

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Posouzení subchronické toxicity směsí pesticidů na raky

Autor: Bc. Anna Hovorková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Alžběta Strouhová

Studijní program a obor: Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: Druhý

České Budějovice, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

Bc. Anna Hovorková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Alžbětě Staré, Ph.D., a také konzultantce Ing. Alžbětě Strouhové za odborné vedení práce, vstřícnost a cenné rady při řešení problematiky tématu této diplomové práce a dále při jejím zpracování. Také bych chtěla poděkovat Ing. Marii Šandové za výpomoc při analytickém zpracování vzorků v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie FROV JU ve Vodňanech.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Anna HOVORKOVÁ
Osobní číslo: V22N008P
Studijní program: N4106 Zemědělská specializace
Studijní obor: Rybářství a ochrana vod
Téma práce: Posouzení subchronické toxicity směsí pesticidů na raky
Zadávací katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Zásady pro vypracování

Pesticidy se dostávají do vodních ekosystémů různými cestami, například povrchovým odtokem, vodní erozí, infiltrací atmosférickou depozicí atd. Z tohoto důvodu se v přírodních vodních ekosystémech vyskytují pesticidy spíše ve formě chemických směsí než jako jednotlivé sloučeniny. Většina studií však hodnotí pouze účinky jednotlivých látek na vodní organismy. Vzhledem k tomu, že tyto chemikálie na sebe vzájemně působí ve složitých systémech a potenciálně mohou měnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, je potřeba se v této souvislosti zaměřit i na mechanismus toxicity směsí pesticidů. Ne pouze mechanismus jednotlivých znečišťujících látek, které nemusí přesně předpovídat složitosti systémů.

Cílem diplomové práce bude posoudit subchronický vliv jednotlivých pesticidů prometrynu a chloridazonu a jejich směsí na raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*).

Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány Laboratoří vodní toxikologie a ichtyopatologie na FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD a ISO pro testy toxicity na zástupcích vodních organismů. Biochemický profil hemolymfy, antioxidační biomarkery a oxidační stres v tkáních raka signálního budou stanoveny dle jednotlivých metod.

Získané výsledky testování rozšíří dosavadní informace o nově poznatky o toxickém vlivu jednotlivých pesticidů, prometrynu, chloridazonu, a jejich směsí na necílové vodní organismy, respektive raky, a budou podkladem pro hodnocení rizik pro životní prostředí (Environmental Risk Assessment).

Rozsah pracovní zprávy: 50-90 stran
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M., 2020. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 29, 1500-1515.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H., Fereidouni, M.S., 2019. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 222, 145-155.
- Chabera, J., Stara, A., Kubec, J., Buric, M., Zuskova, E., Kouba, A., Velisek, J., 2021. The effect of chronic exposure to chloridazon and its degradation product chloridazon-desphenyl on signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111645.
- Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., Jiang, H., 2020. Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 10286-10295.
- Stara, A., Zuskova, E., Vesely, L., Kouba, A., Velisek, J., 2021. Evaluation of single and combined effects of thiacloprid, time and temperature on marbled

crayfish (*Procambarus virginalis*). Chemosphere 273: 128463.

Velíšek, J. a kol., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 2. upravené vydání, 658 s.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Alžběta Stará, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Ing. Alžběta Strouhová**
Fakulta rybářství a ochrany vod

Datum zadání diplomové práce: **6. ledna 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2024**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)
L.S.



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 13. února 2023

Obsah

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Pesticidy a jejich směsi v životním prostředí	10
2.2	Prometryn	11
2.2.1	Vlastnosti látky	12
2.2.2	Mechanismus účinku a toxokinetika	14
2.3	Chloridazon	15
2.3.1	Vlastnosti látky	15
2.3.2	Mechanismus účinku a toxokinetika	17
2.4	Testy toxicity	18
2.5	Nepůvodní akvatické druhy jako modelové organismy	19
2.5.1	Rak signální (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	20
3	MATERIÁL A METODIKA	22
3.1	Subchronický test toxicity	22
3.1.1	Princip, podmínky testu	22
3.1.2	Průběh testu	23
3.2	Odběr vzorků tkání a hemolymfy	24
3.3	Biochemický profil hemolymfy	25
3.4	Analýza biomarkeru oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů	26
3.4.1	Analýza proteinů metodou BCA	26
3.4.2	Analýza lipidní peroxidace (LPO) pomocí testu s TBA	27
3.4.3	Analýza enzymatické aktivity katalázy (CAT)	29
3.4.4	Analýza enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)	30
3.4.5	Analýza aktivity acetylcholinesterázy (AChE)	31
3.4.6	Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)	32
3.4.7	Analýza enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST)	34
3.5	Statistické vyhodnocení	35
4	VÝSLEDKY	36
4.1	Biochemický profil hemolymfy	36
4.1.1	Glukóza (GLU)	36
4.1.2	Proteiny krevní plazmy (TP, ALB, GLOB)	37

4.1.3	Amoniak (NH ₃)	39
4.1.4	Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy (AST, ALT).....	40
4.1.5	Laktát (LAC)	42
4.1.6	Minerály (Mg ²⁺ , Cl ⁻ , K, Na, PHOS).....	43
4.2	Míra oxidačního stresu a analýza antioxidačních biomarkerů	46
4.2.1	Hepatopankreas	46
4.2.2	Sval.....	49
4.2.3	Žábra.....	53
5	DISKUZE.....	57
5.1	Biochemie hemolymfy	57
5.1.1	Glukóza	57
5.1.2	Proteiny krevní plazmy	58
5.1.3	Amoniak	59
5.1.4	Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy	60
5.1.5	Minerály	61
5.1.6	Laktát.....	62
5.2	Oxidační stres a antioxidační biomarkery	63
5.2.1	Lipidní peroxidace.....	64
5.2.2	Antioxidační biomarkery.....	64
6	ZÁVĚR.....	70
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	71
8	SEZNAM ZKRATEK.....	80
9	SEZNAM GRAFŮ, OBRÁZKŮ A TABULEK	82
10	ABSTRAKT	84
11	ABSTRACT	85

1 Úvod

Pesticidy byly v omezené míře používány již od starověku. Jednalo se o přípravky na bázi síry nebo arzenu, které byly v knihách zaznamenány již od 25. století př.n.l. (Costa, 1987). Římané využívali jako rodenticidy dva druhy kýchavice, a to kýchavici bílou (*Veratrum album*) a kýchavici černou (*V. nigrum*). Od 17. století byl jako kontaktní insekticid využíván tabák. Sloučeniny mědi byly známy od raného 18. století pro svoje fungicidní účinky, směs hydratovaného vápna a síranu měďnatého byla poprvé použita ve Francii koncem 18. století. Do třicátých let 20. století byly využívány pesticidy pouze přírodního původu, případně anorganické sloučeniny. Používaly se především sloučeniny arsenu, síra, nikotin, rotenon a sloučeniny rtuti (Costa, 2020).

V roce 1939 švýcarský chemik Paul Mueller objevil insekticidní účinky DDT (dichlordifenyiltrichlorethan), které bylo od uvedení na trh v roce 1942 úspěšně využíváno k tlumení epidemií tyfu a zejména malárie. V následujících letech bylo vyvinuto a komercializováno několik dalších insekticidů na bázi chlorovaných uhlovodíků (lindan, chlordan, aldrin). Ve 20. století byly na trh uvedeny široce využívané pesticidy, např. karbamátové insekticidy, syntetické pyretroidy, tiaziny, parakquat a glyfosát, který se stal celosvětově nejprodávanějším pesticidem vůbec. Desítky herbicidů, fungicidů a rodenticidů byly vyvinuty v posledních desítkách let, řadí se mezi ně například, v poslední době velmi využívaná, skupina neionikotinooidů (Casida, 2015; Casida a Durkin, 2017).

Pesticidy se dají označit jako jediné toxické látky, záměrně vypouštěné ve velkém množství do životního prostředí. Prudký nárůst lidské populace a stále se zmenšující plocha zemědělské půdy dovolují pouze v malé míře omezení využívání pesticidů a přechod k čistě ekologickému zemědělství. Úroveň průmyslu a zemědělství v každé zemi silně ovlivňuje míra jejího rozvoje. Zejména v méně rozvinutých, které nemají silnou legislativu, dochází často k neuváženému a téměř neomezenému používání agrochemikálií na zemědělské půdě. Důsledkem tohoto jednání je narušení abiotických i biotických faktorů, biologických složek půdního i vodního prostředí, s čímž souvisí ohrožování biodiverzity a následná ekologická nerovnováha ekosystémů (Srivastava a kol., 2020).

Vodní prostředí je pesticidy kontaminováno přímo i nepřímo vlivem nesprávné aplikace, likvidace nespoteřovaných zbytků, odpadů z průmyslové výroby pesticidů, domácností nebo vlivem splachů z ošetřených zemědělských ploch (Prousek, 2001; Svobodová a kol., 2008). Výzkum této práce byl zaměřen na sledování účinku prometrynu, selektivního herbicidu ze

skupiny s-triazinů, který byl v minulých letech hojně využíván na ochranu plodin až do svého zákazu v roce 2002 (US EPA, 1996; eAGRI, 2024), a chloridazonu, selektivního herbicidu využívaného dříve k ochraně produkce zejména řepy, dnes zakázaného v ČR od roku 2020 (EFSA, 2007; eAGRI, 2024), a jejich směsi na necílových organismech ve vodním prostředí.

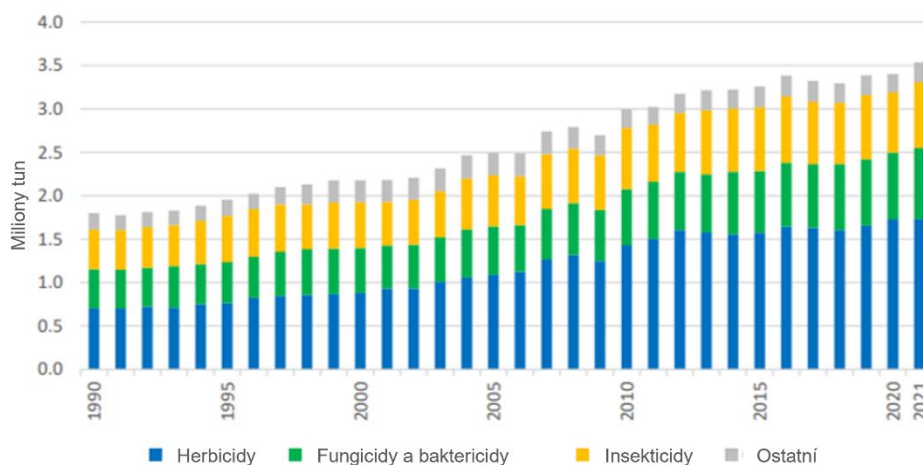
Cílem diplomové práce bylo posoudit subchronický vliv vybraných koncentrací chloridazonu, prometrynu a především jejich směsi na raku signálním (*Pacifastacus leniusculus*) během subchronického testu toxicity. Výsledky stanovení biochemického profilu hemolymfy, biomarkeru oxidačního stresu a analýzy antioxidantů ze vzorků hepatopankreatu, svalstva a žaber sloužily pro posouzení a vyhodnocení vlivu pesticidů a jejich směsi u testovaných jedinců raka signálního. Získané výsledky rozšíří dosavadní množství informací a poznatků o toxickém vlivu jednotlivých pesticidů a jejich směsí na necílové vodní organismy. Získaná data mohou v budoucnu sloužit jako podklady pro hodnocení rizik uvedených látek pro životní prostředí.

2 Literární přehled

2.1 Pesticidy a jejich směsi v životním prostředí

Agrochemikálie umožnily v minulém století více než zdvojnásobit produkci potravin. Současná potřeba zvýšit produkci potravin, aby se nasýtila rychle rostoucí lidská populace, udržuje tlak na intenzivní používání pesticidů a hnojiv. Pesticidy jsou klíčovým zemědělským prostředkem nutným k ochraně osiva a plodin před nežádoucími vlivy. Řadí se mezi ně ochrana před plevele, hmyzem, bakteriemi, houbami a hlodavci. Současně se však, s jejich zvyšující se spotřebou v zemědělství, silněji projevují jejich negativní vlivy a dopady na zdraví a životní prostředí v důsledku kontaminace půdy, vody, necílových rostlin a živočichů pesticidy nebo jejich metabolity. Další alarmující skutečností, kterou je zapotřebí brát v úvahu, je vytváření směsí z pesticidů a metabolitů pesticidů v postiženém životním prostředí, které mohou mít na prostředí mnohem silnější a horší vliv, v porovnání s pesticidy působícími na prostředí samostatně. Vzhledem k provázanosti jednotlivých prvků ekosystémů dochází vlivem působení pesticidů i jejich metabolitů a směsí ke snižování biologické variability a k poškozování organismů, včetně člověka (Carvalho, 2017; FAO, 2023).

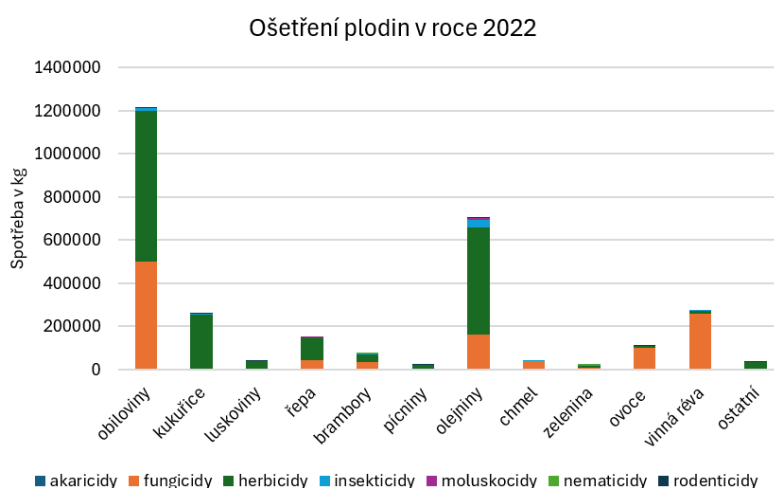
V grafu č. 1 je zobrazeno globální využití pesticidů podle jejich kategorií. Celková spotřeba pesticidů v zemědělství v roce 2021 činila 3,54 milionů tun účinných látek. Jedná se o 4% nárůst oproti roku 2020 a o 11% nárůst během deseti let. V porovnání od roku 1990 došlo, globálně, ke zdvojnásobení aplikace pesticidů. Ve srovnání posledního desetiletí s 90. lety 20. století se celosvětové využívání pesticidů zvýšilo, o 44 % v případě insekticidů, o 53 % v případě herbicidů, o 111 % v rámci baktericidů a fungicidů (FAO, 2023).



Graf č. 1: Celosvětová spotřeba pesticidů podle kategorie (FAO, 2023).

V Evropě byla spotřeba pesticidů v roce 2021 505 tisíc tun. Od roku 1990 došlo ke zvýšení využívání pesticidů pouze o 1 %. V posledních desetiletích dochází spíše k opačnému trendu a k pozvolnému snižování spotřeby pesticidů. Je to způsobeno přísnou evropskou společnou zemědělskou politikou, která používání pesticidů důkladně monitoruje a kontroluje. Použití pesticidů na plochu obdělávané půdy v roce 2021 bylo pro Evropu v průměru 1,75 kg.ha⁻¹, což se řadí pod světový průměr (FAO, 2023).

Spotřeba účinných látek v České republice za rok 2022 na zemědělské půdě představovala 3,72 milionů kilogramů. Z toho 2,94 milionů kilogramů představovaly pesticidy. Nejvýznamněji byly využívány herbicidy (1,74 mil. kg), fungicidy (1,15 mil. kg) a insekticidy (56 tis. kg). K nejvíce ošetřovaným plodinám pesticidy se v roce 2022 řadily obiloviny, olejniný a vinná réva viz graf č. 2 (ÚKZÚZ, 2023).



Graf č. 2: Ošetření plodin v České republice v roce 2022 podle kategorie pesticidů (ÚKZÚZ, 2023).

2.2 Prometryn

Prometryn se řadí do skupiny triazinových herbicidů. Triaziny patří mezi nejstarší selektivní herbicidy, jejichž účinky v roce 1952 objevil J. R. Geiry. Ve druhé polovině 20. století šlo o celosvětově nejpoužívanější herbicidy, zejména pro svou předpokládanou nízkou toxicitu pro necílové organismy a relativně nízkou perzistenci v životním prostředí. Postupem let byly nashromážděny významné důkazy o kontaminaci podzemních vod s-triaziny (symetrické triaziny) společně s dalšími informacemi o jejich toxických vlastnostech. To vedlo k omezení jejich používání, a nakonec téměř k jejich úplnému zákazu. V České republice byly přípravky obsahující prometryn zakázány uvádět na trh a používat od roku 2002. Evropská unie rozhodla o úplném zákazu používání prometrynu v roce 2004 (Zhou a kol., 2012; Đikić, 2014;

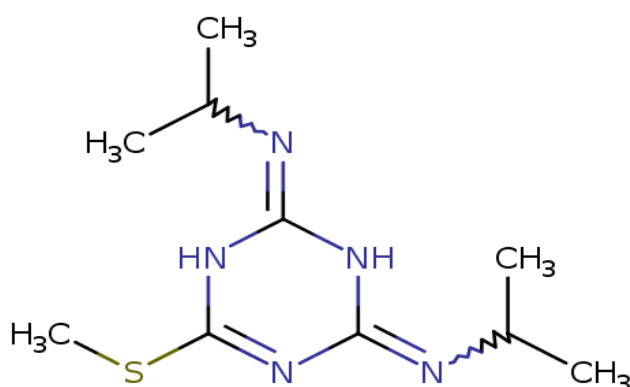
eAGRI, 2024). V současnosti je stále možné využívání některých pesticidních přípravků obsahujících jiné triazinové herbicidy, kterým je například metribuzin (eAGRI, 2024).

Triaziny jsou typické svou heterocyklickou strukturou složenou z uhlíku a dusíku. Prometryn se specificky řadí mezi s-triaziny, přesněji do chemické třídy sírou substituovaných nebo thiomethylových herbicidů nebo do skupiny thio-s-triazinů. Syntetizace prometrynu probíhá postupnými N-alkalacemi kyseliny kyanurové s přidáním thiomethylové skupiny merkaptanu. (Pauli a kol, 1990; Đikić, 2014).

V zemědělství byl prometryn využíván jako pre- a postemergentní herbicid s aplikací 0,5–3,5 kg.ha⁻¹ k hubení jednoletých širokolistých a travních plevelů v plodinách jako je kukuřice, podzemnice olejná, brambory, sója, rýže a mnoho dalších. Prometryn disponuje značnou kontaktní aktivitou s cílovými plevely. Semena a kořeny nebyly v rámci běžných dávek ošetření zasaženy (US EPA, 1996; Đikić, 2014).

2.2.1 Vlastnosti látky

Prometryn, neboli diamino-1, 3, 5-triazin je N,N'-di (propan-2-yl)-1, 3, 5-triazin-2, 4-diamin substituovaný methylsulfandiolovou skupinou v poloze 6 (obrázek č. 1), je organická sloučenina patřící do skupiny methylthio-s-triazinů, které představují aromatické sloučeniny obsahující 1, 3, 5-triazinový kruh substituovaný methylthio skupinou v poloze 2 (ChEBI, 2014b; T3DB, 2014b). Jeho sumární vzorec je C₁₀H₁₉N₅S (Pubchem, 2021b).



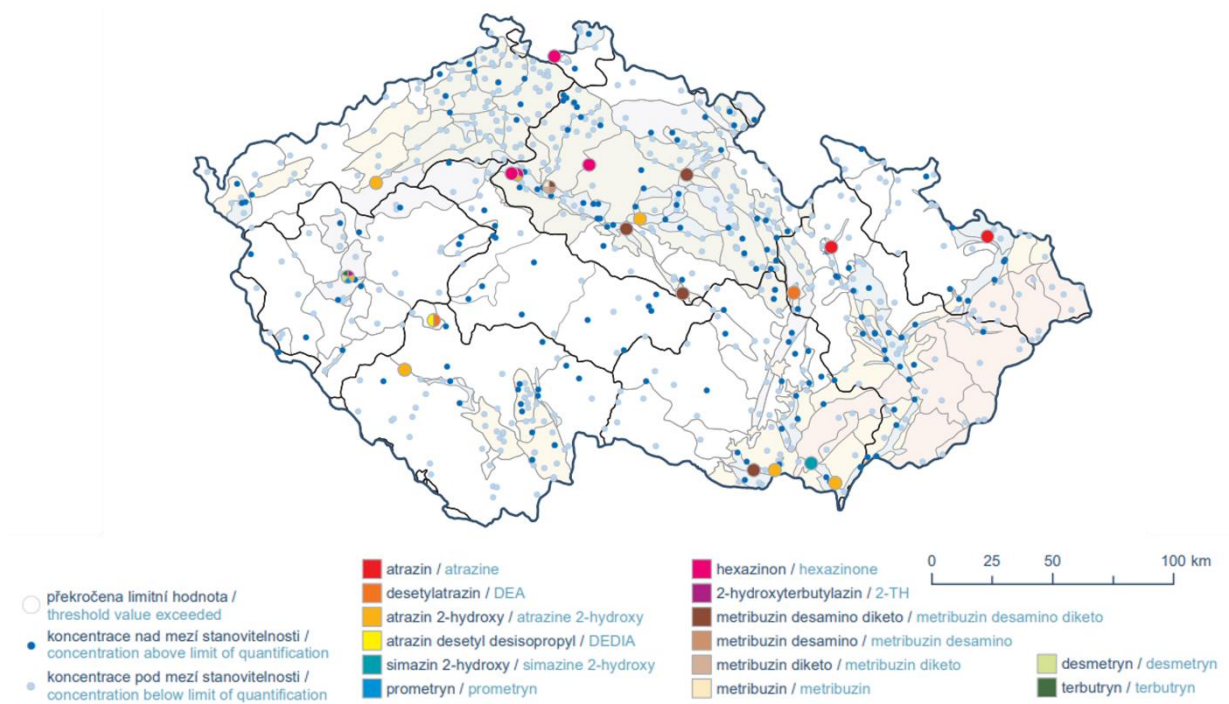
Obrázek č. 1: Struktura prometrynu (T3DB, 2014b).

Prometryn je bílá krystalická látka bez zápachu nebo s velmi slabým zápachem o molekulové hmotnosti $241,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bod tání se pohybuje v rozmezí $118\text{--}120 \text{ }^\circ\text{C}$, pH nasyceného roztoku prometrynu má při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hodnotu 6,7. Prometryn je snadno rozpustný v organických rozpouštědlech, mezi které se řadí aceton, dichlormethan, methanol, oktanol a toluen (US EPA, 1996; Bradley a kol., 2014).

Mobilita prometrynu v půdě je po aplikaci mírně až velmi vysoká. Odpařování z vlhkých půd je dle Henryho konstanty významně větší než u půd suchých. Koeficient adsorpce v půdě pozitivně koreluje s kombinací obsahu organické hmoty, pH, nasycením sorpčního komplexu a salinitou, tento koeficient (K_{OC}) se pohybuje při pH 7 v rozmezí $300\text{--}400 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a s nižším pH stoupá. V půdě se prometryn váže jak na huminové a organické látky, tak i na jílové částice. Po aplikaci zůstává herbicid nejčastěji ve svrchních 30 cm ošetřené půdy, zde je jeho abiotická degradace v aerobních podmínkách až 274 dní, v anaerobních podmínkách to může být až 316 dní. Rozpadu sloučeniny prometrynu významně napomáhá přítomnost půdních mikroorganismů, zvláště půdních bakterií, které jsou zodpovědné za oxidaci prometrynu na sulfoxid a sulfon a dále za N-dealkylaci, která zanechává nerozpuštěný triazinový kruh, který se dále rozpadá jinými procesy (fotolýza, hydrolýza atd.). Degradními produkty v půdě jsou hydroxy-propazin, 2, 4-bis (isopropylamino)-6-hydroxy-S-triazin a 2-methylthio-4-amino-6-isopropylamino-S-triazin (US EPA, 1996; Đikić, 2014).

Prometryn ve vodním prostředí disponuje nízkou rozpustností, jelikož s vodou tvoří slabou bázi. Průměrný poločas hydrolýzy ve vodě je 28 dní, v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech vody, pH a obsahu organických složek může v různých oblastech přetrvávat až 70 dní, kdy se pomaleji rozpadá v alkalickém prostředí. Obvykle je sloučenina při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ stabilní vůči hydrolýze v neutrální, mírně kyselé nebo zásadité vodě. Ve vodě se může ochotně vázat na suspendované organické částice nebo sediment (Đikić, 2014).

Dálkově se prometryn přenáší podzemní vodou, řekami a vzduchem. Je kontaminantem ovzduší, v podobě par a mikročástic, v blízkosti aplikace herbicidu nebo jeho výroby. Jeho částice se však ve vzduchu rozkládají, jelikož absorbují vlnové záření o délce $> 290\text{nm}$ a tím jsou fotodegradibilní. V České republice se hladina prometrynu, v nemodifikované formě, v podzemních vodách v poslední době snižuje (obrázek č. 2), i přes to je zde významné potenciální ohrožení podzemních vod jeho metabolity (Đikić, 2014; Barešová a kol., 2023; ČHMÚ, 2023). V evropských povrchových vodách se prometryn běžně zjišťuje v koncentracích od $0,01$ až do $4,40 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ dokonce i několik let po zákazu (Vryzas a kol., 2011; Caquet a kol., 2012; ČHMÚ, 2024).



Obrázek č. 2: Triazinové a triazinonové herbicidy v podzemních vodách v roce 2022 (ČHMÚ, 2023).

Prometryn je mírně toxický pro studeno i teplomilné ryby a vodní bezobratlé při akutním i chronickém působení. Je však vysoce toxický pro vodní rostliny a řasy. Zjištěné výsledky testů toxicity stanovily akutní toxicitu prometrynu pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) na 2,5–2,9 mg.l⁻¹ 96hLC50, kapra obecného (*Cyprinus carpio*) 8–9 mg.l⁻¹ 96hLC50. Hodnoty akutní toxicity (48hEC50) pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) byly stanoveny na 18,59 mg.l⁻¹, chronický test toxicity stanovil NOEC hodnotu na 1 mg.l⁻¹ a LOEC 2 mg.l⁻¹. Test inhibice růstu testovaných druhů vodních rostlin a řas stanovil hodnoty 96hEC50 u *Chlorella vulgaris* na 53,6 µg.l⁻¹, u okřešku hrbatého (*Lemna gibba*) 11,8 µg.l⁻¹ a pro *Anabaena flos-aquae* 40,1 µg.l⁻¹ (Popova, 1976; Worthing a Walker, 1987; US EPA, 1996; Ma a kol., 2002).

2.2.2 Mechanismus účinku a toxokinetika

V cílových rostlinách prometryn inhibuje přenos elektronů na receptorovém místě fotosystému II při Hillově reakci v průběhu fotosyntézy a oxidační fosforylaci. Prometryn také ovlivňuje metabolismus sacharidů a může tak způsobit nižší koncentraci cukru v ošetřených rostlinách. U zasažených rostlin herbicidem se nejprve objevují žluté okraje listů a chloróza, ta dále přechází v hnědnutí špiček listů, jejich nekróze až odumírání. Přesné mechanismy nejsou známy, u necílových organismů (zvířata, lidé), ale pravděpodobně ovlivňují kyselinu trikarboxilovou a mohou být důsledkem inhibice oxidační fosforylace (ACGIH, 1986; Đikić, 2014).

V případě prometrynu byla maximální koncentrace v krvi exponovaných zvířat (potkan, myš) zjištěna během 1 hodiny od perorálního požití. V porovnání s aplikovanou dávkou prometrynu je jeho množství v těle relativně nízké. Pouze 1,2–1,9 % z původní dávky je distribuováno krví a po 1–2 hodinách klesá. Během prvních 4–8 hodinách je prometryn extenzivně metabolizován. V průběhu 48 hodin je 90–98 % orálně podaného prometrynu vyloučeno močí (46,5–53,3 %) nebo stolicí (33,1–45,5 %), kdy pouze 2 % představují mateřskou látku a zbytek jsou produkty biotransformace. Při testech na myších bylo zjištěno rychlejší vylučování u samic oproti samcům. Při testech na potkanech bylo detekováno v produktech vylučování přibližně 30 metabolitů v průběhu 48–72 hodin. Přibližně 0,4–0,6 % z aplikované dávky je možné detekovat v tkáních (tuková tkáň > svaly > ledviny > játra) v podobě krátkodobé depozice do 7 dnů.

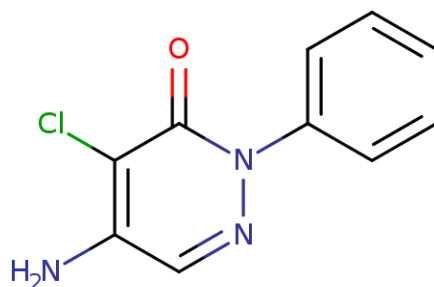
Fáze I zahrnuje flavin adenindinukleotid a cytochrom P-450 monooxygenázu v procesech N-demethylace, S-oxidace, S-S dimerizace a substituce OH skupiny s NH₂ a SCH₃. Do fáze II spadá konjugace s glutathionem a kyselinou glukuronovou. Většina prometrynu je vylučována močí ve formě kyseliny merkapturové (konjugáty s cysteinem) (Đikić, 2014).

2.3 Chloridazon

Chloridazon se řadí mezi selektivní herbicidy ze skupiny derivátů pyridazonů. Poprvé byl uveden na trh společností BASF v 60. letech 20. století (T3DB, 2014a). Chloridazon se využíval zejména při pěstování řepy (cukrová, krmná, červená řepa, mangold) a k hubení širokolistých jednoletých plevelů. Aplikace pomocí postřikovačů byla určena pro předpěstební, preemergentní a časně postemergentní použití. V komerčním využití byl chloridazon také využíván pro ošetření okrasných rostlin včetně cibulovin, růží a školkařských výpěstků v severních státech Evropy. V České republice došlo k ukončení uvádění přípravků obsahujících chloridazon v roce 2019, úplné používání bylo zakázáno od poloviny roku 2020 (US EPA, 2005; EFSA, 2007; T3DB, 2014a; eAGRI, 2024).

2.3.1 Vlastnosti látky

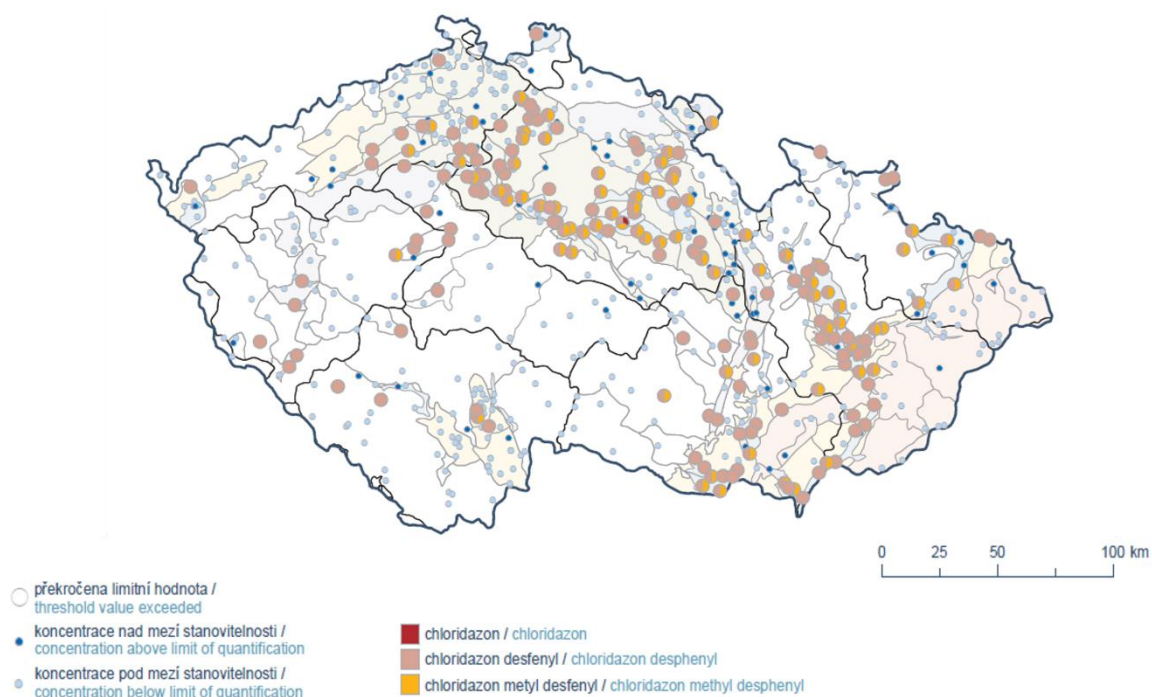
Chloridazon, 5-amino-4-chloro-2-fenylpyridazin-3-on, představuje organickou sloučeninu ze třídy pyridazinonů, které obsahují pyridazinový kruh nesoucí keton se sumárním vzorcem C₁₀H₈ClN₃O. Jedná se o pyridazin-3-(2H)-on se substituovanou aminoskupinou v poloze 5, chloroskupinou v poloze 4 a fenylovou skupinou v poloze 2 (obrázek č. 3) (ChEBI, 2014a; PubChem, 2021a).



Obrázek č. 3: Struktura chloridazonu (T3DB, 2014a).

Jedná se o chemickou sloučeninu pevného skupenství bez barvy a zápachu o molekulové hmotnosti $221,643 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bod tání se pohybuje v rozmezí $198\text{--}202 \text{ }^\circ\text{C}$. Poločas rozpadu závisí na typu půdy. Poločas fotolýzy byl stanoven na 69 dní, poločas aerobního metabolismu v půdě na $90\text{--}152$ dní a poločas anaerobního metabolismu na $307\text{--}607$ dní v závislosti na typu půdy. Hodnoty K_{OC} se pohybují v rozmezí 89 až $340 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$, což vypovídá o mobilitě této látky v půdě. Hlavním způsobem rozkladu chloridazonu v půdě je fotolýza. Herbicid je stabilní vůči hydrolýze při pH 5; 7 a 9 (Tomlin, 2004; US EPA, 2005).

Na základě charakteristik má chloridazon vysoký potenciál přenosu do povrchových i podzemních vod, kde může způsobit kontaminaci vodních zdrojů, zejména v oblastech s přetrvávajícím výskytem tohoto herbicidu (US EPA, 2005). Hlavní riziko v tomto ohledu představují metabolity chloridazonu: chloridazon desfenyl a chloridazon methyl-desfenyl. Tyto metabolity vykazovaly výskyt nad mezí stanovitelnosti u více než 40 % měřených profilů povrchových vod a byly monitorovány na více než 250 profilech společně s dalšími metabolity, jako jsou terbuthylazin 2-hydroxy a atrazin 2-hydroxy na území ČR. Nejvýrazněji se tyto metabolity také projevovaly v počtu zjištěných nadlimitních koncentracích v podzemních vodách, to má vysoký dopad na kvalitu podzemních vod jakožto zdrojů pitné vody (obrázek č. 4) (Barešová a kol., 2023; ČHMÚ, 2023). Koncentrace chloridazonu zjištěné v povrchových vodách Evropy se pohybují v rozmezí $7,4 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ až $3,50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Hintze a kol., 2020; Yan a kol., 2021; ČHMÚ, 2024).



Obrázek č. 4: Chloridazon a jeho metabolity v podzemních vodách v roce 2022 (ČHMÚ, 2023).

K nejcitlivější skupině vodních organismů, reagujících na přítomnost chloridazinu, se řadí řasy ($72\text{hEC}_{50} = 0,174\text{--}0,57 \mu\text{l.l}^{-1}$) a vodní rostliny – okřehek hrbatý ($96\text{EC}_{50} = 4,6 \mu\text{l.l}^{-1}$). Na základě akutní toxicity pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) ($96\text{hLC}_{50} = >32, <46 \text{mg.l}^{-1}$) a pro slunečnici pestrou (*Lepomis gibbosus*) ($96\text{hLC}_{50} = 88,7 \text{mg.l}^{-1}$) byl chloridazon klasifikován jako mírně toxický pro sladkovodní ryby (US EPA, 1991a, b, c, d, 2007).

2.3.2 Mechanismus účinku a toxokinetika

Hlavním mechanismem účinku je inhibice fotosyntézy pomocí blokace elektronů ve fotosystému II a Hillovi reakce. Látka se rychle vstřebává přes kořeny rostlin s akropetální translokací do všech částí rostlin (US EPA, 2005; T3DB, 2014a). Dále způsobuje inhibici biosyntézy karotenoidů, fotodestrukci chlorofilu A, a brání interferenci se zabudováním polárních lipidů do membrán chloroplastů. Odolné rostliny, mezi které se řadí řepa, jsou schopné přeměnit primární sloučeninu na méně toxické metabolity v listech. Citlivější druhy (proso, rajčata) této přeměny nejsou schopny (US EPA, 2007).

Absorpce chloridazonu je z gastrointestinálního traktu velmi rychlá, více jak 80 % se vylučuje močí během 24 hodin. Maximální plazmatické hladiny je dosaženo během 1 hodiny. Nejvyšší množství látky se objevuje v srdci, nadledvinách a gastrointestinálním traktu, potenciál pro bioakumulaci nebyl u této látky zjištěn. K vyloučení chloridazonu dochází

zejména močí (85–90 %) a stolicí (7–26 %), které souvisejí s vylučováním žluči. Poločas rozpadu se pohybuje mezi 16–49 hodinami. Metabolismus chloridazonu spočívá v oxidačních mechanismech, kterými jsou hydroxylace a konjugace, za vzniku nejméně 9 metabolitů v moči a některé z nich také ve stolici a žluči. Mateřská sloučenina se v moči a stolici vyskytuje pouze v malém množství (EFSA, 2007).

2.4 Testy toxicity

Testy toxicity jsou nedílnou součástí veškerých oborů toxikologie. Mezi hlavní cíle, kromě zjišťování akutní a chronické toxicity, náleží také zkoumání její míry a charakteru, pochopení mechanismů působení a vztahů mezi strukturou látek, enzymatickou výbavou živého organismu a toxickými účinky. Důležité poznatky o studovaných látkách jsou získávány systematickým experimentálním výzkumem. Způsob provádění testů toxicity podléhá četným, často se měnícím legislativním předpisům, společně s nutností dodržování závazných standardizovaných postupů pro testování a následné vyhodnocování výsledků. K základnímu rozdělení testů toxicity náleží kategorizace testů podle délky trvání vystavení organismu sledované látce. Testy toxicity lze na základě tohoto parametru rozdělit na akutní, subchronické a chronické (Linhart, 2014).

Prvním krokem ke zjištění toxicity látky je provedení akutního testu toxicity. Hlavním cílem je zjištění závislosti mezi dávkou a akutním účinkem testované látky. Akutní testy toxicity zajišťují získávání kvantitativních údajů o řadě toxických projevů. Nejčastěji je zjišťován letální účinek (mortalita). Vyjadřuje se jako medián letální dávky (LD50). Tento koncept byl zaveden již v roce 1927 původně pro testování silně toxických léčiv nebo bakteriálních toxinů (Trevan, 1927). Hodnota LD50 vyjadřuje dávku určité látky, která po jednorázovém podání usmrtí 50 % testovaných organismů. Zjištěné hodnoty představují vodítko, které napomáhá klasifikovat látky podle míry akutní toxicity (Linhart, 2014).

Akutní testy toxicity poskytují informace o charakteru a míře působení látek na organismus nebo jednotlivé orgány, k posouzení dlouhodobého vystavení organismu toxické látce jsou však nedostačující. Dlouhodobé testování účinků látek je velmi náročné, proto je nutné před rozhodnutím o provedení chronického testování látek získat předběžné informace z relativně krátkodobých, méně náročných testů. Jedná se o provedení subchronických testů sloužících ke zjištění dávkové závislosti opakované expozice škodlivým látkám a charakteru jejich působení na cílové organismy. Doba vystavení sledovaných látek vůči organismům bývá v rozmezí 14 až 90 dnů. Během experimentu se vyhodnocuje řada toxických odpovědí. K základnímu

nespecifickému ukazateli toxicity náleží úbytek tělesné hmotnosti nebo snížení přírůstku oproti kontrolní skupině. Dále jsou sledovány specifické biochemické parametry diagnostikující funkční poruchy, řadí se k nim hematologické parametry, obsah biologicky významných iontů v séru, jejich rovnováha a aktivita enzymů v séru nebo plazmě. Subchronické testy v některých případech postačují k posouzení rizika účinků dlouhodobých nízkých dávek na exponované skupiny organismů nebo slouží jako východisko pro volbu dávek a experimentálních podmínek v chronických studiích. Díky své menší náročnosti na provedení umožňují subchronické testy toxicity sledovat mnohem širší spektrum parametrů a účinků. Mají nezastupitelnou roli v rámci posuzování bezpečnosti léčiv, pesticidů, potravinových aditiv a dalších chemických látek (Wilson a kol., 2008; Linhart, 2014).

Pokud je jednorázová dávka konkrétní látky rozložena na několik dílčích dávek tak, že celkové absorbované množství zůstane zachováno, účinek látky se zpravidla zmenší nebo vymizí úplně. To je dáno koncentrací látky, která nedosáhla hladiny způsobující akutní poškození v cílovém organismu. Situace se mění v případech chronického působení. Zde může být účinek kumulován, takže při stejné celkové dávce může dojít rozložením do delšího časového intervalu ke zvýšení účinku látky. Oproti subchronickým testům toxicity se odlišují pouze delší dobou trvání testů. Ve většině případů jsou při nich organismům podávány opakované dávky testované látky po celou dobu dospělého života. Způsob dávkování je zpravidla volen podle nejpravděpodobnější cesty vstupu testované látky v prostředí. Dávkování vychází z maximální tolerované dávky (MTD), představující dávku, která při 90denním subchronickém testu vyvolala slabý, ale měřitelný pokles hmotnosti. Tím je zajištěno, že při chronickém experimentu bude mít látka výrazný účinek, ale nepovede k vysoké úmrtnosti organismů během provedení testu. Další testované dávkové hladiny představují nejčastěji zlomky MTD (Linhart, 2014).

2.5 Nepůvodní akvatické druhy jako modelové organismy

Vodní organismy se v metodikách testů toxicity řadí mezi nejčastěji používané druhy. Jedná se především o ryby, korýše, měkkýše, vodní rostliny, řasy a bakterie (Kočí a Mocová, 2009; Velíšek a kol., 2018). Výhodou využití testů toxicity na vodních bezobratlých organismech je jednodušší legislativní cesta k povolení provádění testů toxicity na vybraných organismech v porovnání s prováděním testů toxicity na obratlovcích. V případě využití velkých korýšů (raků), je možné testy provádět pouze na nepůvodních druzích, jelikož původní druhy raků v České republice jsou legislativně považovány za kriticky ohrožené (Velíšek a kol., 2018).

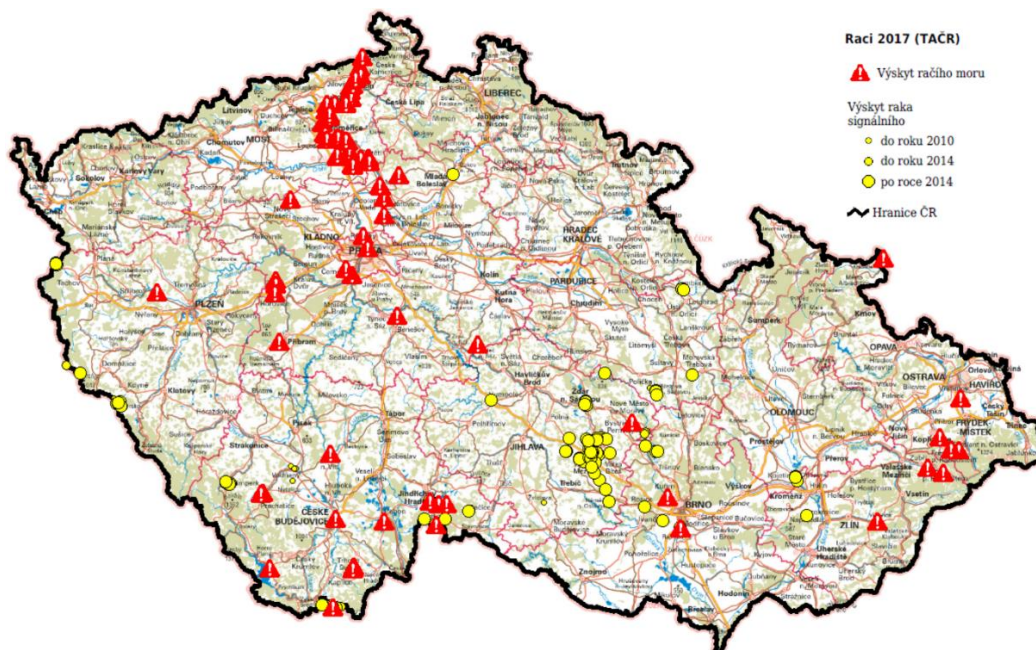
2.5.1 Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)

Rak signální představuje zástupce jednoho z největších druhů raků. Tento druh disponuje značnou velikostí těla (12–16 cm), korelující s hmotností (200–250 g) a dále je u tohoto druhu odhadována dlouhověkost jedinců i více jak 20 let (Kozák a kol., 2013).

Tělo raka bývá zbarveno od světlých po tmavé odstíny hnědé, někdy červenohnědé, můžeme se ale setkat i s modrým zbarvením. Hlavohruď je hladká, na bocích bez trnů. Přítomny jsou dva páry postorbitálních lišt, rostrum je středně dlouhé s hladkými rovnoběžnými okraji. Klepeta jsou zejména u samců mohutná, povrch je hladký a na spodní straně jsou sytě červená. Nepohyblivý prst klepete je opatřen dvěma vzdálenými výrůstky, mezi kterými se nachází mělká prohlubeň. Pro druh je specifická bílá až tyrkysově modrá skvrna na kloubu svrchní strany klepet (Holdich a kol., 2006, Pöckl, 2006).

Původním místem výskytu tohoto druhu je areál mezi Tichým oceánem a Skalistými horami na území Severní Ameriky (Taylor a kol., 2007). Dále je rak signální široce rozšířen v Evropě, kde byl jednoznačně prokázán jeho vliv na populace původních druhů raků, jelikož se jedná o přenašeče račího moru (Lilley a kol., 1997; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll, 1999; Kozubíková a kol., 2010). První dovoz raka signálního, původně pocházejícího z Kalifornie, do Evropy proběhl v roce 1959. Jednalo se o dovoz malého počtu jedinců do Švédska, které chtělo vysazením tohoto druhu posílit počty populací raků, jelikož rak signální je svými ekologickými nároky velmi podobný původnímu druhu, kterým je rak říční (*Astacus astacus*) (Brick, 1977; Svårdson, 1995). Dlouholeté vysazování tohoto druhu do evropských vod, ať už záměrných nebo v důsledku úniků a samovolným šířením, se rak signální stal jedním z nejrozšířenějších druhů raka v Evropě. Nejsilnější populace se vyskytují ve Švédsku, Finsku a Anglii (Spitzzy, 1973; Westman, 1973a,b; Hogger, 1986; Holdich a kol., 2006, 2009).

První dovoz rácat raka signálního do Československa byl uskutečněn v roce 1980 ze Švédska, jednalo se o 1000 kusů tohoto druhu za účelem produkce tržních raků (Policar a Kozák, 2000). Od prvního vysazení raka signálního do rybníků v okolí Velkého Meziříčí je výskyt tohoto druhu znám i v okolí Litomyšle, Kroměříže, Brna, Jindřichova Hradce, Vodňan, Domažlic a další lokality výskytu nadále narůstají, jelikož se potvrzují informace i o jeho výskytu v tekoucích vodách, kde je schopný tvořit početné populace (Policar a Kozák, 2000; Filipová a kol., 2006; Štambergová a Kučera 2009; Štambergová a kol., 2009). Současný výskyt raka signálního na území České republiky je zobrazen na obrázku č. 5 (VÚV TGM, 2020).



Obrázek č. 5: Výskyt raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) v České republice (VÚV TGM, 2020).

Rak signální pohlavně dospívá ve třech až čtyřech letech (60–90 mm), samci obvykle o rok dříve než samice (Abrahamsson, 1971; Kirjavainen a Westman, 1995, 1999). Páření tohoto druhu probíhá na podzim, u většiny jedinců v říjnu (Abrahamsson, 1971; Söderbäck, 1995). Průměrná pleopodální plodnost druhu je 100 až 400 vajíček o velikosti 2,3 až 3 mm, které se v průběhu vývoje zvětšují (Mason, 1978; Savolainen a kol., 1996; Kirjavainen a Westman 1999; Kouba, 2007). Období líhnutí lze pozorovat v závislosti na teplotě od konce března do konce července (Abrahamsson a Goldman, 1970; McGriff, 1983).

U raka signálního je známa protiproudová i poproudová migrace, rychlost kolonizace je však poměrně nízká (Bubb a kol., 2004). Tento druh je dále známý svým budováním nor, kterými může přispívat k erozi břehů, zanášení nižších poloh zasažených toků sedimentem a změně morfologie toku (Kozák a kol., 2013).

3 Materiál a metodika

3.1 Subchronický test toxicity

Subchronický test toxicity na racích byl proveden v akvariijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH Vodňany. Odběr vzorků, analýzy tkání a hemolymfy byly provedeny v zázemí stejnojmenné laboratoře.

Pro subchronický test toxicity byl vybrán jako modelový organismus rak signální (obrázek č. 6). Tento druh je z pohledu české legislativy brán jako nepůvodní až invazní. Jedinci pocházeli z chovu Laboratoře sladkovodních ekosystémů FROV, VÚRH Vodňany. Celkově bylo do testu nasazeno 204 raků. Průměrná délka hlavohruď byla u raků $31,62 \pm 4,04$ mm, délka hlavohruď byla změřena od špičky rostra po konec hlavohruď. Průměrná hmotnost jednoho jedince byla $10,04 \pm 3,95$ g.



Obrázek č. 6: Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*).

3.1.1 Princip, podmínky testu

Subchronický test toxicity byl proveden na základě upravení podmínek pro chronický test toxicity na racích. Princip testu spočíval ve vystavení testovaných jedinců raka signálního po dobu 20 dnů vybraným koncentracím sledovaných pesticidů a jejich směsi, které nebyly pro raky letální. Po 20denním testování následovalo přenesení exponovaných raků do čisté vody,

kde proběhla 10denní depurace. Celkově byly testovány 4 skupiny ve 3 opakováních včetně kontroly. Kontrolní skupina byla společná pro obě látky i jejich směs.

Kontrola stavu jedinců probíhala každý den v rámci krmení raků suchým peletovým krmivem (Sera crabs natural, Německo) *ad libitum*. Světelný režim byl pro test nastaven na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Denně byla zaznamenávána případná mortalita, chování raků a jiné změny v průběhu testu. Výměna lázně byla provedena každý druhý den společně s měřením fyzikálně-chemických vlastností vody (pH, teplota, obsah O₂) před a po výměně lázně. Odběry vzorků tkání proběhly po 10 a 20 dnech v koncentraci pesticidu nebo směsi, dále byl proveden odběr po následovné 10denní depuraci.

3.1.2 Průběh testu

Raci byly umístěni v akváriích s objemem lázně 20 litrů. Do každého akvária bylo nasazeno 17 jedinců, tj. 51 jedinců pro každou testovanou skupinu. Do akvárií byly vloženy plastové úkryty, které zabraňovaly kanibalismu (obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: Akvária s plastovými úkryty.

V testu byly použity analytické standardy pesticidů prometrynu (čistota 99,3 %) a chloridazonu (čistota 99,8 %) od firmy Sigma Aldich, CZ. Pesticidy byly testovány v jedné koncentraci, která je blízká environmentálním hodnotám detekovaným v povrchových vodách (viz. kap. 2.2.1, 2.3.1). Dále byla z obou látek ve stejné koncentraci vytvořena směs. Zvolené koncentrace pesticidů a jejich směsi společně se značením testovaných skupin jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Naměřená průměrná teplota vody v akváriích během testu byla $17,02 \pm 1,88$ °C, hodnoty pH byly $7,36 \pm 0,26$, a obsah kyslíku byl $89,02 \pm 3,91$ %. Během celého testu byla koncentrace kyslíku ve vodě vyšší než 60 % a teplota se pohybovala ve vhodném rozmezí. Mortalita v kontrolním akváriu nepřesáhla 10 % a koncentrace pesticidů v lázni neklesla pod 80 %. V průběhu testu byla dodržena kritéria podmiňující správnost výsledků, a proto lze výsledky považovat za validní.

Tabulka č. 1: Koncentrace pesticidů a jejich směsi.

Testovaná látka	Označení	Koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
Kontrola - K	K1/K2/K3	0
Prometryn - P	P1/P2/P3	3,0
Chloridazon - C	C1/C2/C3	3,0
Směs - S (P+C)	S1/S2/S3	3,0 + 3,0

3.2 Odběr vzorků tkání a hemolymfy

V průběhu testu byly provedeny 3 odběry tkání a hemolymfy. První odběr se uskutečnil po 10 dnech expozice. Další odběr byl proveden po 20 dnech expozice. Poslední odběr byl proveden po 10 dnech depurace v čisté vodě, bez obsahu testovaných pesticidů. Z každé skupiny bylo pro každý odběr vybráno 6 jedinců (2 kusy z každého akvária), kteří byli nejprve změřeni a zváženi. Anestezie raků proběhla umístěním na šupinkový led, který způsobil jejich podchlazení. Nejprve byla odebrána hemolymfa pomocí injekční stříkačky ošetřené roztokem heparinu sodného (Heparin inj., Laciva, ČR) o objemu 0,1 ml na 1 ml hemolymfy, která byla zavedena do těla skrze rozhraní hlavohrudí a zadečku směrem k bázi klepete. Následně byly rakům odebrány tkáně hepatopankreatu, svalů a žaber (obrázek č. 8) pomocí pitevní soupravy. Vzorky hemolymfy a tkání byly uloženy v označených zkumavkách a zamrazeny v kryoboxech na -80 °C.



Obrázek č. 8: Odebrané vzorky tkání.

3.3 Biochemický profil hemolymfy

Odebrané vzorky hemolymfy byly rozmraženy na ledu. Následně byly zvortexovány a centrifugovány po dobu 10 minut při 1000 otáčkách a 4 °C. Supernatant vzorků byl použit pro stanovení biochemických parametrů, které byly měřeny pomocí přístroje Catalyst One (IDEXX Laboratories Inc., USA) podle metody Kolářové a Veliška (2012). Měřeny byly následující parametry:

- Glukóza (GLU)
- Proteiny krevní plazmy - celkové proteiny (TP), albuminy (ALB), globuliny (GLOB)
- Amoniak (NH_3)
- Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy - aspartát aminotransferáza (AST), alanin aminotransferáza (ALT)
- Laktát (LAC)
- Minerální látky - hořčík (Mg^{2+}), chloridy (Cl^{2-}), draslík (K), sodík (Na), anorganický fosfát (PHOS)

3.4 Analýza biomarkeru oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů

Z odebraných vzorků tkání byly analyzovány následující parametry:

- Proteiny
- Lipidní peroxidace (LPO)
- Aktivita katalázy (CAT)
- Aktivita superoxid dismutázy (SOD)
- Aktivita acetylcholinesterázy (AChE)
- Redukovaný glutathion (GSH)
- Glutathion-S-transferáza (GST)

Odebrané vzorky tkání byly před jednotlivými analýzami zhomogenizovány. Zmražené vzorky tkání byly na ledu porcovány pitevními nástroji a váženy v mikrozkumavkách na analytických vahách. K navážené tkáni byl přidán homogenizační PBS pufr (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 % Na₂HPO₄*12H₂O, 0,02 % KH₂PO₄ v deionizované vodě, pH 7,2) v poměru 1 ml pufru na 100 mg tkáně. Takto připravené mikrozkumavky byly vloženy na dobu 6 minut do oscilačního mlýnu od firmy Retsch, typ MM400. Vzorky tkání před i po homogenizaci byly neustále udržovány na ledu, aby nedocházelo k jejich degradaci. Zhomogenizované vzorky byly následně rozpipetovány do připravených zkumavek pro jednotlivé analýzy. Takto připravené vzorky byly do doby stanovení uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

Veškeré analýzy byly provedeny spektrofotometricky prostřednictvím přístroje TECAN Infinite M200 (TECAN Austria, GmbH) v mikrodestičkovém provedení.

3.4.1 Analýza proteinů metodou BCA

Princip metody

Proteiny redukují alkalickou měď Cu^{II} na Cu^I v závislosti na koncentraci. Kyselina bicinchoninová (BCA) je vysoce specifické chromagenní činidlo pro Cu (I), které tvoří komplex s maximem absorpance při 562nm. Díky této vlastnosti je výsledná absorpance při 562nm přímo úměrná koncentraci proteinu (Sigma Aldrich, 2023).

Materiál a reagencie

- 0,1M roztok NaOH
- BSA (hovězí sérový albumin) standard 1 mg BSA/ml ampule (Sigma Aldrich, P0914),
- Chemikálie A: roztok BCA (Sigma Aldrich, B-9643), Chemikálie B: roztok síranu měďnatého CuSO₄ (Sigma Aldrich, C-2284)

Postup metody

Ke 30 μ l zhomogenizované tkáně bylo přidáno 570 μ l 0,1M NaOH. Připravené vzorky byly následně ponechány inkubovat při pokojové teplotě do druhého dne.

Před pipetováním byly vzorky zvortexovány, následně bylo 10 μ l vzorku napipetováno do mikrodestičky ve 2 opakováních. Dále byl připraven roztok kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého (19,6 ml kyseliny + 0,4 ml síranu.) Roztok byl zhomogenizován a pipetován v objemu 200 μ l ke vzorkům v mikrodestičce. Napipetovaná destička byla zakryta folií a po dobu 30 minut inkubována v biologickém termoboxu (LabTech) při teplotě 37 °C. Následně byly inkubované destičky změřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 562 nm.

Kalibrace

Kalibrační řada byla sestavena pomocí vyředění standardu BSA 0,1M roztokem NaOH. Rozsah kalibrační řady byl v rozmezí 12,5 až 1000 μ l.ml⁻¹. Jako blank byl použit 0,1M roztok NaOH.

Vyhodnocení

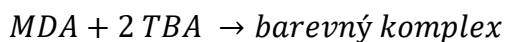
Výsledná koncentrace proteinu byla vypočítána na základě hodnot kalibrační křivky se standardem BSA. Hodnoty výsledků byly uváděny v mg.ml⁻¹.

3.4.2 Analýza lipidní peroxidace (LPO) pomocí testu s TBA

Princip metody

Malondialdehyd (MDA) je sekundárním produktem oxidace polynenasycených mastných kyselin. Je schopný reagovat s bázemi nukleových kyselin a představuje tak jeden z nejmutagennějších produktů lipidní peroxidace. MDA je využíván jako biomarker peroxidace lipidů pomocí jednoduché reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). V přítomnosti antioxidačního činidla v kyselém prostředí vzniká barevný komplex, který lze

spektrofotometricky změřit. Výsledkem analýzy je stanovení barevného TBARS produktu (thiobarbituric acid-reactive substances) (Bastos a kol., 2012; Lushchak a kol., 2005).



Metoda je modifikována na mikroděskové provedení se spektrofotometrickým měřením při 532 nm. Cílem metody je zhodnotit potenciál homogenátu podstoupit proces lipidní peroxidace (LPO) (Surai, 1996).

Materiál a reagensie

- TCA-BHT (20% kyselina trichloroctová (w/v), 2% butylovaný hydrotoluen (w/v)) v poměru 200:1 TCA: BHT,
- 0,6M HCl,
- TRIS TBA (25mM TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan, 100mM TBA v destilované H₂O, pH 7,4),
- Standard MDA (22% 1,1,3,3-tetraethoxypropan (w/v) v 1% H₂SO₄),
- 2mM roztok FeSO₄ v PBS pufru,
- PBS homogenizační pufr

Postup metody

Při analýze se pracovalo s necentrifugovaným homogenátem vzorku o objemu 250 µl, který byl obohacen o 12,5 µl 2mM roztoku FeSO₄. Vzorky byly preinkubovány při 37 °C po dobu 30 minut.

K homogenátu stimulovaného vzorku nebo blanku (PBS pufr) byl v poměru 250 : 75 µl přidán roztok TCA-BHT. Obohacený vzorek byl zvortexován a po dobu 20 minut centrifugován při 4000rpm a 4 °C. Z centrifugovaného vzorku byl odebrán objem 250 µl, který byl přepipetován do mikrozkuhavek společně s 50 µl HCl, a 200 µl TRIS TBA. Vzorky se vařily po dobu 45 minut při teplotě 90 °C. Po ochlazení byl objem 250 µl vzorku přenesen do mikrotitrační destičky ve 2 opakování. Vzniklé zabarvení bylo měřeno spektrofotometricky při 550 a 590 nm (pozad'ová hodnota pro kontrolu).

Kalibrace MDA

Kalibrační křivka MDA byla připravena v rozsahu od 0,5 do 8 nmol MDA v reakční směsi. Koncentrační řada byla připravena vyředěním standardu MDA v PBS pufru podle hodnot v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Kalibrace MDA.

nmol. reakce ⁻¹	100µM roztoku MDA (µl)	PBS (µl)
blank	0	750
0,5	15	735
1	30	720
2	60	690
3	90	660
4	120	630
5	150	600
6	180	570
7	210	540
8	240	510

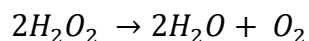
Vyhodnocení

Na základě kalibrační křivky se standardem MDA, připraveného kyselou hydrolyzou MDA, bylo vypočteno množství vzniklého produktu. Výsledky byly vyjádřeny v nmol TBARS.mg proteinů⁻¹.

3.4.3 Analýza enzymatické aktivity katalázy (CAT)

Princip metody

Kataláza (CAT) má dvojí funkci, rozkládat peroxid vodíku (H₂O₂) za vzniku H₂O a O₂ (katalytická aktivita) a oxidaci donorů H, např. methanolu, ethanolu, kys. mravenčí, fenolů apod. se spotřebou 1 molu H₂O₂ (peroxidová aktivita). Metoda je založena na katalytické aktivitě katalázy, kdy je rozklad H₂O₂ sledován měřením poklesu absorbance směsi ve vzorku s H₂O₂ v mikrodestičkách při 240 nm (Aebi, 1984).



Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- TRIS-EDTA pufr (50mM TRIS pufr + 0,1mM EDTA - ethylendiaminotetraoctová kyselina),
- 0,09% H₂O₂ v TRIS-EDTA pufru

Postup metody

Rozmražený homogenát vzorku tkání byl centrifugován po dobu 15 minut při 15000 rpm a 4 °C. Dále byly jednotlivé tkáně vyředěny. Vyředěný vzorek tkáně byl zvortexován a následně z něj bylo přepipetováno 50 µl vyředěného vzorku (blanku) do mikrotitrační UV destičky ve 3 opakováních. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl 0,09% H₂O₂. Destička byla promíchána ve spektrofotometru a ihned měřena po dobu 1 minuty při 240 nm (proti destilované vodě).

Vyhodnocení

Výsledek byl vyjádřen v podobě směrnice křivky za minutu, mající negativní průběh. Molární extinční koeficient H₂O₂ byl 39,4 M.cm⁻¹ při 240 nm. Aktivita CAT byla vyjádřena jako směrnice křivky, od níž byla odečtena směrnice blanku, dále byl proveden přepočet dle následující rovnice na µmol H₂O₂.min⁻¹.mg proteinů⁻¹.

$$CAT \text{ aktivita} = \frac{\text{směrnice křivky}}{39,4 * \text{mg.ml}^{-1}\text{protein} * 10^3}$$

3.4.4 Analýza enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Princip metody

Metaloenzymy disponují zabudovaným iontem kovu (Cu, Zn, Mn, Ni) ve své struktuře, ke kterým se řadí i superoxid dismutáza (SOD). Právě ionty kovů jsou zodpovědné za aktivitu SOD, která se nachází ve všech buňkách organismu, nejvíce poté v játrech, která představují hlavní detoxikační orgán. Její hlavní funkcí je katalýza přeměny reaktivních superoxidových radikálů na molekulový kyslík a peroxid vodíku (Oztürk-Urek a Tarhan, 2001).

Metoda je postavena na schopnosti SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. Produkce superoxidů je způsobena použitím systému nikotinamidadeninukleotidu (NADH) a phenazinu methosulfonátu (PMS). Produkované superoxidy jsou stanoveny pomocí nitrotetrazoliové modři (NBT), které po reakci se superoxidy přechází ve stabilní formazanový produkt. Ten je následně spektrofotometricky měřen. SOD inhibuje přeměnu NBT na barevný produkt v důsledku reakce se superoxidy. Předmětem stanovení je tedy pokles přeměny NBT (Ewing a Janero, 1995). Metoda byla modifikována do mikrodeskového provedení a využívá spektrofotometrického měření při 560 nm.

Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- 50mM PP pufr (KH₂PO₄) s 0,1mM EDTA (pH 7,4),
- 60μM NBT,
- 100μM NADH v 60μM NBT TMA,
- 35μM PMS (phenazin methosulfonát)

Postup metody

Homogenát vzorku byl centrifugován po dobu 30 minut při 15000 rpm a 4 °C. Do mikrodestičky bylo pipetováno 25 μl vzorku/blanku (PBS pufr) společně s 200 μl směsí PP pufru s NADH a NBT ve 3 opakováních. Destička byla promíchána ve spektrofotometru, následně proběhlo první měření při 560 nm ke stanovení interní přeměny NBT vzorkem. Hlavní reakce byla nastartována pomocí přídatku 25 μl PMS a ihned měřena po 5sekundovém třepání při 560 nm.

Vyhodnocení

Molární extenční koeficient NBT při 560 nm byl 15000 M.cm⁻¹. Výška jamky se vzorkem byla 0,6791 cm. Sledovaná byla inhibice tetrazoliové soli na formazan. Výsledná hodnota aktivity SOD byla vypočtena pomocí následujícího vzorce, výsledky byly vyjádřeny v nmol NBT. min⁻¹. mg proteinů⁻¹.

$$SOD \text{ aktivita} = \frac{(směrnice \text{ křivky blank} + směrnice \text{ křivky směr se vzorkem. min}^{-1}) - směrnice \text{ křivky PMS se vzorkem. min}^{-1}}{0,6791 * 15000 * mg. ml^{-1} * 10^6}$$

3.4.5 Analýza aktivity acetylcholinesterázy (AChE)

Princip metody

Metoda je upravenou Ellmanovou metodou pro spektrofotometrické měření aktivity acetylcholinesterázy (AChE) pomocí reakce DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) s acetylthiocholinem za vzniku barevného produktu, který se měří (Ellman a kol., 1961).

Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- 0,75mM DTNB v PBS pufru,
- 3mM ATC (acetylthiocholin)

Postup metody

Homogenizovaný vzorek byl centrifugován po dobu 30 minut při 12000 rpm a 4 °C. Následně bylo napipetováno do mikrodestičky 25 µl vzorku ve 3 opakováních společně se 100 µl DTNB, vzorek byl inkubován po dobu 5 minut. Dále bylo přidáno 25 µl ATC, po 10minutové inkubaci proběhlo první měření při absorbanci 405 nm. Následně bylo provedeno druhé měření po další 5minutové inkubaci. Blank představoval napipetovaný objem 100 µl DTNB, 25 µl destilované vody a 25 µl ATC.

Vyhodnocení

Aktivita AChE byla vypočítána na základě níže uvedené rovnice. Výpočet byl proveden na základě výsledků měření v čase t_0 a t_5 . Interval mezi měřeními byl 5 minut. Mikrodeskový faktor ředění představuje hodnotu 0,49. Hodnoty byly vyděleny celkovým proteinem v mg.ml^{-1} . Výsledek aktivity AChE je vyjádřen v $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg.ml}^{-1}$ proteinů.

$$AChE \text{ aktivita} = \frac{\left[\frac{\text{absorbance } t_5 * 1000 - \text{absorbance } t_0 * 1000}{5} \right] * 0,49}{\text{mg.ml}^{-1}\text{proteinů}}$$

3.4.6 Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)

Princip metody

Tato metoda využívá reakce thiolselektivní Ellmanovy reagentie (DTNB = 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými -SH skupinami za tvorby barevného produktu, který je spektrofotometricky stanovován (Ellman, 1959). Ve vzorcích zbavených proteinů jsou zejména v redukovaném glutathionu (GSH) přítomny volné -SH skupiny. Metoda je modifikována na mikrodeskové provedení a využívá spektrofotometrické měření při 420 nm.

Materiál a reagentie

- TRIS pufr (0,8M TRIS, 0,02M EDTA, pH 8,9),
- PBS homogenizační pufr,
- 0,02M DTNB (2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina, MW=396,3) v methanolu,
- GSH (1 mg.ml^{-1} PBS roztoku, MW=307,3),
- TCA (25% kyselina trichloroctová)

Postup metody

Metoda se skládala ze dvou kroků. Nejprve bylo nutné odstranit ze vzorku tkáň protein. Ke 180 µl vzorku bylo přidáno 10 µl TCA (poměr 10 : 1), při přípravě kalibrační křivky bylo

k 500 μl GSH standardů přidáno 50 μl TCA. Obsah byl vortexován po dobu 10 sekund, následně byl ponechán zreagovat 15 minut. Zreagovaný vzorek byl následně centrifugován 10 minut při 8000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$. Pro další postup byl použit supernatant vzorku zbavený proteinů, pro kalibrační křivku zreagovaný standard. Do mikroadestičky bylo postupně pipetováno 190 μl TRIS pufru, 50 μl vzorku/blanku (PBS)/standardu a 10 μl 0,02M DTNB. Jako pufrový blank bylo pipetováno 240 μl TRIS pufru a 10 μl 0,02M DTNB. Vzorky byly promíchány a ponechány 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Měření proběhlo ve 3 opakováních při absorbanzi 420 nm proti blanku a pozadí při 680 nm.

Kalibrace GSH

Kalibrace GSH byla nastavena v rozmezí od 0,005 do 0,075 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Standard GSH (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS roztoku, MW=307,3) byl 10krát naředěn na 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS, poté byla připravena koncentrační řada podle hodnot v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Koncentrační řada GSH.

GSH (μM)	GSH ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Vyředění ze zásobního roztoku GSH (0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	PBS pufr (μl)
244	0,075	375	125
162,85	0,05	250	250
81,42	0,025	125	375
48,85	0,015	75	425
32,57	0,01	50	450
24,42	0,0075	37,5	462,5
16,28	0,005	25	475
8,14	0,0025	12,5	487,5
blank	0	0	500

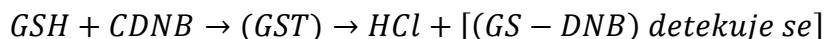
Vyhodnocení

Koncentrace glutathionu byla vypočítána na základě kalibrační křivky pro standardní redukovaný glutathion. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny v $\text{nmol GSH}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.4.7 Analýza enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST)

Princip metody

Principem metody je detekce konjugátu mezi redukováným glutathionem a CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen), který je běžným substrátem pro všechny isoformy glutathion-S-transferázy (GST) (Habig a kol., 1974). Metoda byla modifikována na mikrodoskové provedení a využívá spektrofotometrického měření při 340 nm.



Materiál a reagencie

- PBS homogenizační pufr,
- 10mM roztok redukováného GSH (MW=307,7),
- 50mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen; MW=202,55) v 96% ethanolu

Postup metody

Homogenát vzorku byl centrifugován po dobu 15 minut při 10000 rpm a 4 °C. Vzniklý supernatant byl vyředěn do zkumavek s PBS pufr. Následně došlo k pipetování 10 µl vyředěného vzorku, 180 µl PBS pufru, a nakonec 10 µl CDNB. V případě měření blanku bylo pipetováno 190 µl PBS a 10 µl CDNB. Reakce byla odstartována přidáním substrátu v podobně 50 µl redukováného GSH a ihned měřena podobu 5 minut při 340 nm. Měření proběhlo ve 3 opakováních.

Vyhodnocení

Molární extinkční koeficient konjugované CDNB byl 9600 M.cm⁻¹ při 340 nm, výška hladiny v jamce dosahovala 0,6791 cm. Výsledek aktivity GST byl vyjádřen jako směrnice křivky, od které byla odečtena směrnice blanku a přepočtena dle následující rovnice v jednotkách nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteinů.

$$\text{aktivita GST} = \frac{\text{směrnice křivky} \cdot \text{min}^{-1}}{9600 * 0,6791 * \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{proteinů} * 10^6}$$

3.5 Statistické vyhodnocení

Výsledky pro hemolymfu, oxidační stres a antioxidační parametry jsou uvedeny jako průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami (SD). Výsledky byly vypočteny ze šesti opakování pro každý odběr. Data byla vyhodnocena Bartlettovým testem homogenity rozptylu. Rozdíly ve výsledcích parametrů ze vzorků z expozice a depurace byly analyzovány pomocí Kruskal-Wallisova testu pro neparametrické post-hoc srovnání, jelikož nebylo předpokládáno normální rozdělení dat. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica v. 12.0 pro Windows (StatSoft, ČR).

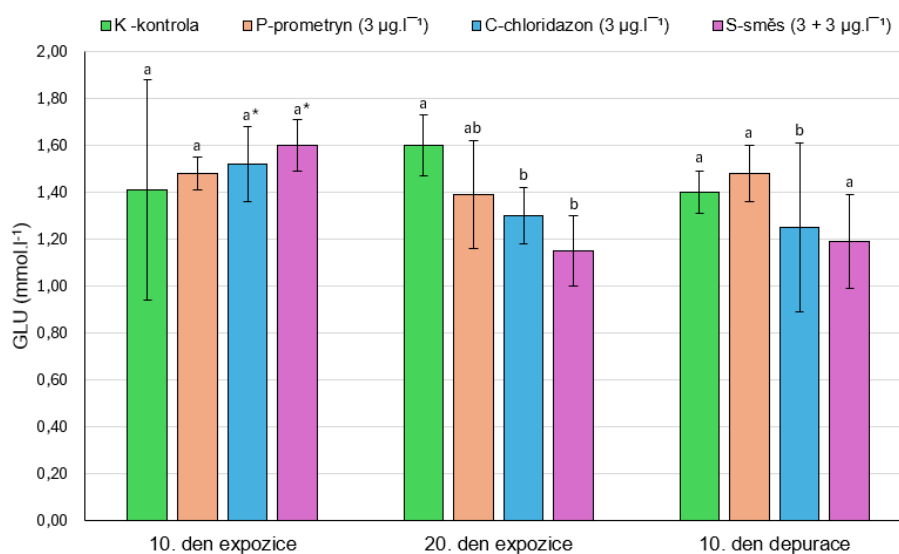
4 Výsledky

Získaná data jsou prezentována jako souhrnné výsledky pro jednotlivé testované skupiny. Označení testovaných skupin a koncentrací je zobrazeno v tabulce č. 1 v kapitole 3 Materiál a metodika (str. 24). Značení testovaných skupin je shodné u všech grafů.

4.1 Biochemický profil hemolymfy

4.1.1 Glukóza (GLU)

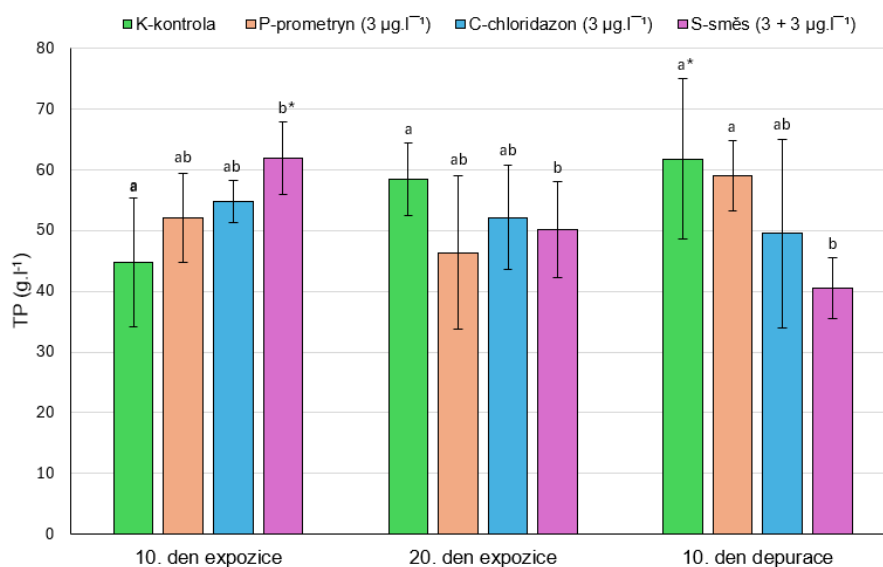
Změny hladiny glukózy (GLU) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 3. Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny GLU bylo u skupiny C a S v porovnání se skupinami K a P po 20denní expozici. Výsledky z 10denní depurace prokázaly statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny GLU u skupiny C v porovnání se skupinami K, P a S. U skupin C a S byly zjištěny statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší hodnoty hladiny GLU po 10denní expozici oproti 20denní expozici a následné depuraci v rámci těchto skupin.



Graf č. 3: Hladina glukózy (GLU) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

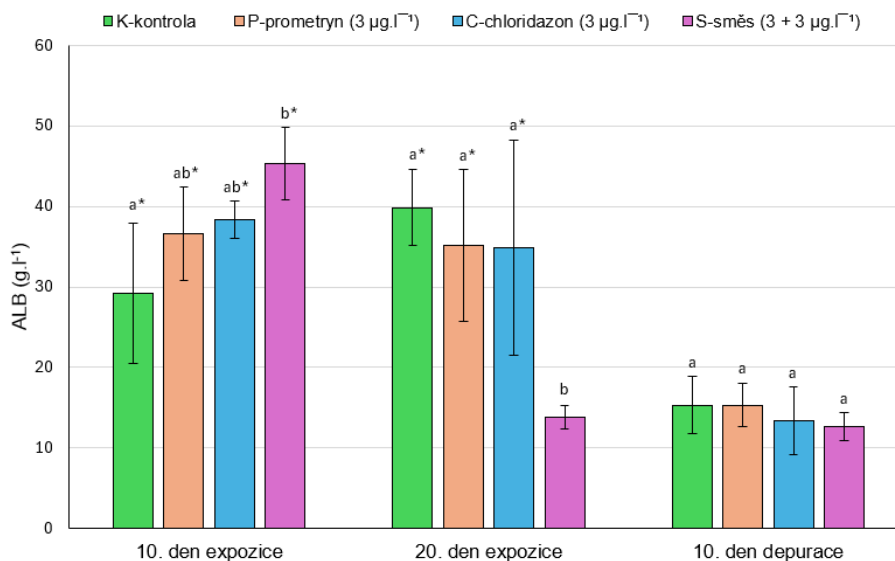
4.1.2 Proteiny krevní plazmy (TP, ALB, GLOB)

Změny hladiny celkového proteinu (TP) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 4. Hladina TP se statisticky významně ($P<0,01$) zvýšila u skupiny S po 10denní expozici, po 20denní expozici a 10denní depuraci byla v této skupině statisticky významně snižena ($P<0,01$) v porovnání s kontrolou. V kontrolní skupině bylo zjištěno statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení hladiny TP po 10 dnech depurace oproti 10 a 20 dnům expozice v kontrolní skupině.



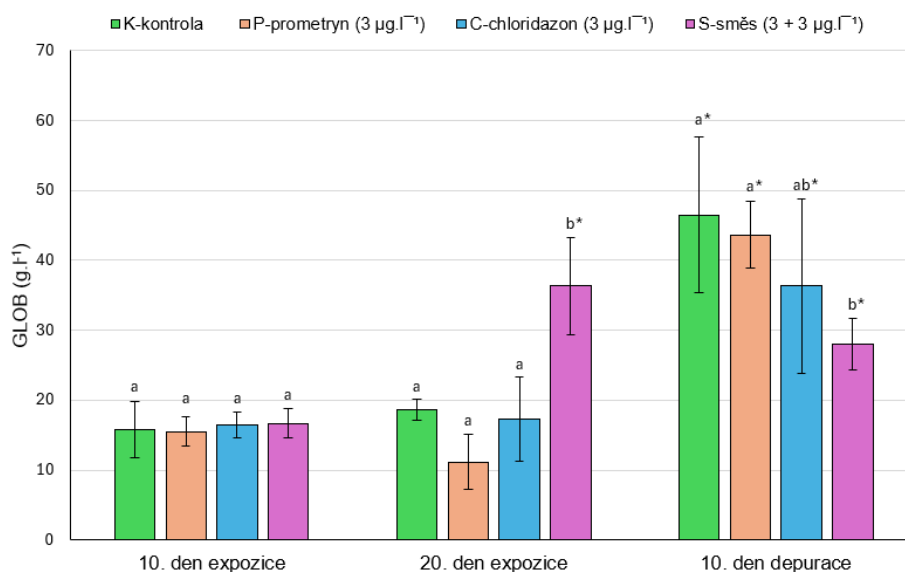
Graf č. 4: Hladina celkového proteinu (TP) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P<0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P<0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny albuminů (ALB) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 5. Hladina ALB u skupiny S byla po 10denní expozici statisticky významně ($P<0,01$) zvýšena oproti kontrole. Výsledky skupiny S po 20denní expozici byly statisticky významně ($P<0,01$) sníženy oproti kontrole a skupinám P a C. Statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení hladiny ALB bylo u všech skupin po 10denní expozici v porovnání s výsledky 10 denní depurace. Výsledky skupin K, P a C po 20denní expozici byly signifikantně ($P<0,01$) vyšší v porovnání s výsledky těchto skupin po 10denní depuraci.



Graf č. 5: Hladina albuminů (ALB) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

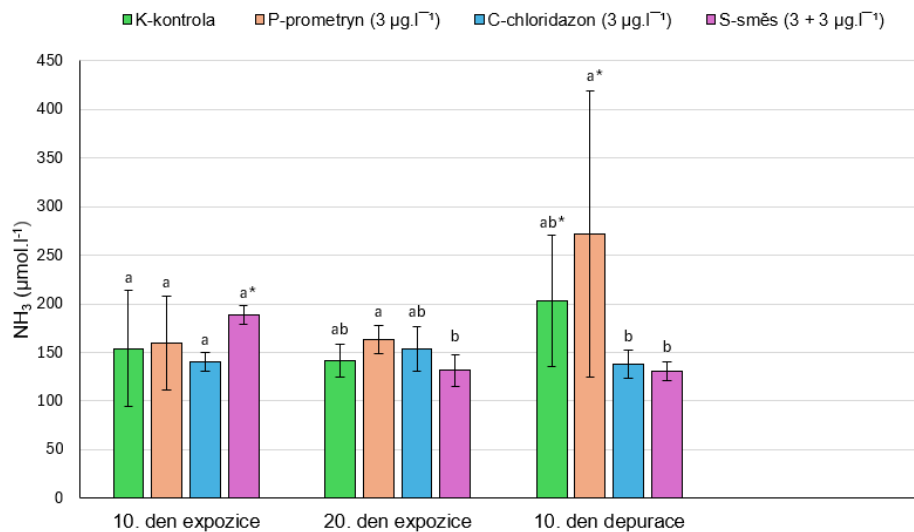
Změny hladiny globulinů (GLOB) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 6. U skupiny S bylo prokázáno statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení GLOB po 20denní expozici v porovnání s kontrolou a skupinami P a C. Výsledky 10denní depurace prokázaly statisticky významné ($P < 0,01$) snížení GLOB u skupiny S v porovnání s kontrolou a skupinou P. U skupiny S došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hladiny GLOB po 20denní expozici, a dále statisticky významnému snížení hladiny GLOB po 10denní depuraci oproti této skupině po 10 denní expozici. Skupiny K, P a C prokázaly statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení GLOB po 10 dnech depurace v porovnání s 10 a 20denní expozicí těchto skupin.



Graf č. 6: Hladina globulinů (GLOB) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

4.1.3 Amoniak (NH₃)

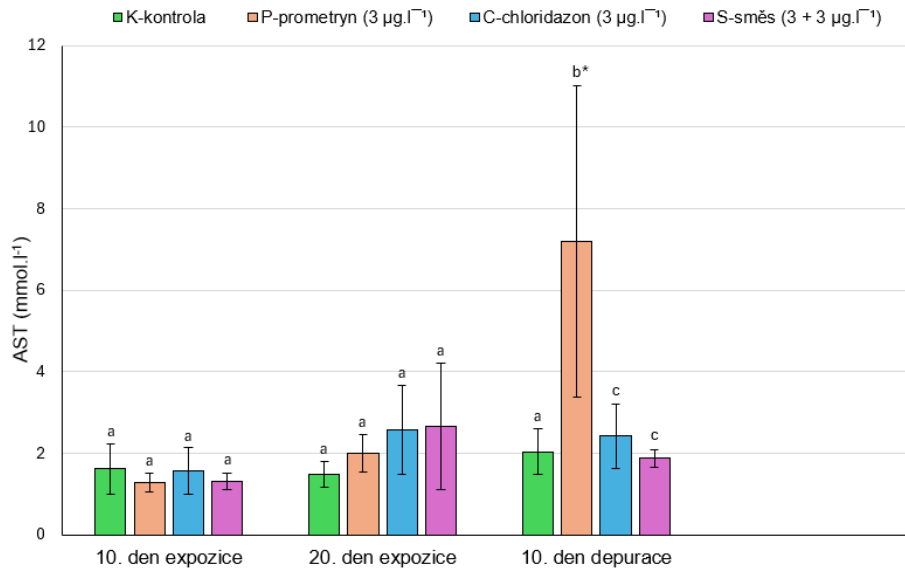
Změny obsahu amoniaku (NH₃) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 7. 20denní expozice prokázala statisticky významné ($P < 0,01$) snížení NH₃ u skupiny S oproti skupině P. Skupiny C a S měly statisticky významně ($P < 0,01$) snížený obsah NH₃ oproti skupině P po 10denní depuraci. 10denní expozice prokázala signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení NH₃ u skupiny S v porovnání této skupiny s 20denní expozicí a 10denní depurací. Obsah NH₃ byl u kontroly a skupiny P po 10denní depuraci statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší v porovnání stejných skupin u 10 a 20denní expozice.



Graf č. 7: Hladina amoniaku (NH₃) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6.

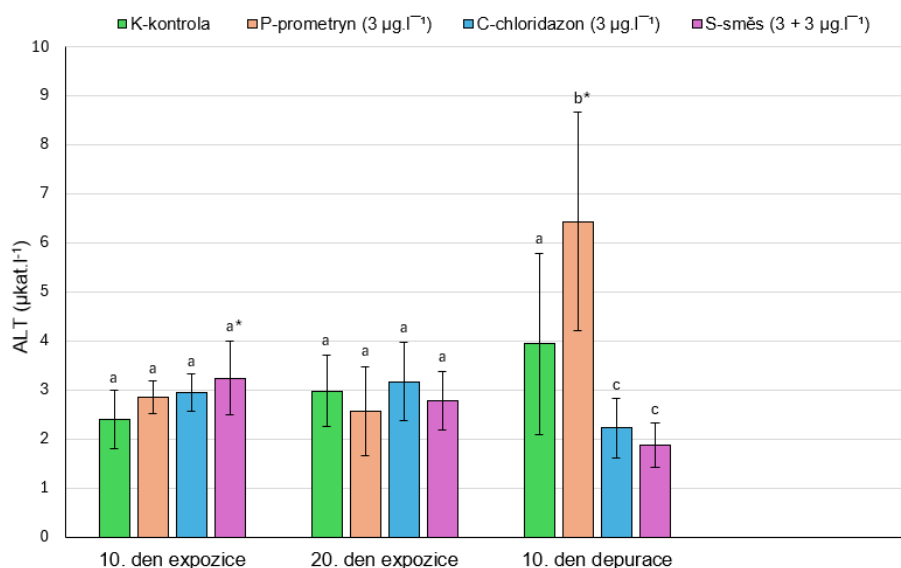
4.1.4 Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy (AST, ALT)

Změny hladiny aspartát aminotransferázy (AST) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 8. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení AST bylo u skupiny P po 10denní depuraci v porovnání s kontrolou a skupinami C a S. Hladina AST u skupin C a S byla signifikantně ($P < 0,01$) nižší v porovnání se skupinou P u 10denní depurace. Skupina P po 10denní depuraci měla statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší hladinu AST v porovnání této skupiny v průběhu 10 a 20denní expozice.



Graf č. 8: Hladina aspartát aminotransferázy (AST) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b, c charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 9. 10denní depurace prokázala statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení hladiny ALT u skupiny P v porovnání s kontrolou, a dále snížení u skupin C a S v porovnání s kontrolou a skupinou P. Skupina S po 10 denní expozici prokázala statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení hladiny ALT v porovnání s 20 denní expozicí a 10 depurací u stejné skupiny. Skupina P po 10denní expozici měla signifikantně ($P < 0,01$) vyšší hladinu ALT v porovnání této skupiny během expozic.



Graf č. 9: Hladina alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b, c charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

4.1.5 Laktát (LAC)

Změny hladiny laktátu (LAC) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v tabulce č. 4. Skupina S po 10denní expozici měla statisticky významně ($P < 0,01$) zvýšený LAC oproti kontrole a skupině P. Ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení u skupiny S došlo následně po 20denní expozici v porovnání s kontrolou a skupinou P.

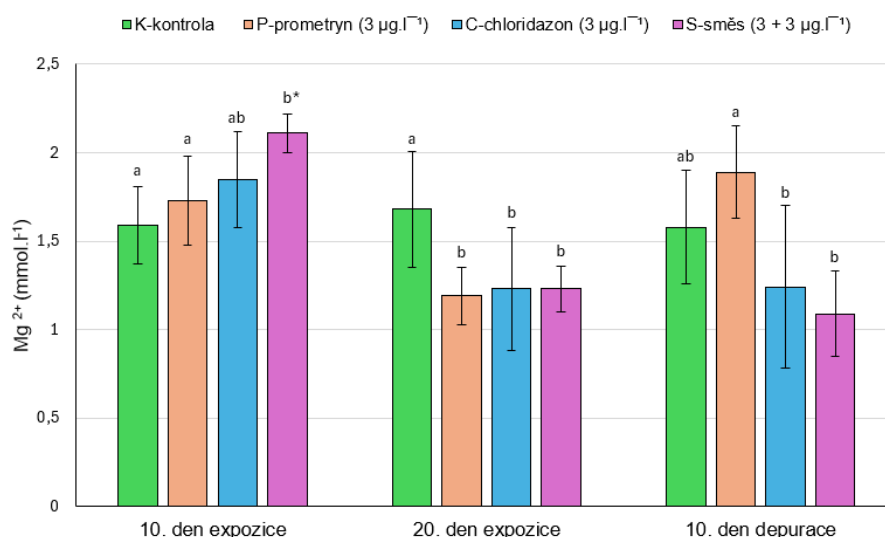
Tabulka č. 4: Hladina laktátu (LAC) v hemolymfě raka signálního.

Parametr	Expozice	Kontrola - K (K – 0 µg.l ⁻¹)	Prometryn (P – 3 µg.l ⁻¹)	Chloridazon (C – 3 µg.l ⁻¹)	Směs P + S (3 + 3 µg.l ⁻¹)	Validace
LAC (mmol.l ⁻¹)	10. den exp.	0.83 \pm 0.49 ^a	1.09 \pm 0.21 ^a	1.40 \pm 0.36 ^{ab}	1.95 \pm 0.46^b	< 0.01
	20. den exp.	1.56 \pm 0.52 ^a	1.56 \pm 0.19 ^a	1.23 \pm 0.27 ^{ab}	1.19 \pm 0.15^b	< 0.01
	10. den dep.	0.82 \pm 0.28 ^a	1.72 \pm 0.77 ^a	1.09 \pm 0.48 ^a	0.82 \pm 0.17 ^a	< 0.05

Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6; exp. – expozice; dep. – depurace.

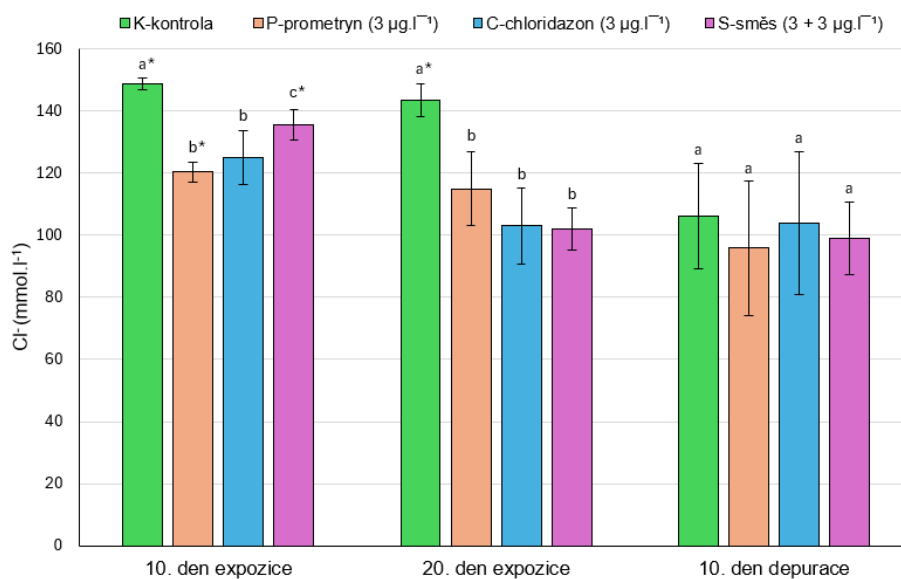
4.1.6 Minerály (Mg^{2+} , Cl^- , K, Na, PHOS)

Změny hladiny hořečnatých iontů (Mg^{2+}) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 10. Výsledky analýzy hladiny Mg^{2+} prokázaly signifikantní ($P<0,01$) zvýšení u skupiny S oproti kontrole a skupině P po 10denní expozici. Statisticky významné ($P<0,01$) snížení Mg^{2+} bylo zjištěno u skupin P, C a S v porovnání s kontrolou u 20denní expozice. Skupiny C a S měly signifikantně ($P<0,01$) nižší hladinu Mg^{2+} oproti skupině P při 10denní depuraci. Hladina Mg^{2+} u skupiny S po 10denní expozici byla statisticky významně ($P<0,01$) vyšší oproti hodnotám skupiny po 20denní expozici a 10denní depuraci.



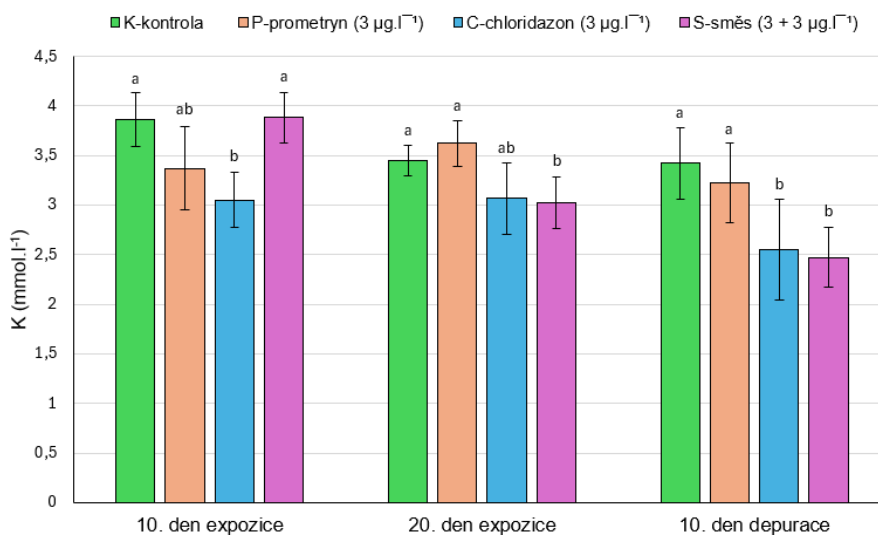
Graf č. 10: Hladina hořečnatých iontů (Mg^{2+}) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P<0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P<0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny chloridů (Cl^-) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 11. Zjištěné hodnoty Cl^- po 10denní expozici vykazovaly statisticky významné ($P<0,01$) snížení u skupin P a C oproti kontrole a zvýšení Cl^- u skupiny S v porovnání se skupinami P a C. Skupiny P, C a S prokázaly signifikantní ($P<0,01$) pokles obsahu Cl^- proti kontrole při 20denní expozici. Statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení Cl^- bylo zjištěno u kontroly a skupiny P a S v porovnání 20denní expozice a 10denní depurace těchto skupin. Kontrolní skupina 20denní expozice vykazovala statisticky významný ($P<0,01$) zvýšení Cl^- v porovnání zmíněné skupiny u 10denní depurace.



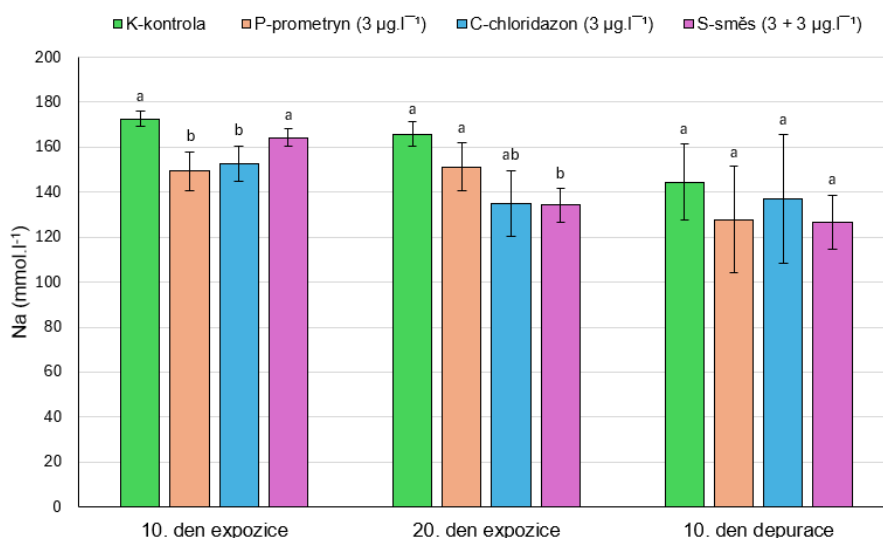
Graf č. 11: Hladina chloridů (Cl⁻) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b, c charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny draslíku (K) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 12. Obsah K byl statisticky významně ($P < 0,01$) snížen u skupiny C v porovnání s kontrolou a skupinou S po 10denní expozici. 20 denní expozice prokázala signifikantní ($P < 0,01$) pokles K u skupiny S v porovnání s kontrolou a skupinou P. Z výsledků 10denní depurace bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení K u skupin C a S oproti kontrole a skupině P.



Graf č. 12: Hladina draslíku (K) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny sodíku (Na) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 13. Analýza koncentrace Na prokázala signifikantní ($P < 0,01$) snížení u skupin P a C proti kontrole a skupině S po 10denní expozici. 20denní expozice prokázala statisticky významné ($P < 0,01$) snížení u skupiny S oproti kontrole a skupině P.



Graf č. 13: Hladina sodíku (Na) v hemolymfě raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Změny hladiny anorganického fosfátu (PHOS) v hemolymfě raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v tabulce č. 5. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení PHOS bylo pouze u skupiny P po 10denní depuraci v porovnání s kontrolou a skupinami C a S.

Tabulka č. 5: Hladina anorganického fosfátu (PHOS) v hemolymfě raka signálního.

Parametr	Expozice	Kontrola - K (K – 0 µg.l ⁻¹)	Prometryn (P – 3 µg.l ⁻¹)	Chloridazon (C – 3 µg.l ⁻¹)	Směs P + S (3 + 3 µg.l ⁻¹)	Validace
PHOS (mmol.l ⁻¹)	10. den exp.	0.27 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.03 ^a	< 0.05
	20. den exp.	0.27 \pm 0.05 ^a	0.27 \pm 0.05 ^a	0.27 \pm 0.04 ^a	0.30 \pm 0.02 ^a	< 0.05
	10. den dep.	0.26 \pm 0.04 ^a	0.38 \pm 0.07^b	0.23 \pm 0.02 ^a	0.29 \pm 0.07 ^a	< 0.01

Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6; exp. – expozice; dep. – depurace.

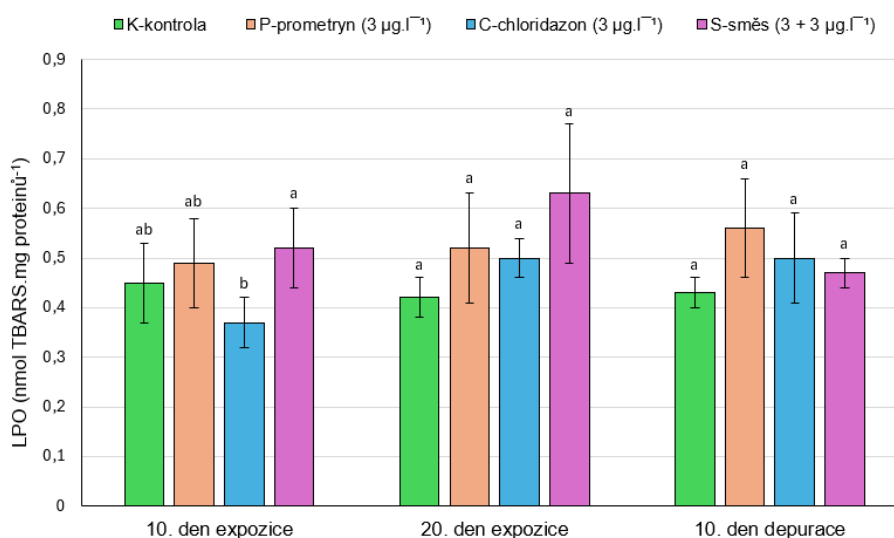
4.2 Míra oxidačního stresu a analýza antioxidačních biomarkerů

Vliv subchronické expozice prometrynu, chloridazonu a jejich směsi na raka signálního byl zjištěn pomocí analýzy antioxidačních enzymů a biomarkerů oxidačního stresu. Jednalo se o stanovení lipidní peroxidace (LPO), aktivity katalázy (CAT), aktivity superoxid dismutázy (SOD), stanovení obsahu acetylcholinesterázy (AChE), stanovení redukovaného glutathionu (GSH) a stanovení aktivity glutathion-S-transferázy (GST). Analýzy byly provedeny ze vzorků tkání hepatopankreatu, svalu a žaber.

4.2.1 Hepatopankreas

Ve vzorcích hepatopankreatu raků byly pozorovány statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) u všech sledovaných biomarkerů v průběhu testu.

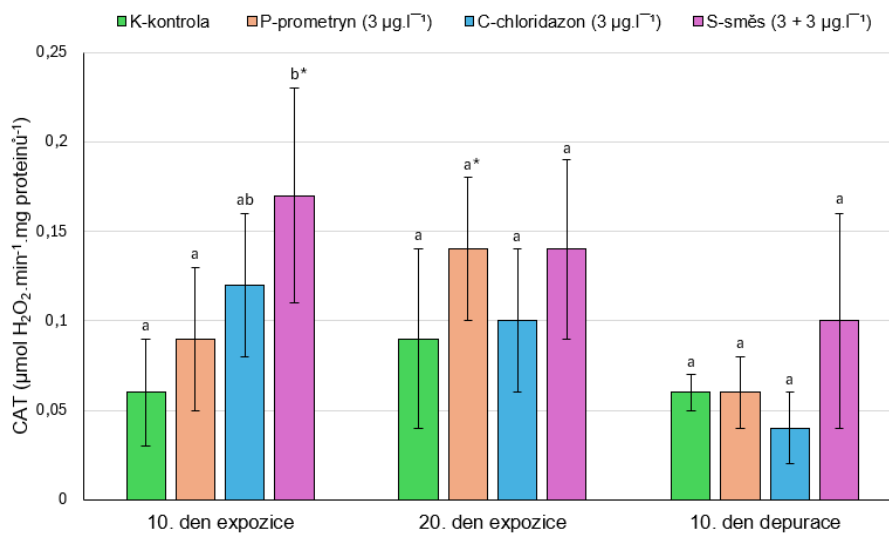
Změny hladiny lipidní peroxidace (LPO) v hepatopankreatu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 14. Výsledky stanovení hladiny LPO prokázaly pouze statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny LPO u skupiny C po 10denní expozici v porovnání se skupinou S.



Graf č. 14: Hladina lipidní peroxidace (LPO) v tkáni hepatopankreatu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

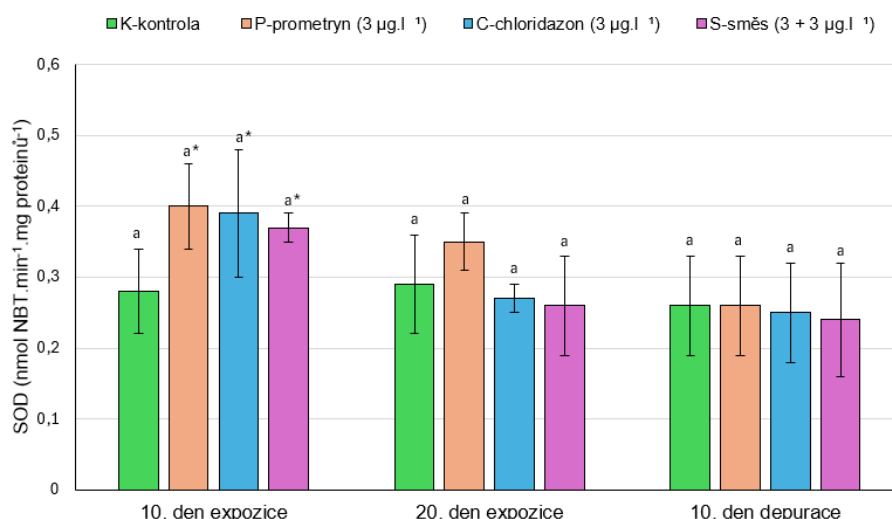
Aktivita katalázy (CAT) v hepatopankreatu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 15. Výsledky stanovení aktivity CAT zjistily statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT u skupiny S po 10denní expozici v porovnání s kontrolou a skupinou P. U skupiny S bylo dále zjištěno signifikantní

($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT oproti hodnotám stanoveným u stejné skupiny po 20 dnech expozice a 10 dnech depurace. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT bylo dále pozorováno u skupiny P po 20denní expozici v porovnání s 10denní expozicí a 10denní depurací.



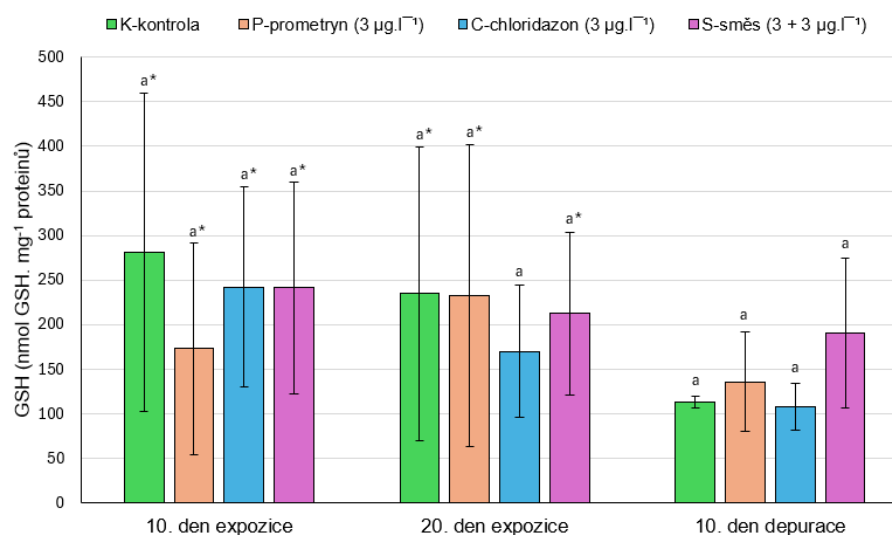
Graf č. 15: Aktivita katalázy (CAT) v tkáni hepatopankreatu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v hepatopankreatu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 16. Výsledky analýzy aktivity SOD prokázaly pouze signifikantní zvýšení ($P < 0,01$) aktivity SOD u skupin P, C a S po 10denní expozici v porovnání s výsledky po 20denní expozici a 10denní depuraci.



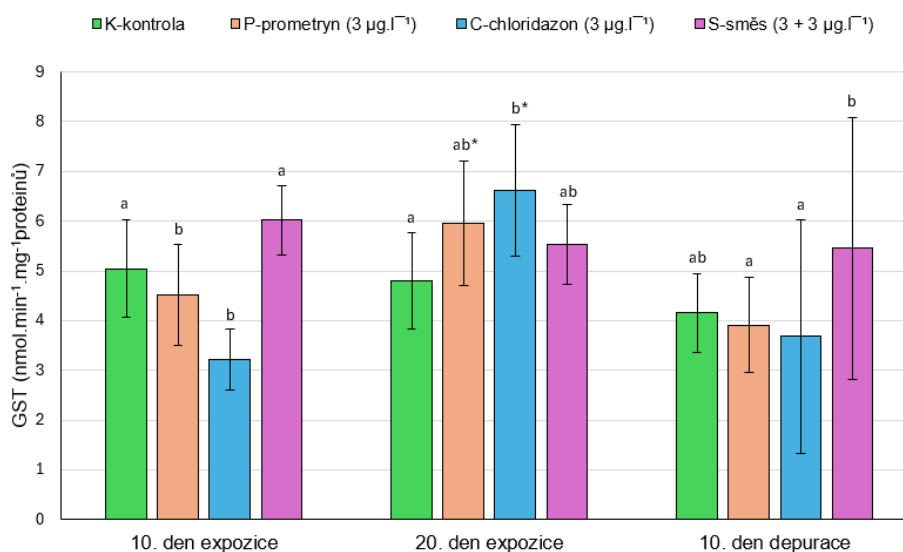
Graf č. 16: Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v tkáni hepatopankreatu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Výsledky obsahu redukovaného glutathionu (GSH) v hepatopankreatu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 17. Hladina GSH byla statisticky významně ($P < 0,01$) zvýšena ve skupině K, P a S po 10 i 20denní expozici v porovnání s výsledky po 10denní depuraci. Dále bylo pozorováno signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení hladiny GSH ve skupině C po 10 dnech expozice v porovnání s výsledky po 20denní expozici a 10denní depuraci.



Graf č. 17: Hladina redukovaného glutathionu (GSH) v tkáni hepatopankreatu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) v hepatopankreatu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 18. Analýza aktivity GST prokázala statisticky významné ($P<0,01$) snížení aktivity GST u skupin P a C oproti skupině K a S po 10denní expozici. Skupina C prokázala signifikantní ($P<0,01$) nárůst aktivity GST po 20denní expozici oproti kontrole. Výsledky získané po 10denní depuraci byly statisticky významně ($P<0,01$) zvýšeny u skupiny S v porovnání se skupinami P a C. Skupina C a P po 20denní expozici vykázala statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity GST oproti výsledkům stejných testovaných skupin po 10denní expozici a 10denní depuraci.



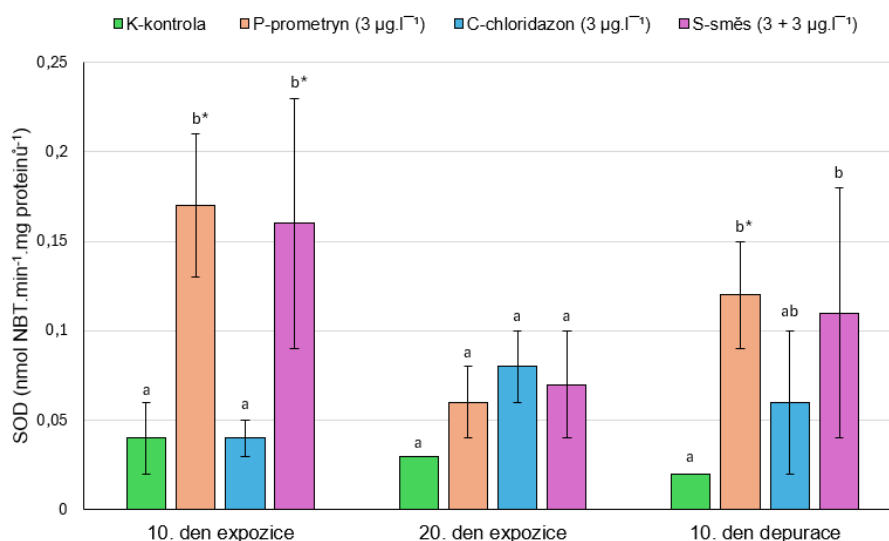
Graf č. 18: Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni hepatopankreatu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P<0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P<0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

4.2.2 Sval

Vzorky svalu prokázaly statisticky významné rozdíly ($P<0,01$) pouze u stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD) a hladiny acetylcholinesterázy (AChE).

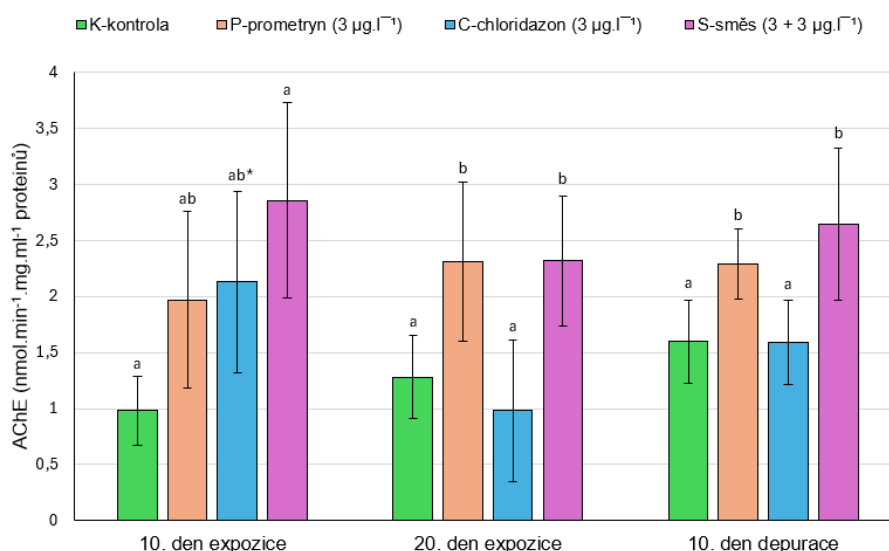
Aktivita SOD v tkáni svalu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 19. Aktivita SOD prokázala statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity SOD u skupiny P a S v porovnání se skupinami K a C po 10denní expozici. Výsledky 10denní depurace prokázaly statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity SOD u skupin P a S proti kontrole. Hodnoty zjištěné u skupin P a S po 10denní expozici prokázaly statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity SOD v porovnání

s výsledky stejných skupin po 20denní expozici, v případě skupiny S i v porovnání výsledků této skupiny s 10denní depurací. Skupina P po 10 denní depuraci vykazovala statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity SOD v porovnání stejné skupiny s výsledky po 20denní expozici.



Graf č. 19: Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v tkáni svalu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P<0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P<0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Výsledky aktivity AChE v tkáni svalu raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 20. Výsledky stanovení aktivity AChE prokázaly statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity AChE u skupin P a S po 20denní expozici oproti skupinám K a C. Stejný trend byl pozorován u výsledků aktivity AChE po 10denní depuraci. Statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity AChE bylo pozorováno u skupiny C po 10denní expozici v porovnání s výsledky po 20denní expozici a 10denní depuraci.



Graf č. 20: Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) v tkáni svalu raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

U dalších testovaných parametrů (LPO, CAT, GSH, GST) nebyly zjištěny statisticky významné ($P < 0,01$) změny. Výsledky stanovení LPO, CAT, GSH a GST jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Výsledky stanovení lipidní peroxidace (LPO), aktivity katalázy (CAT), redukovaného glutathionu (GSH) a glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni svalu raka signálního.

Parametr	Expozice	Kontrola - K (K – 0 µg.l ⁻¹)	Prometryn (P – 3 µg.l ⁻¹)	Chloridazon (C – 3 µg.l ⁻¹)	Směs P + S (3 + 3 µg.l ⁻¹)	Validace
LPO (nmol TBARS. mg proteinů ⁻¹)	10. den exp.	0.46 \pm 0.07 ^a	0.54 \pm 0.05 ^a	0.53 \pm 0.06 ^a	0.46 \pm 0.12 ^a	< 0.05
	20. den exp.	0.56 \pm 0.06 ^a	0.58 \pm 0.09 ^a	0.59 \pm 0.07 ^a	0.62 \pm 0.05 ^a	< 0.05
	10. den dep.	0.49 \pm 0.04 ^a	0.53 \pm 0.07 ^a	0.48 \pm 0.09 ^a	0.46 \pm 0.04 ^a	< 0.05
CAT (µmol H ₂ O ₂ .min ⁻¹ .mg proteinů ⁻¹)	10. den exp.	0.47 \pm 0.12 ^a	0.53 \pm 0.25 ^a	0.47 \pm 0.10 ^a	0.50 \pm 0.16 ^a	< 0.05
	20. den exp.	0.52 \pm 0.10 ^a	0.58 \pm 0.14 ^a	0.52 \pm 0.12 ^a	0.37 \pm 0.10 ^a	< 0.05
	10. den dep.	0.47 \pm 0.10 ^a	0.45 \pm 0.07 ^a	0.49 \pm 0.14 ^a	0.49 \pm 0.14 ^a	< 0.05

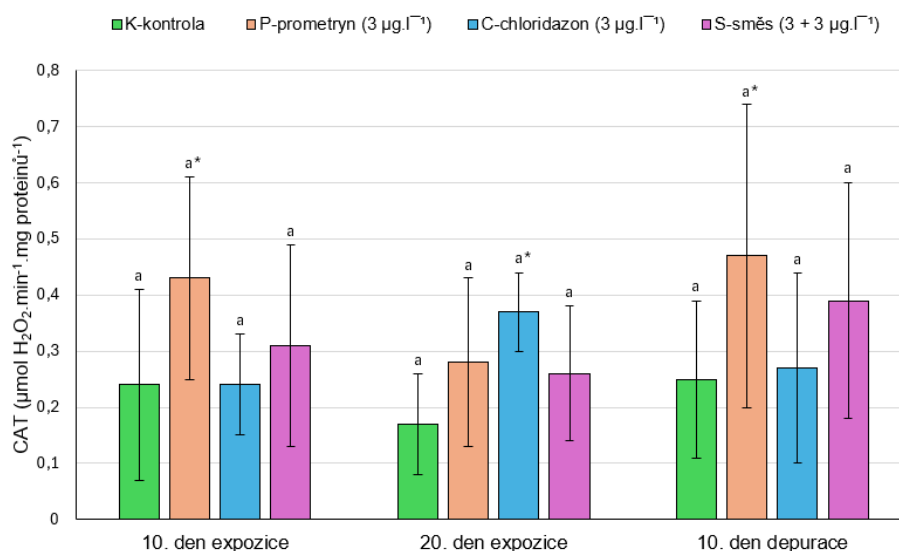
GSH (nmol GSH. mg ⁻¹ proteinů)	10. den exp.	124.32 ± 33.22 ^a	131.97 ± 16.67 ^a	167.72 ± 22.03 ^a	134.78 ± 42.17 ^a	< 0.05
	20. den exp.	137.14 ± 29.12 ^a	135.30 ± 23.07 ^a	132.14 ± 17.67 ^a	156.13 ± 34.31 ^a	< 0.05
	10. den dep.	137.08 ± 16.42 ^a	130.66 ± 27.02 ^a	127.74 ± 24.60 ^a	126.12 ± 18.99 ^a	< 0.05
GST (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteinů)	10. den exp.	1.02 ± 0.43 ^a	0.56 ± 0.22 ^a	0.85 ± 0.17 ^a	0.70 ± 0.25 ^a	< 0.05
	20. den exp.	1.27 ± 0.72 ^a	1.31 ± 0.42 ^a	1.34 ± 0.67 ^a	1.17 ± 0.64 ^a	< 0.05
	10. den dep.	0.89 ± 0.27 ^a	1.21 ± 0.86 ^a	1.12 ± 0.23 ^a	1.50 ± 0.66 ^a	< 0.05

Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6; exp. – expozice; dep. – depurace.

4.2.3 Žábra

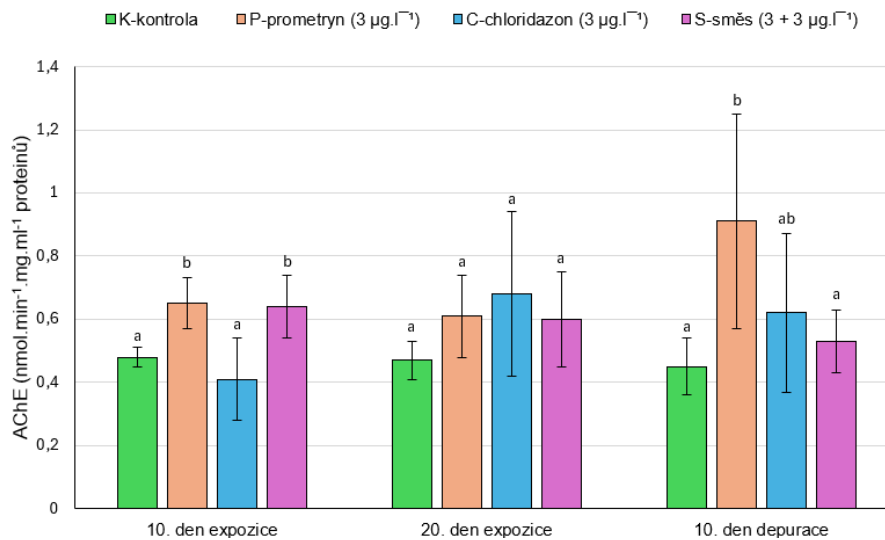
Výsledky expozice testovaných pesticidů a jejich směsi prokázaly statisticky významné ($P<0,01$) rozdíly při stanovení aktivity katalázy (CAT), superoxid dismutázy (SOD), hladiny acetylcholinesterázy (AChE) a redukovaného glutathionu (GSH). Nejvýraznější změny byly zjištěny v případě CAT, AChE a GSH.

Aktivita CAT v tkáni žaber raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 21. Aktivita CAT byla statisticky významně ($P<0,01$) vyšší u skupiny P po 10denní expozici, skupiny C po 20denní expozici a skupiny P po 10denní depuraci v porovnání zmíněných skupin mezi jednotlivými expozicemi a depurací.



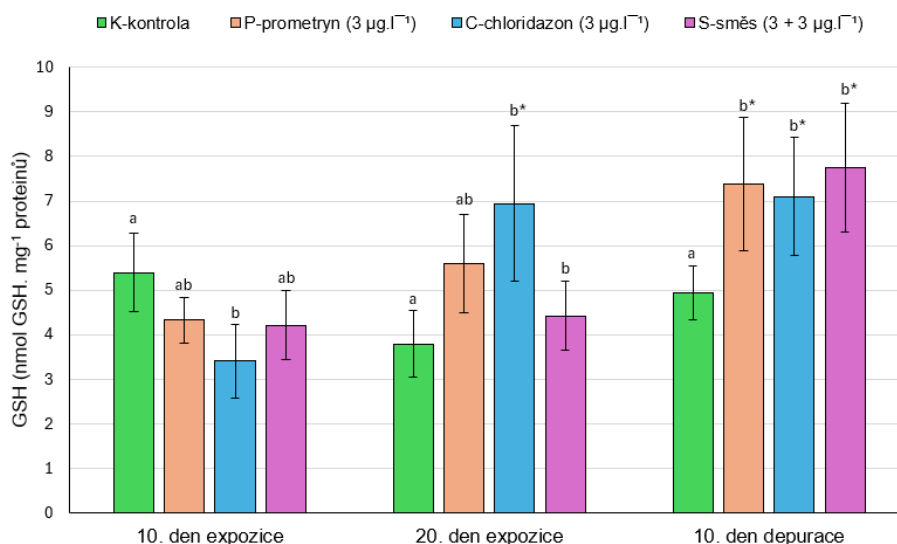
Graf č. 21: Aktivita katalázy (CAT) v tkáni žaber raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P<0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P<0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6.

Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) v tkáni žaber raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi je uvedena v grafu č. 22. Výsledky stanovení aktivity AChE prokázaly statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity AChE u skupin P a S v porovnání s kontrolou a skupinou C po 10denní expozici. Statisticky významné ($P<0,01$) zvýšení aktivity AChE bylo u skupiny P v porovnání s kontrolou a skupinou S u 10denní depurace.



Graf č. 22: Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) v tkáni žaber raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $N=6$.

Výsledky obsahu redukovaného glutathionu (GSH) v tkáni žaber raka signálního po subchronické expozici prometrynu, chloridazonu a jejich směsi jsou uvedeny v grafu č. 23. Stanovený obsah GSH byl statisticky významně ($P < 0,01$) snížen u skupiny C oproti skupinám K, P a S po 10denní expozici. Ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení GSH došlo u skupiny C a S v porovnání se kontrolou po 20denní expozici. Skupina C vykazovala signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení GSH oproti výsledku této skupiny po 10denní expozici. Výsledky po 10denní depuraci prokázaly signifikantní ($P < 0,01$) zvýšení obsahu GSH u skupin P, C a S v porovnání s kontrolou a zároveň v porovnání s výsledky těchto skupin po 10 a 20denní expozici.



Graf č. 23: Hladina redukováného glutathionu (GSH) v tkáni žaber raka signálního. Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $N=6$.

Výsledky stanovení SOD, LPO a GST jsou vyobrazeny v tabulce č. 7. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení bylo zjištěno pouze při stanovení aktivity SOD u skupiny P po 10denní depuraci v porovnání s 10denní a 20denní expozicí stejné skupiny.

Tabulka č. 7: Výsledky stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD), lipidní peroxidace (LPO) a glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni žaber raka signálního.

Parametr	Expozice	Kontrola - K (K – 0 µg.l ⁻¹)	Prometryn (P – 3 µg.l ⁻¹)	Chloridazon (C – 3 µg.l ⁻¹)	Směs P + S (3 + 3 µg.l ⁻¹)	Validace
SOD (nmol NBT · min ⁻¹ · mg proteinů ⁻¹)	10. den exp.	0.09 \pm 0.02 ^a	0.09 \pm 0.03 ^a	0.10 \pm 0.03 ^a	0.13 \pm 0.06 ^a	< 0.05
	20. den exp.	0.09 \pm 0.04 ^a	0.05 \pm 0.03 ^a	0.04 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.04 ^a	< 0.5
	10. den dep.	0.09 \pm 0.05 ^a	0.20 \pm 0.09^{a*}	0.11 \pm 0.06 ^a	0.14 \pm 0.08 ^a	< 0.05
LPO (nmol TBARS · mg proteinů ⁻¹)	10. den exp.	0.20 \pm 0.04 ^a	0.21 \pm 0.02 ^a	0.19 \pm 0.02 ^a	0.21 \pm 0.03 ^a	< 0.05
	20. den exp.	0.19 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	0.20 \pm 0.03 ^a	< 0.05
	10. den dep.	0.20 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.05 ^a	0.24 \pm 0.05 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a	< 0.05

GST (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteinů)	10. den exp.	2.49 ± 0.31 ^a	3.20 ± 0.43 ^a	3.19 ± 0.80 ^a	3.46 ± 0.78 ^a	< 0.05
	20. den exp.	2.57 ± 0.57 ^a	3.54 ± 0.82 ^a	3.39 ± 0.61 ^a	3.68 ± 0.64 ^a	< 0.05
	10. den dep.	2.44 ± 0.53 ^a	3.65 ± 0.90 ^a	2.78 ± 0.83 ^a	2.82 ± 0.77 ^a	< 0.05

Indexy a, b charakterizují statisticky významné rozdíly nebo shodu mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). Index * charakterizuje statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$). Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6; exp. – expozice; dep. – depurace.

5 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo posoudit subchronický vliv chloridazonu prometrynu a jejich směsi v environmentálně blízkých koncentracích na raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Pro posouzení a vyhodnocení vlivu pesticidů a jejich směsi na testované organismy byly použity výsledky stanovení biochemického profilu hemolymfy, analýzy antioxidantů a biomarkeru oxidačního stresu ze vzorků hepatopankreatu, svalstva a žaber.

5.1 Biochemie hemolymfy

Biochemické vyšetření hemolymfy má jednu z největších výpovědních hodnot o stavu sledovaných organismů (Svobodová a kol., 1991; Masopust. 2000). Stanovení biochemického profilu je tak významnou součástí hodnocení získaných výsledků akutních, subchronických a chronických testů toxicity na modelových organismech (Gallardo a kol., 2003; Ballarin a kol., 2004).

5.1.1 Glukóza

K hlavním sledovaným parametrům biochemického profilu hemolymfy náleží glukóza (GLU), která představuje hlavní zdroj energie a její zvýšená hladina indikuje stres organismu, naopak snížení hladiny je spojené s akutním selháním hepatopankreatu v důsledku vyčerpání glykogenu. (Kolářová a Velíšek, 2012). Změny hladiny GLU v průběhu testu naznačují toxický efekt chloridazonu v podobě počátečního zvýšení stresu raků, které se později projevilo na snížení hladiny GLU, to naznačuje trvalé selhání funkce hepatopankreatu. Obdobný trend byl pozorován i u testované směsi, avšak zde nelze jednoznačně prokázat, že by směs měla fatální vliv na funkci hepatopankreatu, jelikož se v průběhu depurace hodnoty GLU u testované směsi vrátili do normálu.

Velíšek a kol. (2013) pozoroval zvýšení GLU u koncentrace prometrynu $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ po 30 dnech expozice a u koncentrace prometrynu 8 a $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ po 60 dnech expozice v porovnání s kontrolou v krevní plazmě juvenilů kapra obecného. Mosiichuk a kol. (2018) ve své práci, kdy vystavil zlaté karasy (*Carrasius auratus*) koncentracím pesticidu Gesagard (0,2; 1; 5 mg.l^{-1} – odpovídá koncentracím prometrynu 0,1; 0,5; 2,5 mg.l^{-1}) po dobu 96 hodin, pozoroval zvýšení obsahu glukózy u koncentrace Gesagardu 1mg.l^{-1} v porovnání s kontrolou.

Při testování na raku signálním Chabera a kol. (2021) pozoroval zvýšení obsahu GLU v hemolymfě v koncentraci chloridazonu ($2,7 \mu\text{g.l}^{-1}$) a chloridazon-desfenylu ($0,45$ a $2,7 \mu\text{g.l}^{-1}$) v porovnání s kontrolou po 15 a 30 dnech expozice.

Zvýšení koncentrace GLU bylo pozorováno i u testované směsi pesticidů ($1,66 \text{ mg.l}^{-1}$ endosulfan + $0,76 \text{ mg.l}^{-1}$ carbofuran + $1,54 \text{ mg.l}^{-1}$ methyl parathion + $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ cypermetrin) v krevní plazmě keříčkovce žabího (*Clarias batrachus*) až o 74 % v porovnání s kontrolou v případě 30denní expozice (Narra, 2016). Veedu a kol. (2022) také pozoroval zvýšení obsahu GLU u testované směsi acetamipridu a thiametoxamu ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) ve všech testovaných expozicích (24, 48, 72 a 95 hodin) v porovnání s ostatními testovanými skupinami v krevní plazmě katly obecné (*Catla catla*). Testované směsi, které vznikly kombinací koncentrací glyfosátu (GLY) a chlorpyrifosu (CHLO), se projeví zvýšením obsahu GLU u všech testovaných kombinací ($2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY) v porovnání s kontrolou po 21 dnech expozice v hemolymfě raka bahenního (*Pontastacus leptodactylus*) (Banaee a kol., 2020). V této studii Banaee a kol. (2020) testoval i jednotlivé koncentrace zvolených pesticidů, u raků v jednotlivých koncentracích pesticidů byla také zjištěná zvýšená hladina GLU oproti kontrolním rakům, ale hodnoty GLU byly statisticky významně nižší než ve zvolených kombinacích GLY s CHLO po 21 dnech expozice.

5.1.2 Proteiny krevní plazmy

U proteinů hemolymfy jsou sledovány celkové bílkoviny (TP), které reflektují poškození funkce jater a ledvin. Zvýšené hodnoty TP indikují poškození buněk ledvin a jater (Walmsley a kol., 1992), a naopak snížené hodnoty TP se projevují u probíhající infekce nebo otravy např. triazinovými herbicidy (Velíšek a kol., 2008). Další součástí krevních proteinů jsou albuminy (ALB) tvořící 40 – 60 % plazmatických bílkovin, jejich stanovením je sledováno poškození jaterních a ledvinových funkcí. Globuliny (GLOB) při vyšší koncentraci indikují zánětlivé procesy (Kaplan a Pesce, 1989; Kolářová a Velíšek, 2012). V případě všech testovaných proteinů plazmy měla největší vliv na hladinu TP, ALB a GLOB testovaná směs pesticidů, která svými hodnotami jednotlivých ukazatelů naznačovala poškození hepatopankreatu a probíhající zánět.

Zvýšení hladiny GLOB bylo prokázáno v mé bakalářské práci (Hovorková, 2022) u testovaných směsí pesticidů prometrynu a metazachloru ($0,01 + 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$; $0,1 + 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$,

1 + 1 mg.l⁻¹) po 8 dnech expozice v porovnání s ostatními testovanými skupinami v hemolymfě raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Signifikantní snížení hladiny TP, ALB a GLOB pozoroval Narra (2016) u testované směsi pesticidů (1,66 mg.l⁻¹ endosulfan + 0,76 mg.l⁻¹ carbofuran + 1,54 mg.l⁻¹ methyl parathion + 0,25 mg.l⁻¹ cypermetrin) u všech testovaných expozic (1, 7, 15, 30 a 60 dní) oproti kontrole v krevní plazmě keříčkovce žabího. Nejvyššího snížení bylo dosaženo po 30denní expozici, a to o 50 % v případě ALB, 50 % v případě GLOB a 66 % v případě TP v porovnání s kontrolou. Veedu a kol. (2022) zjistil významné snížení hladiny TP u testované směsi acetamipridu a thiametoxamu (0,5 mg.l⁻¹ + 0,01 mg.l⁻¹) po 96 hodinách expozice v porovnání této skupiny napříč expozicemi v krevní plazmě katly obecné. Po 21 dnech expozice zaznamenal u všech testovaných směsí (2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY) i jednotlivých látek Banaee a kol. (2020) snížení obsahu TP v hemolymfě raka bahenního v porovnání s kontrolou.

5.1.3 Amoniak

Mezi často zmiňované výsledky stanovení profilu hemolymfy se řadí i amoniak (NH₃), který je toxický pro vodní organismy. Zvýšené hodnoty NH₃ indikují metabolické defekty NH₃ v Krebsově cyklu nebo selhání funkce jater (Kolářová a Velíšek, 2012). Snížený obsah NH₃ byl zaznamenán na konci expozice i po depuraci u testované směsi, v případě depurace bylo dále zjištěno významné snížení i u chloridazonu a naopak zvýšení u prometrynu. Je zajímavé, že se oba pesticidy v případě depurace projeví opačným způsobem na hladinu NH₃ ale jejich směs měla nakonec vliv na snížení hladiny NH₃. Ve směsi je možné uvažovat o potlačení účinku prometrynu nad chloridazonem, které se také odráží v podobnosti výsledků testované směsi a chloridazonu v porovnání mezi sebou. V případě prometrynu lze uvažovat o pozdějším vlivu prometrynu na koncentraci NH₃, který se mohl projevit až při depuraci nebo krátké době depurace, která dostatečně nezajistila navrácení metabolismu NH₃ do normálních hodnot. V neposlední řadě se mohlo jednat o poškození funkce hepatopankreatu, které se projevilo až v depuraci.

V porovnání s kontrolou Chabera a kol. (2020) pozoroval zvýšený obsah NH₃ v hemolymfě raka signálního u koncentrace chloridazon-desfenylu (0,45 µg.l⁻¹) po 30 dnech expozice a koncentrace stejné látky (2,7 µg.l⁻¹) po 15 a 30 dnech expozice.

V mé bakalářské práci (Hovorková, 2022) jsem zaznamenala zvýšení obsahu NH₃ u testované směsi pesticidů prometrynu a metazachloru (0,01 + 0,01 mg.l⁻¹; 0,1 + 0,1 mg.l⁻¹)

i jednotlivých testovaných látek o shodné testované koncentraci (0,01; 0,1; 1 mg.l⁻¹) po 4 a 8denní expozici v hemolymfě raka mramorovaného.

5.1.4 Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy

Součástí stanovení biochemického profilu hemolymfy jsou i cytoplazmatické a mitochondriální enzymy společně s enzymy vázanými na buněčnou membránu, mezi které se řadí asparát aminotransferáza (AST). Zvýšení aktivity AST indikuje onemocnění jater (při vysokých hodnotách až nekrózu jaterního parenchymu) a kosterní svaloviny (Folmar, 1993). Dalším cytoplazmatickým enzymem indikujícím poškození jater toxiny je alanin aminotransferáza (ALT) (Kolářová a Velíšek, 2012). Vyšší aktivita AST a ALT, které jsou projevem toxického účinku, byly zaznamenány u koncentrace prometrynu až po depuraci. Je zajímavé, že toxický účinek prometrynu se na aktivitě AST projevil v depuraci, jelikož lze obecně vzato říct, že aktivita AST je nejvyšší po 24 hodinách po poškození tkáně a poté se do 10 dnů vrací na normální hladinu (Folmar, 1993). U obou biomarkerů mohl hrát významnou roli čas přestupu pesticidu do organismu, odezva organismu v podobě aktivity metabolismu hepatopankreatu v průběhu expozice, anebo nenávratné poškození tkáně hepatopankreatu, díky kterému už nebyl organismus schopný navrácení do původní funkčnosti hepatopankreatu při depuraci. Pro koncentrace chloridazonu a směsi byl účinek na aktivitu AST a ALT spíše opačný, v případě depurace u nich došlo ke snížení aktivity biomarkerů. To naznačuje, že chloridazon ve směsi významně potlačil toxický účinek prometrynu na aktivitu AST a ALT.

Po 30 a 60denní expozici koncentrací prometrynu (0,51; 8; 80 µg.l⁻¹) byla aktivita AST v krevní plazmě kapra obecného významně snížena u všech testovaných koncentrací v porovnání s kontrolou. Opačný trend byl pozorován u aktivity ALT, která byla významně vyšší u všech testovaných koncentrací v průběhu všech expozic v porovnání s kontrolou (Velíšek a kol., 2013).

Zvýšení aktivity AST a ALT bylo zjištěno u koncentrace chloridazonu (2,7 µg.l⁻¹) v porovnání s kontrolou po 30denní expozici vystavení raků signálních této koncentraci. Chloridazon-desfenyl ve všech testovaných koncentracích (0,45; 2,7 µg.l⁻¹) vykazoval signifikantně vyšší aktivitu AST a ALT v porovnání s kontrolou po 15 a 30 dnech expozice (Chabera a kol., 2020).

U testované směsi prometrynu a metazachloru (0,1 + 0,1 mg.l⁻¹) byl v mé bakalářské práci (Hovorková, 2022) zjištěn významný nárůst aktivity ALT po 4. i 8. dnu expozice v hemolymfě raka mramorovaného. Banaee a kol. (2020) zaznamenal signifikantní vliv směsí chlorpyrifosu

a glyfosátu (2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY) na aktivitu AST a u všech testovaných směsí (2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY) na aktivitu ALT po 21denní expozici na racích bahenních.

5.1.5 Minerály

Důležitou součástí stanovení biochemie hemolymfy je i obsah minerálů v hemolymfě, zejména vápníku ve formě vápenatých iontů (Ca²⁺) a hořečnatých iontů (Mg²⁺), chloridů (Cl⁻), draslíku (K) a sodíku (Na), v této diplomové práci byly stanoveny Mg²⁺, Cl⁻, K, Na. Hořečnaté ionty mají významnou roli při aktivaci enzymů, které se účastní anabolických a katabolických procesů, dále jsou zapojeny do syntézy a destrukce acetylcholinu důležitého pro přenos elektrických impulsů a neuromuskulárních spojení. Chloridy udržují rovnovážný stav tekutin a elektrolytů a stojí za chloridovým posunem při transportu HCO₃⁻ v krevních buňkách. Draslík je součástí nitrobuněčné tekutiny ve formě kationtu (K⁺), podílí se na správné funkci nervů a svalů. Sodík ve formě kationtu (Na⁺) je součástí mimobuněčné tekutiny, reguluje objem plazmy a udržuje acidobazickou rovnováhu. Stejně jako K se také podílí na správné činnosti nervů a svalů. K dalším stanovovaným minerálními látkám se řadí anorganický fosfát (PHOS) důležitý při metabolických procesech, je obsažen v nukleových kyselinách, fosfolipidech a nukleotidech. Změny hladiny PHOS v hemolymfě indikují poškození ledvin. (Mayers, 1993; Kolářová a Velíšek, 2012). V případě Mg²⁺ iontů měla směs pesticidů nejvýznamnější vliv na zvýšení obsahu Mg²⁺ po 10 dnech expozice, mohlo to být vyvoláno silnějším počátečním účinkem obou pesticidů na metabolismus enzymu u testovaných organismů. V průběhu expozice poté došlo ke snížení obsahu Mg²⁺ u všech testovaných pesticidů a směsi v podstatě na stejnou hladinu Mg²⁺, zde nelze přesně určit, která testovaná skupina měla větší vliv. Depurace prokázala, že toxický účinek prometrynu nebyl větší než u chloridazonu a směsi, jelikož se hladina Mg²⁺ vrátila do normálu. V případě K se největší změny v obsahu K projevíly u chloridazonu již po 10 dnech expozice, konkrétně došlo ke snížení obsahu draslíku. K tomuto trendu se připojila i testovaná skupina směsi pesticidů po 20 dnech expozice. Lze předpokládat, že vlivem obou pesticidů na ráz ve směsi nebyl toxický účinek tak rychle projevěn, došlo k němu až v průběhu expozice, tomu mohl napomoci vzrůstající stres u testovaných raků atp. Depurace prokázala trvalé snížení obsahu K u chloridazonu a směsi, což naznačuje nevratné poškození tkání a narušení nervové soustavy. Samostatně testované pesticidy prokázaly vliv na hladinu Na⁺ po 10 dnech expozice oproti směsi, která neměla žádný vliv na změnu obsahu Na⁺. Na konci expozice však nejnižší hodnoty vykazovala směs, to naznačuje že dlouhodobější

vystavení směsi pesticidu je pro organismus daleko náročnější zpracovat v rámci detoxikačních mechanismů a mohlo se to tak projevit na poškození tkáně vlivem rozkolísání acidobazické rovnováhy, kterou úbytek Na^+ reflektuje. Depurace byla v tomto případě dostatečně dlouhá na to, aby se hladina Na^+ u všech skupin přiblížila normálu. Obsah Cl^- byl snížen v průběhu expozice u všech testovaných pesticidů a jejich směsí, nelze tedy přesně určit, která z testované skupiny měla větší vliv. Depurace v tomto případě byla dostatečná pro jejich znovu navrácení do normálu. V případě stanovení PHOS bylo významné zvýšení pozorováno pouze u prometrynu v depuraci, mohlo to být způsobeno pozdním projevem toxicity prometrynu na hepatopankreat, poškozením důležitých metabolických pochodů testovaných organismů nebo krátká doba depurace, která nebyla dostatečná pro navrácení normálních hodnot PHOS.

Zvýšení obsahu Mg^{2+} , Cl^- bylo zjištěno u testované směsi prometrynu a metazachloru po 8 dnech expozice v porovnání s testovanou koncentrací metazachloru (0,1; 1 mg.l^{-1}), stejný trend byl také zjištěn u jednotlivých testovaných koncentrací prometrynu (0,01; 0,1; 1 mg.l^{-1}) a metazachloru (0,01 mg.l^{-1}) po 8 dnech expozice (Hovorková, 2022). Veedu a kol. (2022) pozoroval signifikantní snížení obsahu K, Na a Cl^- v krevní plazmě katly obecné po 96 hodinách expozice směsí acetamipridu a triamethoxamu (0,5 mg.l^{-1} + 0,01 mg.l^{-1}) v porovnání s kontrolou, snížení K, Na a Cl^- bylo pozorováno i u jednotlivých koncentrací testovaných pesticidů (0,5; 1 mg.l^{-1}) v této práci.

5.1.6 Laktát

Laktát (LAC) je konečným produktem glykolýzy za anaerobních podmínek. Příčinami nadměrné produkce LAC je tkáňová hypoxie vlivem vysoké fyzické zátěže a laktátová acidóza (respirační nedostatečnost, šok, poruchy periferního překrvení, intoxikace kyanidy a sepse) (Mayes, 1993; Kolářová a Velíšek, 2012). Nejvyšší efekt v podobě zvýšení obsahu LAC byl zjištěn u testované směsi v polovině expozice, to naznačuje vyšší toxický efekt směsi v porovnání se samostatně testovanými pesticidy, který způsobil vyšší míru stresu u testovaných raků a mohl vést k dalším závažnějším důsledkům. Dále v průběhu testu hodnota LAC pro směs výrazně klesla, to může naznačovat vyrovnání se testovaných raků s přítomností pesticidů a znovuoobnovení anaerobní glykolýzy. Depurace byla dostačující, aby se u všech testovaných skupin hladina LAC blížila hladině v kontrole.

Koncentrace prometrynu 8 a 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$ prokázala signifikantní snížení hladiny LAC po 60denní expozici v porovnání s kontrolou v krevní plazmě kapra obecného (Velíšek a kol., 2013). Snížení LAC pozoroval také Mosiichuk a kol. (2018) pro koncentraci Gesagardu

0,2 mg.l⁻¹ (odpovídá 0,1 mg.l⁻¹ prometrynu) v krevní plazmě karasů zlatých po akutní expozici 96 hodin.

Významné zvýšení obsahu LAC v hemolymfě raka signálního pozoroval Chabera a kol. (2021) u testované koncentrace chloridazonu (2,7 µg.l⁻¹) a chloridazon-desfenylu (0,45 a 2,7 µg.l⁻¹) po 30denní expozici v porovnání s kontrolou.

Interpretace získaného biochemického profilu ze vzorků hemolymfy raků je velmi obtížná. Důvodem je závislost úrovně metabolismu organismů na vnějším prostředí, zejména na teplotě vody a jejím chemickém složení. To se odráží v kolísání enzymové aktivity organismu. Pro správné vyhodnocení výsledků je nutné odlišit vliv vnějšího prostředí na odezvu organismu od vnitřních změn prostředí organismu samotného. Toho se dá docílit přesným definováním vnějších podmínek společně s použitím kontrolní skupiny při experimentálních pokusech (Kolářová a Velíšek, 2012).

Z biochemického profilu hemolymfy není zřetelné, že by na všechny biomarkery měla signifikantně vyšší vliv testovaná směs pesticidů oproti pesticidům testovaným samostatně. Výraznější vliv směsi pesticidů byl prokázán pouze u některých biomarkerů (TP, ALB, GLOB, LAC), další ze sledovaných biomarkerů byly ovlivněny více pesticidy testovanými samostatně nebo se z analýzy nedalo přesně určit, jaká testovaná skupina měla větší vliv. V některých případech bylo možné pozorovat potlačení vlivu prometrynu chloridazonem ve směsi, který se poté více projevil u daného biomarkeru. Zajímavá byla také odezva na depuraci u některých biomarkerů, kdy se toxický účinek projevil teprve při ní, jednalo se zejména o prometryn.

5.2 Oxidační stres a antioxidační biomarkery

Volné radikály způsobují v nadbytku oxidační stres v organismu. Jedná se o látky, které disponují nepárovým elektronem ve svém elektronovém obalu. V biologických systémech dochází k jejich vzniku z normálních částic ztrátou nebo přijetím elektronů. Proti negativním vlivům volných radikálů si organismy vyvinuly účinné ochranné mechanismy. Jedná se o mechanismy působení bílkovin a enzymů, které zabraňují tvorbě volných radikálů, odstraňují vzniklé volné radikály, a dále reparační systémy, které odstraňují molekuly poškozené volnými radikály. Veškeré látky, které brání působení volných radikálů jsou označovány jako antioxidanty. Rovnováha mezi produkcí volných radikálů a antioxidantů udržuje normální stav biologického systému organismu. Nerovnováha antioxidantů či volných radikálů způsobuje disbalanci systému, která má za následek rozvoj chorob a další oxidační poškození organismu

(Ďuračková, 1997; Racek 2003). Míra oxidačního stresu byla v této práci stanovena pomocí lipidní peroxidace (LPO). Mezi nejdůležitější antioxidanty, které byly v této diplomové práci stanovovány, se řadí kataláza (CAT), superoxid dismutáza (SOD), acetylcholinesteráza (AChE), redukovaný glutathion (GSH) a glutathion-S-transferáza (GST).

5.2.1 Lipidní peroxidace

Experiment prokázal snížení hladiny LPO pouze u chloridazonu po 10 dnech expozice v tkáni hepatopankreatu. Mohlo se jednat o reakci na vystavení organismu pesticidu, která se v průběhu expozice ustálila vlivem efektivního působení antioxidantů v organismu. Vliv ostatních testovaných látek na tkáň mohl být ovlivněn testovanou koncentrací pesticidu a délkou expozice.

Snížení LPO bylo zjištěno u koncentrace 0,2 a 5 mg.l⁻¹ Gesagardu (prometryn v koncentraci 0,1 a 2,5 mg.l⁻¹) v játrech a u koncentrace 1 a 5 mg.l⁻¹ Gesagardu (prometryn v koncentraci 0,5 a 2,5 mg.l⁻¹) v ledvinách karasů zlatých po 96 hodinách v porovnání s kontrolou v práci Mossichuka a kol. (2015).

Směs acetamipridu a thiamethoxamu (0,5 + 0,01 mg.l⁻¹) zvýšila LPO po 24, 48, 72 a 96 hodinách expozice u žaber katly obecné (Veedu a kol., 2022). Zvýšení LPO pozoroval Narra (2016) v játrech keříčkovce žabího po aplikaci směsi pesticidů (1,66 mg.l⁻¹ endosulfan + 0,76 mg.l⁻¹ carbofuran + 1,54 mg.l⁻¹ methyl parathion + 0,25 mg.l⁻¹ cypermetrin) po 30 dnech expozice v porovnání s kontrolou. Směs diclofenaku, nifedipinu a glyfosátu (600 ng.l⁻¹ + 700 ng.l⁻¹ + 13,4 µg.l⁻¹) zvýšila LPO oproti kontrole u této testované směsi při 18 a 25 °C v trávicí žláze velevruba nadmutého (*Unio tumidus*) po 14 dnech expozice (Khoma a kol., 2021). Bacchetta a kol. (2014) ve své studii směsi endosulfanu a lambda-cyhalothrinu (1,1 µg.l⁻¹ + 0,7 µg.l⁻¹) zjistil zvýšení LPO v játrech a ledvinách druhu piraně myletese jedlého (*Piaractus mesopotamicus*) po 96 hodinách expozice.

5.2.2 Antioxidační biomarkery

Nejvyšší aktivita CAT byla analyzována u směsi pesticidů po 10. dnu expozice v hepatopankreatu. Naznačuje to vyšší vliv pesticidů na produkci volných radikálů, které se projeví zvýšenou aktivitou CAT. V průběhu testu pravděpodobně došlo k ustálení rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním volných radikálů pomocí CAT. V případě prometrynu byly pouze sledovány změny aktivity CAT v průběhu testu v hepatopankreatu, avšak zde nedošlo k žádnému významnému rozdílu od ostatních testovaných skupin. Shodný trend byl pozorován

i v případě žaber, kdy došlo u prometrynu a chloridazonu testovaných samostatně k rozdílným hodnotám v průběhu experimentu, ne však v takové míře, aby zde byl prokázán větší vliv jedné skupiny nad druhou.

Stará a kol. (2013) pozorovala snížení aktivity CAT v játrech a zvýšení aktivity CAT ve střevě kapra obecného u koncentrace prometrynu $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ po 60 dnech expozice v porovnání s kontrolou. Snížení aktivity CAT bylo docíleno v hepatopankreatu raka červeného (*Procambarus clarkii*) u prometrynu ($0,144$ a $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$) po 11 dnech expozice a u všech testovaných koncentrací prometrynu ($0,51 \text{ mg.l}^{-1}$; $0,144 \text{ mg.l}^{-1}$; $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$) po 25 dnech expozice v porovnání kontrolou (Stará a kol., 2014). Snížení aktivity CAT pozoroval také Huang a kol. (2023) u kraba říčního (*Eriocheir sinensis*), kterému byl injekčně podán prometryn v koncentraci $28,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ (40 % 96hLD50), po 24 a 48 hodinách.

U chloridazonu ($2,7 \mu\text{g.l}^{-1}$) a chloridazon-desfenylu ($0,45$ a $2,7 \mu\text{g.l}^{-1}$) byla zjištěna zvýšená aktivita CAT v porovnání s kontrolou u hepatopankreatu a žaber raka signálního po 15 a 30 dnech expozice (Chabera a kol., 2021).

Aktivita CAT výrazně vzrostla v hepatopankreatu raka bahenního u všech testovaných kombinací koncentrací chlorpyrifosu a glyfosátu ($2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY; $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ CHLO + $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ GLY) oproti kontrole po 21 dnech expozice (Banaee a kol., 2020). Zvýšení aktivity CAT u směsi ($1,66 \text{ mg.l}^{-1}$ endosulfan + $0,76 \text{ mg.l}^{-1}$ carbofuran + $1,54 \text{ mg.l}^{-1}$ methyl parathion + $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ cypermetrin) pozoroval Narra (2016) v játrech keříčkovce žabího po 30 dnech expozice v porovnání s kontrolou. Aktivita CAT v žábrech katly obecné se snížila po 96 hodinách expozice směsi acetamipridu a thiamethoxamu ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) v porovnání s kontrolou (Veedu a kol., 2022).

Stanovení aktivity SOD v hepatopankreatu prokázalo pouze zvýšení aktivity SOD u obou testovaných pesticidů a jejich směsi po 10 dnech expozice v porovnání těchto skupin v průběhu času. Nebyly zde však zjištěny takové rozdíly, které by potvrdily, jestli v tomto případě byla toxičtější koncentrace samotného pesticidu nebo jejich směsi. Zvýšení aktivity SOD mohlo být způsobeno odezvou na přítomnost cizorodé látky aktivováním antioxidantních enzymů. V případě tkáně svalu byly pozorovány výraznější rozdíly u prometrynu a směsi po 10 dnech expozice v porovnání s chloridazonem a kontrolou. Indikuje to vyšší toxicitu prometrynu jako takového, která se projevila i v případě směsi. Velmi podobný výsledek byl poté pozorován i při depuraci, což naznačuje určité poškození organismu, kdy docházelo k produkci volných radikálů i v čisté vodě. Zajímavé je i to, že 20. den expozice prokázal snížení aktivity SOD

u všech testovaných skupin, mohlo se jednat o určitý návyk organismů na přítomnost pesticidů ve vodě, který se odrazil v produkci antioxidantů. Tkáň žaber prokázala pouze změny v aktivitě SOD pro prometryn v průběhu času.

Snížení aktivity SOD bylo zjištěno v žábrech kapra obecného u prometrynu ($0,51 \mu\text{g.l}^{-1}$) po 30 dnech expozice, u koncentrace $8 \mu\text{g.l}^{-1}$ prometrynu po 14 a 30 dnech expozice a u koncentrace $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ v průběhu celého experimentu v porovnání s kontrolou. U střeva byla aktivita SOD snížena u koncentrace $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ po 14 dnech expozice v porovnání s kontrolou (Stará a kol., 2013). Snížení aktivity SOD pozorovala Stará a kol. (2014) také u raka červeného v hepatopankreatu a svalu u koncentrace prometrynu $0,144$ a $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$ po 25 dnech experimentu v porovnání s kontrolou. Další snížení aktivity SOD pozoroval Huang a kol. (2023) u kraba říčního v rozmezí 24–72 hodin po injekčním podání $28,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ prometrynu v porovnání s kontrolou. Zvýšení aktivit SOD zjistil Mosiichuk a kol (2015) v játrech a ledvinách karase zlatého u koncentrací Gesagardu $0,2$; 1 a 5 mg.l^{-1} ($0,1$; $0,5$ a $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ prometrynu) v porovnání s kontrolou po 96 hodinách.

Směs diclofenaku, nifedinipu a glyfosátu ($600 \text{ ng.l}^{-1} + 700 \text{ ng.l}^{-1} + 13,4 \mu\text{g.l}^{-1}$) zvýšila aktivitu SOD v trávící žláze velevruba nadmutého oproti kontrole u této testované směsi při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a naopak snížila při $18 \text{ }^\circ\text{C}$ po 14 dnech expozice (Khoma a kol., 2021). Narra (2016) pozoroval také zvýšení SOD v játrech keříčkovce žabího u testované směsi ($1,66 \text{ mg.l}^{-1}$ endosulfan + $0,76 \text{ mg.l}^{-1}$ carbofuran + $1,54 \text{ mg.l}^{-1}$ methyl parathion + $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ cypermetrin) po 30 dnech expozice v porovnání s kontrolou. Směs cypermetrinu a sulfamethoxazolu ($0,651 \mu\text{g.l}^{-1} + 0,3 \mu\text{g.l}^{-1}$) naopak prokázala v žábrech amura bílého snížení aktivity SOD oproti kontrole po 42 dnech expozice (Li a kol., 2022). I Veedu a kol. (2022) pozoroval snížení aktivity SOD v žábrech katly obecné vystavené směsi acetamidridu a thiamethoxamu ($0,5 \text{ mg.l}^{-1} + 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) po dobu 96 hodin v porovnání s kontrolou.

AChE katalyzuje rozklad nervového přenašeče acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou na nervových zakončeních. Změny obsahu AChE mají vliv na hromadění nebo rozklad acetylcholinu, který se projevuje zintenzivněním nebo zeslabením nervových vzruchů. Tyto změny v obsahu AChE jsou sledovány nejčastěji v tkáni svalu nebo žaber. Zvýšený obsah AChE se projevil u prometrynu a testované směsi zejména 20. den expozice a v depuraci v tkáni svalu. Naznačuje to silnější účinek prometrynu samotného a jeho projev i ve vzniklé směsi. Zvýšení hladiny AChE může mít vliv na zvýšený rozklad acetylcholinu, který má vliv na oslabení funkce svalů v organismu. V tkáni žaber byl pozorován stejný výsledek pro prometryn a směs po 10. dnu expozice, avšak v průběhu expozice došlo k vyrovnání hladiny AChE blížící

se obsahu v kontrole. Zvýšení bylo ale poté zaznamenáno u prometrynu v depuraci, to naznačuje poškození organismu v průběhu expozice, které se mohlo projevit oslabenou funkcí žaber a tím zhoršené dýchání.

Zvýšení aktivity AChE bylo pozorováno u koncentrace Gesagardu 5 mg.l⁻¹ (2,5 mg.l⁻¹ prometrynu) v žábrech a ledvinách karasů zlatých v porovnání s kontrolou po 96 hodinách expozice (Mossichuk a kol., 2015).

Aktivita AChE v hemolymfě raka bahenního byla významně snížena oproti kontrole po vystavení raků kombinacím koncentrací chlorpyrifosu a glyfosátu (2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹GLY; 2,5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,4 mg.l⁻¹ GLY; 5 µg.l⁻¹ CHLO + 0,8 mg.l⁻¹ GLY) po 21 dnech expozice (Banaee a kol., 2020). Studie Narra (2016), který testoval směs pesticidů (1,66 mg.l⁻¹ endosulfan + 0,76 mg.l⁻¹ carbofuran + 1,54 mg.l⁻¹ methyl parathion + 0,25 mg.l⁻¹ cypermetrin), prokázala nejvýznamnější snížení AChE v mozku keříčkovce žabího v porovnání s kontrolou 30. den expozice, k opětovnému zvýšení došlo po 60 dnech expozice.

GSH je součástí reakcí katalyzovaných několika enzymy. Společně GSH a GST mají vliv na vznik správných disulfidových vazeb v polypeptidových hormonech a mnoha bílkovinách. Hrají také důležitou roli v metabolismu xenobiotik. GSH, kde SH je reakční skupina molekuly v podobě sulfhydrylové skupiny cysteinu. GSH reaguje s elektrofilními xenobiotiky, enzym katalyzující tuto reakci je GST, který se nachází hlavně v parenchymatózních tkáních a v menší míře v ostatních tkáních (Murray, 1993; Rodwell, 1993). U obsahu GSH v tkáni hepatopankreatu byly pozorovány změny u všech testovaných skupin i kontroly v průběhu celého testu. Sledované změny nebyly tak významné, že by prokázaly větší vliv některé z testovaných skupin nad ostatními. Depurace způsobila ustálení hladiny GSH u všech skupin na podobné úrovni. V tkáni žaber bylo sníženo GSH u chloridazonu po 10 dnech expozice, v průběhu testu se hladiny GSH pro tuto skupinu zvýšila. Stejný trend byl pozorován i pro prometryn a směs, ale nejvýraznější zvýšení u těchto skupin bylo pozorováno až při depuraci. Zvýšení GSH při depuraci mohlo být způsobeno pozdějším nástupem efektu pesticidů a směsi na organismus nebo aktivním metabolismem odbourání pesticidů v žábrech, jelikož žábra jsou jedním z prvních orgánů přicházejícím do styku s vnějším prostředím. V případě aktivity GST bylo zjištěno její snížení u prometrynu a chloridazonu po 10 dnech a zvýšení po 20 dnech expozice v hepatopankreatu. Může to značit určitou inhibici enzymu ze strany pesticidů, která byla v průběhu experimentu potlačena a enzym se tak začal podílet na odbourávání pesticidů v tkáni. Směs v tomto případě nevykazovala takové rozdíly oproti pesticidům testovaným

samostatně v průběhu experimentu. V případě depurace ale prokázala stále probíhající odbourávání negativních vlivů této směsi v hepatopankreatu díky zvýšené aktivitě GST, aktivita GST se totiž pro prometryn a chloridazon při depuraci vrátila na hodnoty kontroly.

GSH bylo významně zvýšeno u kraba říčního po podání prometrynu v koncentraci 28,02 mg.kg⁻¹ po 6, 24 a 48 hodinách a poté významně sníženo v rozmezí 72–96 hodin v porovnání s kontrolou (Huang a kol., 2023). Gesagard v koncentraci 1 a 5 mg.l⁻¹ (0,5 a 2,5 mg.l⁻¹ prometrynu) snížil hladinu GST v žábrech, hladina GST v ledvinách byla snížena v případě všech testovaných koncentrací Gesagardu (0,2; 1 a 5mg.l⁻¹ resp., 0,1; 0,5 a 2,5 mg.l⁻¹) po 96 hodinách v porovnání s kontrolou (Mossichuk a kol., 2015).

U testovaných koncentrací chloridazonu (2,7; 27; 135 a 270 µg.l⁻¹) bylo prokázáno významné zvýšení GSH i GST v porovnání s kontrolou u homogenátu raka mramorovaného po 50 dnech expozice (Velíšek a kol., 2020). Obsah GSH v hepatopankreatu a žábřích raka signálního byl u chloridazonu (0,45 a 2,7 µg.l⁻¹) a chloridazon-desfenylu (0,45 a 2,7 µg.l⁻¹) významně zvýšen v porovnání s kontrolou po 15 a 30 dnech expozice, v případě expozice i v případě depurace (Chabera a kol., 2021).

Směs cypermetrinu a sulfamethoxazolu (0,651 µg.l⁻¹ + 0,3 µg.l⁻¹) prokázala v žábrech amura bílého snížení GSH oproti kontrole po 42 dnech expozice (Li a kol., 2022). Snížení GSH bylo pozorováno u žaber katly obecné po vystavení směsi acetamipridu a thiamethoxamu (0,5 mg.l⁻¹ + 0,01 mg.l⁻¹) oproti kontrole po 24, 48, 72 a 96 hodinách, v případě aktivity GST bylo pozorováno také významné snížení u testované směsi oproti kontrole po 96 hodinách (Veedu a kol., 2022). Hladina GSH a aktivita GST v játrech keříčkovce žabího vystaveného směsi pesticidů (1,66 mg.l⁻¹ endosulfan + 0,76 mg.l⁻¹ carbofuran + 1,54 mg.l⁻¹ methyl parathion + 0,25 mg.l⁻¹ cypermetrin) vykazovaly signifikantní snížení oproti kontrole u GSH a naopak významné zvýšení aktivity GST oproti kontrole po 30 dnech expozice (Narra, 2016). Ve směsi diclofenaku, nifedipinu a glyfosátu (600 ng.l⁻¹ + 700 ng.l⁻¹ + 13,4 µg.l⁻¹) bylo zvýšeno GSH v trávicí žláze velevruba nadmutého oproti kontrole při testování směsi v 18 a 25 °C a naopak zde došlo ke snížení aktivity GST u testované směsi při 18 i 25 °C (Khoma a kol., 2021). Aktivita GST byla snížena oproti kontrole v žábrech druhu piraně ve studii Bacchetta a kol. (2014), které byly vystaveny směsi endosulfanu a lambda-cyhalothrinu (1,1 µg.l⁻¹ + 0,7 µg.l⁻¹) v 96 hodinové expozici.

Tkáně, které vykazovaly největší odezvu na vystavení pesticidům, byly hepatopankreas a žábra, jedná se o hlavní detoxikační orgán a orgán, který přichází prvotně do styku s vnějším prostředím. Stanovením oxidačního stresu a antioxidačních enzymů nebylo dosaženo tak

signifikantních výsledků u biomarkerů, aby byl jasně prokazatelný toxičtější vliv směsi nad pesticidy testovanými samostatně, jako tomu bylo v porovnávaných studiích a v případě stanovení biochemického profilu hemolymfy. Stanovené výsledky mohou být odrazem dostatečně efektivní obranyschopnosti organismů vůči produkci ROS ve sledovaných tkáních. V případě SOD a AChE byl zaznamenán vyšší vliv prometrynu nad chloridazonem v testované směsi.

6 Závěr

Tato studie posuzovala subchronickou toxicitu testované směsi pesticidů, která se skládala z triazinového herbicidu prometrynu a pyridazonového herbicidu chloridazonu, v tkáních raka signálního. Ke stanovení vlivu byl vybrán subchronický test toxicity, kdy byli raci po dobu 20 dní vystaveni koncentracím, prometrynu ($3 \mu\text{l}^{-1}$), chloridazonu ($3 \mu\text{l}^{-1}$) a jejich směsi ($3 + 3 \mu\text{l}^{-1}$) a následně přeneseni do 10denní depurace. Koncentrace byly vybrány za účelem přiblížení se environmentálním hodnotám.

Odběr vzorků hemolymfy, hepatopankreatu, svalu a žaber byl proveden po 10. a 20. dnu expozice a následně po 10denní depuraci. Z těchto vzorků byl stanoven biochemický profil hemolymfy, aktivita antioxidantních biomarkerů a míra oxidačního stresu. V práci jsou vybrány výsledky těch biomarkerů, které vykazovaly nejvýznamnější změny a jsou důležité pro správnou funkci metabolismu orgánových soustav raků.

Z výsledků studie lze pozorovat větší vliv testované směsi pesticidů na biochemický profil hemolymfy v porovnání s analýzami antioxidantní aktivity a oxidačního stresu. Z celkového hlediska nelze přesně určit, zda měla směs signifikantně toxičtější vliv nad pesticidy testovanými samostatně v porovnání se zmiňovanými studiemi. V některých případech byl pozorován větší vliv jednoho pesticidu ve směsi nad druhým. V případě výsledků analýzy hemolymfy u některých biomarkerů bylo patrné potlačení působení prometrynu ve směsi, který byl významně převýšen přítomností chloridazonu. V případě antioxidantů, byl tento jev ve směsi pozorován u prometrynu, který v případě těchto analýz celkově vykazoval větší toxicitu při samostatném testování.

Získané výsledky rozšířily dosavadní množství informací a poznatků o toxickém vlivu jednotlivých herbicidů a jejich směsí na necílové vodní organismy. Získaná data mohou v budoucnu sloužit jako podklady pro hodnocení rizik pro životní prostředí.

7 Přehled použité literatury

- Abrahamsson, S. A. A., Goldman, C. R., 1970. Distribution, density, and production of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in Lake Tahoe, California – Nevada. *Oikos* 21, 83-91.
- Abrahamsson, S. A. A., 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus Astacus* and *Pacifastacus Leniusculus* in an isolated pond. *Oikos* 22, 373-380.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), 1986. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, 44 pp.
- Aebi, S. K., 1984. Catalase invitro. *Methods in enzymology* 105, 121-126.
- Babior, B. M., 1997. Superoxide – a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20, 141-155.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effect of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators* 36, 532-538.
- Ballarin, L., Dalloro, M., Bertotto, D., Libertini, A., Francescon, A., Barbaro, A., 2004. Haematological parameters in *Umbria cirrose* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138, 45-51.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M., 2020. Combined effect of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 20, 1500-1515.
- Barešová, L., Freisleben, J., Fulajtárová, A., Kodeš, V., Mikl, L., Roztočilová, H., Salaba, P., Sirotková, K., Stierand, P., Svátková, M., Svoboda, V., 2023. Kapitola III: Hydrologická bilance kvality vody [online]. *Hydrologická ročenka České Republiky 2022*, Český hydrometeorologický ústav, ISBN 978-80-7653-061-4.
- Bastos, A. S., de Melo Loureiro, A. P., Franco de Oliveira, T., Corbi, S. C. T., Caminaga, R. M. S., Júnior, C. R., Orrico, S. R. P., 2012. Malondialdehyde in gingival crevicular fluid. *Analytical Biochemistry*, 423, 141-146.
- Bradley, J. C., Williams, A., Lang, A., 2014. Jean-Claude Bradley Open Melting Point Dataset [online]. [cit. 19. 2. 2024]. Dostupné na WWW: https://figshare.com/articles/dataset/Jean_Claude_Bradley_Open_Melting_Point_Dataset/1031637.
- Brick, P., 1977. Developing crayfish populations. *Freshwater Crayfish* 3, 211-228.

- Bubb, D. H., Lucas, M. C., Thom, T. J., 2004. Movement and dispersal of the invasive signal crayfish *Pasifastacus leniusculus* in upland rivers. *Freshwater Biology* 49, 357-368.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., Burgeot, T., Allenou, J. P., Gabellec, R., 2012. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 651-666.
- Carlberg, I., Mannervik, E. B., 1975. Glutathione level in rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4475-4480.
- Carvalho, F. P., 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6, 48-60.
- Casida, J. E., 2015. Golden age of RyR and GABA-R diamide and isooxazoline insecticides: common genesis, serendipity, surprises, selectivity, and safety. *Chemical Research in Toxicology* 28, 560-566.
- Casida, J. E., Durkin, K. A., 2017. Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature. *Chemical Research in Toxicology* 30, 94-104.
- Costa, L. G., 1987. Toxicology of pesticides: a brief history. In: Costa, L. G., Galli, C. L., Murphy, S. D. (Eds.), *Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives*. Heidelberg Springer-Verlag, pp. 1-10.
- Costa, L. G., 2020. Pesticides. In: Lippmann, M., Leikauf, G. D. (Eds.), *Environmental toxicants: Human exposures and their health, effects*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, UK, pp. 855-875.
- ČHMÚ – Český hydrometeorologický ústav, 2023. Hlásná a předpovědní povodňová služba [online]. [cit. 4.3. 2024]. Dostupné na WWW: <https://hydro.chmi.cz/>.
- ČHMÚ – Český hydrometeorologický ústav, 2024. Pasportizace látek [online]. [cit. 4.3. 2024]. Dostupné na WWW: <https://pasporty.chmi.cz>.
- Diéguez-Urbeondo, J., Söderhäll, K., 1999. RAPD evidence for the origin of an outbreak of crayfish plague in Spain. *Freshwater Crayfish* 12, 313-318.
- Đikić, D., 2014. Prometryn. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, pp. 1077-1081.
- Đuračková, Z., 1997. Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klinická biochemie a metabolismus* 5, 227-231.
- eAGRI – portál Ministerstva zemědělství, 2024. Registr přípravků na ochranu rostlin.[online]. [cit. 26. 2. 2024]. Dostupné na WWW: <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx>.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.
- Ellman, G. L., Courtney, K., D., Andres, V., Featherstone, R., M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7; 88-90.

- European Food Safety Authority (EFSA), 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide riskassessment of the active substance chloridazon. EFSA Scientific Report 108, 1-82.
- Ewing, J. F., Janero, D. R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* 232, 243-248.
- Filipová, L. Petrušek, A., Kozák, P., Polícar, T., 2006. *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – rak signální. In: Mlíkovský, J., Stýblo, P. (Eds), *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky*. ČSOP, Praha, s. 239-240.
- Folmar, L. C., 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 337-375.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2023. Pesticides use and trade 1990-2021. FAOSTAT Analytical Series No. 70, Rome.
- Gallardo, M. A., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padros, F., Blasco, J., Fernandes-Borra, J., Sanchez, J., 2003. Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223, 15-27.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249(22), 7130-7139.
- Hintze, S., Glauser, G., Hunkeler, D., 2020. Influence of surface water – groundwater interactions on the spatial distribution of pesticide metabolites in groundwater. *Science of the Total Environment* 733, 139109.
- Hogger, J. B., 1986. Aspects of the introduction of “signal crayfish”, *Pacifastacus leniusculus* (Dana), into the southern United Kingdom. 1. Growth and survival. *Aquaculture* 58, 27-44.
- Holdich, D. M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Füderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmíetana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D., Haffner, P. (Eds), *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d’Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 11, 394-395.
- Hovorková, A., 2022. Subletální účinky směsí pesticidů na raky. Bakalářská práce, Vedoucí práce Ing. Alžběta Stará, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. České Budějovice, 69 s.

- Huang, P., Du, J., Cao., L., Gao., J., Li, Q., Sun, Y., Shao, N., Zhang, Y., Xu, G., 2023. Effects of prometryn on oxidative stress, immune response and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 262, 115459.
- Chabera, J., Stara, A., Kubec, J., Buric, M., Zuskova, E., Kouba, A., Velisek, J., 2021. The effect of chronic exposure to chloridazon and its degradation product chloridazon-desphenyl on signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008, 111645.
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), 2014a. Chloridazon CHEBI: 81838 [online]. European Bioinformatics Institute [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:81838>.
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), 2014b. Prometryn CHEBI: 26276 [online]. European Bioinformatics Institute [cit. 19. 2. 2024]. Dostupné na WWW: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:26276>.
- Kaplan, L. A., Pesce, A. J., 1989. *Clinical Chemistry*. CV Mosby Company, St. Louis, 186 pp.
- Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackov, T., Mishenko, L., Manusadžianas, L., Stoliar, O., 2021. Common and particular biochemical responses of *Unio tumidus* to herbicide, pharmaceutical and their combined exposure with heating. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111695.
- Kirjavainen, J., Westman, K., 1995. Development of an introduced signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) population in the small Lake Karisjarvi in central Finland. *Freshwater Crayfish* 10, 140-150.
- Kirjavainen, J., Westman, K., 1999. Natural history and development of the introduced signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in a small, isolated Finnish Lake, from 1968 to 1993. *Aquatic Living Resources* 12, 387-401.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha, 64 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. *Metodika č. 135*. Edice Metodik (Technologická řada). FROV JU, Vodňany, 56 s.
- Kouba, A., 2007. Porovnání embryonálního vývoje původních a nepůvodních druhů raků. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 82 s.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrušek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Polícar, T., 2013. *Biologie a chov raků*. FROV JU, Vodňany, 418 s.
- Kozubíková, E., Puky, M., Kiszely, P., Petrušek, A., 2010. Crayfish plague pathogen in invasive North American crayfish species in Hungary. *Journal of Fish Diseases* 33, 925-929.
- Li, B., Wang, Y., Zhao, H., Yin, K., Liu, Y., Wang, D., Zhong, H., Xing, M., 2022. Oxidative stress is involved in the activation of NF-κB signal pathway and immune inflammatory response in grass carp

- gill induced by cypermethrin and/or sulfamethoxazole. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 19594-19607.
- Lilley, J. H., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1997. RAPD evidence for the origin of crayfish plague outbreaks in Britain. *Aquaculture* 157, 181-185.
- Linhart, I., 2014. *Toxikologie, Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2. Vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, str. 45, 199-207.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak O. V., Storey, J. M., Storey, K. B. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 1319-1330.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 128-132.
- Mason, J. C., 1978. Significance of egg size in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Freshwater Crayfish* 4, 83-92.
- Masopust, J., 2000. *Klinická biochemie*. Karolinum, Praha, 429 str.
- Mayes, P. A., 1993. Metabolismus xenobiotik. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harperova biochemie. Nakladatelství H+H, Jihlava, ISBN 80-7319-013-3.
- McGriff, D., 1983. Growth, maturity, and fecundity of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, from the Sacramento-San Joaquin Delta. *California Fish and Game* 69, 227-242.
- Mosiichuk, N. M., Husak, V. V., Maksymiv, I. V., Hlodan, O. Y., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2015. Toxicity of environmental Gesagard to goldfish may be connected with induction of low intensity oxidative stress in concentration – and tissue-related manners. *Aquatic Toxicology* 165, 249-258.
- Mosiichuk, N. M., Husak, V. V., Maksymiv, I. V., Hlodan, O. Y., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2018. Effect of Prometryn-containing herbicide Gesagard on hematological profiles and biochemical parameters in goldfish liver and plasma. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18, 1177-1185.
- Murray, R. K., 1993. Metabolismus xenobiotik. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harperova biochemie. Nakladatelství H+H, Jihlava, ISBN 80-7319-013-3.
- Narra, M. R., 2016. Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: A long-term monitoring. *Chemosphere* 144, 966-974.

- Oztürk-Urek, R., Tarhan, L., 2001. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128, 205-212.
- Pauli, B. D., Kent, R. A., Wong, M. P., 1990. Canadian water guidelines for metribuzin. *Environmental Canada Sciences Serie* 179, 135-145.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. *European Project CRAYNET*, 47 pp.
- Polícar, T., Kozák, P., 2000. Výskyt raků v ČR. *Bulletin VÚRH Vodňany* 36 (1–2), 18-22.
- Popova, G. V., 1976. Characteristics of the effect of the herbicide prometryn on fish. *Nauchn Osn Okhr Prir* 14, 118-125.
- Prousek, J., 2001. Rizikové vlastnosti látok. *Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava, Slovenská republika*, s. 60-93.
- PubChem, 2021a. Chloridazon [online]. National Centre for Biotechnology Information [cit. 4. 12. 2023], Dostupné na WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15546#section=IUPAC-Name>.
- PubChem, 2021b. Prometryn [online]. National Centre for Biotechnology Information [cit. 19. 2. 2024], Dostupné na WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4929>.
- Racek, J., 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. *Edice Repetorium, svazek šestý*, Galén, Praha, ISBN 80-7262-231-5, 90 s.
- Rodwell, V. W., 1993. Peptidy. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harperova biochemie. 4. české vydání, 2002, Nakladatelství H+H, Jihlava, ISBN 80-7319-013-3.
- Savolainen, R., Westman, K., Pursiainen, M., 1996. Fecundity of Finnish noble crayfish, *Astacus astacus* L., and signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in various natural habitats and in culture. *Freshwater Crayfish* 11, 319-338.
- Sigma Aldrich, 2023. Protein Determination by the Bicinchoninic Acid (BCA) Method [online]. Merck-Life Science [cit. 9.8.2023], Dostupné na WWW: https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination-by-the-bicinchoninic-acid-bca-method?gclid=CjwKCAjw8symBhAqEiwAaTA__G_DeEv_XKtousWws8kq5aNsb7U2Rbb4JP2gAw2lpAEbWX7hp8S75hoCXTAQAvD_BwE&gclid=aw.ds.
- Söderbäck, B., 1995. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a Swedish lake: possible cause and mechanisms. *Freshwater Biology* 33, 291-304.

- Spitzky, R., 1973. Crayfish in Austria: History and actual situation. *Freshwater Crayfish* 1, 10-14.
- Srivastava, P. K., Singh, V. P., Singh, A., Tripathi, D. K., Singh, S., Prasad, S. M., Chauhan, D. K. (Eds.), 2020. *Pesticides in Crop Production – Physiological and Biochemical Action*. John Willey & Sons, UK, pp. 17.
- Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E., Velisek, J., 2013. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105, 18-23.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International* 2014, 680131.
- Surai, P. F., Noble, R. C., Speake, B. K., 1996. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism* 1304, 1-10.
- Svärdson, G., 1995. The early history of signal crayfish introduction into Europe. *Freshwater Crayfish* 8, 68-77.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1991. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik, VÚRH JU Vodňany, 20, 31 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.), *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Štambergová, M., Kučera, Z., 2009. Celoplošné mapování a monitoring populací raků v ČR. *Bulletin VÚRH Vodňany* 45 (2–3), 91-99.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. *Raci v České republice*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 255 s.
- The Toxin and Toxin Target Database (T3DB), 2014a. Chloridazon T3D3806 [online]. [cit. 4. 12. 2023], Dostupné na WWW: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D3806>.
- The Toxin and Toxin Target Database (T3DB), 2014b. Prometryn T3D3906 [online]. [cit. 19. 2. 2024], Dostupné na WWW: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D3906>.
- Taylor, C. A., Schuster, G. A., Cooper, J. E., DiStefano, R. J., Eversole, A. G., Hamr, P., Hobbs, H. H., Robison, H. W., Skelton, C. E., Thoma, R.F., 2007. A reassessment of the conservation status of crayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. *Fisheries* 32, 372-389.
- Tomlin, C. D. S., 2004. Chloridazon. *The e-Pesticide Manual*, 13th Edition, Version 3.1, British Crop Protection Council, Surrey, UK.

- Trevan, J. W., 1927. The error of determination of toxicology. Proceedings of the Royal Society of London 101, Series B, 483-514.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1991a. OPP Pesticide Ecotoxicity Database [online]. [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://ecotox.ipmcenters.org/details.cfm?recordID=7175>.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1991b. OPP Pesticide Ecotoxicity Database [online]. [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://ecotox.ipmcenters.org/details.cfm?recordID=7174>.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1991c. OPP Pesticide Ecotoxicity Database [online]. [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://ecotox.ipmcenters.org/details.cfm?recordID=7173>.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1991d. OPP Pesticide Ecotoxicity Database [online]. [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://ecotox.ipmcenters.org/details.cfm?recordID=7172>.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1996. Registration Eligibility Decision (RED) Prometryn [online]. [cit. 4. 12. 2024]. Dostupné na WWW: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0467.pdf>.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 2005. RED Document for Pyrazon [online]. Environmental Protection Agency [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-069601_1-Sep-05.pdf.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 2007. Office of Pesticide Programs: Pyrazon Screening Level Ecological Risk Assessment for the Re-registracion Decision [online]. [cit. 4. 12. 2023]. Dostupné na WWW: <https://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main>.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) – Musil, B., 2023. Spotřeba přípravků na OR v roce 2022 [online]. eAGRI [cit. 7.3.2024]. Dostupné na WWW: https://eagri.cz/public/portal/ukzuz/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech/spotreba-roky-neviditelny/2022-cz-2/celek_2022_cz_oprava.pdf.
- Veedu, S., Ayyasamy, G., Tamilselvan, H., Ramesh, M., 2022. Single and join toxicity assessment of acetamiprid and thiamethoxam neonicotinoids pesticides on biochemical indices and antioxidant enzyme activities of a freshwater fish *Catla catla*. Comparative Biochemistry and Physiology 257, Part C, 109336.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Novotný, L., Bláhová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinární Medicína 53, 324-332.

- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Svobodova, Z., 2013. Use of biometric, hematologic, and plasma biochemical variables, and histopathology to assess the chronic effects of the herbicide prometryn on Common Carp. *Veterinary Clinical Pathology* 42/4, 508-515.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 658 s.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Chabera, J., Kubec, J., Buric, M., Kouba, A., 2020. Effects of chloridazon on early life stages of marbled crayfish. *Chemosphere* 257, 127189.
- Vryzas, Z., Alexoudis, C., Vassiliou, G., Galanis, K., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 174-181.
- Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka (VÚV TGM), 2020. Data – výskyt račího moru a invazních druhů raků [online]. Hydroekologický informační systém VÚV TGM [cit. 7.3.2024]. Dostupné na WWW: <https://heis.vuv.cz/data/webmap/datovesady/projekty/raci2017/default.asp?tab=6&wmap=hvmap>.
- Walmsley, R. N., Watkinson, L. R., Koay, E. S. C., 1992. Cases in chemical pathology – a diagnostic approach. World Scientific, 125-136.
- Westman, K., 1973a. Cultivation of the American crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Crayfish* 1, 211-220.
- Westman, K., 1973b. The population of the crayfish, *Astacus astacus* L. in Finland and the introduction of the American crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Freshwater Crayfish* 1, 41-55.
- Wilson, N. H., Hardisty, J. F., Hayes, J. R., 2008. Short-term, Subchronic, and Chronic Toxicology Studies. In: Hayes, A. V. (Eds.), *Principles and Methods of Toxicology* 5th ed. Informa Healthcare USA, New York, pp. 1224-1264.
- Worthing, C. R., Walker, S. B., 1987. *The Pesticide Manual – A World Compendium*. The British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK, 700 pp.
- Yan, F., Kumar, S., Spyrou, K., Syari'ati, A., De Luca, O., Thomou, E., Alfonsín, E. M., Gournis, D., Rudolf, P., 2021. Highly Efficient Remediation of Chloridazon and Its Metabolites: The Case of Graphene Oxide Nanoplatelets. *ACS ES&T Water*, 157-166.
- Zhou, J. H., Hu, F., Jiao, J. G., Liu, M. G., Li, X. H., 2012. Effects of bacterial-feeding nematodes and prometryne-degrading bacteria on the dissipation of prometryne in contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments* 12, 576-585.

8 Seznam zkratek

ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AChE	acetylcholinesteráza
ALB	albuminy
ALT	alanin aminotransferáza
AST	aspartát aminotransferáza
ATC	acetylthiocholin
BASF	Badische Anilin & Soda-Fabrik
BCA	kyselina bicinchoninová
BHT	butylovaný hydrotoluen
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	kataláza
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
eAGRI	portál Ministerstva zemědělství
EC50	efektivní koncentrace, která způsobí imobilizaci 50 % testovaných organismů
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FROV	Fakulta rybářství a ochrany vod
GLOB	globuliny
GLU	glukóza
GLY	glyfosát
GSH	redukovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferáza
ChEBI	Chemical Entities of Biological Interest
CHLO	chlorpyrifos
LAC	laktát
LC50	letální koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů

LD50	letální dávka, která způsobí úhyn u 50 % testovaných organismů
LOEC	nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobí škodlivý účinek
LPO	lipidní peroxidace
MDA	malondialdehyd
MTD	maximální tolerovaná dávka
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NBT	nitrotetrazoliová modř
NH ₃	amoniak
NOEC	nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobí žádný škodlivý účinek
PBS	pufr (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 % Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O, 0,02 % KH ₂ PO ₄ v deionizované vodě, pH 7,2)
PHOS	anorganický fosfát
PMS	phenazin methosulfonát
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxid dismutáza
T3DB	The Toxin and Toxin Target Database
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TCA	kyselina trichloroctová
TP	celkový protein
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
US EPA	US Environmental Protection Agency
VÚRH	Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
VÚV TGM	Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka

9 Seznam grafů, obrázků a tabulek

Graf č. 1: Celosvětová spotřeba pesticidů podle kategorie.	10
Graf č. 2: Ošetření plodin v České republice v roce 2022 podle kategorie pesticidů.	11
Graf č. 3: Hladina glukózy (GLU) v hemolymfě raka signálního.	36
Graf č. 4: Hladina celkového proteinu (TP) v hemolymfě raka signálního.	37
Graf č. 5: Hladina albuminů (ALB) v hemolymfě raka signálního.	38
Graf č. 6: Hladina globulinů (GLOB) v hemolymfě raka signálního.	39
Graf č. 7: Hladina amoniaku (NH ₃) v hemolymfě raka signálního.	40
Graf č. 8: Hladina aspartát aminotransferázy (AST) v hemolymfě raka signálního.	41
Graf č. 9: Hladina alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka signálního.	42
Graf č. 10: Hladina hořčnatých iontů (Mg ²⁺) v hemolymfě raka signálního.	43
Graf č. 11: Hladina chloridů (Cl ⁻) v hemolymfě raka signálního.	44
Graf č. 12: Hladina draslíku (K) v hemolymfě raka signálního.	44
Graf č. 13: Hladina sodíku (Na) v hemolymfě raka signálního.	45
Graf č. 14: Hladina lipidní peroxidace (LPO) v tkáni hepatopankreatu raka signálního.	46
Graf č. 15: Aktivita katalázy (CAT) v tkáni hepatopankreatu raka signálního.	47
Graf č. 16: Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v tkáni hepatopankreatu raka signálního.	48
Graf č. 17: Hladina redukovaného glutathionu (GSH) v tkáni hepatopankreatu raka signálního.	48
Graf č. 18: Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni hepatopankreatu raka signálního.	49
Graf č. 19: Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v tkáni svalu raka signálního.	50
Graf č. 20: Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) v tkáni svalu raka signálního.	51
Graf č. 21: Aktivita katalázy (CAT) v tkáni žaber raka signálního.	53
Graf č. 22: Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) v tkáni žaber raka signálního.	54
Graf č. 23: Hladina redukovaného glutathionu (GSH) v tkáni žaber raka signálního.	55
Obrázek č. 1: Struktura prometrynu.	12
Obrázek č. 2: Triazinové a triazinonové herbicidy v podzemních vodách v roce 2022.	14
Obrázek č. 3: Struktura chloridazonu.	16
Obrázek č. 4: Chloridazon a jeho deriváty v podzemních vodách v roce 2022.	17
Obrázek č. 5: Výskyt raka signálního (<i>Pacifastacus leniusculus</i>) v České republice.	21
Tabulka č. 1: Koncentrace pesticidů a jejich směsi.	24
Tabulka č. 2: Kalibrace MDA.	29
Tabulka č. 3: Koncentrační řada GSH.	33
Tabulka č. 4: Hladina laktátu (LAC) v hemolymfě raka signálního.	42

Tabulka č. 5: Hladina anorganického fosfátu (PHOS) v hemolymfě raka signálního.	45
Tabulka č. 6: Výsledky stanovení lipidní peroxidace (LPO), aktivity katalázy (CAT), redukovaného glutathionu (GSH) a glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni svalu raka signálního.	51
Tabulka č. 7: Výsledky stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD), lipidní peroxidace (LPO) a glutathion-S-transferázy (GST) v tkáni žaber raka signálního.	55

10 Abstrakt

Posouzení subchronické toxicity směsí pesticidů na raky

Prometryn, řadící se do skupiny s-triazinů, byl značně využíván v případě ochrany produkce kukuřice před širokolistými plevely a travinami. Jeho používání bylo zakázáno EU v roce 2004. Chloridazon je pyridazonový herbicid využívaný pro ochranu produkce řepy a k hubení širokolistých plevelů. Jeho vlastnosti zvyšují potenciál přenosu tohoto pesticidu do vodního prostředí. Společně se svými metabolity je detekován v podzemních vodách na území ČR. Zákaz jeho používání v ČR je od roku 2020. Příhodné vlastnosti a dlouhodobé využívání těchto látek mohou zvyšovat riziko kontaminace necílových ekosystémů používanými pesticidy a jejich metabolity, které v tomto prostředí mohou vytvářet směsi a mít tak ještě rizikovější dopad na životní prostředí.

Cílem této práce bylo posouzení subchronické toxicity vytvořené směsi pesticidů z koncentrací zmíněných pesticidů na raku signálním (*Pacifastacus leniusculus*) v porovnání s kontrolou a pesticidy testovanými samostatně. K získání výsledků byl využit subchronický test toxicity v délce trvání 20 dnů s následnou 10denní depurací. Kritéria hodnotící toxicitu směsi byly biochemický profil hemolymfy, míra oxidačního stresu a aktivita antioxidantních enzymů ze vzorků hepatopankreatu, svalu a žaber.

Biochemický profil hemolymfy byl významněji ovlivněn u jedinců testovaných ve směsi pesticidů. U biomarkerů pozměněných v důsledku směsi bylo v některých případech pozorováno potlačení vlivu prometrynu ve směsi. Analýza antioxidantních biomarkerů neprokázala vyšší toxicitu směsi nad pesticidy testovanými samostatně. V případě antioxidantů byl větší vliv pozorován u prometrynu testovaného samostatně, kdy v některých případech jeho přítomnost ve směsi potlačila účinek chloridazonu v této směsi.

Klíčová slova: prometryn, chloridazon, směs, biochemie, hemolymfa, antioxidanty, oxidační stres

11 Abstract

Assessment of the subchronic toxicity of pesticide mixtures on crayfish

Prometryn, belonging to the group of s-triazines, has been extensively used in the case of protection of maize production against broadleaf weeds and grasses. Its use was banned by the EU in 2004. Chloridazone is a pyridazone herbicide used to protect beet production and to control broadleaf weeds. Its properties increase the potential for the transfer of this pesticide to the aquatic environment. Together with its metabolites, it has been detected in groundwater in the Czech Republic. Its use in the Czech Republic has been banned since 2020. The adventitious properties and long-term use of these substances may increase the risk of contamination of non-target ecosystems by the pesticides used and their metabolites, which may form mixtures in this environment and thus have an even riskier impact on the environment.

The aim of this work was to assess the subchronic toxicity of the pesticide mixture formed of the concentrations of these pesticides on the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in comparison with the control and pesticides tested alone. A subchronic toxicity test of 20 days duration followed by 10 days depuration was used to obtain the results. The criteria evaluating the toxicity of the mixture were the biochemical profile of haemolymph, oxidative stress level and antioxidant enzyme activity from hepatopancreas, muscle and gill samples.

The biochemical profile of haemolymph was significantly affected in individuals tested in the pesticide mixture. For biomarkers altered due to the mixture, suppression of the effect of prometryn in the mixture was observed in some cases. The analysis of antioxidant biomarkers did not show a higher toxicity of the mixture over the pesticides tested alone. In the case of antioxidants, a greater effect was observed for prometryn tested alone, where in some cases its presence in the mixture suppressed the effects of chloridazon in the mixture.

Keywords: prometryn, chloridazone, mixture, biochemistry, hemolymph, antioxidants, oxidative stress