

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Vliv koncentrace, teploty a doby působení na biochemické parametry raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) exponovaného neonikotinoidovému pesticidu, thiaklopridu.

Autor: Bc. Světlana Hummelová

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

Konzultant diplomové práce: dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.

Studijní program a obor: Zemědělská specializace
Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. a konzultantovi dr hab. Ing. Josefu Velíškovi Ph.D., za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat dalším zaměstnancům laboratoře Vodní toxikologie a ichtyopatologie, FROV JU Vodňany, zejména Ing. Marii Šandové, kteří mi byli nápomocni zejména v praktické části diplomové práce.

Děkuji také mé rodině a všem blízkým, kteří mě po celou dobu studia plně podporovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Světlana HUMMELOVÁ**
Osobní číslo: **V17N004P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Vliv koncentrace, teploty a doby působení na biochemické parametry raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*) exponovaného neonikotinoidovému pesticidu, thiaclopridu**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Thiacloprid patří do skupiny synteticky vyrobených neonikotinoidových látek na bázi přírodního nikotinu. Tyto látky se vyznačují nízkou toxicitou pro savce a vysokou toxicitou na bezobratlé organismy. Využití těchto látek bylo rozšířeno od 90. let, kdy nahradily pro savce vysoce toxické karbamáty a organofosfáty. Několik látek ze skupiny neonikotinoidů bylo na základě zjištěných vysokých koncentracích ve vodách, bioakumulaci a škodlivých účincích na necílové bezobratlé organismy v roce 2013 komisí EU zakázáno. Thiacloprid je stále široce používaná účinná látka, o které je třeba rozšířit a doplnit vědecké poznatky o jejich účincích na necílové bezobratlé organismy. Cílem diplomové práce je posoudit chronické účinky thiaclopridu na raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*).

V rámci diplomové práce bude proveden chronický test toxicity, kdy jednotlivé skupiny raků budou vystaveny vybraným koncentracím thiaclopridu za různých teplotních podmínek. V průběhu testu se bude sledovat mortalita a změny chování raků, antioxidantní biomarkery a oxidační stres v tkáních a biochemický profil hemolymfy. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou Laboratoří vodní toxikologie a ichthyopatologie na FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD a ISO pro testy toxicity na zástupcích vodních organismů. Biochemický profil hemolymfy, antioxidantní biomarkery a oxidační stres v tkáních raka budou prováděny dle jednotlivých metod.

Získané výsledky testování rozšíří dosavadní informace o nové poznatky o toxickém účinku thiaclopridu na necílové vodní organismy, respektive raky, a budou podkladem pro hodnocení rizik thiaclopridu pro životní prostředí (Environmental Risk Assessment).

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 20 stran)**

Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Morrissey, C.A, Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surfacewaters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International* 74: 291-303.

Simon-Delso, N., et al., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 5-34.

Stara, A., Zuskova E., Kouba, A., Velisek, J., 2016. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment* 566/567: 733-740.

Calvo-Flores, F.G., Isac-Garcia, J., Jiménez, J.A.D., 2018. Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties. John Wiley & Sons, 528 pp.

Velíšek, J., a kol., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 600 s.

Kozák, P. a kol., 2013. Biologie a chov raků, FROV JU, 418 s.

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

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **5. ledna 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
L.S.
Zátiší 723/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 10. ledna 2018

Obsah:

1. Úvod	8
2. Literární přehled	11
2.1. Pesticidy	11
2.1.1. Insekticidy.....	12
2.1.2. Neonikotinoidy.....	13
2.1.3. Thiacloprid.....	15
2.2. Biochemické parametry používané jako biomarkery	18
2.2.1. Parametr oxidačního stresu	18
2.2.1.1. Lipidní peroxidace (LPO).....	19
2.2.2. Antioxidační parametry	19
2.2.2.1. Superoxid dismutáza (SOD).....	20
2.2.2.2. Kataláza (CAT).....	20
2.2.2.3. Glutathion/dázy (GSH, GPx, GST, GR)	21
2.2.3. Parametry biochemického profilu hemolymfy/krve	21
2.3. Raci (<i>Astacidea</i>).....	24
2.3.1. Obecná charakteristika raků.....	24
2.3.2. Základní morfologie a anatomie raků.....	25
2.3.3. Rak mramorovaný (<i>Procambarus virginalis</i>).....	26
3. Materiál a metodika	28
3.1. Příprava a průběh chronického testu toxicity.....	28
3.2. Odběr a příprava vzorků k analýze	31
3.3. Jednotlivé metody stanovení biochemických parametrů	33
3.3.1. Metoda pro stanovení proteinů	33
3.3.2. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD).....	35
3.3.3. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity kataláz (CAT)	36
3.3.4. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázi (GST).....	37
3.3.5. Metoda pro stanovení redukováného glutathionu (GSH).....	38
3.3.6. Metoda pro stanovení lipidní peroxidace (LPO).....	40
3.3.7. Biochemický profil hemolymfy.....	42
3.4. Statistické vyhodnocení	42
4. Výsledky.....	43
4.1. Chování a mortalita raků	43
4.2. Antioxidační parametry.....	43
4.2.1. Superoxid dismutáza (SOD)	43
4.2.2. Kataláza (CAT).....	46
4.2.3. Glutathion S-transferáza (GST)	49
4.2.4. Hladina redukováného glutathionu (GSH).....	52

4.3. Parametr oxidačního stresu.....	54
4.3.1. Lipidní peroxidace (LPO).....	54
4.4. Biochemický profil hemolymfy.....	56
4.4.1. Glukóza (GLU).....	56
4.4.2. Amoniak (NH ₃).....	57
4.4.3. Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy.....	58
4.4.3.1. Alanin aminotransferáza (ALT).....	58
4.4.3.2. Asparát aminotransferáza (AST).....	59
4.4.3.3. Kreatinkináza (CK).....	60
4.4.3.4. Laktát dehydrogenáza (LDH).....	61
4.4.4. Minerály.....	62
4.4.4.1. Vápník a hořčík (Ca ²⁺ a Mg ²⁺).....	62
4.4.5. Proteiny krevní plazmy.....	63
4.4.5.1. Albumin (ALB), globulin (GLOB) a celkové proteiny (TP).....	63
5. Diskuse.....	64
5.1. Chování a mortalita.....	65
5.2. Antioxidační parametry a lipidní peroxidace.....	66
5.3. Biochemický profil hemolymfy.....	69
6. Závěr.....	72
7. Seznam použité literatury.....	74
8. Seznam zkratek.....	84
9. Abstrakt.....	86
10. Abstract.....	88

1. Úvod

S obrovským nárůstem celosvětové populace a konzumním stylem života, společně se zintenzivněním průmyslu a zemědělství, se v současné době stále masivně rozvíjí výroba nových pesticidních látek a komerčních výrobků. Používání pesticidů v takovém množství jako v současnosti je považováno za celosvětový problém, zejména proto, že se negativně odráží na životním prostředí (Velíšek a kol., 2014).

Nová řada insekticidních přípravků neonikotinoidů se během dvaceti let za doby své existence dostala mezi nejpoužívanější pesticidy na světě (Tomizawa a Casida, 2011). Jevila se jako ideální náhrada za toxické organofosfáty a karbamáty, jelikož vykazovala nízkou toxicitu pro savce, ptáky i ryby. Brzy se ale zjistilo, že aplikace těchto insekticidů má devastující účinky na významné opylovače – včely, proto bylo používání určitých zástupců z této skupiny v některých zemích zakázáno (Titěra, 2013; Velíšek a Stará, 2018; Evropská komise, 2020; ÚKZÚZ, 2020).

Thiacloprid patří do skupiny neonikotinoidů, které jsou ve velké míře stále používány. Využívá se zejména jako postřikový insekticidní přípravek k ochraně proti škůdcům jádřovin, peckovin, řepky, hořčice, bramboru, jahodníku, rybízu, různých druhů zelenin, maliníku, ostružiníku, okrasných rostlin a ovocných a školek. Vzhledem k jeho širokému rozsahu použití, se aplikuje téměř po celý vegetační rok (březen-září) (Bayer CropScience, 2020).

Při správné aplikaci by se tato látka neměla dostat do kontaktu s vodním recipientem. Podle dostupných dat se však v povrchových vodách vyskytuje. Nejvyšší naměřená koncentrace thiaclopridu $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, byla zaznamenána v povrchových vodách říčního systému Labe v Německu nedaleko Hamburku (Süß a kol., 2006). I poměrně nízké koncentrace ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ chronické expozice) neonikotinoidů ve vodním prostředí způsobují u většiny citlivých bezobratlých organismů fatální důsledky (Morrissey a kol., 2015).

I přesto, že neonikotinoidy představují vysoké nebezpečí pro necílové bezobratlé organismy, doposud se většina studií zaměřila především na zkoumání vlivu těchto látek na včely a některé další zástupce hmyzu. Jen málo studií se zabývá, ať už chronickým nebo akutním působením těchto látek na vodní bezobratlé organismy (Pisa a kol., 2014).

Nejběžnějším zástupcem vodních bezobratlých živočichů, používaných v testech toxicity, je hrotnatka velká (*Daphnia magna*) (Kočí a Mocová, 2009). Studie, které se toxicitou neonikotinoidů na vodních bezobratlých zabývají, později dokazují, že hrotnatka není jejich vhodným zastupujícím organismem, protože vůči neonikotinoidům vykazuje vysokou toleranci ($EC_{50} = 85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Hrotnatka, patří do skupiny korýšů, může se tedy zdát, že korýši jsou obecně méně citlivější než ostatní bezobratlí (Beketov a Liess, 2008). Další studie potvrzují, že neonikotinoidy působí rozdílně již na úrovni jednotlivých druhů. Tuto skutečnost potvrzuje i Strouhová (2018) ve své práci, kde potvrdila, že raci jsou mnohem citlivější skupinou organismů než hrotnatky, i přesto, že oba spadají do skupiny korýšů.

Pro správné vyhodnocení rizik na životní prostředí je nezbytné, aby se studie při zkoumání vlivu toxicity těchto látek více zaměřily na jednotlivé zástupce vodních ekosystémů v rámci samotných druhů. Důležité je si také uvědomit, že pro vyhodnocení rizik je také zásadní doba působení toxických látek. Proto je velmi žádoucí, aby látkám, které mají delší poločas rozpadu byla věnována větší pozornost, a kromě akutních testů toxicity byly více prováděny i testy chronické (Beketov a Liess, 2008). V takovýchto studiích jsou přitom často opomíjené, ale přitom pro život všech organismů velice podstatné, abiotické vlivy prostředí a jejich synergické působení s toxickými látkami jak v životním prostředí, tak v samotném organismu. Mezi ty nejdůležitější, zejména pro život vodních poikilotermních organismů, ale i pro míru toxicity škodlivých látek, řadíme teplotu vody (Jacquin a kol., 2019).

Raci jsou nezastupitelnými zástupci vodních bezobratlých, kteří poskytují i dostatečné množství biologického materiálu pro laboratorní vyšetření a v laboratorních pokusech respektují koncept 3R (Replacement, Reduction a Refinement), z tohoto důvodu se využívají jako vhodný experimentální organismus. Původní druhy raků v České republice patří mezi ohrožené a jsou chráněny legislativou. Rak mramorovaný však spadá do skupiny nepůvodních a invazivních druhů, a díky tomu může být zařazen mezi běžné testovací organismy (Kouba a kol., 2012; Kozák a kol., 2013).

Cíl práce:

Cílem této práce je zhodnotit vliv koncentrace, teploty a doby působení na biochemické parametry raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), exponovaného neonikotinooidovému pesticidu, thiaclopridu. Během hodnocení bude proveden chronický test toxicity, kdy jednotlivé skupiny raků budou vystaveny dvěma různým koncentracím za různých teplotních podmínek. Během testu budou v pravidelných intervalech odebírány jednotlivé vzorky tkání a také zaznamenávány změny chování a fyzický stav raků. Pro vyhodnocení biochemických parametrů bude v tkáních hepatopankreatu, svalu a žaber stanovena aktivita antioxidantů, které jsou úzce spojeny s oxidačním stresem a ve vzorcích hemolymfy bude proveden biochemický profil.

Získané výsledky by měly rozšířit dosavadní znalosti chronického působení thiaclopridu na necílové vodní bezobratlé organismy, konkrétně raky, za různých teplotních podmínek a doby působení, a měly by být vhodným podkladem pro hodnocení rizik thiaclopridu na životní prostředí.

2. Literární přehled

2.1. Pesticidy

Pesticidy jsou látky, které slouží zejména k prevenci, potlačení, ničení nebo odpuzení škodlivých organismů. Využívají se v různých odvětvích, jako jsou např. lesnictví, potravinářství nebo zemědělství, kde slouží zejména k ochraně rostlin, živočichů, potravin nebo krmiv (Pitter, 1999; Velíšek a kol., 2014).

Vzhledem k tak vysoké škále využití, existuje velmi rozsáhlé rozdělení pesticidů. Zapletal (2001) vyčlenil pesticidy na tři základní rozdělení. První je určena podle cílové skupiny organismů, proti kterým se pesticidy používají (tabulka č. 1). Druhé je členěno podle způsobu jejich aplikace (postřiky, aerosoly, páry, plyny, popraše, pevné a tekuté nástrahy, mořidla, nátěry a impregnace) a poslední rozdělení člení pesticidy podle původu (přírodní, syntetické a biopreparáty). Pitter (1999) dělí pesticidy navíc ještě podle působení látky na organismus, a to na systémově působící, ty působí uvnitř těla organismu a kontaktně působící, které zůstávají na povrchu určitého organismu a působí pouze lokálně.

Tabulka č. 1: Druhy pesticidů podle cílové skupiny (Zapletal, 2001).

Název skupiny	Cílová skupina
Akaricidy	Roztoči
Arboricidy	Stromy a keře
Avicidy	Ptáci
Fungicidy	Houby a plísňe
Herbicidy	Rostliny
Insekticidy	Hmyz
Moluskocidy	Měkkýši
Piscidy	Ryby
Rodenticidy	Hlodavci

Pesticidy, jejich sloučeniny i metabolity se mohou hromadit v jednotlivých stupních potravního řetězce a v různých složkách životního prostředí a ovlivňovat tak zdraví i život

necílových organismů a celých ekosystémů (Bermudez-Saldana a kol., 2005; Abrantes a kol., 2010). Ceyhun a kol. (2010) uvádí, že pesticidy mají negativní vliv zejména na vodní ekosystém, jelikož zde dochází k jejich snadné kumulaci a mnohdy také k jejich rozkladu na mnohem škodlivější látky, než je samotná mateřská sloučenina. K tomu dochází zejména díky fyzikálně chemickým přírodním jevům jako jsou např. fotolýza vlivem slunečního záření, vypařování, při vyšších teplotách, hydrolýza ve vlhkém prostředí, oxidace vzdušným kyslíkem nebo biotransformaci (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Pesticidy se do vodního prostředí mohou dostat buď přímou nebo nepřímou cestou. Přímou aplikací se do vody dostávají zejména pesticidy používané ve vodním hospodářství a rybářství, buď k likvidaci vodních rostlin, léčbě parazitického onemocnění nebo redukci nadměrného rozvoje zooplanktonu (řada z těchto přípravků je však již zakázaná). Do vodního prostředí se pesticidy dostávají i nesprávnou nebo nezodpovědnou manipulací, kdy se do vody dostávají např. při úniku odpadní vody z průmyslových závodů, domácnostní nebo při likvidaci jejich zbytků či vyplachování aplikačních zařízení nebo nádob na jejich uskladňování a přepravu (kontejnery, cisterny). Nejčastěji se ale pesticidy do vody dostávají nepřímo, splachem ze zemědělsky obdělávaných ploch, které jsou těmito látkami chemicky ošetřeny (Prousek, 2001; Svobodová a kol., 2008; Velíšek a kol., 2014).

2.1.1. Insekticidy

Ochrana proti nežádoucímu hmyzu je známa již 1000 let př. n. l. z Číny, kde využívali odpudivý účinek síry na ochranu rostlin proti nežádoucímu hmyzu. S postupem času, se začínali postupně využívat i různé jedovaté kovy, jako např. olovo, rtuť nebo arsen. K hubení hmyzu se již od 15. století využívá také přírodních výtažků z různých rostlin, např. tabáku (*Nicotiana*)– alkaloid nikotin nebo z kopretiny stračkolisté (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) – pyrethrum (Cremllyn, 1978).

Největší rozvoj pesticidních sloučenin přichází ve 30. letech 20. století, kdy se začala rozvíjet syntetická chemie a s ní spojená i výroba pesticidů. Celosvětově nejpoužívanějším a nejrozšířenějším pesticidem této doby, se stal prostředek DDT (dichlordifenyltrichlorethan), jehož insekticidní účinky v roce 1939 objevil doktor Paul Muller (Velíšek a kol., 2014). Po několika letech neúměrného používání tohoto pesticidu

se začali postupně projevovat jeho negativní účinky na životní prostředí, které ve své knize *Silent spring* popisuje Rachel Carson (1962).

Mezi nejznámější insekticidy řadíme pesticidy na bázi chlorovaných uhlovodíků, které se nejvíce používaly před 2. světovou válkou, a to zejména v zemědělství na ochranu rostlin a dřeva (Brundage a Barnett, 2010). Dalšími celosvětově používanými insekticidy jsou pesticidy na bázi organofosfátů a karbamátů, které postupně začali nahrazovat perzistentní chlorované pesticidy. Používají se k hubení nežádoucího hmyzu v zemědělství, domácnostech, potravinářství a medicíně, jsou ale silně toxické pro savce i ryby. Na konci 20. století se začalo rozvíjet intenzivní používání insekticidů na bázi pyretroidů a neonicotinoidů, což jsou uměle vytvořené sloučeniny odvozené od přírodně repelentních látek (Velíšek a kol., 2014; Strouhová, 2018).

2.1.2. Neonicotinoidy

Neonicotinoidy řadíme mezi insekticidy, které jsou synteticky vyráběny na základě molekuly přírodního nikotinu (Morrissey a kol., 2015; Sánchez-Bayo a kol., 2016). Výluh z tabákových listů, jako repelentní prostředek, se využívá již od 17. století. Aktivní látku, kterou je alkaloid nikotin, se podařilo izolovat až o století později v roce 1828 (Cremlyn, 1978). Neonicotinoidy se využívají již od roku 1990, kdy postupně začali nahrazovat toxické organofosfáty a karbamáty. Neonicotinoidové pesticidy se obecně totiž vyznačují nízkou toxicitou pro savce a vysokou toxicitou pro bezobratlé organismy (Titěra, 2013). To je nejspíše způsobeno rozdílnou strukturou receptorů v těle organismů, na které jsou schopny se nikotinové látky vázat (Tomizawa a Casida, 2005).

Mechanismus účinku neonicotinoidů

Způsob účinku těchto látek na bezobratlé organismy, je založený na narušení nervových impulsů uvnitř těla, kde na postsynaptické straně neuromuskulárního spojení a v plazmatických membránách jistých neuronů jsou nikotinovými acetylcholinovými receptory (nAChRs) tvořeny iontové kanálky. Acetylcholin plní funkci ligandu, který umožňuje iontům draslíku, sodíku a vápníku přes membránu kontrolovaně procházet. Sloučeniny nikotinu mají na tento receptor silný agonistický vliv, což způsobuje kontinuální stimulaci nervového systému. Ta je způsobena díky tomu, že molekula

nikotinu u hmyzu trvale setrvává navázaná na receptor a tím způsobí trvalé otevření iontového kanálku (Yamamoto a kol., 1998; Karlin, 2010).

Vzhledem k tomu, že neonikotinoidy působí agonisticky na nAChRs a tím ovlivňují centrální nervovou soustavu, řadíme je mezi systémové insekticidy – neurotoxiny. Neonikotinoidy nepředstavují nebezpečí pouze na úrovni nervové soustavy, ale mohou mít dále také negativní vliv na imunitní systém nebo správnou funkci jater a ledvin (Wang a kol., 2018).

Rozšíření neonikotinoidů a jejich hlavní zástupci

Díky tomu, že se tyto insekticidy jeví jako ideální (nízká toxicita pro savce i ptáky), rychle se rozšířilo jejich používání. Z aktivní látky, nikotinu, bylo syntetizováno několik sloučenin. První neonikotinoid, který je dostupný od roku 1991, je imidacloprid a brzy se stal nejprodávanějším insekticidem na světě (Nauen a kol., 2008). Od té doby se podařilo syntetizovat několik dalších sloučenin jako jsou např. clothianidin, thiamethoxam, acetamiprid, dinotefuran, nitenpyram, sulfoxaflor a thiacloprid (Morrissey a kol., 2015).

Neonikotinoidy se jako insekticidy používají ve více než 120 zemích celého světa. Kromě pesticidů pro ošetření semen či celých rostlin našly uplatnění i mezi veterinárními léčivy v antiparazitických přípravcích určených pro kočky a psy (Schenker a kol., 2003; Jeschke a kol., 2011). Wang a kol. (2018) dále uvádí, že celosvětový roční obrat neonikotinoidů se vyšplhal přes 3,5 miliardy dolarů a neonikotinoidy tak obsadily první místo nejprodávanějších insekticidů po celém světě, s průměrnou roční produkcí v roce 2010 odhadovanou na 20 000 tun.

Vlastnosti neonikotinoidů

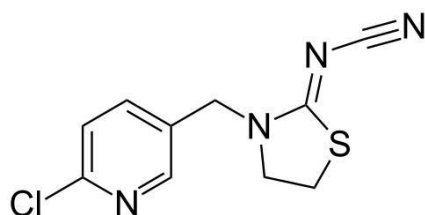
Pesticidy na bázi neonikotinoidů jsou vysoce rozpustné ve vodě. Ve vodách i v půdách vykazují poměrně vysokou stabilitu. Při mírně kyselém nebo neutrálním pH a zároveň bez dostatečného přísunu kyslíku, jsou odolné vůči hydrolyze. Díky těmto vlastnostem se nebezpečné látky společně s povrchovým či podpovrchovým odtokem v prostředí rozšiřují a zvyšují tak svojí perzistenci (Wang a kol., 2018).

Zákaz používání některých neonikotinoidů

Jako každý pesticid mají i neonikotinoidy své nevýhody. Brzy se ukázalo, že představují vysoké riziko nejen pro včely, ale i ostatní necílové bezobratlé organismy (Carreck, 2017). V návaznosti na několik studií a devastujících úmrtí velkých kolonií včel, jakožto významných opylovačů, se Evropská unie v roce 2013 rozhodla, že s účinností od 1. prosince 2013 zakáže používání některých neonikotinoidů. Jedná se konkrétně o imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam, jakožto přípravky pro ošetřování semen rostlin, např. řepky olejky (*Brassica napus napus*), které jsou pro včely hlavním zdrojem (Blacquiere a kol., 2012). Evropská komise a následně Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) zrušili povolení pro prodej thiaclopridu od 1. května 2020, a lze spotřebovat jen zásoby do 9. ledna 2021. Důvodem bylo především riziko kontaminace podzemních vod metabolity thiaclopridu s možnými škodlivými účinky na lidské zdraví a dopad na včely a další necílové organismy (Evropská komise, 2020; ÚKZÚZ, 2020).

2.1.3. Thiacloprid

Thiacloprid {3-[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl]-1,3- thiazolan-2- yliden kyanamid} (obr. č. 1) patří do skupiny chloronicotinylů. Jeho mechanismus účinku je stejný jako u všech neonikotinoidů a spočívá v narušení nervového systému hmyzu (Breer a Sattelle, 1987).



Obr. č. 1: Chemický vzorec thiaclopridu (ČHMÚ, 2020).

Účinná látka, která je dostupná od roku 2003, je obsažena v několika různých pesticidních produktech (tabulka č. 2). Všechny tyto výrobky jsou registrované pod německou firmou společnosti Bayer CropScience. Produkty s obsahem thiaclopridu se používají nejčastěji ve formě postřiku, k ochraně proti škůdcům u řepky olejky, dále pak k ochraně brambor proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a

v neposlední řadě i stromů peckovin a jádrovin proti mšicím. Přípravek SONIDO se od ostatních liší tím, že se používá ve formě mořidla, a to k ošetření kukuřice. Spotřeba látky thiacloprid v České republice v roce 2016 činila téměř 26 000 kg (1), z toho přibližně 80 % bylo použito k ošetření olejnin (Bayer CropScience, 2020).

Tabulka č. 2: Produkty firmy Bayer obsahující thiacloprid (Bayer CropScience, 2020).

Obchodní název	Účinná látka
BISCAYA 240 OD	Thiacloprid 240 g·l ⁻¹
CALYPSO 480 SC	Thiacloprid 480 g·l ⁻¹
PROTEUS 110 OD	Thiacloprid 100 g·l ⁻¹ a 10 g·l ⁻¹ Deltametrin
SONIDO	Thiacloprid 400 g·l ⁻¹

K ošetření zemědělských ploch dochází zejména v jarním období v měsíci dubnu (ČHMÚ, 2020) a dále také před sklizní, kdy je doba aplikace závislá zejména, na ochranných lhůtách jednotlivých přípravků (Bayer CropScience, 2020). Doba a způsob používání thiaclopridu je jeden z faktorů, které ovlivňují výskyt thiaclopridu ve vodních ekosystémech (Dobiáš a kol., 2018). To závisí zejména na aktuálních srážko-odtokových poměrech, kdy se do povrchových vod tento pesticid dostává zejména během intenzivních dešťů, splachem z ošetřených ploch nebo přímým vsakem do vod podzemních (Morrissey a kol., 2015). Dalšími faktory, které ovlivňují nebezpečnost thiaclopridu pro necílové vodní bezobratlé organismy, jsou fyzikálně chemické vlastnosti prostředí a samotný charakter látky i samotného organismu. Z fyzikálních parametrů řadíme mezi ty nejvýznamnější teplotu vody, která významně ovlivňuje metabolismus vodních živočichů, což může vést k rychlejšímu vstřebávání toxikantu do organismu (Williams a kol., 2003). Teplota vody je ovšem velmi variabilní parametr, který je závislý na různých vlastnostech prostředí (např. roční období, nadmořská výška, intenzita slunečního záření, velikost a hloubka vodní plochy apod.). Vzhledem k tomu, že postupně na celém světě dochází ke globálním klimatickým změnám, kdy dochází zejména ke snižování množství srážek a zvyšování průměrné roční teploty, dochází

tak i ke zvyšování průměrných teplot v povrchových vodách (Novický a kol., 2008; ČHMÚ, 2020).

Důležitá je ovšem i samotná vlastnost toxické látky. Thiacloprid je ve vodách i v půdě poměrně stabilní. Poločas rozpadu v půdě je 7 až 21 dní, ve vodách při anaerobních podmínkách však může přetrvat i déle jak jeden rok. Dále se tato látka vyznačuje velmi dobrou rozpustností ve vodě ($184\text{--}185\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a poměrně nízkou hodnotou $\log K_{ow}$ při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,26) (Kollmeyer a kol., 1999; ČHMÚ, 2020).

Thiacloprid, dle platného globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace a označování chemikálií s označením podle věty č. 410 (vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky), by se vůbec neměl dostat do kontaktu s vodním recipientem (Bayer CropScience, 2008). Toxicita thiaclopridu pro vybrané druhy vodních bezobratlých živočichů žijících v ČR je uvedena v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Toxicita thiaclopridu pro vybrané druhy živočichů.

Druh	Latinský název	Doba působení	Koncentrace	Zdroj
Jepice předjarní	<i>Baetis rhodani</i>	96h LC ₅₀	$4,60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	PANNA (2020)
Blešivec obecný	<i>Gammarus pulex</i>	96h LC ₅₀	$0,35\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	PANNA (2020)
Hrotnatka velká	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀	$85,10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	ČHMÚ (2020)

Dostupné informace však nasvědčují tomu, že koncentrace thiaclopridu, ale i ostatních neonikotinoidů ve vodách, několikanásobně překračují limitní koncentrace (v ČR $0,1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Koncentrace thiaclopridu v povrchových vodách po celém světě byla naměřena v rozmezích od $0,02\text{ -- }4,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, v České republice byla nejvyšší koncentrace $0,57\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ naměřena v roce 2016 na Lučickém potoce v obci Olešnice (ČHMÚ, 2020). Nejvyšší zaznamenaná koncentrace ostatních neonikotinoidů, konkrétně imidaclopridu, byla naměřena v povrchových vodách Nizozemska a činila $320\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Van Dijk a kol., 2013).

2.2. Biochemické parametry používané jako biomarkery

Biomarkery

Označení biomarker nesou veškeré měřitelné biologické, biochemické, fyziologické, histologické a morfologické parametry uvnitř těla organismu nebo jeho produktech (např. srst, moč), které vypovídají o vzájemné interakci mezi živým organismem a nebezpečnou látkou. V obecném pojetí jsou biomarkery definovány jako časné varovné signály možného poškození organismu. Jedná se zejména o reakce (biologické odpovědi) organismu, na molekulární či buněčné úrovni, vykazující určitou měřitelnou odchylku od běžného stavu jedince, na škodlivou látku přijímanou z okolního prostředí (Van der Oost, 2003; Paskerová, 2007).

Biochemické parametry používané v toxikologii

Ke změnám, ke kterým u organismů dochází během chronického působení toxické látky, dochází zejména u parametrů oxidačního stresu, antioxidačních biomarkerů a u biochemických parametrů hemolymfy/krve. Projevy těchto parametrů se vyskytují na buněčné úrovni u všech organismů a patří mezi nejpoužívanější biomarkery negativního působení škodlivých látek na živé organismy. U raků jsou tyto změny nejčastěji pozorovány zejména ve svalech, hepatopankreatu, žlábrách a hemolymfě (Hlávková, 2018; Wang a kol., 2018). Tyto biomarkery vykazují dostatečně vysokou specifickou odpověď, a proto se dají označit za velice citlivé a také univerzální (Paskerová, 2009; Wang a kol., 2018).

2.2.1. Parametr oxidačního stresu

Oxidační stres

Oxidační stres je způsobený škodlivými produkty reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které vznikají redukcí molekulárního kyslíku a jsou to zejména peroxid vodíku H_2O_2 , hydroxilové anionty OH^- nebo superoxidový anion O_2^- . Tyto produkty jsou schopny reagovat s významnými makromolekulami v buňkách, což může způsobovat inaktivaci enzymů, oxidaci proteinů, lipidní peroxidaci, narušení redoxní rovnováhy, poruchu DNA a nakonec i smrt celé buňky či organismu. ROS jsou přirozenými produkty každé buňky a jejich množství kontrolují antioxidační systémy. V momentě, kdy je

system narušen toxickou látkou, začne se množství ROS zvyšovat, a to se následně projeví změnou aktivity antioxidantů (Van der Oost, 2003).

Mezi parametry oxidačního stresu využívané v testování chronické toxicity, patří zejména sledování změn lipidní peroxidace, jakožto jednoho z hlavních důsledků oxidačního stresu (Paskerová, 2007).

2.2.1.1. Lipidní peroxidace (LPO)

Lipidní peroxidace, jinak nazývána také jako oxidace nenasycených mastných kyselin, je důsledkem selhání antioxidačního systému, který již není schopen dostatečně regulovat množství ROS. Nastává tak situace, kdy ROS začnou postupně napadat nenasycené mastné kyseliny v buněčných membránách, což vede ke změnám jejich iontové propustnosti (Storey, 1995; Van der Oost a kol., 2003; Cazenave a kol., 2006). Volné radikály nejčastěji napadají polyenové mastné kyseliny, kdy z jejich methylové skupiny dokážou vytrhnout vodíkový atom (např. účinkem OH[•]). Tento proces odstartuje řetězovou reakci, kdy takto zasažená molekula, se sama stane volným radikálem a začne tak napadat vedlejší molekuly. Při tomto procesu, nebo jako její důsledek dochází k tvorbě primárních (lipoperoxidy) a sekundárních produktů. Mezi hlavní sekundární produkty patří zejména malondialdehyd (MDA), který je silně toxický, dokáže se vázat na jednotlivé bílkoviny a měnit tak jejich funkci (Fialová, 2012).

2.2.2. Antioxidační parametry

Antioxidanty

Vzhledem k tomu, že výše zmíněné volné radikály působí na ostatní molekuly oxidačně, látky, které tomuto vlivu brání, nesou název antioxidanty. Jedná se především o látky, které tvorbě volných radikálů buď předcházejí (např. katalázy a peroxidázy) nebo je efektivně odstraňují (např. superoxid dismutáza a glutation) a udržují tak v buňkách rovnovážný stav (Racek, 2003).

Jednotlivé antioxidanty se navzájem doplňují a spolupracují. Organismus je ohrožen zejména ve chvíli, kdy klesají aktivity enzymů katalázy (CAT) a glutation peroxidázy (GPx) a naopak aktivity enzymů superoxid dismutázy (SOD) se zvyšují. Celý systém je závislý na aktivitě enzymů (SOD, CAT, GPx, atd.) a součinnosti neenzymatických

antioxidantů (glutathion, vitamíny, ubichinol₁₀) uvnitř buněk (Racek, 2003; Van der Oost a kol., 2003).

Mezi antioxidační parametry používané v testování chronické toxicity, patří zejména sledování enzymatické aktivity SOD, CAT, glutathion S-transferázy (GST) a hladiny redukovaného glutathionu (GSH).

2.2.2.1. Superoxid dismutáza (SOD)

Superoxid dismutáza patří do skupiny metaloenzymů, jelikož je tvořena zejména z iontů kovů Cu^{2+} a Zn^{2+} (Van der Oost a kol., 2003). Tento enzym se nachází ve všech buňkách v celém těle, největší množství se však vyskytuje v buňkách detoxikačních orgánů (např. játrech/hepatopankreatu). Jejich antioxidační ochrana spočívá ve schopnosti katalyzovat superoxidový anion (O_2^-) na peroxid vodíku (H_2O_2) (Öztürk-Ürek a Tarhan, 2001).

Superoxid (O_2^-) je jeden z nejběžnějších volných radikálů vyskytující se v živých organismech (Bowler a kol., 1995; Babior, 1997). Vzniká zejména při běžných enzymových reakcích nebo dýchání. V případě napadení buněk škodlivou látkou, se v průběhu fagocytózy aktivuje enzym NADPH-oxidáza, která vyvolá tvorbu superoxidů, které společně s dalšími látkami z něho vzniklého, plní svou funkci při zneškodňování nežádoucích látek v těle (Racek, 2003).

2.2.2.2. Kataláza (CAT)

Peroxid vodíku snadno proniká přes jednotlivé membrány a vzhledem k jeho dlouhému biologickému poločasu může oxidací poškozovat jednotlivé buňky. Větší hrozbu může představovat ve chvíli, kdy se za účasti přechodných kovů Fe^{2+} a Cu^+ , začne přeměňovat na vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Racek, 2003). Kataláza patří mezi oxidoreduktázy, které katalyzují přenos elektronu a je jedním z enzymů, které se v ochranných organelách buňky (peroxizomech) podílí na odstranění nebezpečného peroxidu vodíku rozložením na kyslík a vodu. Od peroxidáz se liší tím, že na peroxid vodíku působí ve vysokých koncentracích (Aebi, 1984; Zamocky a kol., 2008).

Kataláza obsahuje zejména porfyrinové skupiny, které spolu s ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} (HEM) a atomy Mn, tvoří sloučeniny, které se významně podílejí na funkci celého systému (Racek, 2003; Van der Oost, 2003).

2.2.2.3. Glutation/dázy (GSH, GPx, GST, GR)

Glutation

Glutation (γ -glutamylcysteinglycin) patří mezi neenzymové antioxidanty a je součástí velké skupiny detoxikačních, metabolických i transportních procesů. Jedná se o tripeptid, který se vyskytuje jak v redukované formě jako thiol (GSH), tak v oxidované (GSSG) formě jako disulfid. Udržováním rovnováhy mezi redukovanou a oxidovanou formou, je schopen také chránit skupiny sulfidových proteinů (Voet a Voet, 2004).

Glutation peroxidáza (GPx)

Glutation peroxidáza je enzym, který zajišťuje pomocí katalýzy redukcí H_2O_2 a zároveň oxidaci GSH na GSSG a H_2O . Pro správnou funkci glutacion peroxidázy je nezbytný dostatečný přísun GSH, za jehož obnovu je zodpovědný enzym zvaný glutacion reduktáza (GR) (Racek, 2003).

Glutation reduktáza (GR)

Glutation reduktáza dokáže katalyzovat přeměnu GSSG na GSH za pomoci pyridinového koenzymu NADPH. Tato důležitá schopnost má za důsledek udržování rovnováhy mezi GSH a GSSG (Van der Oost a kol., 2003).

Glutation S-transferáza (GST)

Glutation S-transferáza patří do skupiny multifunkčních enzymů, které se vyskytují zejména v cytosolu jaterních buněk, kde zajišťují reakci GSH se škodlivou cizorodou látkou (Ballantyne a kol., 1999).

2.2.3. Parametry biochemického profilu hemolymfy/krve

Biochemický profil hemolymfy raků, podobně jako biochemický profil krevní plazmy ryb, nám poskytuje obraz toho, co se děje uvnitř organismu při vystavení škodlivým látkám či jiné změně prostředí (např. změna teploty) (Kolářová a Velíšek, 2012; Stará a kol., 2016). V momentě, kdy dojde k napadení organismu toxickou látkou, začnou buňky uvolňovat určité enzymy a látky do hemolymfy což se projeví jejich kolísáním (Banaee a Ahmadi, 2011). Změny těchto parametrů tak můžou u raků značit poškození tkání, stres, únavu, bolest nebo nemoc (Stará a kol., 2019). Biochemický profil

hemolymfy nám tedy nabízí celkový pohled na zdravotní stav daného organismu (Doubek a kol., 2003; Hawkins a Mawdesley-Thomas, 2006).

Glukóza

Glukóza, patří mezi jednoduché cukry, které všem živým organismům slouží jako lehce dostupný zdroj energie (Závodská, 2006). Změny koncentrace glukózy v plazmě u vodních organismů, jsou často hlavním důsledkem zvýšeného stresu. V momentě, kdy je v krvi/hemolymfě nedostatek glukózy, může docházet k akutnímu selhání jater, z důvodů rychlého vyčerpání glykogenu (Kolářová a Velíšek, 2012).

Amoniak

Amoniak (NH_3) je odpadní látka, kterou ryby i raci, vylučují zejména žábry, jako výsledný produkt jejich trávení (Kozák a kol., 2013; Velíšek a kol., 2014). Obsah amoniaku v plazmě, je závislý na mnoha vnějších i vnitřních faktorech a pokud dojde k jeho hromadění v těle organismů (např. v krvi ryb) může vést až k autointoxikaci organismu. Koncentrace amoniaku v krvi/hemolymfě, je závislá také na obsahu dusíkatých látek v potravě (Velíšek a kol., 2014).

Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy

Ve chvíli, kdy se začne měnit propustnost jednotlivých buněk či dojde k jejich odumírání, začnou se z buněk do krve uvolňovat jednotlivé cytoplazmatické a mitochondriální enzymy.

Asparát aminotransferáza (AST) je enzym, který se nachází z větší části v mitochondriích, zejména v jaterních a svalových buňkách. AST, který se nachází v cytoplazmě, je do krve/hemolymfy uvolňován zejména při zvýšené propustnosti buněčné membrány, naopak AST, který je obsažen v mitochondriích, se do krve/hemolymfy začne uvolňovat, až ve chvíli, kdy dojde k výraznějšímu porušení buňky. Zvýšení aktivity AST může vypovídat zejména o porušení svalové tkáně (Folmar, 1993).

Mezi další cytoplazmatické enzymy řadíme alanin aminotransferázu (ALT), která se nachází zejména v jaterních buňkách a zvýšení její aktivity v krvi/hemolymfě může poukazovat na toxické poškození jater (Neff, 1985).

Dalším významným enzymem je kreatinkináza (CK), která se nachází zejména ve svalových tkáních. Změna její aktivity je většinou důsledkem poškození svaloviny nebo intoxikace (Kolářová a Velíšek, 2012).

V neposlední řadě, je také důležitý enzym laktát dehydrogenáza (LDH), který se také řadí mezi cytoplazmatické enzymy. Tento enzym a zejména pak zvýšení jeho aktivity, může nasvědčovat akutnímu selhání jater nebo jejich toxickému poškození (Kolářová a Velíšek, 2012).

Minerály (Vápník a hořčík)

Vápník a hořčík jsou důležité esenciální prvky a patří mezi nepostradatelné součásti všech buněk. Pro raky je důležitý zejména vápník v období svlekání, kdy mají raci zvýšené nároky minerálů pro tvorbu nového krunýře (exoskeletu). Obsah vápníku v hemolymfě raků tak může souviset s fází svleku (Stará a kol., 2016). Kolářová a Velíšek (2012) také uvádí, že snížená koncentrace vápníku v krvi ryb může mít souvislost s onemocněním kosterní soustavy nebo ledvin. Hořčík je zase spojen s důležitým enzymem acetylcholinem, který má za úkol správnou funkci nervových přenosů.

Proteiny krevní plazmy

Proteiny v plazmě jsou z velké části tvořeny albuminy (ALB) a dále také globuliny (GLOB). Zvýšené množství celkových proteinů (TP) může poukazovat na buněčné poškození ledvin a jater (Walmsley a kol., 1992). Velíšek a kol. (2014) uvádí, že snížené množství těchto látek, značí déle trvající infekci nebo otravu.

2.3. Raci (*Astacidea*)

2.3.1. Obecná charakteristika raků

Raci jsou největší zástupci sladkovodních bezobratlých živočichů. V životním prostředí plní důležité funkce a bez jejich existence by bylo prostředí velmi ohroženo. Ve volné přírodě je totiž můžeme najít v různých typech vodních ekosystémů. Nacházejí se v oblasti tekoucích nebo stojatých vod. Osidlují různá stanoviště od drobných potoků přes veletoky i ústí řek, tůň, bažiny, rybníky, jezera nebo přehrady. Vyhledávají zejména skrytá místa jako jsou různé podvodní kořenové systémy, kamenité útvary, husté porosty vodních rostlin nebo si v měkkém substrátu vyhrabávají nory (Holdich, 2002; Kozák a kol, 2013).

Momentálně je popsáno více jak 640 druhů raků (Crandall a Buhay, 2008). Původní druhy raků můžeme najít téměř po celém světě, výjimku tvoří pouze Antarktida a Afrika (kromě endemického druhu žijícího na Madagaskaru). Největší biodiverzita je rozšířená v zemích Austrálie a Severní Ameriky, proti tomu nejnižší počet původních druhů raků najdeme v Evropě (Holdich, 2002; Souty-Grosset a kol., 2006).

Raci jsou sladkovodní koryši (Crustacea), kteří spadají do řádu Decapoda. Latinský název Crustacea je odvozen z latinského slova *crusta* (skořápka či schránka), díky kterému dostali tito živočichové svůj název (Štamberková, 2009). Tělo raků je totiž pokryto tvrdým a pevným krunýřem (exoskeletem). Exoskelet raka obsahuje zejména chytin, dále pak proteiny, lipidy, aminokyseliny a minerální soli (fosforečnan a uhličitan vápenatý). Svoji schránku raci v pravidelných intervalech svlékají (Zarenkov, 1982). V období těsně před a po svlékání se rak stává nejzranitelnějším (Kozák a kol, 2013). Proces svlékání je pro raky velice náročný, protože dochází k řadě fyziologických, biochemických a anatomických změn (Reynolds, 2002). Vzhledem k absenci tvrdého krunýře se tak z raků jednoduše stávají oběti predátorů. Hager (1996) mezi nejvýznamnější predátory řadí hlavně ryby jako úhoře, pstruhy, kapry nebo okouny. Dalšími významnými predátory jsou i vydry, norci nebo ondatry (Ackefors, 1998).

Raci plní v ekosystému jak funkci potravy pro vyšší živočichy, tak i funkci samotného predátora jiných vodních bezobratlých (Reynolds, 2011). Jelikož do jejich jídelníčku můžeme zařadit širokou škálu potravy, řadíme raky mezi všežravce. Mezi její

základní složky patří zejména detrit, řasové nárosty, makrofyta, bezobratlí živočichové, jikry nebo ryby. Obsah jídelníčku závisí také na potravní nabídce, fázi svlékání či rozmnožování (Goddard, 1988).

Raky řadíme mezi gonochoristy, avšak některé druhy jsou schopni se rozmnožovat pomocí partenogeneze. V období páření jsou raci aktivní ve vyhledávání svého partnera. Celý proces je řízen hormonálně a je ovlivňován hlavně teplotou vody a fotoperiodou (Kozák a kol., 2013).

2.3.2. Základní morfologie a anatomie raků

Dvě hlavní části, z kterých se skládá tělo raka se nazývají hlavohruď (cephalothorax) a zadeček (abdomen). Vrchní část a boky hlavohrudi pokrývá jednotný krunýř (karapax), který vybíhá ventrálním směrem a vytváří tak špičatý čelní trn (rostrum), na kterém můžeme u některých druhů vidět drobné trny. Po stranách vyrůstá jeden pár složených očí, které jsou chráněny rostrem. Za očima se na hlavohrudi nachází jeden nebo dva páry podélných (postorbitálních) lišt, které jsou důležitým znakem při rozpoznávání druhů. Na horní části krunýře jsou zřetelné tři rýhy. Příčná rýha, nazývaná cervikální, vybíhá do oblouku kaudálním směrem. Za ní se nachází pár podélných (žaberních) brázd, které vybíhají směrem k zadečku a vymezují tak část štítu, který je přichycený k tělu. Abdomen je tvořen ze šesti článků po stranách spojenými pohyblivými klouby a mezi články měkkou blánou. Zadeček je zakončen ocasní destičkou (telson), na kterém se nachází řitní otvor (Štambergová a kol., 2009; Kozák a kol. 2013). Pohyblivé končetiny vyrůstají z každého pravého tělního článku, kromě ocasní ploutvičky. Na hlavové části vyrůstají dva páry tykadel (antenuly a anteny), kusadla (mandibuly) a dva páry čelistí (maxily I a II). Dalších osm párů vyrůstá z hrudní části těla, první tři páry příústních nožek (maxilopody) usnadňují manipulaci s potravou. Zbylých pět párů končetin jsou kráčivé nohy (pereopody). První pár pereopod je ze všech končetin nejvýraznější, nejsilnější a nejmohutnější, jelikož se na jeho konci nachází robustní klepeta. Zbytek kráčivých nohou jsou oproti prvnímu páru drobné a všechny srovnatelně velké. Druhý a třetí pár kráčivých nohou nese také klepeta, avšak výrazně menší a poměrně nenápadné a poslední čtvrtý a pátý pár je bez klepítek. Zbytek končetin se nachází na zadečku, slouží zejména k přivádění okysličené vody k žaberním komorám, u samic ještě navíc ke kladení vajíček. Každý zadečkový článek, kromě telsonu nese jeden pár končetin. Prvních pět

párů nazýváme pelepody, zatímco u samců jsou první dva páry přizpůsobeny ke kopulaci (gonopody I a II) u samic je první pár redukovaný. Poslední nožky (uropody) jsou zcela odlišné od výše zmíněných, jsou to spíše ploché destičky, které spolu s telsonem plní funkci rychlého úprku před predátorem (Štambergová a kol. 2009; Kozák a kol. 2013).

Svalová soustava v těle raků se skládá z příčně pruhovaného svalstva a podobá se svalovině obratlovců. Největší množství svaloviny se nachází na zadečku a také ve velkých klepetech. Dýchací soustavu zajišťují především žábry, které se nacházejí na obou stranách hlavohruďi schované v žaberní komoře. Kromě respirační funkce zajišťují žábry i vylučování oxidu uhličitého a amoniaku, hyperfiltraci odpadních látek, virů a patogenů nebo tvorbu hlenu, který napomáhá čištění žaber (Vogt, 2002; Kozák a kol., 2013). Cévní soustava raků má otevřený krevní oběh. Tepny přivádějí hemolymfu přímo od srdce do dutin mezi vnitřní orgány. Hemolymfa je složena z krvinek (hemocytů) a mízy (plazmy) a tvoří až 27 % objemu celého těla. Hemocyty se skládají ze tří typů buněk. Prvním typem jsou hyalinové buňky, které odpovídají za srážlivost hemolymfy. Zbylé buňky se nazývají semi-granulocyty a granulocyty. Ty zajišťují v těle raka např. správný chod imunitního systému nebo označování jednotlivých patogenů pomocí melaninových pouzder. Plazma se skládá zejména z vody, iontů, bílkovin a cukrů, avšak obsah těchto látek se často mění v závislosti na fyziologickém stavu raka. Trávicí soustava raků se skládá z úst, jícnu, předního žaludku, hepatopankreatu, zadního žaludku, střeva, konečníku a řitního otvoru. Hepatopankreas je slinivko-jaterní žláza, která je ukryta v hlavohruďi raka a je zodpovědná zejména za tvorbu trávicích enzymů, látkovou přeměnu cukrů, zajištění dostatečného množství vápníku a ukládání některých těžkých kovů (Kozák a kol., 2013).

2.3.3. Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*)

Rak mramorovaný (v minulosti označen jako *Procambarus fallax* f. *virginalis*), nyní aktuálně označen pod latinským názvem *Procambarus virginalis* je původem ze Severní Ameriky konkrétně ze států Florida a Georgia (Taylor a kol., 2007). Ve svém původním areálu rozšíření obývá zejména nevysychající oblasti tekoucích a stojatých vod, kde si vytváří primitivní nory (Hobbs, 1981; Hendrix a Loftus, 2000; Dorn a Trexler, 2007). Ideální teplota vody se pro tento druh pohybuje v rozmezí mezi 18 a 25 °C, krátkodobě

(období několika týdnů) dokáže snášet i teploty pod 8 a nad 30 °C, kdy se však výrazně zpomaluje jeho metabolismus a dochází tak k zastavení růstu i rozmnožování. Rak mramorovaný je známý zejména díky svému způsobu reprodukce, rozmnožuje se totiž partenogeneticky (Scholtz a kol., 2003; Vogt a kol., 2004; Martin a kol., 2007). Tato forma, však není v místě svého původního rozšíření známá, poprvé byla popsána až v Evropě koncem 20. století akvaristickými chovateli (Lukhaup, 2001). Postupně, se tato forma raka, s rostoucím zájmem akvaristů a jejich nezodpovědnému vypouštění raků do volných vod, začala rozšiřovat po celém světě, a to jak v zemích Evropy např. v Nizozemsku, Itálii, Německu nebo Slovensku, tak i ve státech ostatních kontinentů, např. v Japonsku nebo na Madagaskaru (Kozák a kol., 2013).

Rak mramorovaný patří mezi menší druhy raků, jeho obvyklá celková délka těla je do 10 cm, může však dosahovat i délky maximálně 13 cm. V laboratorních podmínkách se průměrně dožívá dvou let, pouhých 10 % jedinců se dožije více jak tří let, jedná se tedy o poměrně krátkověký druh. K tak brzkému úmrtí dochází zejména během neúspěšného svlékání (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010). Rak je charakteristický svým nápadným mramorováním, které vyniká na zeleno-hnědém těle, zejména na bocích hlavohrudí. Tělo raka je jemné, pouze s pár trny za týlní částí. Na hlavohrudí najdeme pouze jeden pár postorbitálních lišt. Klepeta jsou malá a jemně zrnitá s výrazným trnem na zápěstí klepet (Holdich a kol., 2006).

Jak bylo již na začátku zmíněno, tento druh raka se rozmnožuje pouze partenogeneticky, tzn. bez přítomnosti samců. Pohlavní dospělosti dosahují samice v závislosti na teplotě vody přibližně kolem 25 až 34 týdnů života. Při vhodných podmínkách jsou schopny se opakovaně rozmnožovat několikrát do roka (Holdich a kol., 2006; Vogt, 2010). Jediná samice chovaná v zajetí, je schopna vyprodukovat během jednoho reprodukčního cyklu až 400 ks vajíček o velikosti 1,5 – 1,9 mm. Inkubační doba trvá poměrně krátkou dobu a při vyšších teplotách dosahuje 2-3 týdnů (Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006).

Jak vyplývá z výše popsaných informací, tento druh raka je velice nenáročný a oblíbený jak v zájmových chovech akvaristů, tak i mezi vědci, a to zejména při různých odborných studiích. Jedná se však o nepůvodní druh raka, který přináší i určité míry rizika pro náš ekosystém, a to nejen díky své schopnosti se partenogeneticky rozmnožovat

několikrát do roka nebo své agresi, ale zároveň patří mezi potenciální přenašeče nebezpečného račího moru, který je pro naše původní raky smrtelný (Kozák a kol., 2013).

3. Materiál a metodika

Vliv koncentrace, teploty a doby působení thiaclopridu na biochemické parametry raka mramorovaného byl sledován pomocí chronického testu toxicity. Raci byli rozděleni do jednotlivých skupin a vystaveni vybraným koncentracím thiaclopridu za různých teplotních podmínek. Během chronického testu se pravidelně sledovaly změny chování a fyzický stav raků a fyzikálně chemické parametry vody. Dále se také pravidelně odebíraly vzorky tkání a hemolymfy pro vyhodnocení vlivu na biochemické parametry.

Pro vyhodnocení oxidačních parametrů, aktivity a hladiny antioxidantů v tkáních a pro stanovení biochemického profilu hemolymfy, bylo nutné u každého raka odebrat vzorky hemolymfy, žaber, svalů a hepatopankreatu. Postupy pro zjištění biochemických parametrů byly prováděny podle jednotlivých metod.

Testování probíhalo v akvarijských místnostech a laboratořích vodní toxikologie a ichtyopatologie na Fakultě rybářství a ochrany vod, ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém Jihočeské univerzity ve Vodňanech.

3.1. Příprava a průběh chronického testu toxicity

Experimentální organismy a chemikálie

Vliv chronické toxicity byl zkoumán na raku mramorovaném (obr. č. 2). Pro experiment, byli vybráni přibližně stejně velcí dospělí jedinci o průměrné délce hlavohrudi $26,14 \pm 2,87$ mm (měřeno od špičky rostra po konec telsonu) a hmotnosti $5,48 \pm 1,67$ g, kteří jevíli známky dobrého zdravotního stavu. Pro testování bylo potřeba 216 ks raka mramorovaného, který pocházel z vlastního chovu Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, Laboratoře sladkovodních ekosystémů.



Obr. č. 2: Rak mramorovaný (Foto: Autor).

Pro experiment byl použit analytický standard thiaclopidu, o čistotě 99,9 % od firmy Sigma Aldrich, CZ.

Skupiny raků a příprava akvárií

Před samotným experimentem byli raci náhodně rozděleni do 12 akvárií a 7 dní aklimatizováni do samotného začátku experimentu. V každém akváriu bylo 18 raků a každá sledovaná koncentrace i kontroly byly provedeny v opakování (celkem bylo 36 raků pro každou testovanou skupinu). Rozdělení raků do skupin a příslušné koncentrace a teploty jsou uvedeny v tabulce č. 4.

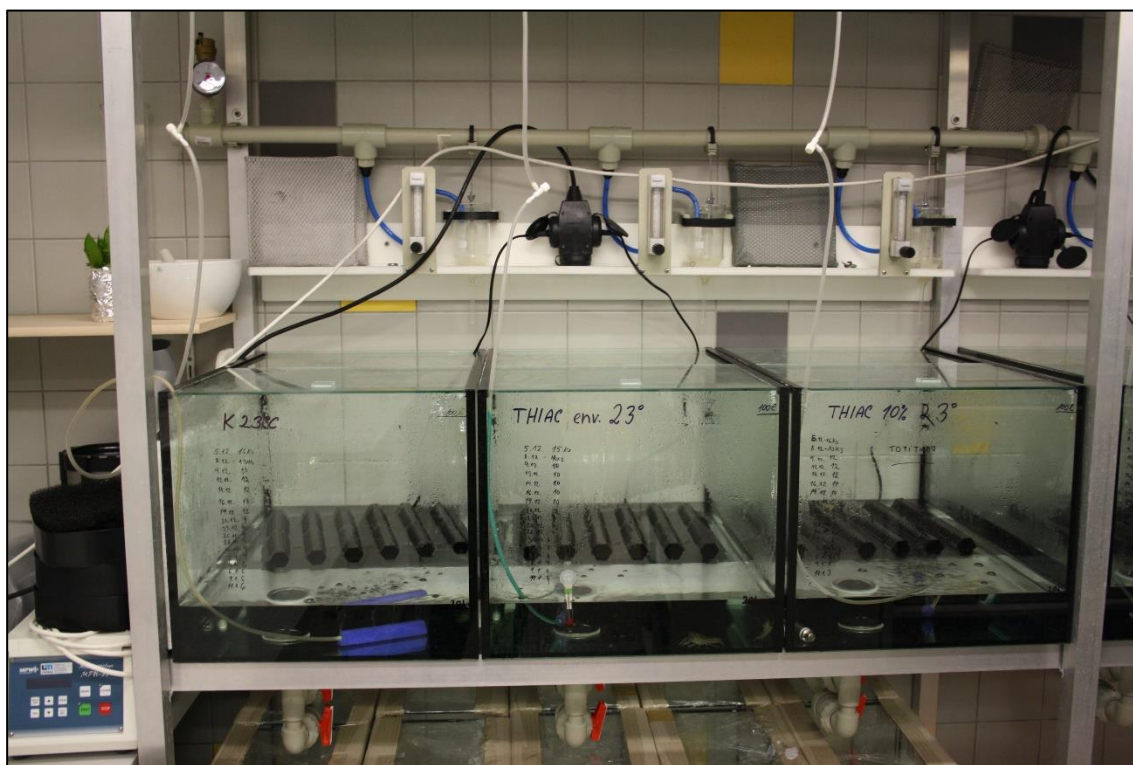
Tabulka č. 4: Jednotlivé skupiny raků, teploty a koncentrace thiaclopidu.

Skupina č.	Název skupiny	Koncentrace thiaclopidu μl^{-1}	Teplota vody
1	K 17	0	17 °C
2	TEN 17	4,5	17 °C
3	TLC 17	64,6	17 °C
4	K 23	0	23 °C
5	TEN 23	4,5	23 °C
6	TLC 23	64,6	23 °C

Testování dvou sledovaných koncentrací thiaclopidu a kontroly (K) probíhalo při dvou rozdílných teplotách 17 a 23 °C. Pro sledování chronického vlivu thiaclopidu byla vybrána nejvyšší zjištěná environmentální koncentrace 4,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TEN) zjištěná v povodí Labe (Süß a kol., 2006) a koncentrace 64,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TLC), která odpovídá 10% hodnotě

96hodinové letální koncentraci pro raka mramorovaného (Strouhová, 2018). Zásobní roztok thiaclopridu byl připraven v destilované vodě. Kontrolní raci byli v čisté vodě bez obsahu thiaclopridu.

Do každého akvária o velikosti 100 l bylo dáno 20 l vody a odpovídající množství thiaclopridu. Voda v akváriích se pravidelně 3x týdně měnila za novou lázeň, a to každé pondělí, středu a pátek. V každém akváriu byly umístěny plastové úkryty, aby se předešlo případnému kanibalismu a vzájemné agresivitě raků (obr. č. 3). Voda v akváriích byla vytemperována před výměnou v akumulčních kádích na teplotu zhruba 17 °C, což odpovídalo i teplotě akvarijní místnosti. Teplota 23 °C byla udržována v akváriích pomocí elektrických akvarijních přímotopů.



Obr. č. 3: Akvária s jednotlivými úkryty (Foto: A. Stará).

Podmínky a průběh chronického testu

Každý den byly sledovány fyzikálně chemické parametry vody. V akváriích s teplotou vody 17 °C, byla zaznamenána teplota $16,71 \pm 0,72$ °C, koncentrace rozpuštěného kyslíku $91,19 \pm 3,77$ % a pH $7,7 \pm 0,10$. V akváriích s teplotou vody 23 °C

se teplota pohybovala v rozmezí $22,5 \pm 0,95$ °C, koncentrace rozpuštěné kyslíku $86,83 \pm 4,25$ % a pH $7,82 \pm 0,21$. Světelné podmínky byly nastaveny v režimu 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Další fyzikálně chemické parametry vody byly sledovány v těchto koncentracích: KNK $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, suma vápníku a hořčíku $8,91 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, celkový amoniak $0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, NO_2^- $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, NO_3^- $5,92 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, PO_4^{3-} $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a CHSK_{Mn} $1,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace thiaclopridu ve vodě byla analyticky stanovována metodou kapalinové chromatografie (HPLC-MS/MS) (Hao a kol., 2015) a během zkoušek neklesla pod 95% nominální koncentrace. Stanovení koncentrace nebylo součástí diplomové práce a bylo provedeno formou služby.

Délka testu trvala celkem 56 dní. Z toho v prvních 28 dnech (fáze expoziční) byli raci vystaveni vybraným koncentracím zkoumané látky a ve zbylých 28 dnech probíhala tzv. fáze zotavovací (depurační), kdy byli raci přesunuti do čisté vody bez obsahu zkoumané látky thiaclopridu.

3.2. Odběr a příprava vzorků k analýze

Průběh jednotlivých odběrů

Odběr vzorků probíhal po 7, 14 a 28 dnech expozice a dále pak po dalších 14 a 28 dnech depurace. Při každém odběru byly z každého akvária náhodně odebrány 3 ks raka (6 ks za skupinu). U každého jedince byla zaznamenána jeho hmotnost a délka hlavohrudi. Raci byli následně přemístěni do mísy s drceným ledem z důvodu zpomalení jejich životních funkcí a následnému usmrcení.

Poté se u každého jedince odebraly vzorky hemolymfy (obr. č. 4). Odběrový materiál (zkumavky a injekční stříkačky) bylo nutné těsně před odběrem ošetřit protisrážecím přípravkem 0,01 ml heparinu sodného na ml hemolymfy (Heparin inj., Léčiva, Praha). K odběru byla použita jednorázová injekční stříkačka a vzorek byl ihned umístěn do uzavíratelných zkumavek. Aby došlo k řádnému propojení hemolymfy s heparinem, bylo nutné je po dobu 15 s jemně protřepávat a následně 10 minut centrifugovat při 10 000 rpm. Odstředěný supernatant byl opatrně odebrán a uchován v mikrozkušavkách v mrazáku při -80 °C pro další zpracování. Vzorky hemolymfy z prvního odběru (7. den expozice) byly špatně heparizovány a došlo k jejich sražení.

Nebylo je tedy možné použít při dalším zpracování a vyhodnocení, a proto nejsou 7. den experimentu hodnoty parametrů hemolymfy ve výsledcích uvedeny.

Dále byly odebrány vzorky hepatopankreatu, svalu a žaber (obr. č. 4). Ty bylo nutné do dalšího zpracování uchovávat při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazícím boxu.



Obr. č. 4: Odebírání vzorků tkání a jednotlivé vzorky ve zkumavkách (Foto a úprava: Autor).

Příprava vzorků k analýze – homogenizace vzorků

Při dalším zpracování byly vzorky tkání vždy uchovávány na šupinkovém ledu, aby nedošlo k jejich rozmrznutí a znehodnocení. Z každého vzorku bylo do čisté zkumavky přidáno přibližně 0,15 – 0,18 g tkáně a úměrné množství homogenizačního pufru v poměru 1 ml pufru na 100 mg tkáně.

Pro stanovení CAT a SOD se použil předem připravený PP pufr o koncentraci 50 mM KH_2PO_4 s obsahem 1mM EDTA (pH 7,4) v destilované vodě. Pro stanovení ostatních parametrů byl použit PBS pufr s obsahem 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,02% KH_2PO_4 (pH 7,2). Takto připravené vzorky byly homogenizovány na rotačním homogenizátoru (TissueLyser II, QIAGEN®) po dobu 5 minut a při dalším zpracování stále uchovávány na ledu. Dále byly vzorky zpracovány dle jednotlivých metod (obr. č. 5).

3.3. Jednotlivé metody stanovení biochemických parametrů

3.3.1. Metoda pro stanovení proteinů

Chemikálie a činidla:

- BSA standard (bovinní albumin),
- BCA činidlo A: Bicinochoninic acid solution – Sigma Aldrich (B-9643),
- BCA činidlo B: Copper (II) sulfate – Sigma Aldrich (C-2284),
- 0,1M NaOH.

Postup metody:

Do předem připravených zkumavek se 30 μ l zhomogenizovaného vzorku bylo přidáno 570 μ l 0,1M NaOH a obsah byl řádně promíchán na vortexu. Takto připravené vzorky se nechaly po dobu 24 h inkubovat při pokojové teplotě 20 °C.

Podle tabulky č. 5 se do jednotlivých mikrozkušavek připravila standardní koncentrační řada. Po řádném zamíchání vzorků na vortexu bylo pipetováno 10 μ l každého vzorku do mikrotitrační destičky, a to včetně vzorků z koncentrační řady, ve dvou opakováních.

Následně bylo smícháno 58,8 ml BCA činidla A s 1,2 ml BCA činidla B a obsah byl promíchán na vortexu. Takto vzniklé činidlo bylo v množství 200 μ l pipetováno ke každému vzorku multikanálovou pipetou do mikrotitrační destičky.

Mikrotitrační destička byla přikryta fólií a po dobu 30 minut při 37 °C inkubována v termoboxu (Biological Thermostat BT 50). Po inkubaci byly vzorky ihned měřeny ve spektrofotometru při vlnové délce 562 nm proti blanku. Výsledné barevné zbarvení proteinů je zobrazeno na obr. č. 6.

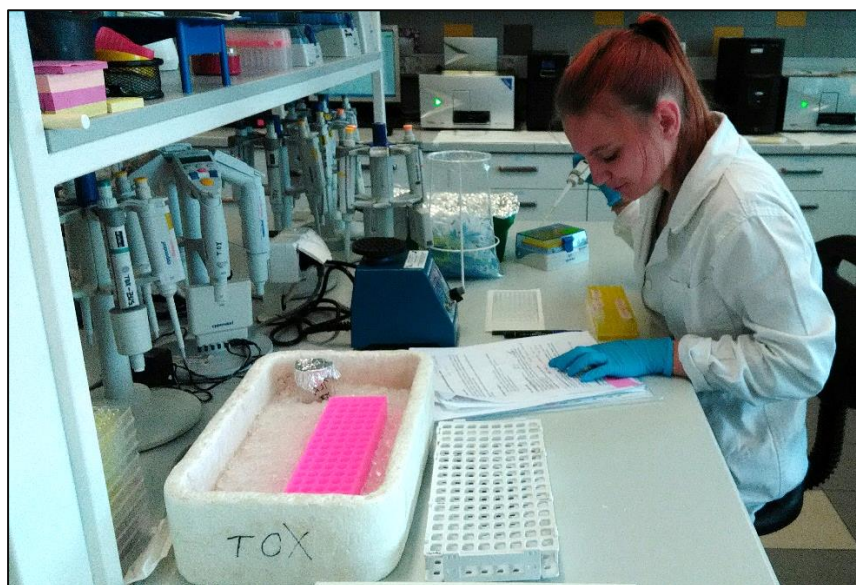
K měření byl využit spektrofotometr typu TECAN Infinite M200 (TECAN Austria GmbH). Na tomto přístroji byly měřeny i ostatní sledované biomarkery.

Vyhodnocení výsledků:

Výsledné hodnoty koncentrace proteinů v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v jednotlivých vzorcích, byly vypočteny na základě kalibrační křivky.

Tabulka č. 5: Tabulka pro kalibraci proteinů.

Vzorek	Koncentrační řada ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	BSA ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	NaOH (μl)
S1	1000	250 μl (1 mg BSA · 1 ml^{-1} NaOH)	0
S2	800	200 μl S1	50
S3	400	100 μl S2	100
S4	200	100 μl S3	100
S5	100	100 μl S4	100
S6	50	100 μl S5	100
S7	25	100 μl S6	100
S8	12,5	100 μl S7	100
BL	Blank	0	100



Obr. č. 5: Zpracování vzorků dle jednotlivých metod v laboratoři (Foto: A. Stará)

3.3.2. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Princip metody:

Metoda je založená na schopnosti SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. K vytvoření takových superoxidů se využívá systém NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a PMS (phenazin methosulfonát). Takto vzniklé superoxidy jsou detekovány pomocí NBT (nitroblue tetrazolium), jenž dohromady tvoří stabilní modré zbarvení (obr. č. 6), které je následně spektrofotometricky měřeno (Ewing a Janero, 1995).

Chemikálie a činidla:

- Homogenizační pufr 50 mM PP pufr (KH_2PO_4) s 1 mM EDTA (pH 7,4),
- 50 mM PP pufr s 0,1 mM EDTA (pH 7,4),
- 60 μM NBT v PP pufru,
- 100 μM NADH,
- 35 μM PMS (phenazine methosulfonate),
- všechny chemikálie byly uchovávány v šeru a na ledu.

Postup metody:

Nejdříve byly vzorky vloženy na 30 minut do centrifugy při 15 000 rpm a 4 °C. Následně bylo do mikrotitrační destičky (vždy ve 3 opakováních) pipetováno 25 μl zhomogenizovaného vzorku/blanku (PP pufru) a k tomu multikanálovou pipetou připipetováno 200 μl PP pufru s NADH a NBT. Takto připravené vzorky byly vloženy do spektrofotometru a při vlnové délce 560 nm měřeny po dobu 2 minut s 20sekundovými intervaly. Dalším krokem bylo nastartování samotné reakce. To se provedlo přidáním 25 μl 35 μM PMS. Po 5sekundovém třepání se po dobu 5 minut s 20sekundovými intervaly změřila kinetika reakce při vlnové délce 560 nm.

Vyhodnocení výsledků

Výsledná hodnota SOD aktivity byla vypočtena na základě změřených směrnic křivek (Sm. kř.) a podle následujícího vzorce byla vyjádřena v $\text{nmol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$\text{SOD aktivita} = \frac{(\text{Sm. kř. blanku} + \text{sm. kř. směsi se vzorkem/min}) - \text{sm. kř. s PMS se vzorkem/min}}{0,6791 \cdot 15000 \cdot (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{proteinu})} \cdot 10^6$$

3.3.3. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity kataláz (CAT)

Princip metody:

Tato metoda využívá schopnost CAT měnit peroxid vodíku na kyslík a vodu. Pomocí spektrofotometru se zaznamenává pokles absorpance zkoumaného vzorku s peroxidem vodíku (obr. č. 6) a následně se pomocí rovnice vyhodnotí míra aktivity enzymu CAT (Aebi, 1984).

Chemikálie a činidla:

- Homogenizační pufr 50 mM PP pufr (KH₂PO₄) s 1 mM EDTA (pH 7,4),
- TRIS EDTA pufr (50 mM TRIS pufr s 0,1mM EDTA (pH 7,6),
- 0,09% H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru s 0,1mM EDTA (pH 7,6).

Postup metody:

Nedříve byly vzorky vloženy na 30 minut do centrifugy při 15 0000 rpm a 4 °C. Následně bylo třeba vzorek z důvodu vysoké koncentrace naředit dle druhu tkáně s PP pufr (poměr vzorku : PP pufru = 20 µl : 480 µl). Takto naředěné vzorky se promíchaly na vortexu a poté bylo do mikrotitrační (UV) destičky pipetováno 50 µl zředěného vzorku a 250 µl 0,09% H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru s 0,1mM EDTA. Mikrotitrační destičky byly rychle vloženy do spektrofotometru, kde byly promíchány a ihned měřeny při vlnové délce 240 nm po dobu 1 minuty a to ve 3 opakováních.

Vyhodnocení výsledků:

Konečné hodnoty aktivity CAT se vyjádřily pomocí směrnice křivky za minutu, od které se odečetla směrnice blanku. Výsledná hodnota byla následně vypočtena podle následující rovnice a vyjádřena v µmol H₂O₂·min⁻¹·mg⁻¹ proteinů.

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{Směrnice křivky}}{39,4 \cdot 1 \cdot (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{proteinu})} \cdot 10^6$$

3.3.4. Metoda pro stanovení enzymatické aktivity glutation S-transferázi (GST)

Princip metody:

Pro stanovení aktivity GST se používá metoda, která je založena na odhalení konjugátu (obr. č. 6) mezi redukováným glutationem a CNDB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen), jakožto běžně používaným substrátem (Habig a kol., 1974).

Chemikálie a činidla:

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

Postup metody:

Vzorky byly nejprve vloženy na 15 minut při 4 °C a 10 000 rpm do centrifugy. Poté bylo nutné odebrat supernatant a zředit v PBS pufru podle typu tkáně (hepatopankreas 50:140 PBS, pro žábry a sval 150:40 PBS, součet vzorku a PBS pufru musel tvořit vždy 190 µl).

Do mikrotitrační destičky se pipetovalo 40 µl vyředěného vzorku a následně bylo přidáno multikanálovou pipetou 150 µl PBS, 10 µl CDNB a nakonec 50 µl redukováného GSH. Toto měření bylo provedeno pro každý vzorek vždy ve 3 opakováních.

Po přidání redukováného GSH byly vzorky vloženy do spektrofotometru, kde byly po dobu 3 sekund protřepávány a následně ihned změřeny, a to po dobu 5 minut a při vlnové délce 340 nm.

Vyhodnocení výsledků:

Výsledné hodnoty aktivity GST byly vyjádřeny pomocí směrnice křivky, která byla odečtena od směrnice blanku a poté vypočítána pomocí následující rovnice. GST aktivita byla vyjádřena v $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

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

3.3.5. Metoda pro stanovení redukovaného glutationu (GSH)

Princip metody:

Principem metody pro stanovení hladin GSH, je reakce volných-SH skupin společně s DTNB (2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) za vzniku barevné sloučeniny (obr. č. 6), která je spektrofotometricky měřena (Ellman, 1959).

Chemikálie a činidla:

- TRIS pufr (0,8M TRIS; 0,02M EDTA; pH 8,9),
- 0,02M DTNB (396,3 MW) v methanolu,
- GSH ($1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS roztok, 307,3 MW),
- 25% TCA (kyselina trichloroctová).

Postup metody:

Vzorky byly nejprve vloženy na 15 minut při 4 °C a 10 000 rpm do centrifugy. Následně bylo do prázdných zkumavek pipetováno 18 μl 25% TCA a 180 μl supernatantu vzorku. Takto připravené vzorky byly nejprve po dobu 10 sekund promíchány na vortexu a poté při pokojové teplotě nechány po dobu 15 minut inkubovat. Vzorky byly opět promíchány na vortexu a na 10 minut při 4 °C a 8 000 rpm vloženy do centrifugy.

Po vyjmutí z centrifugy bylo do mikrotitrační destičky (ve 3 opakováních) pipetováno 50 μl supernatantu vzorku a multikanálovou pipetou přidáno 190 μl TRIS pufru a 10 μl DTNB. Vzorky byly následně vloženy do spektrofotometru, kde byly promíchány a po dobu 5 minut inkubovány při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky spektrofotometricky změřeny při vlnové délce 420 nm proti blanku a 680 nm proti pozadí.

Kalibrace:

K vyhodnocení výsledků bylo zapotřebí vytvořit kalibraci GSH v rozsahu 0,005 – 0,075 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (s body viz tabulka č. 6). Standart GSH bylo zapotřebí nejdříve 10x naředit s PBS puftrem na koncentraci 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následně byla podle tabulky č. 6 vytvořena koncentrační řada. K vyřaděným standardům koncentrační řady bylo přidáno 50 μl TCA.

Tabulka č. 6: Tabulka pro vytvoření koncentrační řady.

	Výsledná koncentrace GSH ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	GSH $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (μl)	PBS pufr (μl)
1	0,075	375	125
2	0,05	250	250
3	0,025	125	375
4	0,015	75	425
5	0,01	50	450
6	0,0075	37,5	462,5
7	0,005	25	475
8	0,0025	12,5	487,5
9	Blank	0	500

Po uplynutí této doby byly vzorky kalibrační řady znovu promíchány a následně pipetovány do mikrotitrační destičky v množství 50 μl . Do ní bylo dále přidáno 190 μl TRIS pufru a 10 μl DTNB. Vzorky byly ihned vloženy do spektrofotometru, kde byly promíchány a po dobu 5 minut inkubovány při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky kalibrační křivky změřeny ve spektrofotometru při vlnové délce 420 nm proti blanku a 680 nm proti pozadí.

Vyhodnocení výsledků:

Koncentrace glutationu se vypočítala na základě kalibrační křivky pro standardní redukovaný glutation. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny v $\text{nmol GSH} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.3.6. Metoda pro stanovení lipidní peroxidace (LPO)

Princip metody:

Míra LPO se zaznamenává a měří pomocí TBARS testu (thiobarbituricacid reactive substances), který je založen na stanovení barevných sloučenin. Výsledkem LPO je oxidační produkt MDA, který vzniká reakcí reaktivních kyslíkových radikálů společně s nenasycenými mastnými kyselinami. MDA společně s kyselinou thiobarbiturovou vytváří barevný komplex (obr. č. 6), který se měří pomocí spektrofotometru (Uchiyama a Mihara, 1978; Livingstone a kol., 1990; Surai a kol., 1996;).

Chemikálie a činidla:

- TCA-BHT (20% kyselina trichloroctová, 2% butylovaný hydrotoulén), v poměru 200:1 (TCA:BHT),
- 0,6M HCl,
- TRIS-TBA (25 mM TRIS, 100 mM TBA v destilované vodě), pH 7,4,
- Standard MDA (0,22% 1,1,3,3-tetraethoxypropan v 1 % H₂SO₄),
- 2 mM FeSO₄ v PBS.

Postup metody:

Při této metodě byly použity zhomogenizované necentrifugované vzorky tkání. Do prázdných zkumavek bylo pipetováno 250 µl zhomogenizované tkáně raka a 12,5 µl 2 mM FeSO₄. Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu a následně po dobu 30 minut a při teplotě 37 °C inkubovány na termodesce v termoboxu. Poté byly vzorky opět promíchány na vortexu, ze zkumavek bylo odebráno 12,5 µl vzorku a přidáno 0,75 µl TCA-BHT.

Roztok byl opět promíchán na vortexu a následně vložen na 20 minut do centrifugy při 8 000 rpm a 4 °C. Dále bylo do prázdných zkumavek postupně pipetováno 50 µl HCl, 200 µl TRIS TBA a 250 µl supernatantu vzorku.

Takto vzniklý roztok byl opět promíchán na vortexu a inkubován na termodesce v termobloku při teplotě 90 °C po dobu 45 minut. Po uplynutí této doby se nechaly vzorky pomalu vychladnout. Následně bylo 250 µl roztoku pipetováno do mikrotitračních

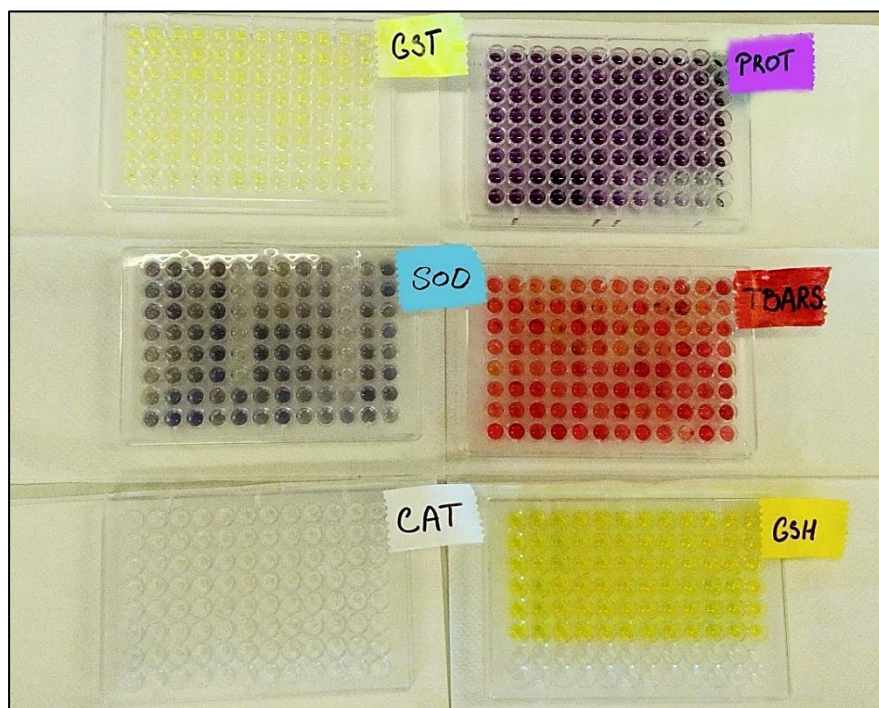
destiček. Konečné zbarvení bylo spektrofotometricky změřeno nejdříve při vlnové délce 550 nm a poté při 590 nm po dobu 15 minut.

Vyhodnocení výsledků:

Vzniklé hodnoty byly spočítány na základě rovnice vytvořené z kalibrační křivky (tabulka č. 7). Kalibrace byla vytvořena pomocí standardu MDA. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako nmol TBARS·mg⁻¹ proteinů.

Tabulka č. 7: Tabulka pro vytvoření kalibrační křivky.

nmol/reakci	100 μM roztok MDA (μl)	PBS (μl)
Blank	0	750
0,5 (tzn. 2μM)	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



Obr. č. 6: Vzniklé barevné sloučeniny u jednotlivých parametrů a proteinu (Foto: Autor). Glutation S-transferáza (GST), superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), protein (PROT), lipidní peroxidace (TBARS), redukovaný glutation (GSH).

3.3.7. Biochemický profil hemolymfy

Vzhledem k tomu, že existuje jen málo studií, které by popisovaly přesné metody pro vyšetření hemolymfy raků, bylo postupováno podle metodiky, která je zaměřená na biochemickém profilu krve ryb podle Kolářové a Velíška (2012).

Pro stanovení biochemického profilu hemolymfy byl použit supernatant z odstředěné hemolymfy. Vzorky supernatantu z hemolymfy byly měřeny pomocí biochemického analyzátoru VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories Inc., USA). Přístroj měří pomocí příslušných testovacích disků, které se musely vkládat pro každý měřený vzorek společně s požadovaným objemem supernatantu (podle množství stanovovaných parametrů) do přístroje. Ze supernatantu hemolymfy raků byly změřeny hodnoty parametrů: glukózy (GLU), celkových bílkovin (TP), albuminu (ALB), globulinu (GLOB), amoniaku (NH_3), asparát aminotransferázy (AST), alanin aminotransferázy (ALT), kreatinkinázy (CK), láktát dehydrogenázy (LDH), vápníku (Ca^{2+}) a hořčíku (Mg^{2+}). Po vložení vzorků a testovacích disků s vybranými parametry přístroj automaticky zanalyzoval sledované ukazatele.

3.4. Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení výsledků byl použit software R verze 3.6.2 (R Core Team, 2016). Pro hodnocení vlivu teploty, koncentrace, času a jejich interakcí byl použit zobecněný lineární model s gausovskou distribucí. Přičemž postupnou selekcí byly z modelu se všemi interakcemi (full model) odebírány jednotlivé faktory či jejich interakce, až zbyl finální model, ve kterém byly faktory signifikantní ($P < 0,05$). Následně byl proveden post-hoc test, který určil, jak se od sebe jednotlivé parametry významně liší. Všechna naměřená data udávají průměr \pm směrodatnou odchylku, kdy $N = 6$.

4. Výsledky

4.1. Chování a mortalita raků

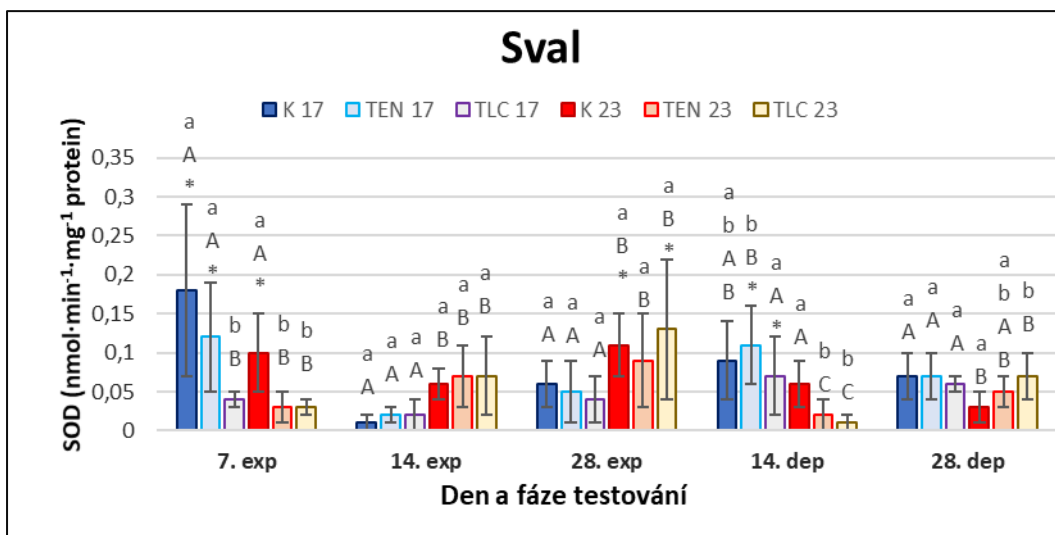
V rámci jednotlivých teplot, nevykazovali raci mezi skupinami žádné rozdílné či neobvyklé chování týkající se příjmu krmiva, pohybové aktivity nebo rychlosti dýchání. Zároveň nebyl pozorován žádný úhyn. Všeobecně raci v nádržích s chladnější vodou (17 °C) vykazovali pomalejší fyziologickou a pohybovou aktivitu ve srovnání s raky v teplejší vodě (23 °C), kteří byli všeobecně aktivnější ve všech sledovaných skupinách i kontrole.

4.2. Antioxidační parametry

4.2.1. Superoxid dismutáza (SOD)

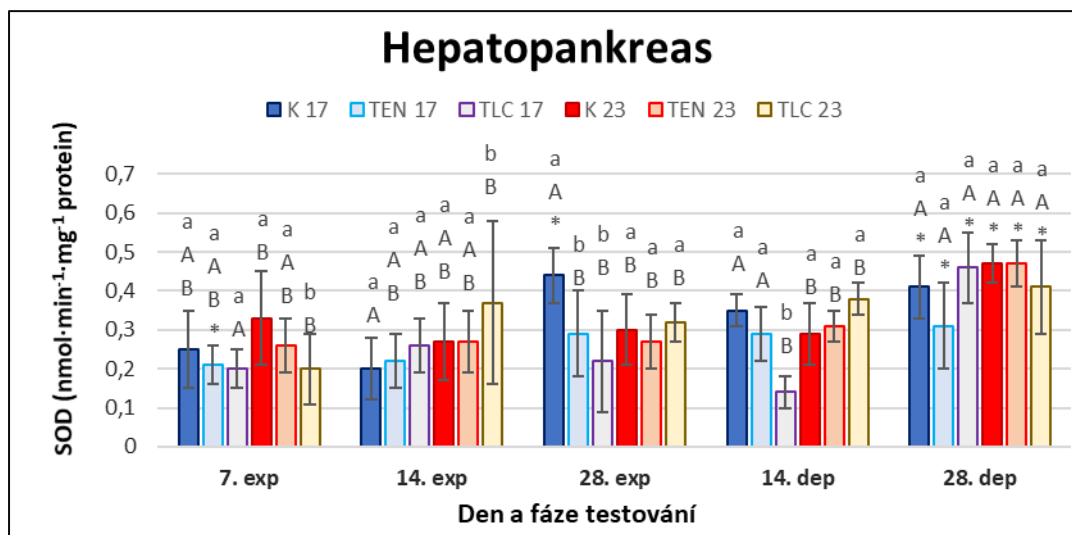
Statisticky významné ($P < 0,01$) změny aktivity SOD oproti kontrole se projevily při obou teplotách a ve všech vyšetřovaných tkáních: svalu (graf č.1), hepatopankreatu (graf č. 2) a žábách (graf č. 3).

Z grafu č. 1 je patrné, že se změna aktivity SOD ve svalech raků při teplotě 17 °C, oproti kontrole K 17, projevila pouze u skupiny TLC 17, kdy byla po 7 dnech expozice naměřena statisticky signifikantně ($P < 0,01$) nižší aktivita SOD. Naopak při teplotě 23 °C, se aktivita SOD ve svalech raků, oproti kontrole K 23, změnila u obou měřených koncentrací thiaclopridu. Snížená aktivita SOD, byla zaznamenána u obou skupin (TEN 23; TLC 23), a to po 7 dnech expozice a také po 14 dnech depurace. K dalším statisticky významným ($P < 0,01$) změnám aktivity SOD došlo až na konci experimentu, tedy po 28 dnech depurace, kdy se aktivita SOD u skupiny TLC 23, oproti kontrole K 23, dokonce zvýšila.



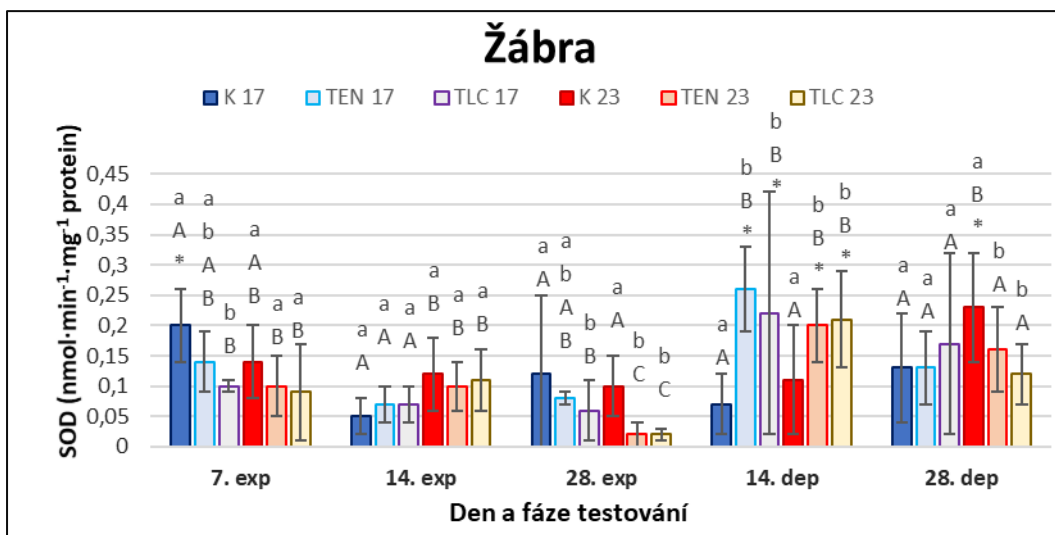
Graf č. 1: Hodnoty superoxid dismutázy (SOD) ve svalu raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu ve dnech; dep – depurace v čisté vodě ve dnech; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Z grafu č. 2 je patrné, že statisticky významná ($P < 0,01$) změna aktivity SOD se projevila i v tkáních hepatopankreatu, a to opět při obou teplotách. U teploty 17°C se změna v aktivitě SOD projevila u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu. Snížená aktivita SOD oproti kontrole K 17 je patrná u skupiny TEN 17 i TLC 17, kdy nastala po 28 dnech expozice. U skupiny TLC 17 byla zvýšená aktivita zaznamenána i po 14 dnech depurace, ale na konci testování, tedy po 28 dnech depurace, se aktivita SOD ustálila na běžnou úroveň K 17. Naopak u teploty 23°C byla signifikantní ($P < 0,01$) změna aktivity SOD, oproti kontrole K 23, ve tkáních hepatopankreatu zaznamenána pouze u skupiny TLC 23, a to po 7 a 14 dnech expozice, ale po zbytek testu se hodnoty vrátily na úroveň kontroly.



Graf č. 2: Hodnoty superoxid dismutázy (SOD) v hepatopankreatu raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

V dalším grafu č. 3 vidíme, že u teploty 17°C , byla aktivita SOD v tkáních žaber, oproti kontrole K 17, statisticky rozdílná ($P < 0,01$) u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu. U skupiny TLC 17, oproti kontrole K 17, byla aktivita SOD během expozice po 7 dnech nejprve snižena, po 14 dnech na úrovni kontrolní skupiny, po 28 dnech opět snižena, ale v průběhu depurace, se po 14 dnech výrazně zvýšila, a to se signifikantním rozdílem ($P < 0,05$) v této skupině v průběhu celého experimentu. Tento rozdíl ($P < 0,05$) byl zaznamenán i u skupiny TEN 17, kdy po 14 dnech depurace došlo k náhlému zvýšení SOD. U obou skupin však poslední den testování, tedy po 28 dnech depurace, hodnoty SOD klesly na běžné hodnoty kontroly K 17. Aktivita SOD se i u teploty 23°C měnila u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu, a to se stejným trendem. U obou skupin (TEN 23; TLC 23) byla zaznamenána signifikantně ($P < 0,01$) snižena aktivita SOD až po 28 dnech expozice. K prudkému zvýšení došlo po 14 dnech depurace, a to opět se signifikantním rozdílem ($P < 0,05$) v průběhu celého experimentu a oproti kontrole K 23, se ke konci depurace (28. den) aktivita SOD opět snížila.

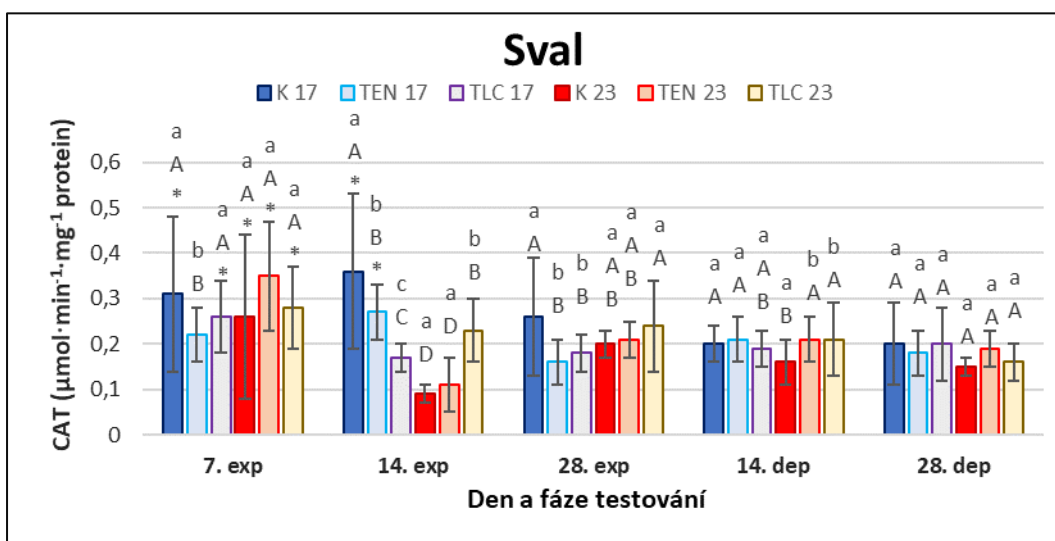


Graf č. 3: Hodnoty superoxid dismutázy (SOD) v žábách raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.2.2. Kataláza (CAT)

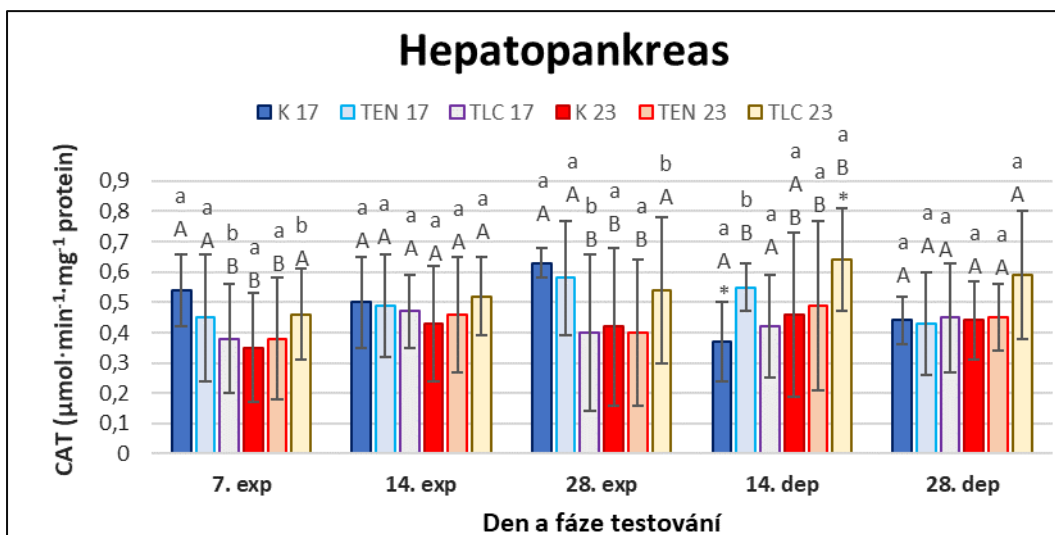
Statisticky významné ($P < 0,01$) změny aktivity CAT oproti kontrole se projevily při obou teplotách a ve všech tkáních svalů (graf č. 4), hepatopankreatu (graf č. 5) a žaber (graf č. 6).

Z grafu č. 4 je patrné, že statisticky významná změna ($P < 0,01$) aktivity CAT ve svalu, při teplotě $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se oproti kontrole K 17 projevila u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu. U skupiny TEN 17 byla zaznamenána signifikantně ($P < 0,01$) nižší aktivita CAT po celou dobu expozice. I ve skupině TLC 17 byla naměřena nižší aktivita CAT, ale až po 14 a 28 dnech expozice. V průběhu depurace se však hodnoty CAT u obou skupin thiaclopridu vrátili na běžnou úroveň kontroly K 17. Další změny nastaly i u teploty $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy u skupiny TLC 23 po 14 dnech expozice byla zjištěna signifikantně ($P < 0,01$) zvýšená aktivita CAT oproti kontrole K 23. U obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu, byla v průběhu depurace oproti kontrole K 23, zaznamenána také zvýšená aktivita CAT, konkrétně po 14 dnech, ale do konce depurace (28 dne) se vrátila na běžnou úroveň kontroly. V grafu č. 4 také vidíme, že aktivita CAT byla téměř u všech skupin nejvyšší zejména na začátku experimentu ($P < 0,05$).



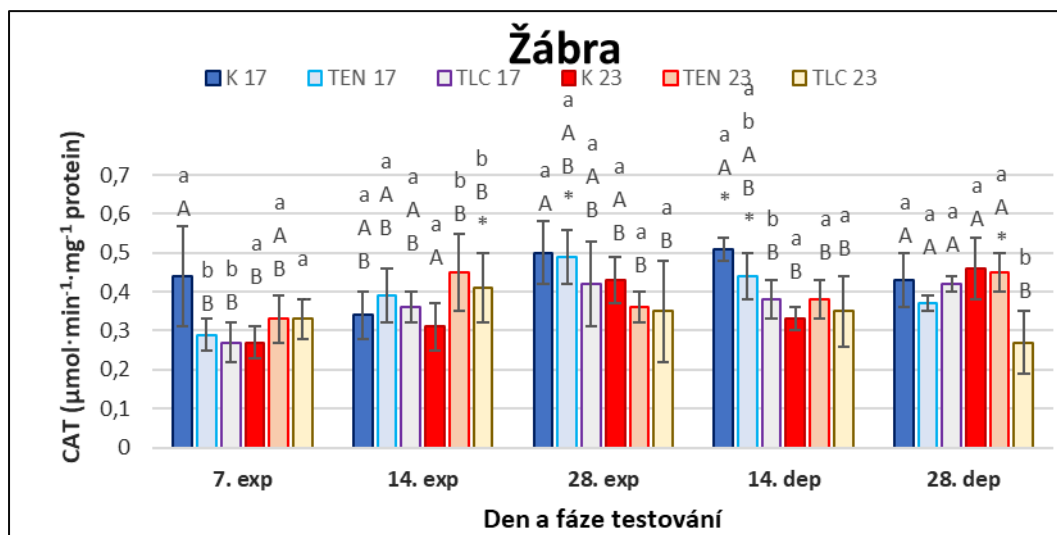
Graf. č. 4: Hodnoty katalázy (CAT) ve svalu raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P<0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P<0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

V dalším grafu č. 5 můžeme vidět, že statisticky významná ($P<0,01$) změna u enzymu CAT byla zaznamenána i ve tkáních hepatopankreatu, a to opět při obou teplotách. U teploty $17 \text{ }^\circ\text{C}$ nastalo signifikantní zvýšení ($P<0,01$) oproti kontrole K 17 u skupiny TEN 17 až v průběhu depurace po 14 dnech, ale na konci (po 28 dnech) se hodnoty pohybovaly již na úrovni kontrolní skupiny K 17. Naopak u skupiny TLC 17 byla během expozice aktivita CAT po 7 dnech snižena, po 14 dnech na úrovni kontroly a po 28 dnech opět snižena. Po 14 dnech depurace se aktivita CAT vrátila opět na hodnoty kontrolní skupiny. Při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$, byly statisticky významné změny ($P<0,01$) aktivity CAT, oproti kontrole K 23 zaznamenány pouze u skupiny TLC 23, kdy v průběhu expozice došlo po 7 dnech nejprve ke zvýšení, po 14 dnech se aktivita CAT pohybovala v hodnotách kontroly K 23 a po 28 dnech došlo opět ke zvýšení. V průběhu depurace se již po 14 dnech vrátila aktivita CAT na hodnoty kontrolní skupiny K 23.



Graf č. 5: Hodnoty katalázy (CAT) v hepatopankreatu raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Z grafu č. 6 je dále patrné, že statisticky významná ($P < 0,01$) změna aktivity CAT byla zaznamenána i v žábrách raků, také při obou teplotách. U teploty $17 \text{ }^\circ\text{C}$ nastaly statisticky významné změny ($P < 0,01$) aktivity CAT u obou zkoumaných koncentrací. U skupin TEN 17 a TLC 17 byla po 7 dnech expozice, oproti kontrole K 17, zaznamenána signifikantně ($P < 0,01$) nižší aktivita CAT. U skupiny TEN 17 i TLC 17 se již po 14 dnech expozice ustálila aktivita CAT na běžnou úroveň K 17. U skupiny TLC 17 byla signifikantně ($P < 0,01$) nižší aktivita pozorována opět po 14 dnech depurace, ale na konci testování po 28 dnech depurace, se hodnota aktivity CAT u této skupiny vrátila na hodnoty K 17. Signifikanční změny ($P < 0,01$) aktivity CAT byly u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu zaznamenány i při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$. U skupiny TEN 23 i TLC 23, byla oproti kontrole K 23, po 14 dnech expozice, zaznamenána vyšší aktivita CAT. Po 28 dnech expozice i během depurace se aktivita CAT ustálila na běžnou úroveň kontroly a u skupiny TLC 23, bylo oproti kontrole K 23 zaznamenáno na konci testování po 28 dnech depurace dokonce její snížení.



Graf č. 6: Hodnoty katalázy (CAT) v žábřácích raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.2.3. Glutathion S-transferáza (GST)

Aktivity GST jednotlivých tkání jsou zobrazeny v tabulce č. 8. Ke statisticky významným ($P < 0,01$) změnám aktivity GST došlo u obou zkoumaných koncentrací, a to zejména v tkáních svalů a hepatopankreatu.

V tabulce č. 8 můžeme vidět, že ve svalech raků, byla statisticky významná ($P < 0,01$) změna aktivity GST u teploty $17 \text{ }^\circ\text{C}$, zaznamenána u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu. U skupiny TEN 17, bylo v průběhu expozice oproti kontrole K 17 nejdříve po 7 dnech zaznamenáno její snížení, po 14 dnech naopak její zvýšení, ale po 28 dnech se aktivita ustálila na běžnou úroveň kontroly K 17. V průběhu depurace se aktivita GST ve skupině TEN 17 po 14 dnech opět zvýšila, ale ke konci testování (po 28 dnech) se vrátila na běžnou úroveň kontroly K 17. U skupiny TLC 17, oproti K 17 bylo také v průběhu expozice po 7 dnech zaznamenáno nejprve její signifikantní ($P < 0,01$) snížení, ale již po 14 dnech se vrátila hodnota na úroveň kontroly K 17, ale naopak po 28 dnech expozice se projevilo její zvýšení, které přetrvávalo i po 14 dnech depurace. Ke konci testování (po 28 dnech) se aktivita u této skupiny také vrátila na hodnoty K 17. K signifikantním ($P < 0,01$) změnám aktivity GST ve svalech raků došlo i u teploty $23 \text{ }^\circ\text{C}$, kdy u skupiny TEN 23 byla zaznamenána oproti kontrole K 23 vyšší aktivita GST

po 7 dnech expozice. U této skupiny (TEN 23) byla zaznamenána i statisticky ($P<0,05$) nejvyšší aktivita GST v průběhu celého testování. Naopak u této skupiny bylo po 14 dnech expozice, oproti kontrole K 23, zaznamenáno její signifikantní ($P<0,01$) snížení, ale po 28 dnech expozice se její aktivita vrátila na běžnou hodnotu K 23. V průběhu depurace bylo po 14 dnech opět zaznamenáno její zvýšení, které již ke konci experimentu (po 28 dnech) nebylo zaznamenáno. Vyšší aktivita GST, oproti K 23 byla statisticky ($P<0,01$) zaznamenána i u skupiny TLC 23 hned po 7 dnech expozice, kdy byla zároveň zaznamenána i signifikantně ($P<0,05$) nejvyšší aktivita GST u této skupiny v průběhu celého experimentu. Již po 14 dnech expozice se aktivita GST ustálila na hodnoty kontrolní skupiny K 23 a na této úrovni zůstala po celý zbytek experimentu.

V tabulce č. 8 dále vidíme, že statisticky významné změny ($P<0,01$) aktivity GST byly zaznamenány i v hepatopankreatu, ale pouze u teploty 23 °C, kdy byly zaznamenány změny u obou zkoumaných koncentrací thiaclopridu. U skupiny TEN 23 byla signifikantní změna oproti K 23, zaznamenána po 7 dnech expozice, kdy bylo zaznamenáno její zvýšení, ale již po 14 dnech expozice až do konce experimentu nebyl mezi touto skupinou a K 23 zaznamenán žádný statisticky významný ($P<0,01$) rozdíl.

V tabulce č. 8 jsou zaznamenány i aktivity GST v žábrách raků. Statisticky významné rozdíly ($P<0,01$) GST v žábrách byly pozorovány pouze po 14 dnech expozice, a to pouze mezi teplotami. Během dalších dnů experimentu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny ($P<0,01$) mezi jednotlivými skupinami thiaclopridu, teplotami a kontrolami.

Tabulka č. 8: Hodnoty aktivity glutation S-transferázy (GST) ve všech tkáních raka mramorovaného během experimentu.

GST (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ protein)								
Tkáň	Fáze experimentu	Den	Testovací skupina					
			K 17 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 17 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 17 (64,6 µg·l ⁻¹)	K 23 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 23 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 23 (64,6 µg·l ⁻¹)
Sval	expozice	7	2,03 ± 0,59 ^{aA*}	1,56 ± 0,51^{bB}	1,43 ± 0,40^{bB}	1,81 ± 0,26 ^{aB}	2,37 ± 0,84^{bA*}	2,37 ± 0,56^{bA*}
		14	2,03 ± 0,66 ^{aA*}	2,74 ± 0,34^{bB*}	1,93 ± 1,05 ^{aA}	1,72 ± 0,23 ^{aA}	1,21 ± 0,42^{bC}	2,01 ± 0,23 ^{aA}
		28	1,64 ± 0,67 ^{aA}	1,57 ± 0,37 ^{aA}	2,11 ± 0,86^{bB*}	1,74 ± 0,63 ^{aAB}	1,61 ± 0,57 ^{aA}	1,68 ± 0,43 ^{aA}
	depurace	14	1,15 ± 0,44 ^{aA}	2,05 ± 0,41^{bB}	2,03 ± 0,76^{bB}	1,43 ± 0,35 ^{aA}	2,13 ± 0,64^{bB}	1,67 ± 0,12 ^{aA}
		28	1,43 ± 0,50 ^{aA}	1,98 ± 0,49 ^{aA}	1,88 ± 0,55 ^{aA}	1,59 ± 0,35 ^{aA}	1,95 ± 0,24 ^{aA}	1,66 ± 0,38 ^{aA}
Heptaopankreas	expozice	7	4,85 ± 0,80 ^{aA}	4,53 ± 1,54 ^{aA}	4,77 ± 1,43 ^{aA}	4,41 ± 0,92 ^{aA}	5,68 ± 0,97^{bB}	6,06 ± 1,55^{bB}
		14	6,37 ± 0,93 ^{aA}	6,39 ± 1,79 ^{aA}	7,01 ± 1,17 ^{aA}	7,28 ± 1,45 ^{aA}	7,00 ± 1,78 ^{aA}	4,93 ± 1,55^{bB}
		28	5,81 ± 0,97 ^{aA}	6,72 ± 0,67 ^{aA}	6,90 ± 0,83 ^{aA}	6,73 ± 1,49 ^{aA}	6,43 ± 0,92 ^{aA}	6,34 ± 0,79 ^{aA}
	depurace	14	6,10 ± 1,08 ^{aA}	7,48 ± 0,70 ^{aA}	7,14 ± 0,80 ^{aA}	7,35 ± 1,36 ^{aA}	6,54 ± 0,98 ^{aA}	6,90 ± 0,47 ^{aA}
		28	5,89 ± 0,54 ^{aA}	6,64 ± 0,62 ^{aA}	6,30 ± 0,81 ^{aA}	6,60 ± 0,58 ^{aA}	6,30 ± 1,77 ^{aA}	6,81 ± 1,03 ^{aA}
Žábra	expozice	7	4,18 ± 0,66 ^{aA}	3,10 ± 0,63 ^{aA}	3,61 ± 0,58 ^{aA}	3,51 ± 0,59 ^{aA}	3,90 ± 0,96 ^{aA}	3,41 ± 0,93 ^{aA}
		14	5,56 ± 1,03 ^{aA}	4,57 ± 0,83 ^{aAB}	4,32 ± 0,74 ^{aAB}	3,08 ± 0,58 ^{aB}	4,10 ± 0,86 ^{aAB}	3,93 ± 0,56 ^{aB}
		28	4,26 ± 1,04 ^{aA}	4,13 ± 0,54 ^{aA}	3,10 ± 0,77 ^{aA}	3,61 ± 1,18 ^{aA}	3,91 ± 0,96 ^{aA}	3,08 ± 1,52 ^{aA}
	depurace	14	4,04 ± 0,50 ^{aA}	3,63 ± 0,56 ^{aA}	3,49 ± 0,77 ^{aA}	3,05 ± 0,53 ^{aA}	3,55 ± 0,92 ^{aA}	3,55 ± 1,35 ^{aA}
		28	4,54 ± 1,32 ^{aA}	4,08 ± 1,27 ^{aA}	4,55 ± 1,55 ^{aA}	2,81 ± 0,42 ^{aA}	3,31 ± 0,53 ^{aA}	3,08 ± 0,82 ^{aA}

Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase.

4.2.4. Hladina redukováného glutationu (GSH)

Hodnoty GSH naměřené ve všech tkáních, jsou zaznamenány v tabulce č. 9. Ve svalech raků, byly statisticky významné ($P < 0,01$) změny GSH zaznamenány u teploty 17 °C pouze u skupiny TLC 17, kdy došlo oproti kontrole K 17, ke snížení hodnoty GSH po 14 dnech expozice, ale již po 28 dnech expozice se hodnoty vrátily na úroveň kontrolní skupiny K 17. U teploty 23 °C byly také zaznamenány statisticky významné ($P < 0,01$) změny hodnot GSH ve svalech raků, a to u obou skupin (TEN 23; TLC 23). U obou skupin došlo, oproti kontrole K 23 ke zvýšení hodnot GSH po 7 dnech expozice, kdy byla zároveň u skupiny TEN 23 statisticky ($P < 0,05$) zaznamenána nejvyšší hodnota GSH v průběhu celého experimentu. U obou skupin po 28 dnech expozice nastalo opět snížení GSH na hodnoty kontroly K 23, které přetrvávalo po celý zbytek testování.

V tabulce č. 9 vidíme, že statisticky významné ($P < 0,01$) změny hodnot GSH byly zaznamenány i v hepatopankreatu. U teploty 17 °C byly oproti kontrole K 17 zaznamenány u obou testovaných koncentrací thiaclopidu. U skupiny TEN 17, došlo k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,01$) oproti K 17 až po 14 dnech depurace, kdy byla u této skupiny zaznamenána i statisticky nejvyšší ($P < 0,05$) hodnota GSH v průběhu celého experimentu. Na konci testování po 28 dnech depurace byly naopak u této skupiny zaznamenány signifikantně ($P < 0,01$) snížené hodnoty GSH, oproti K 17. I u skupiny TLC 17, byly oproti kontrole K 17, zaznamenány signifikantně ($P < 0,01$) snížené hodnoty GSH, a to v průběhu expozice hned po 7 dnech, ale po 14 dnech byly zaznamenány hodnoty na běžné úrovni kontroly K 17. Po 28 dnech expozice i dále po 14 dnech depurace, byly opět zaznamenány oproti K 17 hodnoty snížené. Ke konci testování, tedy po 28 dnech depurace již nebyly u této skupiny pozorovány statisticky významné ($P < 0,01$) rozdíly proti kontrole K 17. Další statisticky významné ($P < 0,01$) změny hodnot GSH v hepatopankreatu, byly oproti kontrole K 23, zaznamenány také při teplotě 23 °C, ale pouze u skupiny TLC 23, kdy byly zaznamenány zvýšené hodnoty GSH až po 28 dnech expozice a přetrvávaly ještě po 14 dnech depurace, kdy byla zároveň zaznamenána i statisticky * ($P < 0,05$) nejvyšší hodnota u této skupiny v průběhu celého testu. Ke konci testování, tedy po 28 dnech depurace nebyly u této skupiny oproti K 23 zaznamenány žádné statisticky významné ($P < 0,01$) změny.

V tabulce č. 9 jsou zaznamenány i statisticky významné ($P<0,01$) hodnoty GSH v žábrách raků. Rozdílné hodnoty GSH můžeme pozorovat jen nepatrně. Jediná statisticky významná ($P<0,01$) změna nastala již po 7 dnech expozice, kdy bylo u teploty 17 °C zaznamenáno snížení hodnoty GSH u skupiny TEN 17, oproti kontrole K 17. Již po 14 dnech expozice nebyly dále u této skupiny zaznamenány žádné statisticky významné ($P<0,01$) změny.

Tabulka č. 9: Hodnoty redukovaného glutationu (GSH) ve všech tkáních raka mramorovaného během experimentu.

GSH (nmol·mg ⁻¹ protein)								
Tkáň	Fáze experimentu	Den	Testovací skupina					
			K 17 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 17 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 17 (64,6 µg·l ⁻¹)	K 23 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 23 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 23 (64,6 µg·l ⁻¹)
Sval	expozice	7	16,49 ± 3,77 ^{aA}	16,16 ± 3,76 ^{aA}	14,47 ± 4,16 ^{aA}	16,55 ± 2,91 ^{aA}	23,72 ± 7,17^{bB*}	20,41 ± 4,01^{bB}
		14	23,22 ± 3,47 ^{aA*}	19,87 ± 3,09 ^{aA}	11,59 ± 3,16^{bB}	13,71 ± 3,15 ^{aB}	13,09 ± 1,84 ^{aB}	14,09 ± 1,41 ^{aB}
		28	16,10 ± 2,13 ^{aA}	14,46 ± 1,66 ^{aA}	14,21 ± 3,20 ^{aA}	13,72 ± 1,88 ^{aA}	12,70 ± 2,86 ^{aA}	11,34 ± 1,96 ^{aA}
	depurace	14	14,03 ± 4,35 ^{aA}	12,36 ± 0,92 ^{aA}	12,48 ± 1,35 ^{aA}	14,38 ± 1,60 ^{aA}	14,54 ± 1,95 ^{aA}	15,02 ± 0,84 ^{aA}
		28	12,47 ± 1,58 ^{aA}	13,95 ± 1,75 ^{aA}	13,12 ± 2,16 ^{aA}	13,19 ± 2,51 ^{aA}	12,45 ± 3,55 ^{aA}	12,23 ± 1,52 ^{aA}
Heptaopankreas	expozice	7	42,08 ± 8,48 ^{aA}	38,06 ± 12,99 ^{aA}	30,66 ± 8,71^{bB}	43,53 ± 16,45 ^{aA}	41,62 ± 17,31 ^{aA}	38,16 ± 8,81 ^{aA}
		14	50,56 ± 8,85 ^{aA}	49,15 ± 16,39 ^{aA}	44,16 ± 9,21 ^{aA}	54,44 ± 19,42 ^{aA}	43,21 ± 18,45 ^{aA}	44,98 ± 17,92 ^{aA}
		28	54,75 ± 9,16 ^{aA}	46,51 ± 24,43 ^{aA}	31,65 ± 21,08^{bB}	34,79 ± 9,95 ^{bB}	42,22 ± 14,85 ^{abAB}	50,09 ± 15,05^{aB}
	depurace	14	46,32 ± 18,93 ^{aA}	61,08 ± 12,46^{bB*}	35,47 ± 9,08^{bA}	47,05 ± 11,28 ^{aA}	55,76 ± 18,14 ^{abAB*}	64,75 ± 8,07^{bB*}
		28	50,22 ± 9,96 ^{aA}	30,65 ± 13,06^{bB}	42,85 ± 17,64 ^{aAB}	43,69 ± 14,67 ^{abAB}	35,24 ± 17,15 ^{aB}	49,27 ± 21,02 ^{bA}
Žábra	expozice	7	5,04 ± 1,43 ^{aA}	3,62 ± 1,11^{abB}	4,05 ± 0,89 ^{abAB}	4,11 ± 0,58 ^{aAB}	4,52 ± 1,06 ^{aAB}	4,01 ± 1,17 ^{aAB}
		14	5,67 ± 1,08 ^{aA}	4,80 ± 0,71 ^{aA}	3,88 ± 1,46 ^{aA}	4,01 ± 0,92 ^{aA}	4,07 ± 0,92 ^{aA}	4,09 ± 1,73 ^{aA}
		28	4,55 ± 0,53 ^{aA}	4,64 ± 0,70 ^{aA}	2,88 ± 0,71 ^{aA}	3,91 ± 0,44 ^{aA}	4,26 ± 0,58 ^{aA}	2,89 ± 1,91 ^{aA}
	depurace	14	3,76 ± 0,86 ^{aA}	4,43 ± 0,93 ^{aA}	2,59 ± 1,06 ^{aA}	3,66 ± 0,66 ^{aA}	4,14 ± 1,05 ^{aA}	3,96 ± 1,07 ^{aA}
		28	4,46 ± 1,05 ^{aA}	4,94 ± 1,62 ^{aA}	5,70 ± 2,12 ^{aA}	4,11 ± 0,77 ^{aA}	3,61 ± 0,84 ^{aA}	3,78 ± 1,09 ^{aA}

Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P<0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P<0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase.

4.3. Parametr oxidačního stresu

4.3.1. Lipidní peroxidace (LPO)

Naměřené hladiny LPO v jednotlivých tkáních, jsou zobrazeny v tabulce č. 10.

Ve svalech byly statisticky významné ($P < 0,01$) změny LPO pozorovány u raků v nádržích se 17 °C, kdy ve skupině TLC 17 v porovnání s kontrolou K 17 a TEN 17, byla zaznamenána snížená hodnota LPO po 14 dnech expozice. Na konci testu po 28 dnech depurace, nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny ($P < 0,01$) mezi sledovanými skupinami (TEN 17 a TLC 17) ani kontrolou K 17. U teploty 23 °C došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení u obou testovaných koncentrací thiaclopridu po 7 dnech expozice v porovnání s kontrolou K 23. Dále po 14 dnech expozice a po zbytek experimentu nebyly mezi skupinami (TEN 23, TLC 23, K 23) zaznamenány žádné statisticky významné změny ($P < 0,01$).

V hepatopankreatu došlo ke staticky významným ($P < 0,01$) změnám v hladině LPO, u testovaných koncentrací thiaclopridu vystavených obou teplotám. Statisticky významně ($P < 0,01$) zvýšené hladiny LPO, byly při teplotě 17 °C zaznamenány ve skupině TEN 17, kdy oproti kontrole K 17 došlo ke zvýšení po 7 a 14 dnech expozice. Naopak u skupiny TLC 17, došlo ke snížení hladin LPO po 14 a 28 dnech expozice, snížení přetrvávalo i po 14 dnech depurace, ke zvýšení došlo až po 28 dnech depurace, oproti kontrole K 17. U raků při teplotě 23 °C bylo pozorováno statisticky signifikantní ($P < 0,01$) snížení LPO v TEN 23 po celou dobu expozice i depurace v porovnání s kontrolní skupinou K 23. U raků ve skupině TLC 23 způsobila expozice thiaclopridu (14 a 28 dní) snížení LPO a během depurace měla hladinu LPO srovnatelnou s kontrolní skupinou K 23.

V žábkách nebyla zaznamenána žádná statisticky významná změna ($P < 0,01$) LPO, ani mezi jednotlivými skupinami, teplotami či dobou expozice.

Tabulka č. 10: Hodnoty lipidní peroxidace (LPO) ve všech tkáních raka mramorovaného během experimentu.

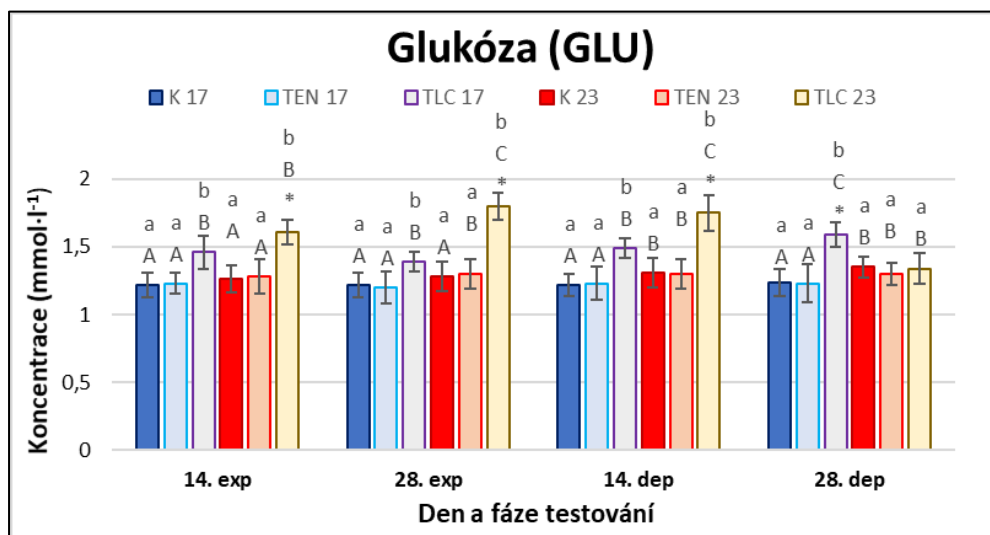
LPO (nmol·mg ⁻¹ protein)								
Tkáň	Fáze experimentu	Den	Testovací skupina					
			K 17 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 17 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 17 (64,6 µg·l ⁻¹)	K 23 (0 µg·l ⁻¹)	TEN 23 (4,5 µg·l ⁻¹)	TLC 23 (64,6 µg·l ⁻¹)
Sval	expozice	7	0,35 ± 0,05 ^{aA}	0,36 ± 0,06 ^{aA}	0,38 ± 0,09 ^{aA}	0,35 ± 0,05 ^{aA}	0,56 ± 0,09^{bB*}	0,48 ± 0,05^{bB*}
		14	0,61 ± 0,04 ^{aB*}	0,57 ± 0,05 ^{aB*}	0,34 ± 0,08^{bA}	0,33 ± 0,03 ^{aA}	0,33 ± 0,03 ^{aA}	0,35 ± 0,02 ^{aA}
		28	0,42 ± 0,05 ^{aA}	0,35 ± 0,02 ^{aAB}	0,42 ± 0,07 ^{aA}	0,35 ± 0,07 ^{aAB}	0,36 ± 0,04 ^{aAB}	0,34 ± 0,03 ^{aB}
	depurace	14	0,42 ± 0,04 ^{aB}	0,36 ± 0,02 ^{aAB}	0,39 ± 0,03 ^{aAB}	0,34 ± 0,02 ^{aA}	0,42 ± 0,03 ^{aAB}	0,34 ± 0,01 ^{aA}
		28	0,39 ± 0,05 ^{aA}	0,37 ± 0,02 ^{aA}	0,37 ± 0,03 ^{aA}	0,34 ± 0,02 ^{aA}	0,38 ± 0,04 ^{aA}	0,33 ± 0,02 ^{aA}
Heptaopankreas	expozice	7	0,28 ± 0,02 ^{aA}	0,44 ± 0,17^{bB}	0,25 ± 0,02 ^{aA}	0,40 ± 0,12 ^{aB}	0,26 ± 0,02^{bA}	0,33 ± 0,07^{abAB}
		14	0,60 ± 0,17 ^{aA*}	0,73 ± 0,16^{bB*}	0,49 ± 0,17^{cC*}	0,63 ± 0,27 ^{aA*}	0,49 ± 0,09^{bC*}	0,44 ± 0,14^{bC}
		28	0,63 ± 0,14 ^{aA*}	0,68 ± 0,05 ^{aA*}	0,34 ± 0,11^{bB}	0,77 ± 0,15 ^{aA*}	0,37 ± 0,07^{bB}	0,41 ± 0,13^{bB}
	depurace	14	0,62 ± 0,10 ^{aA*}	0,74 ± 0,19 ^{aA*}	0,34 ± 0,20^{bB}	0,57 ± 0,19 ^{aA}	0,43 ± 0,14^{aB*}	0,50 ± 0,19 ^{aAB*}
		28	0,54 ± 0,12 ^{aA*}	0,51 ± 0,12 ^{aA*}	0,74 ± 0,13^{bB*}	0,73 ± 0,14 ^{aB*}	0,54 ± 0,12^{bA*}	0,72 ± 0,22 ^{aB*}
Žábra	expozice	7	0,23 ± 0,04 ^{aA}	0,17 ± 0,03 ^{aA}	0,18 ± 0,02 ^{aA}	0,17 ± 0,02 ^{aA}	0,20 ± 0,03 ^{aA}	0,19 ± 0,02 ^{aA}
		14	0,25 ± 0,05 ^{aA}	0,21 ± 0,02 ^{aA}	0,21 ± 0,02 ^{aA}	0,15 ± 0,03 ^{aA}	0,17 ± 0,02 ^{aA}	0,16 ± 0,04 ^{aA}
		28	0,17 ± 0,02 ^{aA}	0,18 ± 0,02 ^{aA}	0,15 ± 0,03 ^{aA}	0,16 ± 0,03 ^{aA}	0,16 ± 0,02 ^{aA}	0,14 ± 0,05 ^{aA}
	depurace	14	0,16 ± 0,01 ^{aA}	0,17 ± 0,02 ^{aA}	0,16 ± 0,03 ^{aA}	0,14 ± 0,01 ^{aA}	0,15 ± 0,02 ^{aA}	0,15 ± 0,04 ^{aA}
		28	0,19 ± 0,03 ^{aA}	0,18 ± 0,03 ^{aA}	0,20 ± 0,02 ^{aA}	0,14 ± 0,02 ^{aA}	0,15 ± 0,04 ^{aA}	0,14 ± 0,03 ^{aA}

Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označují statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase.

4.4. Biochemický profil hemolymfy

4.4.1. Glukóza (GLU)

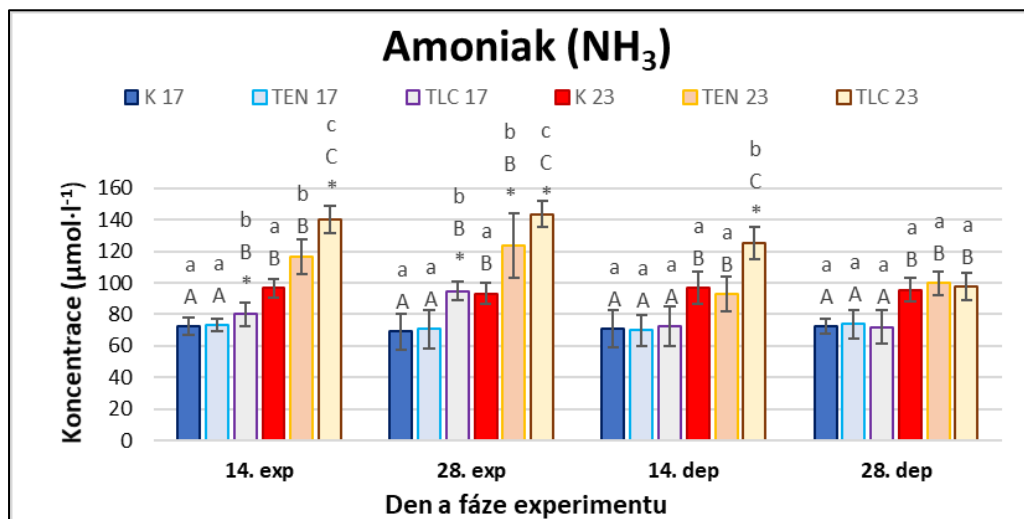
V grafu č. 7 vidíme, že u teploty 17 °C se koncentrace glukózy, oproti kontrole K 17, projevila pouze u skupiny TLC 17, kdy byly zaznamenány statisticky ($P<0,01$) zvýšené hodnoty glukózy po celou dobu expozice i depurace. Z grafu č. 7 je dále patrné, že ke konci testování, tedy po 28 dnech depurace, se koncentrace glukózy u této skupiny oproti předešlým dnům ještě signifikantně ($P<0,05$) zvýšila. U teploty 23 °C, se statisticky významná ($P<0,01$) změna koncentrace glukózy, oproti kontrole K 23, projevila u obou skupin (TEN 23, TLC 23). U skupiny TEN 23 byla oproti kontrole K 23, zaznamenána mírně zvýšená koncentrace glukózy až po 28 dnech expozice, v průběhu depurace již žádné statisticky významné ($P<0,01$) rozdíly zaznamenány nebyly. U druhé skupiny TLC 23 byly signifikantně ($P<0,01$) zvýšené hodnoty glukózy, oproti kontrole K 23, zaznamenány již po 14 dnech expozice a přetrvávaly i po 14 dnech depurace. V tomto období byly zároveň i statisticky nejvyšší ($P<0,05$) naměřené koncentrace v průběhu celého testu. Ke konci depurace, tedy po 28 dnech se koncentrace GLU ustálila na běžné hodnoty K 23.



Graf. č. 7: Hodnoty glukózy (GLU) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P<0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P<0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.2. Amoniak (NH₃)

V grafu č. 8 můžeme vidět, že u teploty 17 °C, se změna koncentrace NH₃ projevila pouze u skupiny TLC 17, kdy byly oproti kontrole K 17, zaznamenány statisticky významně ($P<0,01$) zvýšené hodnoty po celou dobu expozice (po 14 i 28 dnech), v těchto dnech byly zároveň zaznamenány i statisticky nejvyšší ($P<0,05$) hodnoty v průběhu celého experimentu. Již po 14 dnech depurace se koncentrace NH₃ u této skupiny ustálila na běžnou úroveň kontroly K 17. Narozdíl od předchozí teploty, můžeme v grafu č. 8 vidět, že se statisticky významná ($P<0,01$) změna koncentrace NH₃ při teplotě 23 °C, oproti kontrole K 23, projevila u obou testovaných skupin (TLC 23, TEN 23). U skupiny TEN 23 byly oproti K 23 zvýšené hodnoty NH₃ naměřeny po celou dobu expozice (po 14 i 28 dnech). Po 28 dnech expozice bylo u této skupiny zároveň statisticky zaznamenáno ($P<0,05$) zvýšení koncentrace NH₃ v průběhu celého testu. Po 14 dnech depurace již u této skupiny nebyly zaznamenány žádné statisticky významné ($P<0,01$) změny oproti K 23. U druhé skupiny TLC 23 byly signifikantně ($P<0,01$) zvýšené hodnoty NH₃, oproti kontrole K 23, zaznamenány již po 14 dnech expozice a přetrvávaly i po 14 dnech depurace. V tomto období byly zároveň i statisticky nejvyšší ($P<0,05$) naměřené koncentrace v průběhu celého experimentu. Ke konci depurace, tedy po 28 dnech se koncentrace NH₃ ustálila na běžné hodnoty K 23.

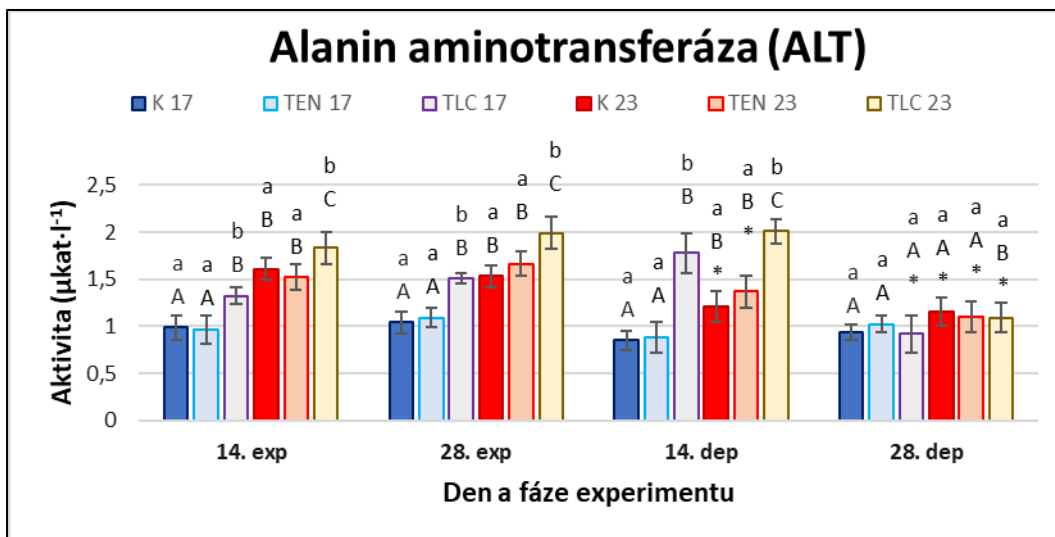


Graf č. 8: Hodnoty amoniaku (NH₃) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P<0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P<0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – 0 µg·l⁻¹; TEN 17, TEN 23 – 4,5 µg·l⁻¹; TLC 17, TLC 23 – 64,6 µg·l⁻¹.

4.4.3. Cytoplazmatické a mitochondriální enzymy

4.4.3.1. Alanin aminotransferáza (ALT)

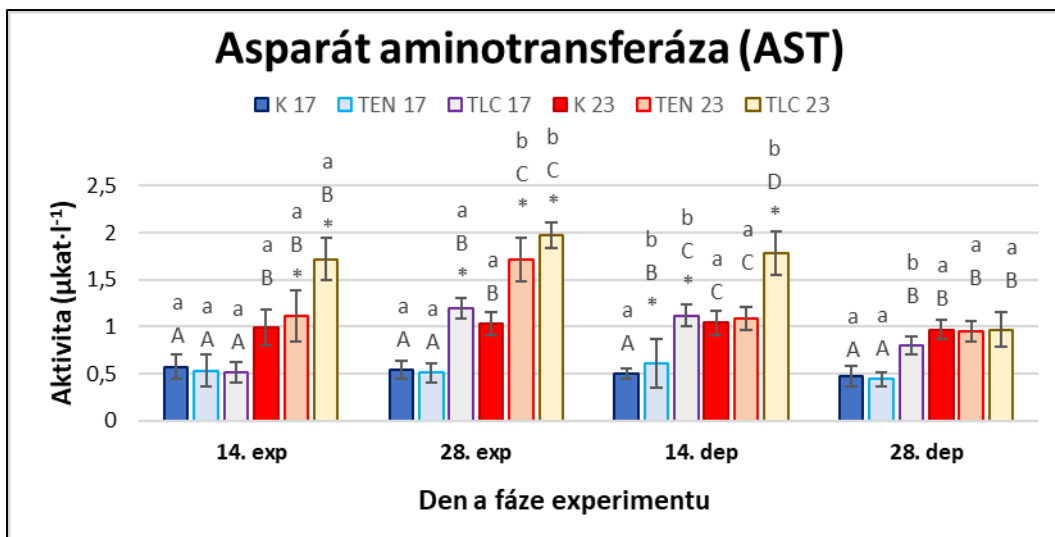
V grafu č. 9, vidíme, že u teploty 17 °C se změna aktivity ALT, oproti kontrole K 17, projevila pouze u skupiny TLC 17, kdy byly po 14 i 28 dnech expozice a ještě i po 14 dnech depurace statisticky zaznamenány ($P<0,01$) vyšší hodnoty v aktivitě. Ke konci testu, tedy po 28 dnech depurace se však hodnoty v aktivitě ALT ustálily na běžnou úroveň kontroly K 17. Statisticky významná ($P<0,01$) změna aktivity ALT oproti K 23, se projevila i u teploty 23 °C, ale pouze ve skupině TLC 23, kdy byla zvýšená aktivita ALT zaznamenána po celou dobu expozice (po 14 i 28 dnech) a přetrvávala i po 14 dnech depurace. Poslední den depurace (po 28 dnech) byla zaznamenána naopak nižší aktivita ALT, jak oproti kontrole K 23 ($P<0,01$), tak i v průběhu celého experimentu u TLC 23 ($P<0,05$).



Graf č. 9: Hodnoty aktivity alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P<0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P<0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.3.2. Asparát aminotransferáza (AST)

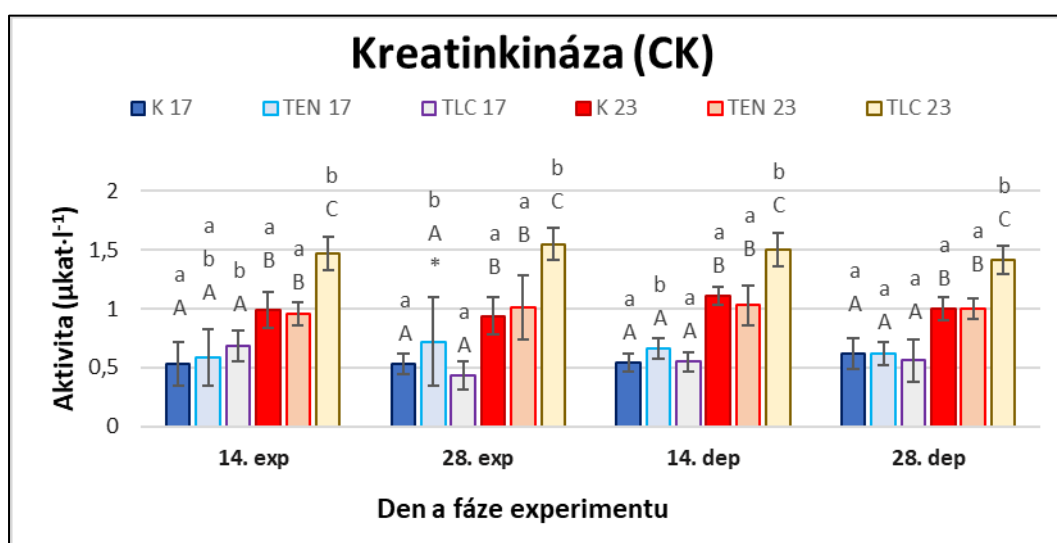
Statisticky významná ($P < 0,01$) změna v aktivitě AST při teplotě 17 °C, se oproti kontrole K 17 projevila u obou skupin (TEN 17, TLC 17). Z grafu č. 10 je patrné, že u skupiny TEN 17 byla zvýšená aktivita AST, oproti kontrole K 17, zaznamenána až po 28 dnech depurace, což byla u této skupiny i signifikantně ($P < 0,05$) nejvyšší aktivita v průběhu celého experimentu. U skupiny TLC 17 byla zvýšená aktivita AST oproti K 17 zaznamenána až po 28 dnech expozice, ale přetrvávala i po 14 dnech depurace. V tomto období byla u této skupiny zaznamenána i signifikantně ($P < 0,05$) nejvyšší aktivita AST v průběhu celého experimentu. Ke konci testu však aktivita AST u této skupiny byla oproti K 17 stále signifikantně ($P < 0,01$) zvýšená. Také u teploty 23 °C se statisticky významně ($P < 0,01$) změnila aktivita AST oproti kontrole K 23, kdy se projevila u obou skupin (TLC 23, TEN 23). U skupiny TEN 23 oproti K 23, byla zvýšená aktivita AST až po 28 dnech expozice, ale již po 14 dnech depurace se aktivita AST vrátila na běžnou úroveň K 23. U skupiny TLC 23, oproti K 23, byla signifikantně ($P < 0,01$) zvýšená aktivita AST zaznamenána až po 28 dnech expozice a přetrvávala i po 14 dnech depurace. V tomto období u této skupiny byla zároveň zaznamenána i signifikantně nejvyšší ($P < 0,05$) aktivita AST v průběhu celého testu. Ke konci experimentu po 28 dnech depurace se aktivita AST ustálila na běžnou úroveň K 23.



Graf č. 10: Hodnoty aktivity asparát aminotransferázy (AST) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.3.3. Kreatinkináza (CK)

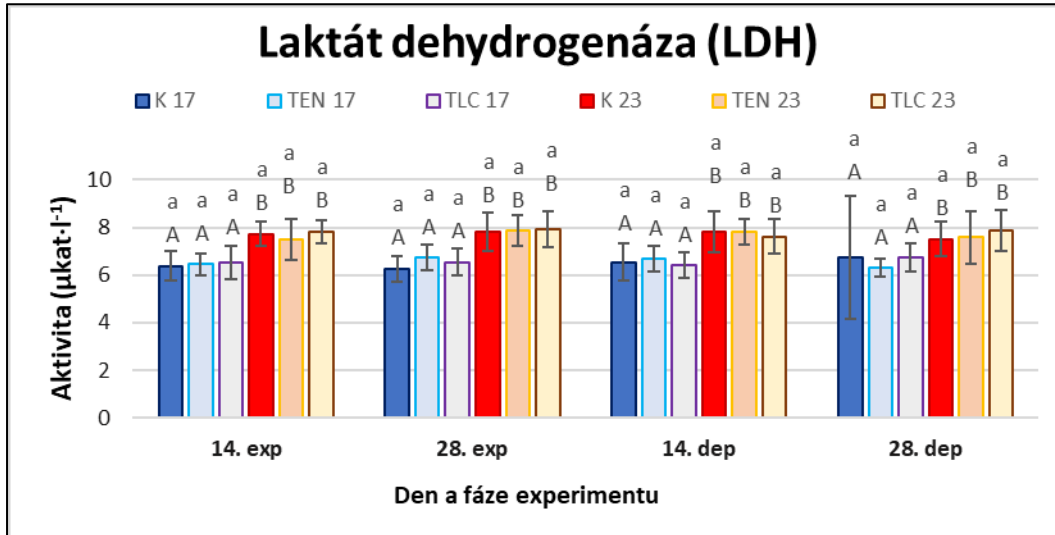
V grafu č. 11 vidíme, že u teploty 17 °C, byly oproti kontrole K 17, zaznamenány statisticky významné ($P < 0,01$) změny aktivity CK u obou skupin (TEN 17, TLC 17). U skupiny TEN 17, oproti kontrole K 17, byla zvýšená aktivita CK zaznamenána po 28 dnech expozice a po 14 dnech depurace stále přetrvávala. Signifikantně nejvyšší ($P < 0,05$) změna aktivity CK u této skupiny v průběhu celého experimentu nastala po 28 dnech expozice. Ke konci testu, tedy po 28 dnech depurace se aktivita CK opět vrátila na běžné hodnoty K 17. U skupiny TLC 17, oproti K 17, byla zvýšená aktivita CK zaznamenána již po 14 dnech expozice, ale po 28 dnech expozice se aktivita CK vrátila na hodnoty u kontrolní skupiny K 17. U teploty 23 °C se statisticky významná ($P < 0,01$) změna aktivity CK oproti kontrole K 23 projevila pouze u skupiny TLC 23. Zvýšené hodnoty aktivity CK, oproti K 23, byly zaznamenány po celou dobu expozice (po 14 i 28 dnech) a přetrvávaly i po celou dobu depurace (po 14 i 28 dnech). Poslední den depurace u této skupiny byla však zaznamenána statisticky významně ($P < 0,05$) nižší aktivita během celého experimentu, nicméně pořád statisticky převyšovala ($P < 0,01$) hodnoty kontroly K 23.



Graf č. 11: Hodnoty aktivity kreatinkinázy (CK) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopidu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.3.4. Laktát dehydrogenáza (LDH)

V grafu č. 12 můžeme dobře vidět, že u aktivity LDH nebyly mezi skupinami v rámci jednotlivých teplot zaznamenány žádné statisticky významné ($P < 0,01$) rozdíly. Jediný statisticky významný ($P < 0,01$) rozdíl je patrný při teplotě 23 °C, kdy byly u všech skupin, oproti teplotě 17 °C zaznamenány, vyšší aktivity LDH.



Graf č. 12: Hodnoty aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase. exp – expozice thiaclopridu; dep – depurace v čisté vodě; K 17, K 23 – $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TEN 17, TEN 23 – $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; TLC 17, TLC 23 – $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.4. Minerály

4.4.4.1. Vápník a hořčík (Ca²⁺ a Mg²⁺)

V tabulce č. 11 můžeme dobře vidět, že u změřených koncentrací Ca²⁺ a Mg²⁺ nebyly mezi skupinami v rámci jednotlivých teplot, zaznamenány žádné statisticky významné ($P < 0,01$) rozdíly. Jediný statisticky významný ($P < 0,01$) rozdíl je patrný při teplotě 23 °C, kdy byly u všech skupin oproti teplotě 17 °C, zaznamenány vyšší koncentrace Ca²⁺ a Mg²⁺.

Tabulka č. 11: Hodnoty minerálů v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu.

	Den	Fáze experimentu	MINERÁLY					
			Testovací skupina					
			K 17	TEN 17	TLC 17	K 23	TEN 23	TLC 23
Ca ²⁺ (mmol·l ⁻¹)	14.	expozice	3,33 ± 0,29 ^{aA}	3,37 ± 0,12 ^{aA}	3,38 ± 0,26 ^{aA*}	3,52 ± 0,22 ^{aB*}	3,50 ± 0,13 ^{aB*}	3,49 ± 0,21 ^{aB*}
	28.	expozice	3,39 ± 0,22 ^{aA}	3,36 ± 0,17 ^{aA}	3,40 ± 0,19 ^{aA *}	3,39 ± 0,17 ^{aA}	3,44 ± 0,21 ^{aA}	3,49 ± 0,27 ^{aA *}
	14.	depurace	3,23 ± 0,16 ^{aA}	3,26 ± 0,18 ^{aAB}	3,29 ± 0,10 ^{aAB}	3,39 ± 0,18 ^{aB}	3,40 ± 0,14 ^{aB}	3,42 ± 0,18 ^{aB}
	28.	depurace	3,20 ± 0,16 ^{aA}	3,28 ± 0,21 ^{aA}	3,27 ± 0,20 ^{aA}	3,35 ± 0,11 ^{aA}	3,25 ± 0,17 ^{aA}	3,28 ± 0,14 ^{aA}
Mg ²⁺ (mmol·l ⁻¹)	14.	expozice	1,17 ± 0,10 ^{aA}	1,14 ± 0,12 ^{aA}	1,18 ± 0,18 ^{aA}	1,25 ± 0,04 ^{aB}	1,26 ± 0,06 ^{aB}	1,27 ± 0,11 ^{aB}
	28.	expozice	1,11 ± 0,12 ^{aA}	1,16 ± 0,09 ^{aA}	1,13 ± 0,11 ^{aA}	1,22 ± 0,08 ^{aB}	1,24 ± 0,07 ^{aB}	1,25 ± 0,08 ^{aB}
	14.	depurace	1,13 ± 0,13 ^{aA}	1,15 ± 0,10 ^{aA}	1,11 ± 0,23 ^{aA}	1,28 ± 0,13 ^{aB}	1,24 ± 0,07 ^{aB}	1,27 ± 0,09 ^{aB}
	28.	depurace	1,13 ± 0,14 ^{aA}	1,17 ± 0,07 ^{aA}	1,14 ± 0,07 ^{aA}	1,29 ± 0,05 ^{aB}	1,27 ± 0,05 ^{aB}	1,25 ± 0,09 ^{aB}

Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku. *Označuje statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v čase; K 17, K 23 – 0 μg·l⁻¹; TEN 17, TEN 23 – 4,5 μg·l⁻¹; TLC 17, TLC 23 – 64,6 μg·l⁻¹.

4.4.5. Proteiny krevní plazmy

4.4.5.1. Albumin (ALB), globulin (GLOB) a celkové proteiny (TP)

Z tabulky č. 12 vyplývá, že u naměřených koncentrací ALB a GLOB nebyly zaznamenány žádné statisticky významné ($P < 0,01$) rozdíly.

Tabulka č. 12 dále ukazuje, že obecně při vyšší teplotě, byla naměřena u všech skupin (K 23, TEN 23, TLC 23) i vyšší koncentrace TP, oproti skupinám vystaveným nižším teplotním podmínkám (K 17, TEN 17, TLC 17). Mezi skupinami však v rámci jednotlivých teplot nebyly zaznamenány statisticky významné ($P < 0,01$) změny.

Tabulka č. 12: Hodnoty proteinů v hemolymfě raka mramorovaného během experimentu.

	Den	Fáze experimentu	PROTEINY PLAZMY					
			Testovací skupina					
			K 17	TEN 17	TLC 17	K 23	TEN 23	TLC 23
TP (g·l ⁻¹)	14.	expoze	20,67 ± 1,60 ^{aA}	21,33 ± 1,97 ^{aA}	21,17 ± 2,27 ^{aA}	22,33 ± 1,25 ^{aB}	22,83 ± 1,07 ^{aB}	22,67 ± 1,11 ^{aB}
	28.	expoze	20,67 ± 1,49 ^{aA}	20,50 ± 1,50 ^{aA}	20,00 ± 1,53 ^{aA}	21,83 ± 1,07 ^{aB}	22,17 ± 1,07 ^{aB}	21,67 ± 1,70 ^{aB}
	14.	depurace	20,83 ± 1,34 ^{aA}	21,17 ± 1,57 ^{aA}	21,00 ± 1,53 ^{aA}	22,67 ± 1,37 ^{aB}	22,50 ± 0,96 ^{aB}	21,83 ± 1,86 ^{aB}
	28.	depurace	20,67 ± 1,80 ^{aA}	20,83 ± 1,07 ^{aA}	21,00 ± 1,15 ^{aA}	23,00 ± 0,82 ^{aB}	22,83 ± 1,07 ^{aB}	22,50 ± 1,26 ^{aB}
ALB (g·l ⁻¹)	14.	expoze	2,83 ± 0,69 ^{aA}	2,67 ± 0,94 ^{aA}	2,50 ± 0,96 ^{aA}	3,00 ± 0,58 ^{aA}	3,17 ± 0,69 ^{aA}	3,00 ± 0,82 ^{aA}
	28.	expoze	2,33 ± 0,75 ^{aA}	2,17 ± 0,69 ^{aA}	2,00 ± 0,58 ^{aA}	3,17 ± 0,69 ^{aA}	2,67 ± 0,94 ^{aA}	2,83 ± 1,07 ^{aA}
	14.	depurace	2,50 ± 0,96 ^{aA}	2,33 ± 0,75 ^{aA}	2,17 ± 1,07 ^{aA}	3,17 ± 0,69 ^{aA}	3,00 ± 0,82 ^{aA}	2,83 ± 0,37 ^{aA}
	28.	depurace	2,17 ± 0,69 ^{aA}	2,33 ± 0,75 ^{aA}	2,17 ± 0,69 ^{aA}	3,17 ± 0,69 ^{aA}	3,00 ± 0,82 ^{aA}	2,83 ± 0,69 ^{aA}
GLOB (g·l ⁻¹)	14.	expoze	17,83 ± 1,34 ^{aA}	19,00 ± 1,00 ^{aA}	18,33 ± 1,70 ^{aA}	19,83 ± 0,37 ^{aA}	19,67 ± 0,94 ^{aA}	19,67 ± 0,94 ^{aA}
	28.	expoze	18,33 ± 1,60 ^{aA}	18,17 ± 1,57 ^{aA}	18,00 ± 1,29 ^{aA}	18,67 ± 0,75 ^{aA}	19,50 ± 1,50 ^{aA}	18,83 ± 1,07 ^{aA}
	14.	depurace	18,33 ± 1,89 ^{aA}	18,17 ± 1,95 ^{aA}	18,83 ± 2,54 ^{aA}	19,50 ± 1,12 ^{aA}	19,50 ± 0,50 ^{aA}	19,00 ± 2,00 ^{aA}
	28.	depurace	18,83 ± 1,86 ^{aA}	18,17 ± 1,57 ^{aA}	19,50 ± 1,80 ^{aA}	19,83 ± 0,69 ^{aA}	19,67 ± 0,47 ^{aA}	19,50 ± 0,76 ^{aA}

Hodnoty uvádějí průměr ± SD, N=6. Malá a velká písmena představují statistické rozdíly ($P < 0,01$) mezi skupinou v jedné teplotní zóně a mezi oběma teplotními zónami ve stejném čase vzorku; K 17, K 23 – 0 μg·l⁻¹; TEN 17, TEN 23 – 4,5 μg·l⁻¹; TLC 17, TLC 23 – 64,6 μg·l⁻¹.

5. Diskuse

Pro správné vyhodnocení vlivu toxické látky na organismus je důležité zaměřit se i na ostatní faktory, které mohou toxicitu látky a její působení velice ovlivňovat. Náhlé, ale i dlouhodobé působení abiotických faktorů, může mít negativní vliv na fyziologické i biochemické pochody všech organismů a tím změnit jejich citlivost ke znečišťujícím látkám v životním prostředí (Morris a Oliver, 1999). Velice významným abiotickým faktorem, který přímo ovlivňuje život všech vodních organismů, zejména těch poikilotermních, je teplota vody. Fyziologický stav těchto živočichů, je závislý na teplotě prostředí, proto je vhodné při zkoumání chronické toxicity látek zohlednit i vliv dalších faktorů prostředí (Manciocco a kol., 2014; Jacquin a kol., 2019).

O vliv teploty na biochemické i fyziologické parametry vodních živočichů se ve svých publikacích zajímá několik autorů (López-Olmeda a Sánchez-Vázquez, 2011; Long a kol., 2012; Zhang a kol., 2017). Většina autorů se zabývá pouze vlivem samotné teploty, zejména akutním vlivem rychle rostoucí teploty na biochemické či fyziologické parametry ryb (Cheng a kol., 2018; Yang a kol., 2018) nebo raků (Malev a kol., 2010; Bone a kol., 2017). Autorů, kteří ve svých pracích zkoumají synergické účinky toxických látek s teplotou vody, je podstatně méně. Jacquin a kol. (2019) ve své práci uvádí, že teplotní i chemické vlivy v prostředí spolu úzce souvisí. Vysoké teploty zvyšují metabolismus ryb a zároveň usnadňují vstřebávání toxických látek do organismu. Kombinace několika stresových faktorů (vysoká teplota, nedostatek kyslíků, působení toxických látek) má negativní vliv na schopnost organismu vytvářet dostatečné množství obranných mechanismů (Mehta, 2017).

5.1. Chování a mortalita

Během našeho experimentu bylo všeobecně zjištěno, že při teplotě vody 17 °C, vykazovali raci ve všech skupinách nižší fyziologickou aktivitu, oproti rakům v nádržích s teplotou vody 23 °C, kde byli raci ve všech skupinách aktivnější. Chronické působení thiaclopridu v koncentracích 4,5 a 64,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ při různých teplotách (17 a 23 °C) dále nemělo během experimentu žádný zásadní vliv na změny chování či mortalitu raka mramorovaného. Většina laboratorních studií popisuje pouze účinky různých dávek testované látky na organismy, ale nehodnotí už další vlivy prostředí jako je v našem případě teplota. Většina laboratorních studií je prováděna při konstantní teplotě kolem 20 °C, jak popisují i následující studie. Velíšek a Stará (2018) ve své práci zkoumali vliv několika koncentrací thiaclopridu (4,5, 225 a 450 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 35 dní na embrya a plůdek kapra obecného (*Cyprinus carpio*) při průměrné teplotě vody 22 °C. Podobně i Koutník a kol. (2014), kteří zkoumali chronický vliv metribuzinu v koncentracích 0,52 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 3,06 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 30 dní při průměrné teplotě vody 20 °C na raka mramorovaného. V těchto pracích (Koutník a kol., 2014; Velíšek a Stará, 2018) nebyly zjištěny žádné rozdíly v chování a mortalitě raků během experimentů. Změny v chování u různých druhů raků zaznamenala ve své práci Strouhová (2018), která sledovala akutní toxicitu pesticidního přípravku Calypso (obsah thiaclopridu 480 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) při průměrné teplotě 20 °C. Při koncentracích Calypsa pod 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u raků nezaznamenala žádné významné změny v chování. Změny chování, jako převrácení raků na záda, nekoordinované pohyby a zpomalené dýchání a následnou mortalitu, zaznamenala až při vyšších koncentracích od 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Studie, která se zabývá toxickou dávkou pesticidů při různých teplotách, je práce Jacquina a kol. (2019), kteří se zabývali vlivem dvou koncentrací (8,4 a 42,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) směsi 6 herbicidů (S-metolachlor, isoproturon, linuron, atrazine-desethyl, aclonifen and pendimethalin) při teplotách 22 a 32 °C v průběhu 96 hodin na karase zlatého (*Carrasius auratus*). Jejich výsledky ukázaly, že vyšší teplota sama o sobě způsobila změny v chování ryb, kdy byla pozorována zvýšená aktivita plavání a příjem krmiva, a zvýšila i negativní účinek pesticidů.

5.2. Antioxidační parametry a lipidní peroxidace

Změny aktivity antioxidačních enzymů (SOD, CAT) i neenzymatického antioxidantu (GSH) byly zaznamenány ve všech tkáních (svalu, hepatopankreatu i žaber) u obou zkoumaných koncentrací ($4,5$ a $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a sledovaných teplot (17 a $23 \text{ }^\circ\text{C}$) v průběhu experimentu. Jedinou výjimku tvoří GST, jehož změna aktivity byla zaznamenána jen v tkáních svalů a hepatopankreatu, také u obou koncentrací v obou sledovaných teplotách. Většina autorů ve své práci sleduje pouze vliv různých koncentrací, ale nehodnotí i další abiotické faktory, jako je v našem případě teplota vody. Jak již bylo zmíněno, většina laboratorních studií je prováděna při konstantní teplotě kolem $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Změny aktivit antioxidantů u raných vývojových stádiích kapra obecného vystaveného thiaclopridu, při průměrné teplotě vody $22 \text{ }^\circ\text{C}$, ve své práci popisují Velíšek a Stará (2018), kteří zaznamenali u všech zkoumaných koncentrací ($4,5$ - $450 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) sníženou aktivitu SOD a GR, naopak u CAT, GST a GSH změny oproti kontrolní skupině nenastaly. Výrazné změny GST u zástupce korýšů – krevetě baltické (*Palaemon adspersus*) také zaznamenali ve své práci i Berghiche a kol. (2017), kteří zkoumali akutní vliv (96 h) neonikotinoidového insekticidu Actara (25% thiamethoxam) v koncentraci $0,30$ a $0,65 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V tkáních raka červeného (*Procambarus clarkii*) byly v práci Staré a kol. (2014), také zaznamenány změny v aktivitě SOD, CAT a GR, v průběhu chronické expozice prometrynu u všech zkoumaných koncentrací ($0,510 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,144$ a $1,144 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) při průměrné teplotě vody $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Změny aktivity biochemických parametrů sledovali ve své práci i Cheghib a kol. (2020), kteří zkoumali chronický vliv třech různých koncentrací (10 , 20 a $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) neonikotinoidového insekticidu Actara (25% thiamethoxam) při průměrné teplotě vody $16 \text{ }^\circ\text{C}$, v průběhu 28 dní v játrech ryb se závěrem, že aktivita GST byla závislá na době působení a výši koncentrace. Yang a kol. (2020) ve své práci shromáždili zjištěné skutečnosti o vlivu pyrethroidů na necílové vodní živočichy, konkrétně ryby. I z jejich práce vyplývá, že chronický vliv běžně se vyskytujících environmentálních koncentrací pyrethroidů (deltametrin $0,04$ - $24 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, cypermethrin $<1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a lambda-cyhalothrin $0,346$ - $0,983 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) v povrchových vodách, má silný vliv na biochemické parametry (SOD, CAT, GST, GSH, LPO) vodních organismů.

Během našeho měření byly zaznamenány jak zvýšené, tak snížené hodnoty jednotlivých antioxidantů. Jejich kolísání bylo závislé také na době působení a dávce

toxické látky (thiaclopridu), kdy se v průběhu expozice raci nejspíše přizpůsobovali působení thiaclopridu a také v průběhu depurace, kdy se s největší pravděpodobností organismus vyrovnával s velkým množstvím zbývajících volných radikálů způsobených předešlou expozicí thiaclopridu. Chronický vliv různých koncentrací imidaclopridu (0,3, 1,25 a 5 mg·l⁻¹) na biochemické ukazatele (ROS, SOD, CAT a GST) ryb během 28 dní, ve své práci zkoumali i Ge a kol. (2015), kdy zjistily zvýšené i snížené hodnoty parametrů v závislosti na době expozice.

Dalším faktorem, který měl zásadní vliv na antioxidační parametry v průběhu našeho měření byla i teplota vody. Při nižší teplotě (17 °C) byly častější změny zaznamenány u CAT a GSH. Naopak při vyšší teplotě (23 °C) se častější změny vyskytovaly u enzymu SOD. U GST však teplota vody na její aktivitu neměla výrazný vliv, počet změn byl v obou teplotách přibližně stejný. V našem měření jsme dále prokázali, že teplota vody neměla vliv pouze na antioxidační parametry samotné, ale ovlivnila i aktivitu jednotlivých antioxidačních parametrů v souvislosti s toxicitou zkoumané látky thiaclopridu. U všech antioxidantů, byly v několika případech naměřeny rozdílné hodnoty mezi teplotami u skupin vystavených stejným koncentracím thiaclopridu, i přesto, že jejich kontrolní skupiny mezi teplotami nevykazovaly žádné rozdíly. K podobným výsledkům došli i Jacquin a kol. (2019), kteří zjistili, že samotná teplota vody na buněčnou úroveň organismu vliv neměla, ale naopak při vyšší teplotě (32 °C) se prokázaly mnohem větší škodlivé účinky směsi pesticidů než při nižší teplotě (22 °C). Kombinované vlivy teploty a pesticidů ve své práci zjistil i Mehta (2017), kdy potvrdil, že toxicita škodlivých látek v prostředí je značně ovlivněna změnou klimatických podmínek a může mít neblahé účinky na samotné vodní organismy. Jejich schopnost tolerovat vysoké teplotní podmínky je tedy přímo snížena chronickou expozicí škodlivých látek. Parithabhanu a Deepak (2014) ve své práci také potvrzují, že toxicitu pesticidů významně ovlivňuje kromě teploty i pH vody tím, že mění fyziologické reakce vodních organismů, což může výrazně snižovat jejich toleranci ke škodlivým látkám. Dopad teplotního stresu ve své práci potvrzují i Malev a kol. (2010), kdy zkoumali vliv zvýšené teploty vody (25 a 30 °C) na raka bahenního (*Astacus leptodactylus*) se závěrem, že způsobený stres vyvolaný zvýšenou teplotou vody vedl k významnému poškození DNA.

Z našich výsledků dále vyplývá, že zkoumaná látka thiaclopridu v obou koncentracích (4,5 i 64,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) při teplotě 23 °C vedla k LPO u raka mramorovaného, zejména v tkáních svalů, hned po 7 dnech expozice, avšak po zbytek experimentu se hodnoty LPO ustálily na běžnou úroveň kontroly K 23. Zvýšené hodnoty LPO byly také zaznamenány v tkáních hepatopankreatu, ale naopak u teploty 17 °C, také v obou koncentracích thiaclopridu. Je však zajímavé, že u skupiny TEN 17, byly zvýšené hladiny LPO zaznamenány již po 7 a 14 dnech expozice, a naopak u skupiny TLC 17, oproti skupině TEN 17 i K 17, byly po celou dobu experimentu hodnoty LPO sníženy, kdy na jeho konci po 28 dnech depurace bylo zaznamenáno u této skupiny výrazné zvýšení. Naopak v tkáních žaber se lipidní peroxidace nepotvrdila. V našem případě, měla na LPO vliv, jak koncentrace zkoumané látky, tak teplota vody i doba působení, kdy antioxidanty v různých tkáních a při různých teplotách a koncentracích thiaclopridu, reagovaly rozdílně. Tato skutečnost se odrazila i od výsledných hodnot LPO, které byly po dobu experimentu zjištěny jak sníženy, tak zvýšené, a především na začátku nebo na konci experimentu. K podobným výsledkům došli ve své práci i Cazenave a kol. (2006), kteří v jednotlivých tkáních ryb, po akutní expozici mycrocistinu-RR při průměrné teplotě 21 °C, došli k odlišným výsledkům LPO, kdy v tkáních jater a žaber, proti kontrole zaznamenali jejich snížení, v tkáních mozku jejich zvýšení, ale ve střevech rozdílné hodnoty LPO nezaznamenali. Cazenave a kol. (2006) dále vysvětlují, že různorodost reakcí v jednotlivých orgánech, může být způsobena jejich odlišným příjmem, biotransformací nebo bioakumulací škodlivých látek. Poškození tkání ve své práci popisují i Shukla a kol. (2017), kdy v tkáních ledvin a jater zaznamenali zvýšené hodnoty LPO, po 24hodinové expozici imidaclopridu (27,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i dichlorvosu (15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) při 25 °C. Naopak Velíšek a Stará (2018) a Hlávková (2018), v průběhu jejich experimentu, LPO způsobenou vlivem toxické látky nepotvrdili, i přesto, že změnu antioxidačních parametrů zaznamenali.

V průběhu celého experimentu byly u sledovaných biomarkerů zaznamenány změny i v kontrolních skupinách. Tato skutečnost jen potvrzuje to, že bilance antioxidačního systému a udržování rovnovážného stavu ROS je pro organismus velice energetický náročný proces, na kterém se podílí celá řada enzymů a látek. Ty mohou být ovlivněny nejen toxicitou dané látky, dobou působení nebo teplotou vody, jako v této studii,

ale i jinými vlivy, jako jsou např. samotná manipulace (Bergmann a kol., 2001), hustota obsádky, predace, potravní rivalita, roční období apod. (Chainy a kol., 2016).

5.3. Biochemický profil hemolymfy

Vliv koncentrace thiaclopridu ($4,5$ i $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), teploty a doby působení měl v průběhu našeho experimentu vliv i na významné látky a enzymy v hemolymfě raků, kdy se projevil u ukazatelů GLU, NH_3 a enzymů AST, ALT, CK. Další sledované parametry (LDH, TP, Ca^{2+} , Mg^{2+}) byly ovlivněny především teplotou vody, kdy u raků v teplejší vodě ($23 \text{ }^\circ\text{C}$) byly zvýšené hodnoty těchto ukazatelů oproti rakům v chladnější vodě ($17 \text{ }^\circ\text{C}$). V jediných dvou parametrech (ALB a GLOB) nebyly zaznamenány žádné rozdíly.

Výrazné změny v hodnotách ALB a GLOB v hemolymfě, ve své práci nezaznamenali ani Stará a kol. (2016), kteří zkoumali subchronické působení (14 dní expozice a 14 dní depurace) terbutylazinu a jeho degradačního produktu v koncentracích $2,9$ a $580 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ na biochemické parametry raka červeného (*Procambarus clarkii*) při průměrné teplotě vody $19,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Stará a kol. (2019), kteří zkoumali chronický vliv (28 dní expozice, 28 dní depurace) s-metalachloru a jeho degradačního produktu (metalachlor-OA) v koncentracích $4,2$ a $42 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ na biochemické parametry raka mramorovaného při průměrné teplotě vody $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$, také nezaznamenali změny LDH, TP, Ca^{2+} , Mg^{2+} . Významné změny Ca^{2+} a Mg^{2+} v hemolymfě raků nezaznamenal ve své práci ani Benli (2015), který zkoumal subchronický vliv dvou koncentrací etofenproxu ($0,04$ a $0,10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), při průměrné teplotě vody $20 \text{ }^\circ\text{C}$, na biochemické parametry raka bahenního.

U LDH, TP, Ca^{2+} , Mg^{2+} byly v naší práci zaznamenány pouze změny mezi jednotlivými teplotami. Vliv samotné teploty byl dále také potvrzen u GLU, NH_3 , AST, ALT a CK, kdy všeobecně při vyšší teplotě byly pozorovány zvýšené hodnoty těchto parametrů. V našem měření se dále potvrdilo, že jisté enzymy a látky v hemolymfě raků, můžou kolísat se vzájemnou souvislostí teploty prostředí a toxicity škodlivých látek. Tato skutečnost byla sledována u hladin GLU a NH_3 , kdy se nižší koncentrace thiaclopridu ($4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) projevila pouze u skupin TEN 23, avšak u skupin TEN 17 žádné změny sledovány nebyly. Podobná situace nastala i u enzymu CK, jehož zvýšená aktivita byla

zaznamenána u skupiny TEN 17, kdy se naopak u skupiny TEN 23 nepotvrdila. Naopak vystavení raků vyšší koncentraci thiaclopridu ($64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) mělo vliv na zvýšení GLU, NH_3 , AST, ALT i CK, a to u obou teplotních skupin (TLC 23, TLC 17). Dlouhodobými účinky dvou či více různých koncentrací pesticidů na biochemické parametry raků ve svých pracích zkoumá několik autorů Banaee a Ahmadi (2011), Benli (2015), Stará a kol. (2016, 2019). Stará a kol. (2019) ve své práci došli k závěru, kdy u nižší ($2,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace degradačního produktu s-metalachloru při průměrné teplotě vody $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ zaznamenali zvýšení ALT, AST, NH_3 a u vyšší koncentrace ($580 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) této látky se projevilo navíc i zvýšení hladin GLU. Banaee a Ahmadi (2011) ve své práci došli k závěru, že toxicita endosulfanu na biochemické parametry (např. LDH) raka bahenního při průměrné teplotě vody $17 \text{ }^\circ\text{C}$, stoupá se zvyšující se koncentrací i dobou působení. Stará a kol. (2016) ve své práci uvádějí, že vliv degradačního produktu pesticidu terbutylazinu při průměrné teplotě vody $19,1 \text{ }^\circ\text{C}$ má významný vliv na CK i Ca^{2+} v hemolymfě raků již v takových koncentracích, které se běžně vyskytují v povrchových vodách ($2,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Samotným vlivem teploty na biochemické parametry krve ryb nebo hemolymfy vodních korýšů se zajímá velké množství autorů a je dobře popsána i u zástupců korýšů (Durand a kol., 2000; Malev a kol., 2010; Liu a kol., 2010; Wang a kol., 2019; Quily a kol., 2020). Teplotní stres má prokazatelný vliv na řadu biochemických parametrů, mění hladiny různých látek v hemolymfě/krvi vodních živočichů a může nepříznivě ovlivnit jejich metabolismus i imunitní systém (Cheng a kol., 2018). Malev a kol. (2010) ve své práci potvrdili, že zejména teplota vody, ale i řada jiných stresorů (nedostatek kyslíku nebo potravy) má významný vliv na kolísání biochemických parametrů, jako je např. koncentrace GLU v hemolymfě raků. Zvýšené hodnoty AST, ALT, LDH a GLU byly zaznamenány v práci Chenga a kol. (2018), kteří zkoumali vliv postupně se zvyšující teploty ($25 - 37 \text{ }^\circ\text{C}$) na biochemické parametry krve ryb. Zvýšení hodnot AST, ALT a TP, po vystavení krevetky rosenbergovi (*Macrobrachium rosenbergii*) vyšším teplotním podmínkám ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) ve své práci zaznamenali i Liu a kol. (2010). Durand a kol. (2000) ve své práci uvádí, že při průměrných letních teplotách vody ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) stoupá obsah amoniaku v hemolymfě kraba pavoučího (*Maja squinado*), oproti hodnotám při průměrné teplotě vody $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

V průběhu našeho měření bylo dále zjištěno, že u skupin vystavených nižší koncentraci thiaclopridu ($4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) se u GLU a NH_3 projevilo zvýšení zejména po 14

i 28 dnech expozice, ale již po 14 dnech depurace nebyli raci touto látkou dále ovlivněni. Naopak u enzymů CK a AST se zvýšení aktivity začalo projevovat zejména až po 28 dnech expozice, kdy ještě po 14 dnech depurace byly hodnoty stále zvýšené, ale 28denní depurační doba stačila k vyrovnání hodnot na úroveň kontroly. Naopak u vyšší koncentrace thiaclopridu ($64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo zjištěno, že 28denní depurační doba nebyla dostatečná, jelikož raci na konci testování stále vykazovali zvýšené hodnoty CK, ALT, AST i GLU. Z této skutečnosti vyplývá, že depurační doba 28 dní stačí pro vyrovnání biochemických parametrů v hemolymfě raků u nižší koncentrace thiaclopridu ($4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), ale při vystavení raků vyšší koncentraci jejich metabolismus vyžaduje více času než 28 dní depurace na jejich úplné zotavení. Z našich výsledků je patrné, že doba působení toxické látky ovlivňuje biochemické parametry vodních živočichů, což ve své práci potvrzují i Banaee a Ahmadi (2011) i Banaee a kol. (2011). Stejně jako se potvrdilo i v naší práci, doba potřebná k zotavení organismu je pro vodní živočichy také podstatná a ve své práci to také potvrzují i Stará a kol. (2016, 2019), kdy uvádějí, že celková potřebná doba pro zotavení organismu je závislá na toxické dávce a její době působení na organismus.

6. Závěr

Globální změny klimatu, zvyšující se teplota vody a stále se zvyšující spotřeba chemických látek mají negativní dopad na vodní ekosystémy. Znehodnocené životní prostředí má za důsledek zvyšování molekulárního i buněčného poškození organismů. Vzhledem k tomu, že i poměrně nízké koncentrace pesticidů běžně se vyskytujících v povrchových vodách po celém světě negativně ohrožují život organismů, mohou tak vést k tomu, že synergické působení měnících se abiotických i antropogenních stresorů bude mít negativní dopad nejen na jednotlivce, ale i na celá společenstva, a nakonec i celý ekosystém.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv koncentrace, doby působení a teploty na biochemické parametry raka mramorovaného, vystaveného insekticidu thiaclopridu. Z výsledků této práce je patrné, že koncentrace thiaclopridu už v takových hodnotách, jaké se vyskytují v povrchových vodách ($4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), má negativní účinek na biochemické parametry raka mramorovaného. Thiacloprid v tkáních svalů, hepatopankreatu a žaber raků ovlivnil rovnováhu v antioxidačním systému a způsobil oxidační stres v tkáních svalů a hepatopankreatu. Dále thiacloprid zapříčinil zvýšenou koncentraci GLU a NH_3 a enzymatickou činnost AST, ALT a CK v hemolymfě, což potvrzuje poškození buněk v organismu a zvýšení uvolňování těchto látek do hemolymfy raků. Tato práce se však nezabývala pouze samotným vlivem koncentrace thiaclopridu, ale také důležitým parametrem, na kterém je život poikilotermních živočichů přímo závislý, a to teplotou vody. V této práci bylo potvrzeno, že teplota vody hrála při zkoumání vlivu thiaclopridu důležitou roli. Ovlivnila aktivitu jednotlivých enzymů a látek v tkáních svalů, hepatopankreatu, žaber a hemolymfě, což mělo dopad na jejich odlišné projevy vůči samotné toxicitě thiaclopridu na organismus. Samotná koncentrace látky měla v důsledku vliv i na schopnost regenerace raků, kdy zejména při vyšších koncentracích thiaclopridu a vyšších teplotách nebyli raci schopni během 28denní depurační doby vyrovnat své biochemické mechanismy na běžnou úroveň kontrol.

Od 1. května 2020 je prodej thiaclopridu zakázán, ale je však možné jeho zásoby spotřebovat do 9. ledna 2021 a jeho metabolity tak mohou ještě několik let přetrvávat v ekosystému. Zákaz této látky jen potvrzuje, že její používání negativně působí na životní prostředí, což potvrzují i výsledky této práce. Nesmíme však zapomenout, že se zákazem

jistých pesticidů přichází na řadu výroba nových, jejichž účinkům na necílové organismy není věnována dostatečná pozornost. Na závěr této práce bych doporučila, při zkoumání vlivů pesticidních látek, zaměřit se zejména na jejich chronické působení a zároveň zohlednit i jiné faktory prostředí, jako je zvyšující se globální teplota, která má za důsledek nejen zvyšování teploty vody, ale také ubývání vodních zdrojů a s ním spojené i zvyšující se koncentrace škodlivých látek ve vodním prostředí. Získané výsledky této práce rozšířily dosavadní informace o vlivu thiaclopridu na necílové vodní organismy, konkrétně raky a potvrdily synergické účinky teploty vody a koncentrace thiaclopridu, jejichž účinky zkoumá jen málo autorů a mohou být dále příkladem pro vyhodnocení rizik na životní prostředí.

7. Seznam použité literatury

- Abrantes, N., Pereira, R., Goncalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments and fish tissues in a lake surrounded by agricultural lands: concerning risks to humans and ecological receptors. *Water and Air Pollution*, 212, 77-88.
- Ackefors, H.E.G., 1998. The culture and capture crayfish fisheries in Europe. *World Aquaculture*, 29, 18-24; 64-67.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Ballantyne, B., Marrs, T. C., Syversen, T., 1999. *General and applied Toxicology*. 3rd Edition, John Wiley and Sons, 1842-1897 pp.
- Banaee, M., Ahmadi, K., 2011. Sub-lethal toxicity impacts of endosulfan on some biochemical parameters of the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(11), 827-835.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(1), 1-6.
- Bayer CropScience, 2008. Bezpečnostní list CALYPSO 480 SC podle Nařízení (ES) č. 1907/2006 (REACH). Dostupné na: <https://www.cropscience.bayer.cz/cs/prодукty/pripravky-na-ochranu-rostlin/calypso-480-sc/>, (navštíveno online 12.4.2020).
- Bayer CropScience, 2020. Přípravky na ochranu rostlin osiva a prostředky pro DDD činnost. Praha: Bayer, s. r. o., 290 s.
- Beketov, M.A., Liess, M., 2008. Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(2), 461-470.
- Benli, A.C.K., 2015. The influence of etofenprox on narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823): Acute toxicity and sublethal effects on histology, hemolymph parameters, and total hemocyte counts. *Environmental toxicology*, 30(8), 887-894.
- Berghiche, H., Touati, K., Chouahda, S., Soltani, N., 2017. Impact of the neonicotinoid insecticide, Actara®, on the shrimp *Palaemon adspersus*: Biomarkers measurement. In *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration*, pp. 533-534.

- Bergmann, M., Taylor, A.C., Moore, P.G., 2001. Physiological stress in decapod crustaceans (*Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator*) discarded in the Clyde Nephrops fishery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(2), 215-229.
- Bermudez-Saldana, J.M., Excuder-Gilaber, L., Medina-Hernandez, M.J., Villajueva-Vamanas, R.M., Zahrado, S., 2005. Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides. *Journal of Chromatography*, 814, 115-125.
- Blacquiére, T., Smagghe, G., Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 973-992.
- Bone, J.W., Renshaw, G.M., Wild, C.H., 2017. Physiological and biochemical responses to elevated temperature in a threatened freshwater crayfish, *Euastacus sulcatus* (Decapoda: Parastacidae). *Marine and Freshwater Research*, 68(10), 1845-1854.
- Breer, H., Sattelle, D.B., 1987. Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *Journal of Insect Physiology*, 33(11), 771-790.
- Brundage, K.M., Barnett, J.B., 2010. Immunotoxicity of pesticides. In: Krieger, R. (Ed.), *Hayes' Handbook of pesticides toxicology*. Volume 2, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 483-497.
- Carreck, N.L., 2017. A beekeeper's perspective on the neonicotinoid ban. *Pesticide Management and Science*, 7, 1295-1298.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 378 pp.
- Cazenave, J., de los Angeles Bistoni, M., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 1-12.
- Ceyhun, S.B., Senturk, M., Erdogan, O., Kufreivoglu, O.I., 2010. *In vitro* and *in vivo* effect of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Orconhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 177-181.
- Crandall, K.A., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. *Hydrobiology*, 595, 295-301.
- Cremllyn, R.J.W., 1978. *Pesticides: Preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, 240 pp.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2020. Dostupné na: <http://hydro.chmi.cz/>, (navštíveno online 12.4.2020).
- Dobiáš, J., Koželuh, M., Zajíček, A., Fučík, P., Liška, M., 2018. Dynamika vyplavování pesticidních látek v povodí Čechtického potoka.

- Dorn, N.J., Trexler, J.C., 2007. Crayfish assemblage shifts in a large drought-prone wetland: the roles of hydrology and competition. *Freshwater Biology*, 52, 2399-2411.
- Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Fürll, M., Knotková, Z., Pejřilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003. *Veterinární hematologie*. Noviko a.s., Brno, 464 s.
- Durand, F., Devillers, N., Lallier, F.H., Regnault, M., 2000. Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal spider crab *Maia squinado* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 127(3), 259-271.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Evropská komise: Neonicotinoids, Dostupné na:
https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en, (navštíveno online 7.5.2020).
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, 232(2), 243-248.
- Fialová, L., 2012/2013. Lipidy (mastné kyseliny, lipoperoxidace, trávení). Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK Praha. Dostupné na:
<https://el.lf1.cuni.cz/p5p8l4k0mdk/>, (navštíveno online 30.4.2020).
- Folmar, L.C., 1993. Effect of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 337-375.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856-1862.
- Goddard, J.S., 1988. Food and Feeding. In: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds), *Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation*. Croom Helm Ltd., London, pp. 145-166.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases - First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hager, J., 1996. *Edelkrebse*. Leopold Stocker Verlag, Graz, 128 pp.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.

- Hao, C., Morse, D., Zhao, X., Sui, L., 2015. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoids in environmental water. *Rapid Communication And Mass Spectrometry* 2015, 2225-2232.
- Hawkins, R.I., Mawdesley-Thomas, L.E., 2006. Fish haematology - A bibliography. *Journal of Fish Biology*, 4, 193-232.
- Hendrix, A.N., Loftus, W.F., 2000. Distribution and relative abundance of the crayfishes *Procambarus alleni* (Faxon) and *P. fallax* (Hagen) in southern Florida. *Wetlands*, 20, 194-199.
- Hlávková, M., 2018. Hodnocení subchronického působení atrazinu na raka (*Cherax destructor*). Diplomová práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 89 s.
- Hobbs, H.H., Jr., 1981. The crayfishes of Georgia. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 318, 549 pp.
- Holdich, D.M., 2002. *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science. 326 pp.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckel, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Frosset, 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.
- Chainy, G.B.N., Paital, B., Dandapat, J., 2016. An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica*, 2016.
- Cheghib, Y., Chouahda, S., Soltani, N., 2020. Side-effects of a neonicotinoid insecticide (actara®) on a non-target larvivorous fish *Gambusia affinis*: Growth and biomarker responses. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.12.007>.
- Cheng, C.H., Guo, Z.X., Luo, S.W., Wang, A.L., 2018. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 190-198.
- Jacquín, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Le Hénaff, M., De Jong, L., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 255-264.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 897-908.

- Karlin, A., 2010. Nicotinic acetylcholine receptors. In: Bradshaw, R.A. and Dennis, E.A., Handbook of cell signaling (second edition). Amsterdam: Elsevier, pp. 221-224.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. Ekotoxikologie pro chemiky. VŠCHT, Praha, 199 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profile krve ryb. FROV JU Vodňany, 135, 54 s.
- Kollmeyer, W.D., Flattum, R.F., Foster, J.P., Powell, J.E., Schroeder, M.E., Soloway, S.B., 1999. Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Springer, Tokyo, pp. 71-89.
- Kouba, A., Kuklina, I., Niksirat, H., Máchová, J., Kozák, P., 2012. Tolerance of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to Pesteril 36 supports use of peracetic acid in astaciculture. Aquaculture, 350/353, 71-74.
- Koutník, D., Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. The effect of subchronic metribuzin exposure to signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana 1852). Neuroendocrinology Letters, 35, 51-56.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková-Balcarová, E., Policar, T., 2013. Biologie a chov raků. Vodňany: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod., 418 s.
- Liu, B., Xie, J., Ge, X., Xu, P., Wang, A., He, Y., Chen, R., 2010. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. Fish and shellfish immunology, 29(1), 49-57.
- Livingstone, D.R., Martinez, P.G., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus Edulis* L, and other molluscs. Functional Ecology, 4(3), 415-424.
- Long, Y., Li, L., Li, Q., He, X., Cui, Z., 2012. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. PloS One, 7(5), e37209.
- López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Thermal Biology, 36(2), 91-104.
- Lukhaup, C., 2001. *Procambarus* sp. - Der Marmorkrebs. Aquaristik Aktuell, 7-8, 48-51.
- Malev, O., Šrut, M., Maguire, I., Štambuk, A., Ferrero, E.A., Lorenzon, S., Klobučar, G.I., 2010. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air

- exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 152(4), 433-443).
- Manciocco, A., Calamandrei, G., Alleva, E., 2014. Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: the need of the etho-toxicology approach. *Chemosphere*, 100, 1-7.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The partenogenetic Marmorokrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften*, 94, 843-846.
- Mehta, K., 2017. Impact of temperature on contaminants toxicity in fish fauna: A review. *Indian Journal of Science and Technology*, 10, 1-6.
- Morris, S., Oliver, S., 1999. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: Simulation studies of commercial shipping methods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 122(3), 299-308.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291-303.
- Nauen, R., Jeschke, P., Copping, L., 2008. In Focus: Neonicotinoid insecticides Editorial. *Pest Management Science*, 64, 1081.
- Neff, J.M., 1985. Use of biochemical measurement to detect pollutant-mediated damage to fish. *ASTM Special Technical Publication 854*, 155-183.
- Novický, O., Vyskoč, P., Vizina, A., Kašpárek, L., Pícek, J., 2008. Klimatická změna a vodní zdroje v povodí Vltavy. *VÚV TGM, v.v.i., Praha*, 29 s.
- Öztürk-Ürek, R., Tarhan, L., 2001. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 205-212.
- PANNA (Pesticide Action Network North America), 2020. PAN Pesticides Database - Chemical. Dostupné na: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PRI6211#Ecotoxicity, (navštíveno online 16.4.2020).
- Parithabhanu, A., Deepak, M., 2014. Toxicity of cypermethrin influenced by pH and temperature on the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(1), 1-4.

- Paskerová, H., 2007. Biomarkery ekotoxicity sinic. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, 47 s.
- Paskerová, H., 2009. Subletální účinky a biomarkery ekotoxicity sinic. Diplomová práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, 80 s.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H, Wiemers, M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 68-102.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- Prousek, J., 2001. Rizikové vlastnosti látek. Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava, Slovensko, pp. 60-93.
- Racek, J., 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galén, Praha, 92 s.
- Reynolds, J.D., 2002. Growth and reproduction. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 30-52.
- Reynolds, J.D., 2011. A review of ecological interactions between crayfish and fish, indigenous and introduced. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystem*, 401 pp.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D., 2016. Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 71-54.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorkerbs (marbled crayfish): A parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology*, 303 A, 393-405.
- Shukla, S., Jhamtani, R.C., Dahiya, M.S., Agarwal, R., 2017. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology Reports*, 4, 240-244.
- Schenker, R., Tinembart, O., Humbert-Droz, E., Cavaliero, T., Yerly, B., 2003. Comparative speed of kill between nitenpyram, fipronil, imidacloprid, selamectin and cythioate against adult *Ctenocephalides felis* (Bouché) on cats and dogs. *Veterinary Parasitology*, 112, 249-54.

- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Partenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*, 421, 806.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Patrimoines Naturels, Paris, 64, 187 pp.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Toxicology Letters*, 229, S105-S106.
- Stará, A., Kubec, J., Zusková, E., Burič, M., Faggio, C., Kouba, A., Velíšek, J., 2019. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere*, 224, 616-625.
- Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2016. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment*, 566, 733-740.
- Storey, K.B., 1995. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. In: II Workshop in Comparative Animal Physiology, Serra Negra, Brazil, Assoc Bras Divulg Cientifica, 1715-1733 pp.
- Strouhová, A., 2018. Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové organismy. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 59 s.
- 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-Lipids and Lipid Metabolism*, 1304(1), 1-10.
- Süß, A., Bischoff, G., Mueller, A.C., Buhr, L., 2015. Chemisch-biologisches Monitoring zu Pflanzenschutzmittelbelastungen und Lebensgemeinschaften in Gräben des Alten Landes. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 58(2), 28.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.), *Veterinrní toxikologie v klinické praxi*. Profí Press, Praha, s. 201-217.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. *Raci v České republice*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 255 s.
- 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.

- Titěra, D., 2013. Analýza rozsahu a vlivu používání insekticidu ze skupiny neonikotinoidů pro včely v ČR. Závěrečná zpráva, Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., DOL, 27 s.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanism of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2883-2886.
- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-278.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermuelen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský). <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/>, (navštíveno online 7. 5. 2020).
- Van Dijk, T.C., Van Staaldin, M.A., Van der Sluijs, J.P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS One*, 8(5), e62374.
- Velíšek, J., Stará, A., 2018. Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 194, 481-487.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šírková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.
- Voet, D., Voet, J.G., 2004. *Biochemistry*. Hoboken. John Wiley and Sons, 1, pp. 591.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Backwell Science Ltd., Oxford, pp. 53-151.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology*, 11, 643-669.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004. Life stages and reproductive components of the Marmorkrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology*, 261, 286-311.
- Vryzas, Z., Alexoudisa, C., Vassiliou, G., Galanisa, K., Papadopoulou-Mourkidoub, E., 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(2), 174-181.

- Wang, X., Anadón, A., Qinghua, W., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larranaga, M., Yuan, Z., Martínez, M., 2018. Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 18.1-18.37.
- Wang, Z., Qu, Y., Zhuo, X., Li, J., Zou, J., Fan, L., 2019. Investigating the physiological responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute cold-stress. *PeerJ*, 7, e7381.
- Williams, P.L., James, R.C., Roberts, S.M., 2003. Principles of toxicology: Environmental and industrial applications. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, USA, 603 pp.
- Yamamoto, I., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Walcott, E. C., Sumikawa, K., 1998. Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Insect Biochemistry and Physiology*, 37, 24-32.
- Yang, C., Lim, W., Song, G., 2020. Mediation of oxidative stress toxicity induced by Pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 234, 108758.
- Yang, S., Yan, T., Zhao, L., Wu, H., Du, Z., Yan, T., Xiao, Q., 2018. Effects of temperature on activities of antioxidant enzymes and Na⁺/K⁺-ATPase, and hormone levels in *Schizothorax prenanti*. *Journal of Thermal Biology*, 72, 155-160.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., Obinger, C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(9), 1527-1547.
- Zapletal, O., 2001. Speciální veterinární toxikologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno, 148 s.
- Zarenkov, N.A., 1982. Členistonogie. Rakoobraznye, Čast' 1. Izd. MGU, Moskva, 515 s.
- Závodská, R., 2006. Biologie buněk: Základy cytologie, bakteriologie, virologie. Scientia, Praha, 159 s.
- Zhang, Y., Loughery, J.R., Martyniuk, C.J., Kieffer, J.D., 2017. Physiological and molecular responses of juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) to thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 203, 314-321.

8. Seznam zkratek

3R:	Replace, Reduce, Refine
ALB:	Albumin
ALT:	Alanin aminotransferáza
AST:	Asparát aminotransferáza
BCA-A:	Bicinochonic acid solution-Sigma Aldrich (B-9643)
BCA-B:	Copper (II) sulfate-Sigma Aldrich (C-2284)
BHT:	Butylovaný hydro toulen
BSA:	Bovinní albumin
CAT:	Kataláza
CK:	Kreatinkináza
CNDB:	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CHSK _{Mn} :	chemická spotřeba kyslíku manganistanem draselným
ČHMÚ:	Český hydrometeorologický úřad
DDT:	dichlordifenyiltrichlorethan
Dep.:	Depurace
DTNB:	2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina
EC:	Efektivní koncentrace
EDTA:	Ethylendiaminetetraoctová kyselina
Exp.:	Expozice
GHS:	Globální harmonizovaný systém
GLOB:	Globulin
GLU:	Glukóza
GPx:	Glutation peroxidáza
GSH:	Redukovaný glutation
GSSG:	Oxidovaný glutation
GST:	Glutation S-transferáza
HPLC-MS/MS:	High-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry
K 17:	Kontrolní skupina 17 °C
K 23:	Kontrolní skupina 23 °C
LDH:	Laktát dehydrogenáza
LC:	Letální koncentrace
LPO:	Lipidní peroxidace
MDA:	Malonaldehyd
NADH:	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH:	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nAChRs:	Nikotinové acetylcholinové receptory
NBT:	Nitroblue tetrazolium

PANNA:	Pesticide Action Network North America
PMS:	Phenazin methosulfonát
PROT:	Protein
ROS:	Reactive oxygen species (Reaktivní kyslíkové radikály)
Sm. Kř.:	Směrodatná křivka
SOD:	Superoxid dismutáza
TBARS:	Thiobarbituric acid reactive substances (Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou)
TCA:	Kyselina trichloroctová
TEN 17:	Skupina vystavená koncentraci thiaclopridu $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, při $17 \text{ }^\circ\text{C}$
TEN 23:	Skupina vystavená koncentraci thiaclopridu $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, při $23 \text{ }^\circ\text{C}$
TLC 17:	Skupina vystavená koncentraci thiaclopridu $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, při $17 \text{ }^\circ\text{C}$
TLC 23:	Skupina vystavená koncentraci thiaclopridu $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, při $23 \text{ }^\circ\text{C}$
TP:	Total protein (celkové proteiny)
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚKZÚZ:	Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský
UV:	Ultrafialové záření

9. Abstrakt

Vliv koncentrace, teploty a doby působení na biochemické parametry raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*), exponovaného neonikotinoidovému pesticidu, thiaclopridu.

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv koncentrace, teploty a doby působení thiaclopridu na biochemické parametry raka mramorovaného nyní označen latinským názvem (*Procambarus virginalis*).

Doba experimentu probíhala po dobu 56 dní (28 dní expozice a 28 dní depurace), kdy byli raci rozděleni do skupin podle vybraných koncentrací: (kontrolní skupina (K) bez obsahu thiaclopridu, nejvyšší zjištěná environmentální koncentrace $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TEN) a koncentrace $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TLC), která odpovídá 10% hodnotě 96hodinové letální koncentraci pro raka mramorovaného a různých teplot vody (17 a 23 °C).

Během experimentu byla u raků vystavených nižší teplotě vody (17 °C) pozorována obecně nižší aktivita v chování než u raků vystavených vyšší teplotě (23 °C). Vliv obou zkoumaných koncentrací ($4,5$ a $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) způsobil v tkáních svalu a hepatopankreatu LPO a změnu aktivity GST. Dále byly zaznamenány statisticky významné ($P < 0,01$) změny SOD, CAT a GSH ve všech tkáních (svalu, hepatopankreatu i žaber), u obou zkoumaných koncentrací ($4,5$ a $64,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a sledovaných teplot (17 a 23 °C) v průběhu experimentu. Vliv koncentrace thiaclopridu, teploty a doby působení způsobil dále nárůst GLU, NH_3 , AST, ALT a CK v hemolymfě raků. Další sledované parametry v hemolymfě (LDH, TP, Ca^{2+} , Mg^{2+}) byly ovlivněny především teplotou, kdy u raků v teplejší vodě (23 °C) byly zaznamenány zvýšené hodnoty těchto ukazatelů oproti rakům v chladnější vodě (17 °C). V jediných dvou parametrech (ALB a GLOB) nebyly zaznamenány v hemolymfě žádné rozdíly. Nejvyšší statisticky významné ($P < 0,05$) změny jednotlivých parametrů v rámci skupin byly pozorovány nejčastěji po 14 a 28denní expoziční době, kdy u některých parametrů, zejména při vyšší koncentraci thiaclopridu i teplotě vody bylo zjištěno, že 28denní depurační doba nebyla dostatečná pro vyrovnání biochemických parametrů na běžné hodnoty kontrol. Na závěr je vhodné zmínit, že na vliv jednotlivých parametrů měla vliv i samotná teplota vody, kdy byly v několika případech naměřeny rozdílné hodnoty sledovaných biomarkerů mezi teplotami u skupin vystavených stejným

koncentracím thiaclopridu, i přesto, že jejich kontrolní skupiny mezi teplotami nevykazovaly žádné rozdíly.

Výsledky této práce potvrzují synergické účinky thiaclopridu, teploty a doby působení na necílové vodní organismy a mohou být podkladem pro další studie zabývající se hodnocením vlivu thiaclopridu i jiných pesticidních látek na organismy.

Klíčová slova: insekticidy, korýši, hemolymfa, antioxidanty, oxidační stres, synergické účinky.

10. Abstract

Effect of Concentration, Temperature and Duration of Action on Biochemical Parameters of Marbled Crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*) Exposed to Neonicotinoid Pesticide, Thiachlopid.

The aim of this work was to evaluate the effect of concentration, water temperature conditions and duration of action of thiachlopid on biochemical parameters of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*).

The time of this experiment was taken for 56 days (28 days of exposure and 28 days of depuration). Crayfish were divided into groups according to selected concentrations: control group without thiachlopid (K), highest detected environmental concentration $4.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TEN) and concentration $64.6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (TLC) (10 % of the 96-hour lethal concentration for marbled crayfish) and different water temperatures (17 and 23 °C).

Crayfish, which was exposed to a lower water temperature conditions (17 °C) during the experiment, have been generally shown lower activity in behaviour against crayfish exposed to a higher temperature (23 °C). The effect of concentrations of thiachlopid (4.5 and $64.6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) caused in the muscle and hepatopancreas LPO and changed GST activity. Statistically significantly ($P < 0.01$) changes were observed in all tissues (muscle, hepatopancreas and gills), caused by effect of concentrations of thiachlopid (4.5 and $64.6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) and temperature condition (17 and 23 °C) during the experiment in SOD, CAT and GSH. The effect of thiachlopid concentration, water temperature condition and duration of action caused in haemolymph significantly ($P < 0.01$) increase in GLU, NH_3 , AST, ALT and CK. Other parameters in haemolymph (LDH, TP, Ca^{2+} , Mg^{2+}) were affected only by the water temperature condition. Crayfish in higher water temperature condition (23 °C) showed higher values of these indicators in opposite to crayfish in colder temperature condition (17 °C). No different changes in haemolymph were observed only in two parameters (ALB and GLOB). The highest statistically significantly ($P < 0.05$) changes of individual parameters inside each one group were observed especially after 14 and 28 days of exposure. Especially in higher concentration of thiachlopid and temperature was found that 28 days of depuration time was not sufficient to balance biochemical parameters to normal control values. At the end, it is apt to mention that water temperature condition had influence on individual parameters

themselves, when in several cases different values of monitored biomarkers were measured between temperatures in groups exposed to the same concentrations of thiacloprid, even though their control groups showed no differences between temperatures.

The results of this work confirm the synergistic effect of thiacloprid, temperature and duration of action on non-target aquatic organisms and could be used for other studies to evaluate the effect of thiacloprid and other pesticides on organisms.

Key words: insecticides, crustaceans, haemolymph, antioxidants, oxidative stress, synergistic effects.