty: Pro přípravu vodných roztoků antioxidantů byly použity L-(+)-kyselina askorbová v pevném stavu s extra čistými krystaly (Merck, Německo), kyselina močová, solid (BDH), albumin, solid (bovinní sérový albumin, frakce V, Sigma), kalibrovaný roztok bilirubinu (Sigma) a Trolox (Aldrich Chemical Co, USA). DL- α -tokoferol (Merck) byl zředěn v ethanolu (Merck).

Soupravy činidel (Hoffman-LaRoche Ltd, Švýcarsko):

Kyselina močová byla měřena enzymatickou metodou, bilirubin metodou alkalického pikrátu a albumin byl měřen metodou bromkrezolového zeleného barviva. Tyto analýzy byly provedeny na Cobas Mira analyzátoru (Roche) dle pokynů výrobce a za použití komerčně dostupných kalibrátorů.

Automatizovaný FRAP test: Analyzátor Cobas Mira byl použit k provedení testu takto: 300 μl čerstvě připraveného FRAP činidla bylo zahřáto na 37 °C a slepý pokus byl měřen při vlnové délce 593 nm, poté bylo přidáno 10 ml vzorku spolu s 30 ml H_2O ; konečné ředění vzorku v reakční směsi bylo tedy 1/34. Odečítání absorbance v průběhu

monitorování bylo po 0,5 s a poté každých dalších 15 s. Změny absorbance ($\Delta A_{593 \text{ nm}}$) byly vypočítány pro každý vzorek a $\Delta A_{593 \text{ nm Fe}^{\text{II}}}$ ze standardního roztoku byly testovány paralelně. Všechny roztoky byly použity v den přípravy; roztoky kyseliny askorbové byly použity do 1 hodiny od přípravy. Koncentrace bovinního sérového albuminu byly převedeny z gramů/litr na mikromoly/litr pomocí molekulární hmotnosti 68000.

Diferenční pulsní voltametrie – Brdičkova reakce

Hladiny metallothioneinu byly stanoveny pomocí elektrochemické detekce, tzn. adsorpční přenosové rozpouštěcí techniky s diferenční pulsní voltametrií - Brdičkovy reakce.

Diferenční pulsní voltametrické měření bylo provedeno s přístrojem 747 VA Stand připojeným k 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko), s použitím standardní buňky se třemi elektrodami a chlazeným držákem vzorku (4 °C). Jako pracovní elektrody byly použity závěsné rtuťové kapkové elektrody (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm². Jako referenční elektroda byla použita Ag/AgCl/3M KCl elektroda a jako měrná elektroda byla použita skleněná uhlíková elektroda. Analyzované vzorky byly před měřením zbavené kyslíku propláchnutím s argonem (99,999 %) a nasycené vodou po dobu 120 s. Byl použit Brdičkův nosný elektrolyt obsahující 1 mM Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 M amoniakálního pufru (NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6). Další experimentální podrobnosti lze nalézt ve studii Fabrik et al. (2008).

Stanovení nízkomolekulárních thiolů

Toto stanovení bylo provedeno pomocí HPLC. Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Výsledkem kvalitativní analýzy je zjištění, jaké látky jsou obsažené ve směsi a výsledkem kvantitativní analýzy je zjištění, v jaké koncentraci jsou jednotlivé složky ve směsi obsažené (URL 10, 2004).

Mobilní fáze je ta, která se v chromatografickém systému pohybuje. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn. Je-li mobilní fází kapalina, jedná se pak právě o kapalinovou chromatografii. Stacionární fáze je v chromatografickém systému ta fáze, která je nepohyblivá. Stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf, který tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor (URL 10, 2004).

System vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED), se skládal ze dvou dodávajících čerpadel pracujících v rozsahu 0,001-9.999 ml.min⁻¹ (Model 582 ESA Inc., Chelmsford, MA), sloupce Zorbax Eclipse AAA (velikost částic 4,6 x 150 mm 3,5 mikronů, Varian Inc., CA, USA) a elektrochemického detektoru CoulArray (Model 5600A, ESA, USA). Vzorek (30 µl) byl aplikován pomocí autosampleru (Model 540 Microtiter HPLC, ESA, USA). Další experimentální údaje lze nalézt ve studii Petrlova et al. (2006a) a Potesil et al. (2005).

Stanovení olova a železa

Koncentrace těžkých kovů byly zjištěny pomocí diferenční pulsní anodické rozpouštěcí voltametrie a hmotnostní detekce s indukčně vázanou plazmou. Stručně řečeno, voltametrické měření bylo provedeno na přístroji 797 VA Computrace s Compact 863 VA Autosamplerem a na dvou 800 Dosino dávkovacích systémech pro automatické dávkování roztoků pomocí standardních vodivostních buněk se třemi elektrodami (Metrohm, Švýcarsko). Systém elektrod byl stejný jako u již popsané "Diferenční pulsní voltametrie - Brdičkova reakce". Další experimentální údaje lze nalézt ve studii Krizkova et al. (2007).

Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů (LMWA)

Pro zhodnocení celkové antioxidační kapacity, odvozené od nízkomolekulárních antioxidantů plazmy, byla použita cyklická voltametrie. Naměřený anodický proud je úměrný koncentraci LMWA v plazmě vzorku. Princip testu je popsán ve studii Chevion et al. (2000). Vzorky tkání byly odebrány během pitvy supa mrchožravého (*Neophron percnopterus*). Smíšené vzorky půdy byly odebrány z voliér supů.

Příprava vzorku

Vzorky krve získané ze supů byly vloženy do thermomixeru (Eppendorf 5430, Německo), kde byly za stálého třepání při 99 °C, po dobu 15 minut. Denaturovaný homogenát byl odstředěn při 4 °C, 15000 otáčkách, po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, Německo). Tepelné působení účinně denaturuje a odstraňuje termolabilní a vysokomolekulární bílkoviny ze vzorků (Petrlova et al., 2006b). Připravené vzorky byly použity pro detekci metallothioneinu a nízkomolekulárních thiolů.

Statistická analýza

Statistické analýzy byly provedeny v programu Statistica for Windows 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Data o normalitě a homogenitě rozptylu byla vyhodnocena Kolmogorov-Smirnovým testem, případně Levenovým testem. Pro statistické srovnání byly použity: Jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) a neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro všechny testy byly hodnoty $p < 0,05$ považovány za statisticky významné a hodnoty $p < 0,01$ za velmi významné (v grafech označeno pomocí * a **).

6 Výsledky

Supi byli otráveni olovnatými ionty pocházejícími z nátěru a pilin obroušených z ocelové konstrukce voliéry, které kontaminovaly půdu v takové míře, že povrchová vrstva obsahovala až 25850 µg/g olova. Přímá expozice olovu spočívala v pozření mršiny, která byla kontaminována zbytky starého nátěru z půdy.

Klinický popis případu

Samec supa mrchožravého vykazoval klinické příznaky intoxikace (apatie, polydipsie, polyurie, regurgitace, páchnoucí tekutina volně vytékající ze zobáku a dilatace volete způsobená stagnací potravy) a následně uhynul. V oblasti volete a žaludku bylo na rentgenovém snímku pořízeném post mortem možno rozlišit mnoho malých rentgenkontrastních úlomků. Koncentrace olova v játrech, ledvinách a v krvi byla 12,20; 8,16 a 2,66 µg/g.

Laboratorní vyšetření prokázalo výrazné zhoršení hematologických a biochemických parametrů. Základní parametry u tohoto ptáka byly: koncentrace hemoglobinu = 71 g/l, Ca = 3,41 mmol/l, P = 7,68 mmol/l, UAC = 11712 µmol/l, AST = 26,92 µkat/l, ALP = 5,59 µkat/l, CK = 326,04 µkat/l, LDH = 29 µkat/l.

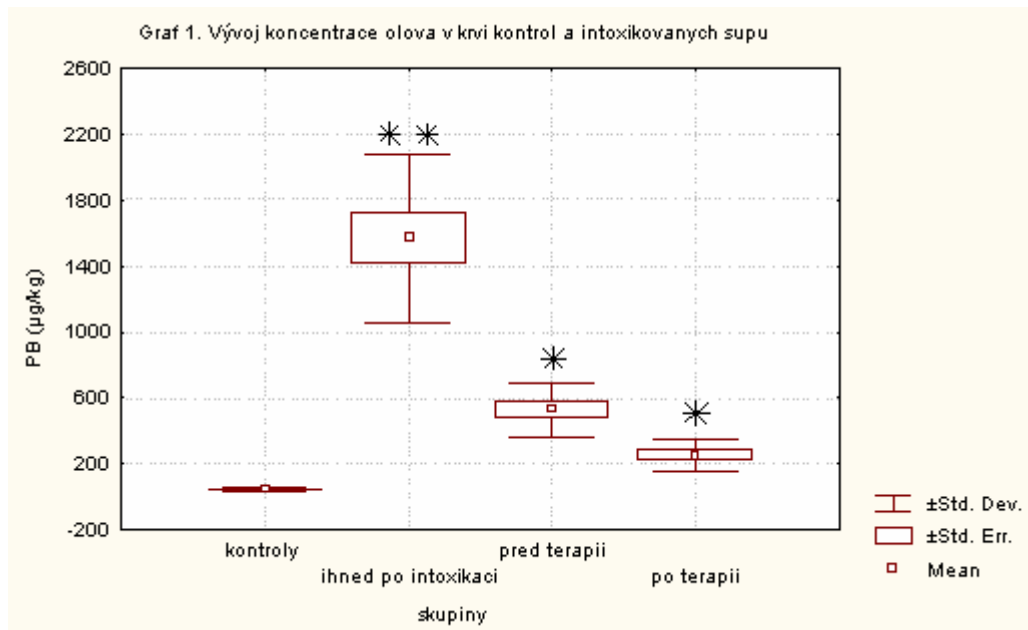
Žádný další sup nezemřel, ani nevykazoval klinické příznaky intoxikace olovem.

U samice supa mrchožravého ze stejné voliéry klesla hladina olova do dvou měsíců z původní hodnoty 1,07 µg/g na 0,28 µg/g. Nejprve byla tato samice léčena penicilaminem, ale vzhledem k nežádoucím účinkům byla dále léčena aplikací Ca-EDTA.

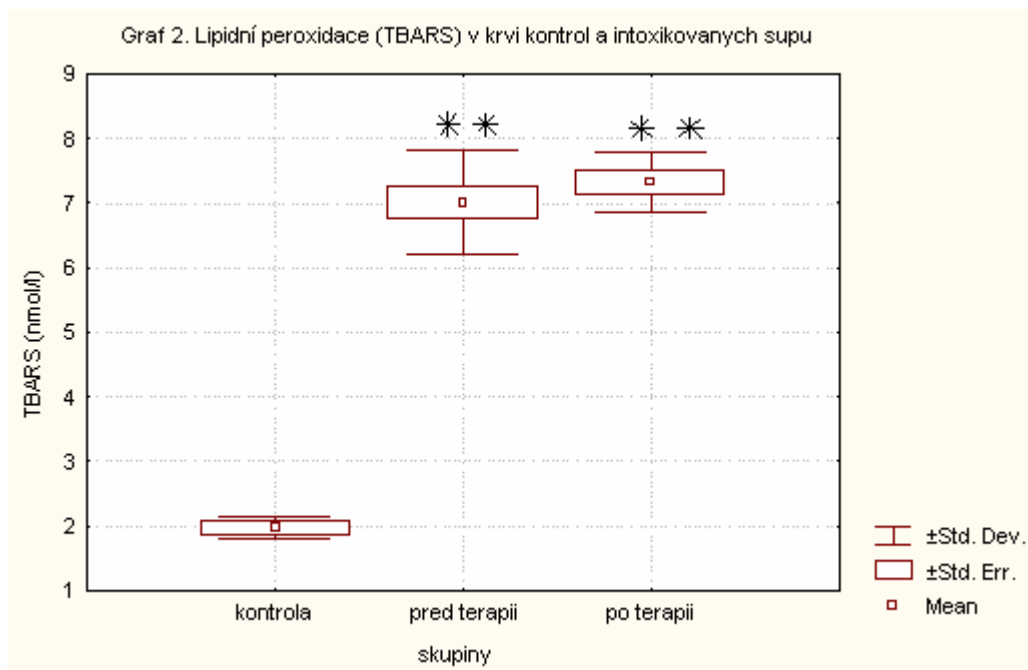
Z toxikologických rozborů krve osmi supů hnědých vyplývá, že se bez léčby obsah olova snížil z počáteční hodnoty 1,49 µg/g na 0,53 µg/g. Měsíc po podání Ca-EDTA klesl obsah olova až na hodnotu 0,23 µg/g.

Výsledky jsou prezentovány formou grafů.

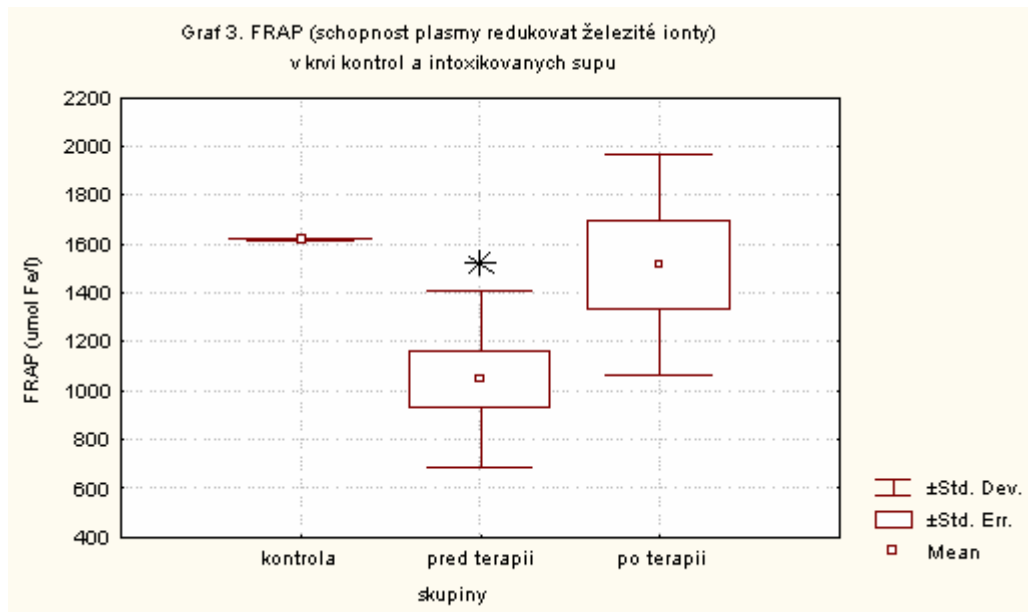
V Grafu 1 je znázorněn vývoj koncentrace olova u supů. Jsou zde vyneseny hodnoty týkající se kontrolní skupiny supů, supů ihned po intoxikaci, skupiny supů před terapií a měsíc po terapii Ca-EDTA.



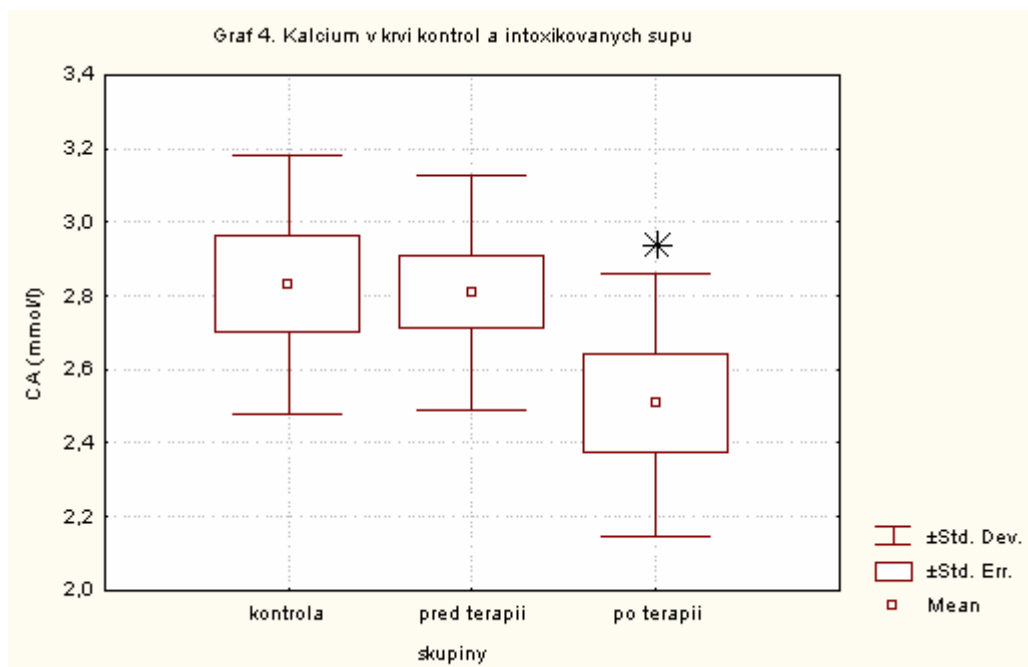
Graf 2 znázorňuje výrazný nárůst lipidní peroxidace (TBARS) v krvi intoxikovaných supů před a po terapii, ve srovnání s kontrolní skupinou supů.

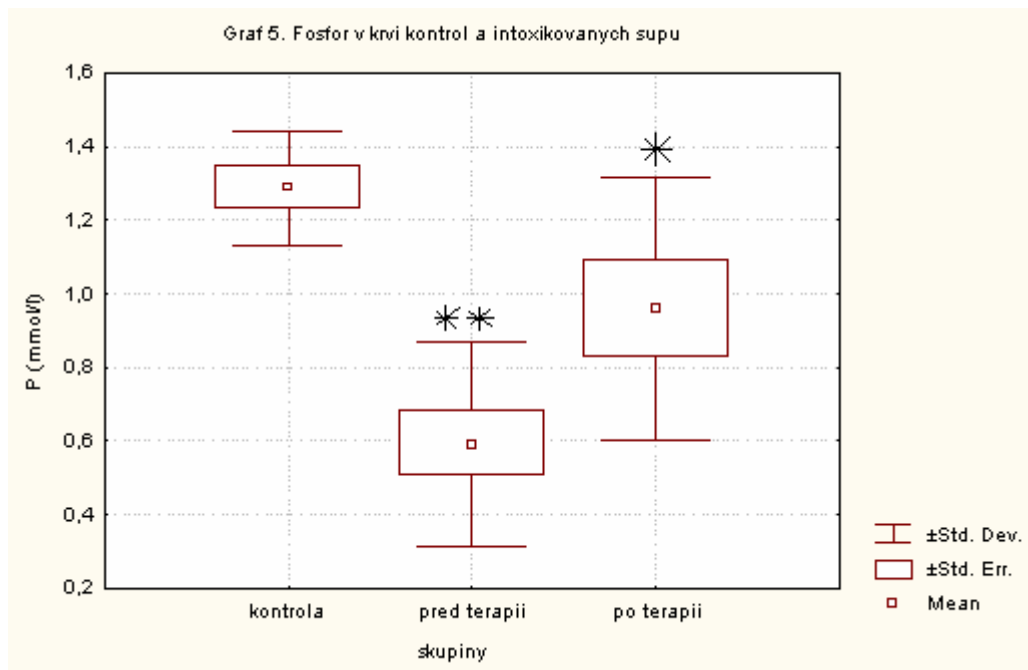


FRAP test (schopnost plazmy redukovat železité ionty, celková antioxidační kapacita) byl s vysokou statistickou významností nižší u skupiny ptáků před terapií. Následující léčba hodnoty FRAP testu stabilizovala (Graf 3).

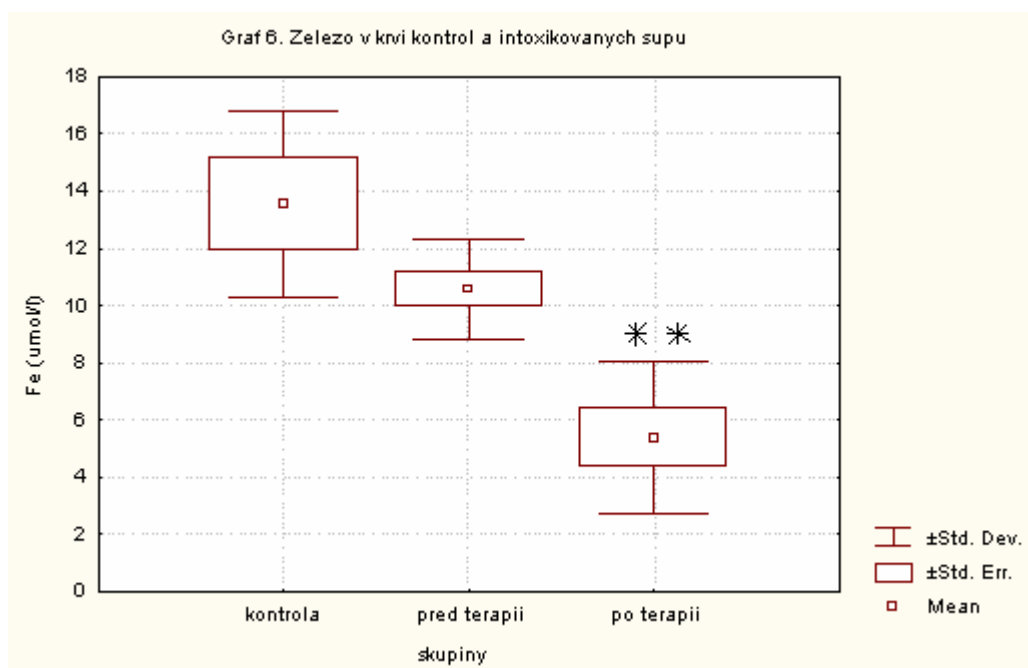


U hladin vápníku v krvi kontrol a intoxikovaných supů před terapií nebyly zjištěny žádné rozdíly statistické významnosti. Nicméně, z Grafu 4 je vidět, že terapie Ca-EDTA má za následek pokles hladiny vápníku. Kromě toho vede intoxikace olovem ke snížení hladiny fosforu, která zůstala nižší i po léčbě (viz Graf 5).

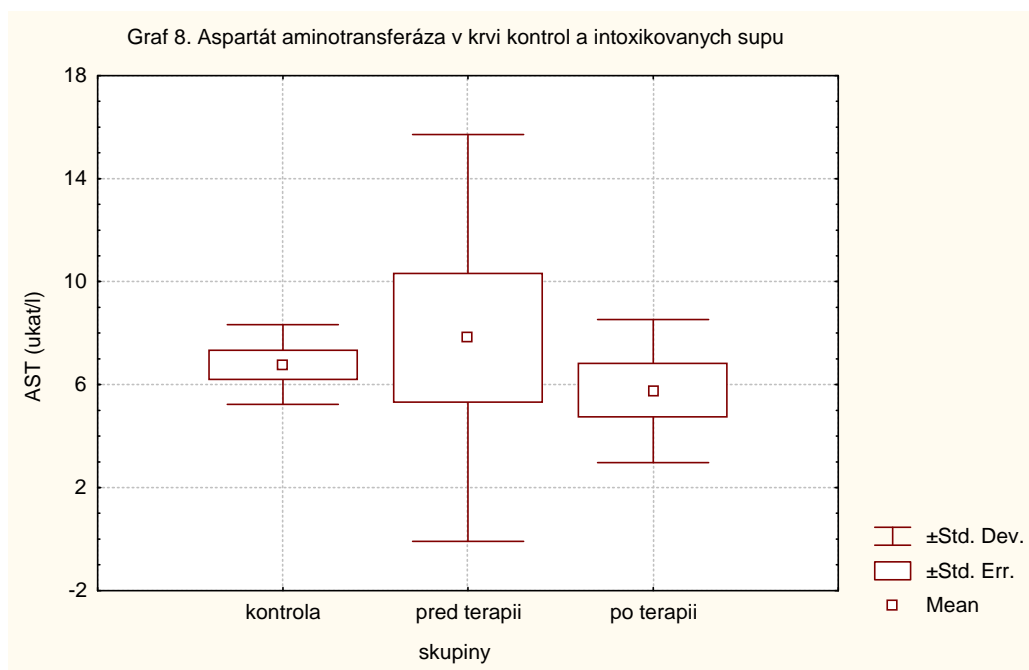
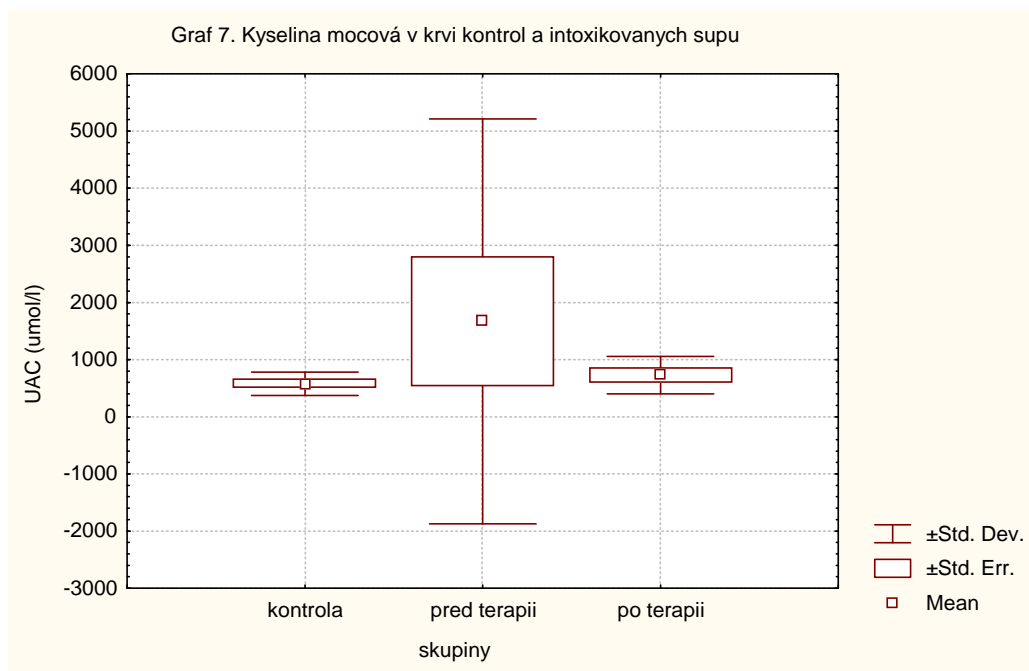




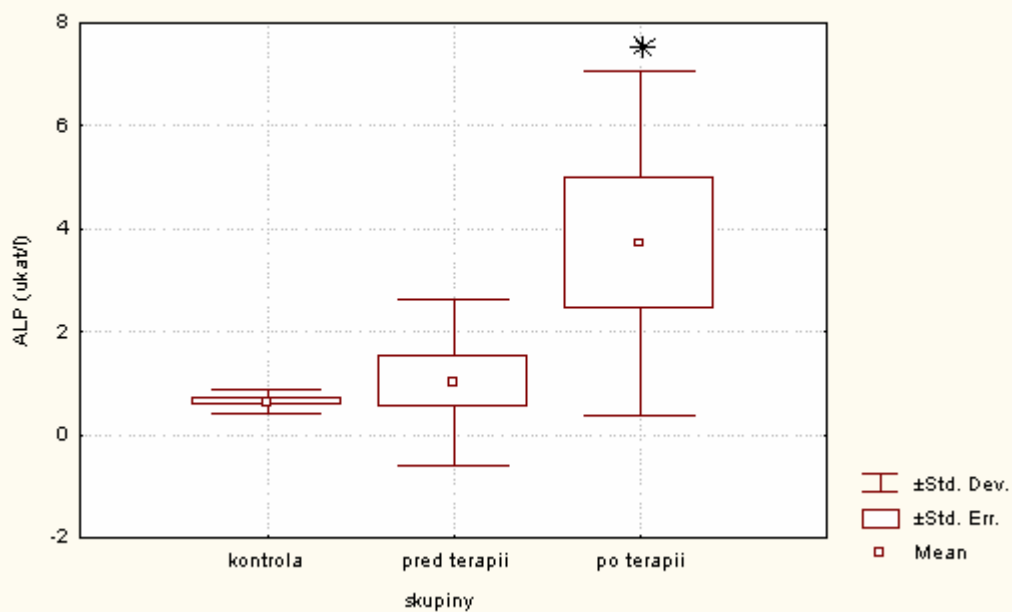
Hladina železa byla nižší u ptáků před terapií (statisticky nevýznamné), pokles na ještě nižší hodnoty (statisticky velmi významné) nastal po následné terapii Ca-EDTA (viz Graf 6).



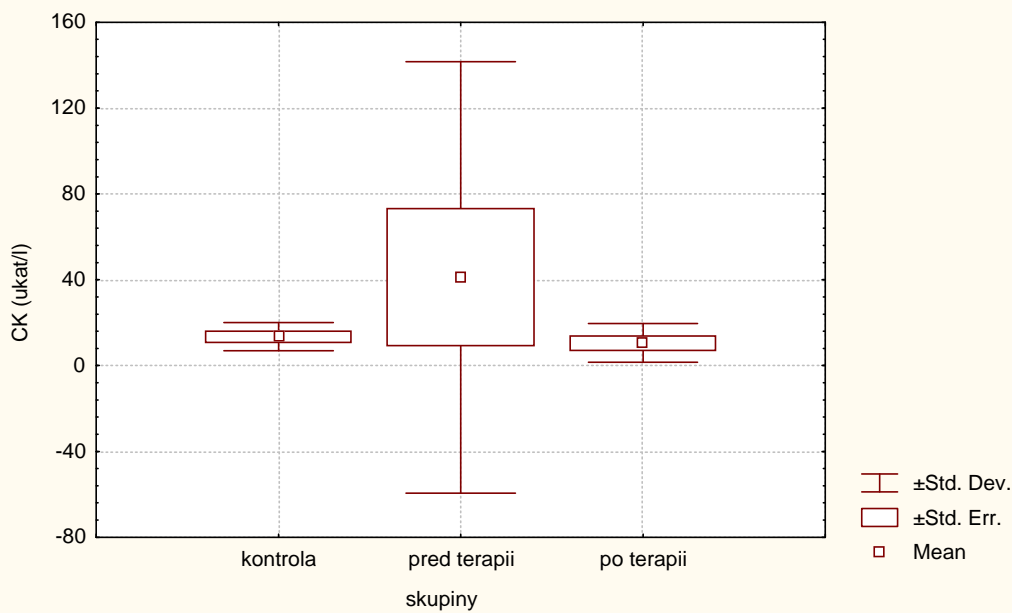
Graf 7 a 8 znázorňuje hladinu kyseliny močové a aspartát aminotransferázy v krvi kontrol a intoxikovaných supů. Z těchto grafů lze vyčíst velkou variabilitu u ptáků před léčbou a normalizovaný stav do jednoho měsíce po léčbě. Totéž platí u kreatinkinázy (Graf 10). Ve srovnání s kontrolami nebyla alkalická fosfatáza statisticky významná u ptáků před léčbou, ale po terapii Ca-EDTA se alkalická fosfatáza zvýšila (viz Graf 9).



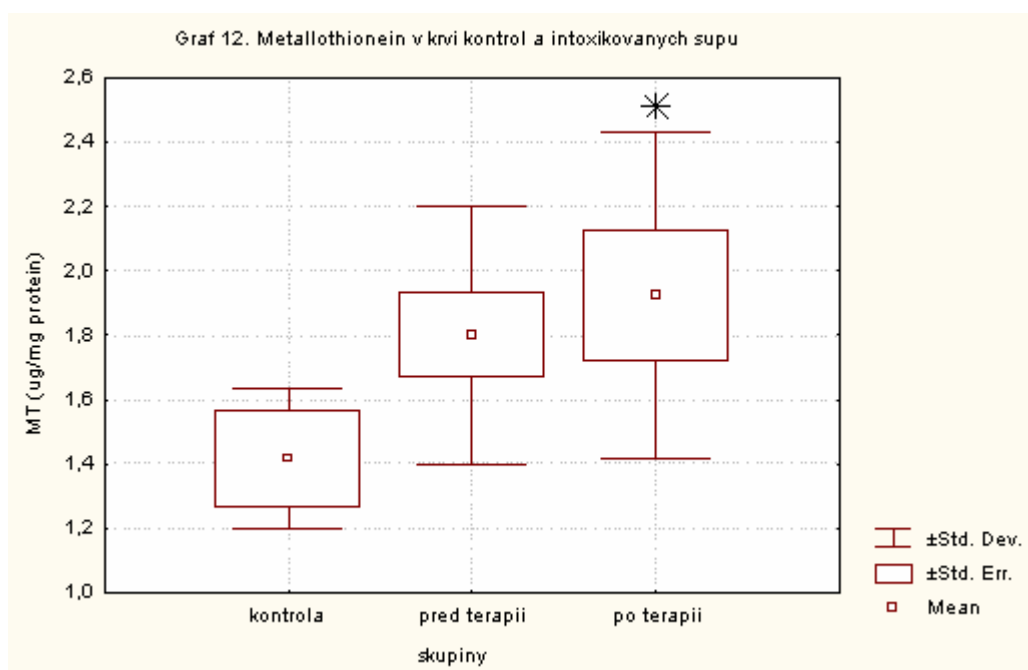
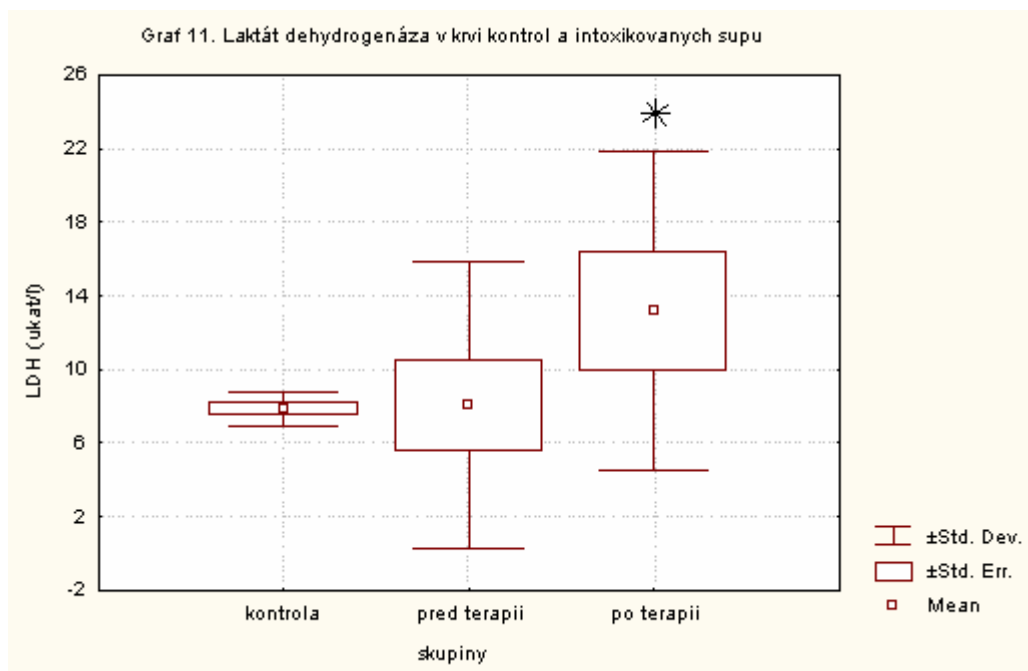
Graf 9. Alkalická fosfatáza v krvi kontrol a intoxikovaných supu



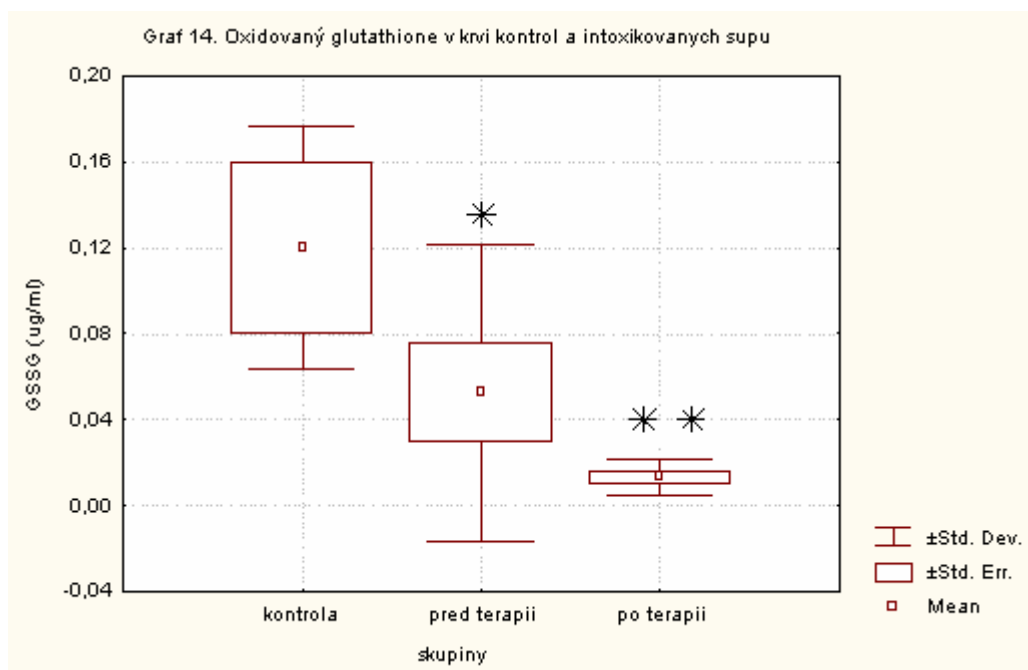
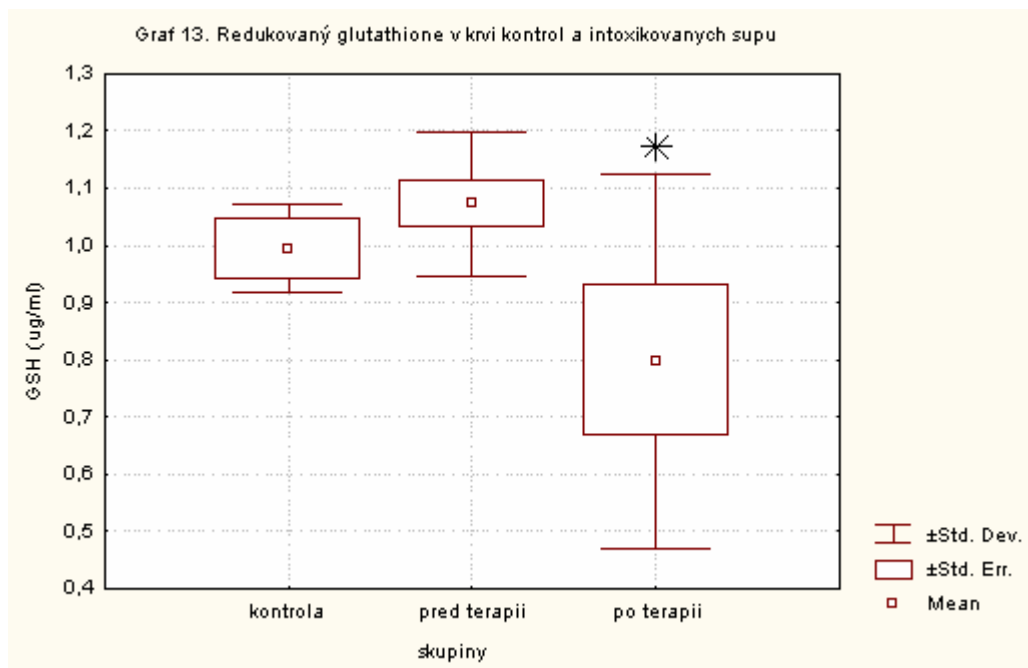
Graf 10. Kreatin kináza v krvi kontrol a intoxikovaných supu



U laktátdehydrogenázy (Graf 11) bylo pozorováno mírné zvýšení po terapii, kdežto u nízkomolekulárních antioxidantů nebyly zjištěny žádné statistické rozdíly u skupiny intoxikovaných ptáků před a po terapii. Podle očekávání byly hladiny metallothioneinu zvýšeny u supů vystavených olovu (viz Graf 12).



V Grafu 13 a 14 je znázorněno srovnání redukovaného a oxidovaného glutathionu v krvi kontrol a intoxikovaných supů před a po terapii. Ve srovnání s kontrolou redukovaný glutathion po terapii Ca-EDTA klesal. Taktéž oxidovaný glutathion měl u ptáků před i po terapii klesající tendenci.



Vysvětlivky zkratk použitých v grafech:

Std. Dev. (Standard Deviation) = směrodatná odchylka

Std. Err. (Standard Error) = střední chyba průměru

Mean = průměr

7 Diskuze

K otravě olovem došlo za jeden měsíc po návratu supů do jejich ubikace, ve které byl odstraněn starý nátěr suříkovou barvou. Přestože bylo ve voliérách vystaveno kontaminaci půdy olovem deset ptáků, pouze jeden pták uhynul. Pro otravu olovem u zvířat svědčí obecně koncentrace tohoto kovu v ledvinách a játrech nad 8-10 $\mu\text{g/g}$ nativní hmotnosti tkáně (Thompson, 2007). Koncentrace olova v krvi, játrech a ledvinách u samce supa mrchožravého svědčily pro akutní intoxikaci a hladinu olova, která již způsobuje úhyn (Samour, 2008). Stejně tak laboratorní analýzy potvrdily závažné poškození jater, ledvin a anémii (Villegas et al., 2002).

Tento případ je podobný otravě olovem u dropa hřívnatého (*Chlamydotis undulata*) chovaného v zajetí na soukromé farmě ve Spojených arabských emirátech, kde drop hřívnatý požil větší kousky zelené barvy, která se odloupla z opěrných kovových tyčí voliéry (Bailey et al., 1995).

Ve skupině přežívajících supů jsme byli schopni posoudit vývoj intoxikace v závislosti na čase a zhodnotit jak nepříznivé účinky olova, tak účinky léčby na parametry krve. Olovo má negativní dopad na celkový zdravotní stav, růst, imunitní odpověď, reprodukci a mnoho dalších fyziologických funkcí u ptáků, včetně biosyntézy hemoglobinu (Fair and Ricklefs, 2002).

Je známo, že některé z nežádoucích účinků olova mohou být spojeny s oxidativním poškozením lipidů, proteinů nebo DNA (Mateo et al., 2003).

Výsledky týkající se lipidní peroxidace (TBARS) a schopnosti plazmy redukovat železité ionty (FRAP test, celková antioxidační kapacita) demonstrují oxidativní stres u olovem exponovaných supů (Graf 2 a 3). I když se zdálo, že se hodnoty FRAP testu po terapii Ca-EDTA vrátily k normálu, hodnoty lipidní peroxidace (TBARS) ve srovnání s ptáky, kteří nebyli léčeni Ca-EDTA, mírně vzrostly. Zvyšující se hodnoty lipidní peroxidace TBARS korespondují se závěry Chvapila et al. (1974), prokazující zvýšení TBARS v játrech potkanů léčených Ca-EDTA.

Změny v redox systému glutathionu byly u našich supů také prokázány, a to jak před terapií Ca-EDTA, tak po terapii. Dle Werneryho et al. (2004) se hladina vápníku u sokolů, kteří byli vystaveni olovu nemění, zatímco hladina fosforu u nich stoupá. Pokles vápníku u supů po podání Ca-EDTA je jasně viditelný (Graf 4).

Narozdíl od Werneryho et al. (2004) bylo se statistickou významností zjištěno, že jsou u supů hladiny fosforu před i po terapii nižší, kromě extrémního nárůstu hladiny fosforu u samce supa mrchožravého, který uhynul.

Získaná data také dokumentují u léčených i neléčených supů výrazný pokles železa. Pokles hladiny železa u olovem exponovaných ptáků měl za následek rozvoj anémie, kdežto léčba ptáků Ca-EDTA navozovala vylučování železa (Chvapil et al., 1974).

Významný nárůst ALP aktivity u skupiny supů po ošetření může být vysvětlen rozkladem kolagenu a indukci metabolismu v kostech po Ca-EDTA terapii (Braide, 1984).

Pokud jde o vývoj koncentrace olova v krvi, je důležité si uvědomit, že zpočátku vysoké hodnoty poklesly dokonce i bez léčby, pravděpodobně v důsledku ukládání olova v kostech a jeho vylučování. Snížení koncentrace olova v krvi po podání Ca-EDTA nebylo tak podstatné, jak by se dalo očekávat. To může být vysvětleno chelatací a mobilizací olova z kostí (Thompson, 2007).

8 Závěr

K otravě olovem došlo za jeden měsíc po návratu supů do jejich voliéry, ve které byl odstraněn starý nátěr suříkovou barvou. Přestože ve voliérách bylo vystaveno kontaminaci půdy olovem deset ptáků, pouze jeden pták uhynul. Koncentrace olova v játrech, ledvinách a v krvi byla 12,20; 8,16 a 2,66 $\mu\text{g/g}$. Pro otravu olovem u zvířat svědčí obecně koncentrace tohoto kovu v ledvinách a játrech nad 8-10 $\mu\text{g/g}$ nativní hmotnosti tkáně.

Koncentrace olova v krvi, játrech a ledvinách u samce supa mrchožravého byly typické pro akutní intoxikaci a odpovídaly hladině olova, která již způsobuje úhyn. Také laboratorní analýzy prokázaly výrazné zhoršení hematologických a biochemických parametrů. Žádný další sup nezemřel, ani nevykazoval klinické příznaky intoxikace olovem.

U samice supa mrchožravého ze stejné voliéry klesla hladina olova do dvou měsíců z původní hodnoty 1,07 $\mu\text{g/g}$ na 0,28 $\mu\text{g/g}$. Nejprve byla tato samice léčena penicilaminem, ale vzhledem k nežádoucím účinkům byla dále léčena aplikací Ca-EDTA.

Z toxikologických rozborů krve osmi supů hnědých vyplývá, že se bez léčby obsah olova snížil z počáteční hodnoty 1,49 $\mu\text{g/g}$ na 0,53 $\mu\text{g/g}$. Měsíc po podání Ca-EDTA klesl obsah olova až na hodnotu 0,23 $\mu\text{g/g}$.

Výsledky diplomové práce mají klinický význam v terapii u volně žijících ptáků a ptáků chovaných v zajetí. Údaje o některých krevních parametrech totiž doposud u supů nebyly publikovány. Výsledky této práce dále dokumentují potřebu dodávat ptákům intoxikovaným olovem a ptákům léčeným Ca-EDTA antioxidanty, železo a vápník. Tyto látky působí k vyrovnání nepříznivých účinků expozice olovem a Ca-EDTA terapie.

9 Abstrakt a klíčová slova

Otrava olovem u supa hnědého - vývoj biochemických parametrů

Tichá, V.

Fakulta veterinární hygieny a ekologie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na problematiku otravy olovem u skupiny supů chovaných v Zoologické zahradě hlavního města Prahy. Získaná data se týkají toxikologických a biochemických parametrů a také analýzy oxidativního stresu. Kromě toho byly s použitím výše uvedených parametrů hodnoceny účinky terapie. Nežádoucím účinkům olova byli vystaveni dva supi mrchožraví (*Neophron percnopterus*) a osm supů hnědých (*Aegypius monachus*). K otravě olovem došlo za jeden měsíc po návratu ptáků do jejich voliéry, ve které byl odstraněn starý nátěr suříkovou barvou. Supi byli otráveni olovnatými ionty pocházejícími z nátěru a pilin obroušených z ocelové konstrukce voliéry, které kontaminovaly půdu v takové míře, že povrchová vrstva obsahovala až 25850 µg/g olova. Přímá expozice olovu spočívala v pozření mršiny, která byla kontaminována zbytky starého nátěru z půdy.

Samec supa mrchožravého byl ve voliéře nalezen s příznaky apatie, polydipsie, polyurie a regurgitace v lednu 2009. Následující klinické vyšetření odhalilo strnulost, páchnoucí tekutinu volně vytékající ze zobáku a dilataci volete způsobenou stagnací potravy. Samec zemřel krátce poté, co s ním bylo manipulováno. V oblasti volete a žaludku bylo na rentgenovém snímku pořízeném post mortem možno rozlišit mnoho malých rentgenkontrastních úlomků. Koncentrace olova v játrech, ledvinách a v krvi byla 12,20; 8,16 a 2,66 µg/g. Žádný další sup nezemřel, ani nevykazoval klinické příznaky intoxikace olovem. U samice supa mrchožravého ze stejné voliéry klesla hladina olova do dvou měsíců z původní hodnoty 1,07 µg/g na 0,28 µg/g. Nejprve byla tato samice léčena penicilaminem, ale vzhledem k nepříznivým účinkům byla dále léčena aplikací Ca-EDTA. Z toxikologických rozborů krve osmi supů hnědých vyplývá, že se bez léčby obsah olova snížil z počáteční hodnoty 1,49 µg/g na 0,53 µg/g, pravděpodobně v důsledku

vylučování toxických iontů kovu, nebo v důsledku jejich ukládání do kostí. Měsíc po podání Ca-EDTA klesl obsah olova až na hodnotu 0,23 µg/g.

Klíčová slova: plumbémie, otrava olovem, dravci v zajetí, účinky léčby, biochemie, oxidativní stres, metallothionein, redukovaný a oxidovaný glutathion, peroxidace lipidů, FRAP test

10 Seznam literatury

- 1) BAILEY T. A, HOWLETT J. C., NALDO J., SAMOUR J. H. Lead toxicosis in captive houbara bustards (*Chlamydotis undulata maqueenii*). *Veterinary Record*, 1995, vol. 137, p. 193–194.
- 2) BAKSI, S. N., KENNY, A. D. Effect of lead ingestion on Vitamin D3 metabolism in Japanese quail. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, 1978, vol. 21, p. 375–378.
- 3) BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, vol. 239, p. 70–76.
- 4) BRAIDE, V. B. Calcium EDTA toxicity: Renal excretion of endogenous trace metals and the effect of repletion on collagen degradation in the rat. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1984, vol. 15, no. 1, p. 37–41.
- 5) DARLING, C. T. R., THOMAS, V. G. Lead bioaccumulation in earthworms, *Lumbricus terrestris*, from exposure to lead compounds of differing solubility. *Science of The Total Environment*, 2005, vol. 346, p. 70–80.
- 6) DONG-HA N., DOO-PYO L. Abnormal lead exposure in globally threatened Cinereous vultures (*Aegypius monachus*) wintering in South Korea. *Ecotoxicology*, 2008, vol. 18, p. 225-229.
- 7) FABRIK, I., RUFEROVA, Z., HILSCHEROVA, K., ADAM, V., TRNKOVA, L., KIZEK, R. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using Brdicka reaction. *Sensors*, 2008, vol. 8, p. 4081-4094.

- 8) FAIR, J. M., RICKLEFS, R. E., Physiological, growth, and immune response of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, vol. 42, p. 77–87.
- 9) FINKELSTEIN, M. E., GWIAZDA, R. H., SMITH, D. R. Lead poisoning of seabirds: environmental risks from leaded paint at a decommissioned military base. *Environmental Science & Technology*, 2003, vol. 37, p. 3256–3260.
- 10) FISHER I. J., PAIN D. J., THOMAS V. G. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological conservation*, 2006, vol. 131, p. 421-432.
- 11) GARCIA–FERNANDEZ, A. J., SANCHEZ–GARCIA, J., A., JIMENEZ–MONTALBAN, P., LUNA, A. Lead and kadmium in wild birds in south-eastern Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, vol. 14, p. 2049–2050.
- 12) GARCIA–FERNANDEZ, A. J., MARTINEZ–LOPEZ E., ROMERO, D., MARIA–MOJICA, P., GODINO, A., JIMENEZ, P. High levels of blood lead in Griffon vultures (*Gyps fulvus*) from Cazorla national park (southern Spain). *Environmental Toxicology*, 2005, vol. 20, p. 459–463.
- 13) GILL, C. E., LANGELIER, K. M. Acute lead poisoning in a bald eagle secondary to bullet ingestion. *Canadian Veterinary Journal*, 1994, vol. 35, p. 303–304.
- 14) GREEN, R. E., NEWTON, I., SCHULTZ, S., CUNNINGHAM, A. A., GILBERT, M., PAIN, D. J., PRAKASH, V. Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *Journal of Applied Ecology*, 2004, vol. 41, no. 5, p. 793–800.
- 15) HERNANDEZ, M., MARGALIDA, A. Pesticide abuse in Europe: effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. *Ecotoxicology*, 2008, vol. 17, no. 4, p. 264–272.

- 16) CHEVION, S., ROBERTS, M. A., CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radicals Biology & Medicine*, 2000, vol. 28, p. 860-870.
- 17) CHVAPIL, M., ARONSON, A. L., PENG, Y. M. Relation between zinc and iron and peroxidation of lipids in liver homogenate in CaEDTA-treated rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 1974, vol. 20, no. 2, p. 216–227.
- 18) KENDALL, R. J., LACHER, T. E., BUNCK, C., DANIEL, B., DRIVER, C. E., GRUE, C. E., LEIGHTON, F., STANSLEY, W., WATANABE, P. G., WHITWORTH, M. An ecological risk assessment of lead shot exposure in non-waterfowl avian species: upland game birds and raptors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, vol. 15, p. 4–20.
- 19) KENNEDY, S., CRISLER, J. P., SMITH, E., BUSH, M. Lead poisoning in sandhill cranes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1977, vol. 171, no. 9, p. 955-958.
- 20) KENNTNER, N., KRONE, O., ALTENKAMP, R., TATARUCH, F. Environmental contaminants in liver and kidney of free-ranging northern goshawks (*Accipiter gentilis*) from three regions of Germany. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, vol. 45, p. 128–130.
- 21) KRIZKOVA, S., ZITKA, O., ADAM, V., BEKLOVA, M., HORNA, A., SVOBODOVA, Z., SURES, B., TRNKOVA, L., ZEMAN, L., KIZEK, R. Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues. *Czech Journal of Animal Science*, 2007, vol. 52, p. 143-148.
- 22) MATEO, R., BEYER, W. N., SPANN, J., HOFFMAN, D., RAMIS, A. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2003, vol. 66, no. 14, p. 1371–1389.

- 23) MATEO, R., TAGGART M. A., GREEN A. J., CRISTOFOL C., RAMIS, A., LEFRANC, H., FIGUEROLA, J., MEHARG, A. A., Altered porphyrin excretion and histopathology of Greylag Geese (*Anser anser*) exposed to soil contaminated with lead and arsenic in the Guadalquivir Marshes, Southwestern Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, vol. 25, no. 1, p. 203–212.
- 24) PAIN, D. J. Lead in waterfowl. In *Beyer, W. M., Heinz, G. H., Redman-Norwood, A. W. (Eds.), Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Boca Raton: Lewis Publisher, 1996, p. 251–262.
- 25) PAIN, D. J., RATTNER, B. A. Mortality and hematology associated with the ingestion of one number four lead shot in mallard ducks, *Anas rubripes*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1988, vol. 40, p. 159–164.
- 26) PAIN, D. J., CARTER, I., SAINSBURY, A. W., SHORE, R. F., EDEN, P., TAGGART, M. A., KONSTANTINOS, S., WALKER, L. A., MEHARG, A. A., RAAB, A. Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Science of the Total Environment*, 2007, vol. 376, no. 1, p. 116–127.
- 27) PASKOVA, V., ADAMOVSKY, O., PIKULA, J., SKOCOVSKA, B., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J., BABICA, P., MARSALEK, B., HILSCHEROVA, K. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Science of the Total Environment*, 2008, vol. 398, p. 34–47.
- 28) PATEE, O. H., WIEMEYER, S. N., MULHERN, B. M., SILEO, L., CARPENTER, J. W. Experimental lead-shot poisoning in bald eagles. *Journal of Wildlife Management*, 1981, vol. 45, p. 806–810.
- 29) PATEE, O. H., PAIN, D. J. Lead in the environment. In *Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Jr., Cairns, J., Jr. (Eds.), Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press Inc., 2003, p. 373–408.

- 30) PETRLOVA, J., MIKELOVA, R., STEJSKAL, K., KLECKEROVA, A., ZITKA, O., PETREK, J., HAVEL, L., ZEHNALÉK, J., ADAM, V., TRNKOVA, L., KIZEK, R. Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-Liquid Chromatography with Coul-Array detection. *Journal of Separation Science*, 2006a, vol. 29, p. 1166-1173.
- 31) PETRLOVA, J., POTESIL, D., MIKELOVA, R., BLASTIK, O., ADAM, V., TRNKOVA, L., JELEN, F., PRUSA, R., KUKACKA, J., KIZEK, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta*, 2006b, vol. 51, p. 5112-5119.
- 32) PFEIFER, I., RICHTER, J., RICHTEROVÁ, S. Olovo a zdraví člověka v historii a současnosti. *Zdravotnictví v České republice*, 1998, roč. 1, č. 3, s. 15-16.
- 33) POTESIL, D., PETRLOVA, J., ADAM, V., VACEK, J., KLEJDUS, B., ZEHNALÉK, J., TRNKOVA, L., HAVEL, L., KIZEK, R. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays L.*) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1084, p. 134-144.
- 34) SAMOUR, J. Toxicology. In *Samour J (Eds), 2008. Avian Medicine*. Edinburgh: Mosby Elsevier, 2008, p. 269–281.
- 35) SCHEUHAMMER, A. M., NORRIS, S. L. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. *Ecotoxicology*, 1996, vol. 5, no. 5, p. 279–295.
- 36) SCHEUHAMMER, A.M., BOND, D. E., BURGESS, N. M., RODRIGUE, J. Lead and stable isotope ratios in soil, earthworms and bones of American woodcock (*Scolopax minor*) from eastern Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, vol. 22, p. 2585–2587.

- 37) SKOCOVSKA, B., HILSCHEROVA, K., BABICA, P., ADAMOVSKY, O., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J., KNOTKOVA, Z., MARSALEK, B., PASKOVA, V., PIKULA, J. Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon*, 2007, vol. 49, no. 6, p. 793–803.
- 38) SVOBODOVÁ, Z., BEZDĚKOVÁ, B., DVOŘÁK, R., DVOŘÁKOVÁ, D., GRÝMOVÁ, V., HAUPTMAN, K., JAHN, P., JEKL, V., JURANOVÁ, R., KNOTEK, Z., KNOTKOVÁ, Z., KONRÁD, J., KROUPOVÁ, H., KULÍKOVÁ, L., LUDVÍKOVÁ, E., MÁCHOVÁ, J., MODRÁ, H., PAVLATA, L., PECHOVÁ, A., PÍZOVÁ, M., SVOBODA, M., SVOBODA, M., SUCHÝ, P., TARAS, L., TITĚRA, D., TUKAČ, V., VESELÝ, V., VRŠKOVÁ, D. *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2008. s. 158–161.
- 39) THOMPSON, L. J. Lead. In *Gupta R. C., eds, Veterinary Toxicology, 1st ed.* New York, 360 Park Avenue South, USA: Academic Press, 2007, p. 438–441.
- 40) VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. s. 101–104.
- 41) VILLEGAS, A., SANCHEZ, J. M., COSTILLO, E., CORBACHO, C. Blood chemistry and haematocrit of the black vulture (*Aegyptius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and Integrative Physiology*, 2002, vol. 132, no. 2, p. 489–497.
- 42) WERNERY, R., ERNERY, U., KINNE, J., SAMOUR, J. *Colour Atlas of Falcon Medicine*. 1st. ed. Hannover: Schlütersche, 2004. 134 p.

Internetové zdroje:

URL 1: ANONYM. Olovo [online]. [cit. 2010-03-21]. Dostupné z:

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Olovo>

URL 2: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:

http://www.zoochleby.cz/zvirata/sup_hnedy.htm

- URL 3: ANONYM. Olovo [online]. [cit. 2010-12-30]. Dostupné z:
<http://www.chpr.szu.cz/monitor/tds00c/7chem/8vysled00/anorg00/PB.pdf>
- URL 4: ANONYM. Olovo a sloučeniny (jako Pb) [online]. [cit. 2010-02-18].
Dostupné z: http://www.irz.cz/latky/olovo_a_sl
- URL 5: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
<http://www.zoozlin.eu/cz/zvirata-a-expozice/zvirata.html?zvire=sup-hnedy>
- URL 6: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
http://cs.wikipedia.org/wiki/Sup_hn%C4%9Bd%C3%BD
- URL 7: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
<http://www.zooliberec.cz/cz/katalog/ptaci/sup-hnedy/186>
- URL 8: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
<http://www.zoodecin.cz/new/cz/?p=clanky/sup-hnedy>
- URL 9: ANONYM. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
<http://www.zoopraha.cz/cs/zvirata/ptaci/sup-hnedy>
- URL 10: ANONYM. Chromatografie [online]. [cit. 2011-01-04]. Dostupné z:
old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
- URL 11: ČERMÁK, V., PISKAČ, P. Olovo [online]. [cit. 2010-04-02]. Dostupné z:
<http://www.piskac.cz/ETD/>
- URL 12: POŘÍZ, J. Sup hnědý [online]. [cit. 2010-08-03]. Dostupné z:
<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8513/>
- URL 13: VLČKOVÁ, E. Dravce zabíjí kořist plná olova [online]. [cit. 2011-01-02].
Dostupné z: <http://www.silvarium.cz/zpravy-z-oboru-myslivost/dravce-zabiji-korist-plna-olova-lidove-noviny>

11 Seznam zkratek, vysvětlivky

ALAD	dehydratáza kyseliny delta–aminolevulové
ALP	alkalická fosfatáza
AST	aspartát aminotransferáza
Ca–EDTA	komplexní sůl vápníku a kyseliny etylendiamintetraoctové (edetové)
CDNB	1–chlor–2,4–dinitrobenzen
CK	kreatinkináza
CNS	centrální nervový systém
Co(NH₃)₆Cl₃	chlorid hexaamminkobaltitý
DTNB	5,5´-dithiobis–2–nitrobenzoové kyseliny
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EEP	Europäisches Erhaltungs Program (česky Evropské programy ohrožených druhů) společný projekt evropských zoologických zahrad na záchranu ohrožených druhů světové fauny
FRAP test	ferric reducing ability of plasma schopnost plazmy redukovat železité ionty celková antioxidační kapacita plasmy
GABA	kyselina gama–aminomáselná

GIT	gastrointestinální trakt
GSH	redukovaný glutathion
GST	glutathion-s-transferáza
GPX	glutathionová peroxidáza
GR	glutathion reduktáza
GSSG	oxidovaný glutathion
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources Červený seznam ohrožených druhů
HCl	kyselina chlorovodíková
HMDE	hanging mercury drop electrode závěsné rtuťové kapkové elektrody
HPLC	high performance liquid chromatography vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDH	laktátdehydrogenáza
LMWA	nízkomolekulární antioxidanty
Mean	průměr
NADPH	redukovaný NADP ⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát)
PBS	fosfátový pufr

per vias naturales latinsky přirozenými cestami

Std. Dev.	Standard Deviation směrodatná odchylka
Std. Err.	Standard Error střední chyba průměru
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances lipidní peroxidace
TCA	kyselina trichloroctová
TPTZ	2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazin
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan
UAC	kyselina močová

12 Příloha

Sup hnědý (*Aegypius monachus*)

Na fotografiích jsou zachyceni supi hnědí ve voliérách Zoologické zahrady hlavního města Prahy.





