

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Hodnocení subchronického působení atrazinu na raka
(*Cherax destructor*)

Autor: Bc. Markéta Hlávková

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

Konzultant diplomové práce: Ing. Jaroslava Lidová

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

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2018

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. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou formou v databázi 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.

V Českých Budějovicích dne 3. 4. 2018

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí diplomové práce Ing. Alžbětě Staré Ph.D. a konzultantce Ing. Jaroslavě Lidové za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady v průběhu experimentu a při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům laboratoře Vodní toxikologie a ichthyopatologie, FROV JU Vodňany, kteří mi byli nápomocni v průběhu experimentální části této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přáteli, kteří mě během studia na Jihočeské univerzitě podporovali.

Bc. Markéta Hlávková

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta HLÁVKOVÁ**
Osobní číslo: **V16N005P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Hodnocení subchronického působení atrazinu na raka *Cherax destructor***
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 :

Cílem diplomové práce je posoudit subchronické účinky atrazinu na raka *Cherax destructor*.

V rámci diplomové práce bude proveden subchronický test toxicity na raku *Cherax destructor* s atrazinem. Během testu se bude sledovat vliv atrazinu na mortalitu, změny v chování, biochemický profil hemolymfy, antioxidační biomarkery a oxidační stres v tkáních raka *Cherax destructor*. Po skončení subchronické expozice atrazinu budou raci drženi dalších několik dnů v čisté vodě bez testované látky pro sledování zotavení a znovuoobnovení vybraných biochemických ukazatelů exponovaných raků.

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

Získané výsledky testování rozšíří dosavadní informace o nové poznatky o toxickém vlivu atrazinu na necílové vodní organismy, respektive raky, a budou podkladem pro hodnocení rizik atrazinu 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:

Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 600 s.

Velisek, J., Stara, A., Svobodova, Z., 2011. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. In: Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. Stoytcheva, M., (Ed.). InTech. pp. 377-402.

Rudneva I., 2014. Biomarkers for stress in fish embryos and larvae. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 204 p.

Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). BioMed Research International, 6 p.

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.

Velíšek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Neuroendocrinology Letters 34: 31-36.

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

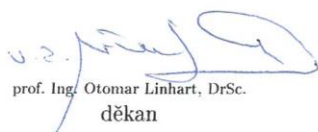
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: Ing. Jaroslava Lidová

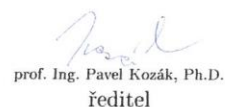
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 11. prosince 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 4. května 2018


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 11. prosince 2016

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Literární přehled	10
2.1	Pesticidy	10
2.1.1	Dělení pesticidů	11
2.2	Herbicidy.....	12
2.2.1	Dělení herbicidů.....	14
2.2.2	Herbicidy ve vodách	15
2.3	Triaziny	16
2.3.1	Atrazin	17
2.4	Raci	19
2.4.1	Obecná charakteristika raků.....	19
2.4.2	Parastacidae	20
2.4.3	Cherax destructor	21
2.4.4	Použití raků v testech toxicity s triaziny	24
2.5	Oxidativní stres a poškození organismů	24
2.5.1	Biomarkery	26
2.5.2	Biomarker oxidativního poškození tkání.....	27
2.5.3	Antioxidační biomarkery	28
2.5.4	Biochemický profil hemolymfy.....	31
3	Materiál a metodika	36
3.1	Princip a podmínky subchronického testu	36
3.2	Experimentální materiál	36
3.3	Příprava experimentálních akvárií a rozdělení raků do skupin.....	37
3.4	Odběr vzorků.....	38
3.5	Metody stanovení oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů.....	40
3.5.1	Metoda stanovení lipidní peroxidace (TBARS)	43
3.5.2	Metoda stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD).....	46
3.5.3	Metoda stanovení enzymatické aktivity kataláz (CAT)	47
3.5.4	Metoda stanovení redukováného glutathionu (GSH)	48
3.5.5	Metoda stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST). 51	
3.5.6	Metoda stanovení enzymatické aktivity glutathion reduktázy (GR)	52
3.5.7	Metoda stanovení hladiny koncentrace proteinů	53

3.6	Metoda stanovení biochemického profilu hemolymfy	54
3.7	Statistické vyhodnocení	55
4	Výsledky	56
4.1	Chování raků	56
4.2	Biomarker oxidačního stresu.....	56
4.2.1	Lipidní peroxidace	56
4.3	Antioxidační biomarkery	57
4.3.1	Superoxid dismutáza.....	57
4.3.2	Kataláza	59
4.3.3	Redukovaný glutation	60
4.3.4	Glutathion S-transferáza	61
4.3.5	Glutathion reductáza.....	62
4.4	Biochemické ukazatele hemolymfy	62
5	Diskuze	65
5.1	Chování raků	65
5.2	Oxidativní stres a antioxidační enzymy	66
5.3	Biochemický profil hemolymfy	67
6	Závěr	70
7	Přehled literatury.....	71
8	Seznam zkratk	85
9	Abstrakt.....	88
10	Abstract.....	89

1 Úvod

Celosvětově, nejvíce znepokojujícím problémem je znečištění životního prostředí, zapříčiněné lidskou činností (Abrantes a kol., 2010). Tento narůstající problém je připisován faktorům, které souvisí primárně se zemědělstvím a průmyslovými technologiemi (Figueiredo-Fernandes a kol., 2006). Spolu se zvýšením zemědělské produkce rapidně vzrostla i spotřeba chemických látek, jež jsou nezbytné pro ochranu rostlin před škůdci. Ačkoliv vede použití těchto látek ke zvýšení produkce, tak nelze nezmínit jejich negativní vliv nejen na necílové organismy a životní prostředí, ale i na lidské zdraví (Bermudez-Saldana a kol., 2005; Abrantes a kol., 2010). V tomto ohledu lze označit vodní ekosystémy za nejvíce ohrožené, neboť po aplikaci těchto látek na polní kultury dochází ke kontaminaci jak povrchových, tak podzemních vod (Ceyhun a kol., 2010).

Triazinové herbicidy jsou považovány za kontaminanty, které jsou ve vodním prostředí často sledovány kvůli své toxicitě a perzistenci. Detekovatelné hladiny těchto látek je možné sledovat jak v pitné vodě, tak i v potravinách, rybách, a dalších vodních organismech (Plhalová a kol., 2011). Triaziny mají schopnost narušit energetický metabolismus, což se u postiženého organismu projevuje jako třes, křeče, paralýza, zpomalené dýchání, problémy s chůzí a průjem (Hayes a Laws, 1991). V posledních letech rostou obavy z perzistence, mobility a toxicity triazinů a jejich metabolitů v důsledku zjištěných zbytkových koncentrací těchto herbicidů ve vodě a v různých složkách životního prostředí (Chapadense akol., 2009).

Atrazin (6-chloro-N²-ethyl-N⁴-(1-methylethyl)-1,3,5,-triazin-2,4,-diamin) se dříve používal pro kontrolu některých listnatých a travních plevelů, cukrové třtiny a hospodářských ploch, kde postupem let docházelo k jeho kumulaci (Ahrens a kol., 1994). Je mírně až vysoce toxický pro vodní organismy. Atrazin spolu s jeho rezidui negativně ovlivňuje vodní organismy včetně raků už při environmentálních koncentracích (Loughlin a kol., 2016). Je schopný poškozovat DNA organismů, což zahrnuje genotoxicitu, mutagenitu, imunotoxicitu a kumuluje se v tkáních. Nejvíce nebezpečná je jeho perzistence a karcinogenita, která se týká jak raků, tak ryb (Nwani a kol., 2010; Xing a kol., 2015).

Sladkovodní raci jsou ekologicky významnými bentickými organismy obývajícími vodní prostředí. Jsou považováni za jedny z klíčových ekosystémových bioindikátorů, u kterých se negativní účinky látek projevují nejen na úrovni populací,

ale vedou ke změnám v rámci celých společenstev (Buřič a kol. 2013). Navzdory této skutečnosti existuje nedostatek údajů o subchronických nebo chronických expozicích triazinů v environmentálních koncentracích na racích.

Cílem této diplomové práce je vyhodnotit subchronické působení atrazinu na raka ničivého (*Cherax destructor*). Vliv atrazinu na raky bude hodnocen především podle změn v chování a za pomoci biochemických analýz: biochemického profilu hemolymfy, oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů v tkáních. Sledované parametry budou hodnoceny u raků během 14denní expozice atrazinu a dále budou tyto parametry posouzeny po 14denní expozici raků v čisté vodě pro zotavení. Cílem této studie bude také rozšířit podklady hodnocení rizik atrazinu nejen na raky, ale také na životní prostředí s doporučením dalšího zapojení raků do testů s pesticidy.

2 Literární přehled

2.1 Pesticidy

Za pesticidy lze označit všechny sloučeniny anebo jejich směsi, které jsou určeny pro prevenci, ničení, potlačení, odpuzení, či kontrolu škodlivých organizmů (nežádoucích rostlin, mikroorganismů či živočichů) během produkce, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv a dále látky aplikované u zvířat proti ektoparazitům (Codex Alimentarius Commission, 2013). Mezi pesticidy jsou rovněž zařazeny sloučeniny používané jako desikanty, regulátory či stimulatory růstu a klíčení aplikované na plodiny před nebo po jejich sklizni (Velíšek a kol., 2014).

Použití pesticidů provází lidstvo již po staletí. Již ve Starověkém Řecku a Číně byly známy účinky síry a arsenu, jako účinného insekticidního přípravku k ochraně rostlin. Ve starověkém Římě byly izolovány z pryskyřníkovitých rostlin alkaloidy, které byly poté úspěšně používány pro hubení hlodavců (rodenticidy). S postupem času byly objeveny další, většinou vesměs přírodní látky, které vykazovaly pesticidní účinky. Jednu z takových látek popisuje například zpráva z roku 1669, která hovoří o využití tabákového výluhu, v boji proti mšicím (Shepard, 1939). Od druhé poloviny 19. stol. až do počátku 20. stol. byly pesticidní přípravky založeny především na přírodní a méně pak na anorganické bázi. Mezi první pesticidy na anorganické bázi lze zařadit takzvanou Bordeaux směs (hydratované vápno a síran měďnatý), která byla poprvé použita ve Francii v roce 1883 jako účinný fungicid. Podobné úspěchy zaznamenaly i sloučeniny na základě arsenu a rtuti (Hayes, 1982). Tyto anorganické látky byly později nahrazeny jejich organickými formami, které však vykazovaly vysokou toxicitu pro člověka a z tohoto důvodu bylo značně omezeno jejich použití (Bakir a kol., 1973). Ve 30. a 40. letech byl učiněn objev pesticidů na bázi chlorovaných uhlovodíků. Tyto halogenderiváty, u kterých byla část nebo všechny atomy nahrazeny atomem chlóru, byly nejčastěji využívány jako přípravky s insekticidními, fungicidními a rodenticidními účinky (Brundage a Barnett, 2010). Pesticidů na této bázi bylo vyrobeno značné množství například aldrin, eldrin, heptachlor, lindan, toxafen a další, přičemž výsadní postavení získalo DDT (dichlordifenyltrichlorethan), za které byl objevitel jeho účinků, doktor Paul Müller oceněn v roce 1948 Nobelovou cenou (Velíšek a kol., 2014). Toxicita chlorovaných uhlovodíků spočívala v zamezení nervového vzruchu, který se projevoval křečovitými pohyby (Narahashi, 2010).

Pesticidy na bázi chlorovaných uhlovodíků se vyznačují afinitou k tukům a velmi nízkým stupněm degradace. Z toho důvodu byly v 70. letech postupně nahrazovány organofosfáty a pyrethroidy, které se staly základem pro pesticidy používané dodnes (Velíšek a kol., 2014).

Vlivy pesticidů na jednotlivé složky ekosystému nebyly až do 60. let minulého století podrobně zkoumány. Přelom nastal v roce 1962, kdy Rachel Carson vydala knihu *Silent spring*, ve které popisuje vedlejší účinky DDT na ekosystém (Carson, 1962). Po uveřejnění této publikace došlo k rozvoji analytických metod, které byly schopny detekovat rezidua pesticidů v potravinách a zároveň započaly výzkumy, které se zabývaly vlivem pesticidů na živé organismy. Na základě těchto studií byla vytvořena Stockholmská úmluva, která reguluje a zakazuje použití nebezpečných pesticidních a perzistentních látek (Velíšek a kol., 2014).

2.1.1 Dělení pesticidů

Rozdělení pesticidů na základě hubení určitého škůdce, podle aplikace a podle původu, podrobně zpracoval Zapletal a kol. (2001).

2.1.1.1 Rozdělení podle určitého škůdce

- Akaricidy: přípravky určené pro hubení roztočů
- Algicidy: přípravky určené pro hubení řas
- Arboricidy: přípravky určené pro hubení stromů nebo keřů
- Avicidy: přípravky určené k hubení ptáků
- Fungicidy: prostředky používané k ochraně před houbovými chorobami
- Herbicidy: přípravky určené k hubení rostlin
- Insekticidy: přípravky určené k hubení hmyzu
- Moluskocidy: prostředky používané pro hubení měkkýšů
- Pesticidy: přípravky používané k hubení ryb
- Rodenticidy: prostředky využívané k hubení hlodavců

2.1.1.2 Rozdělení podle aplikace

- Postřiky
- Aerosoly
- Fumiganty (plyny nebo páry)
- Popraše

- Pevné a tekuté nástrahy
- Mořidla
- Nátěry a impregnace

2.1.1.3 Rozdělení podle původu

- Přírodní látky (například pyretriny, nikotinoidy)
- Syntetické látky (například pyrethroidy, neonikotinoidy)
- Biopreparáty

2.2 Herbicidy

Herbicidy jsou chemické sloučeniny, které jsou řazeny mezi pesticidní látky. Podle Jagera (1983) lze za herbicidy označit takové sloučeniny, které u rostlin způsobují významnou inhibici jejich růstu nebo aplikace těchto látek vede ke zničení celé rostliny či její části.

Primární funkce herbicidů spočívá v mechanismu potlačení, odlistění nebo úhynu nám nevhodících se plevelných rostlin, které jinak ve vysokém rozšíření výrazně snižují, až způsobují úplnou ztrátu produkce pěstovaných rostlin, například v zemědělství, lesním hospodářství i zahradnictví (Velíšek, 1999). Je velmi důležité říci, že většina z herbicidních přípravků svým účinkem ovlivňuje nejen rostliny, ale díky svým kumulačním a perzistentním vlastnostem se mohou zároveň ukládat v různých formách v potravním řetězci, a tím negativně ovlivňovat necílové organismy včetně člověka (Velíšek a kol., 2014).

Potíže s růstem plevelů jsou známé už odnepaměti. V ranných počátcích zemědělské výroby sloužilo k odstranění nežádoucích rostlin primárně ruční pletí, které bylo v průběhu dalších let usnadněno zapojením hospodářských zvířat. Spolu s technickým pokrokem byla do zemědělství zapojena první mechanizace, která vedla k rychlejší redukci plevelných rostlin. Použití prvních chemických látek k likvidaci plevele, lze označit za přelomový okamžik, díky kterému došlo k výraznému zefektivnění v pěstování zemědělských plodin. Mezi první takto použité látky patřila modrá skalice, jejíž účinky byly popsány již v roce 1896 (Mikulka a Kneifelová, 2004). V průběhu dalších let byly objeveny a zároveň testovány další látky, mezi které patřil například raphanit, chlorid měďnatý, kyselina sírová, sloučeniny arsenu, boru a dusíkaté vápno. V roce 1945 byly poprvé použity herbicidy na organické bázi, mezi tyto látky

patřil například diuron, simazin, aminotriazol a mnohé další. Během 90. let 19. století představovaly herbicidy nejrychleji se rozšiřující odvětví v rámci zlepšování funkčnosti pesticidů. Rozvoj vývoje herbicidů byl ovlivněn hned dvěma hlavními důvody. První zahrnoval činnost zemědělských center, které se začaly zaměřovat na pěstování monokultur, díky kterým bylo dosaženo mnohem vyšších výnosů. Druhý důvod představoval vysoké náklady, jež musely být vynaloženy na provoz mechanizace, která byla nezbytná pro odstraňování plevelu (Marquis, 1986). Jak uvádí Patočka a kol. (2004) už během indočínské války v letech 1961-1973 byly herbicidy ve vysokém množství používány především ve Vietnamu, Laosu a dalších zemích. Použití herbicidních přípravků mělo následně negativní vliv na faunu a flóru, i na místní obyvatele. Z tohoto důvodu jsou již nově vyvinuté herbicidní přípravky pečlivě ekotoxikologicky testovány.

Herbicidy jsou schopny využívat hned několik mechanismů, kterými působí na plevelné rostliny. První mechanismus je podle Ecobichona (1991) založen na principu inhibice fotosyntézy s následným dopadem na nadzemní části rostlin. Druhý typ mechanismu popisují Fuerst a Norman (1991), kdy je omezen mechanismus přenosu elektronů během procesu fotosyntézy v chloroplastech rostlin a zamezí se takzvané Hillově reakci. Zamezením této reakce dochází k narušení buněčného uspořádání a fytotoxicitě. Tento druh mechanismu je typický především pro triazinové herbicidy a fenylkarbamáty. Následující mechanismy herbicidů mohou také poškozovat syntézu bílkovin, buněčné dělení a podobně. (Ecobichon, 1991). Účinky a transport herbicidů v prostředí jsou ovlivňovány celou řadou různých faktorů, kam řadíme teplotu vzduchu, rychlost větru, vlhkost půdy, půdní druh, dešťové srážky, intenzitu světla a další (Mikulka a Kneifelová, 2004).

2.2.1 Dělení herbicidů

System rozdělení herbicidů byl zpracován podle Zapletala a kol. (2001) a Mikulky a Kneifelové (2004).

2.2.1.1 Podle účinku

- Selektivní herbicidy – chemické látky, které jsou schopny redukovat jen určitý druh plevelů, aniž by poškodily okolní druhy rostlin.
- Neselektivní herbicidy – jedná se o chemické látky používané k likvidaci veškeré vegetace.

2.2.1.2 Podle fyziologického působení

- Kontaktní (dotykové) herbicidy – jde o látky, které jsou schopné buď poničit, anebo zcela zničit tu část rostliny, kde se jí herbicid dotkl. Mechanismus těchto herbicidů je založen na schopnosti srážet bílkoviny a dehydrovat pletiva rostlin. Fungují jako plazmatické jedy.
- Systémové (translokační) herbicidy – tato skupina herbicidů proniká do rostlin a je pomocí floému nebo xylému rozváděna do všech částí rostlin, kde způsobí zpomalení růstu, naruší látkovou výměnu a následně úhyn celé rostliny. Proto se tyto látky používají i na vytrvalé plevele.
- Herbicidy sterilizující půdu – jsou schopny zničit rozmnožovací orgány rostlin v půdě.

2.2.1.3 Podle způsobu příjmu rostlinou

- Aplikace na listy – ošetření probíhá v průběhu vegetační doby.
- Aplikace na kořeny – aplikace se provádí na půdu a následně je látka přijímána kořenovým systémem rostlin.

2.2.1.4 Podle období jejich aplikace

- Předset'ová aplikace – herbicid je aplikován na připravenou nebo nepřípravenou půdu, než dojde k setí či sázení plodin.
- Preemergentní aplikace – aplikace je prováděna po zasetí rostliny, ale než dojde k jejímu vzejití.
- Postemergentní aplikace – aplikace je prováděna po vzejití rostliny a je možné ji aplikovat jen na ohniskové místo.

2.2.1.5 Podle mechanismu účinku

- Syntetické auxiny – jde o skupinu takzvaných regulátorů růstu, které vyvolají enormní růst, avšak dochází k deformacím listů, stonků a celkovému vyčerpání rostliny.
- Inhibitory syntézy bílkovin – jde o skupinu herbicidů, jejíž mechanismus je založen na blokaci syntézy esenciálních aminokyselin ovlivňujících stavbu těla rostlin. Následně dochází k zastavení růstu a postupnému úhynu.
- Inhibitory buněčného dělení – jde o půdní herbicidy ovlivňující klíčení plevelů.
- Inhibitory fotosyntézy – jsou to herbicidy inhibující převážně fotosystém II, ale i transport elektronů ve fotosystému I. Jsou zde zahrnuty triazinové herbicidy a fenylkarbamáty.
- Inhibitory biosyntézy karotenoidů – jde o látky narušující vytváření rostlinných barviv, převážně chlorofylu. Působení se projevuje vybělením listů a následným odumíráním rostlin.

2.2.2 Herbicidy ve vodách

Povrchové vody v České republice byly podle studie Sehonové a kol. (2012) kontaminovány během let 2004-2005 a to nejvíce herbicidy na bázi triazinů a chloracetanilidů. Přestože byly tyto látky zakázány již v roce 2004, jejich přítomnost v povrchových vodách je stále patrná. Problémy s rezidui pesticidních přípravků v povrchových vodách se netýkají pouze České republiky, ale bez nadsázky lze říci, že se jedná o celoevropský problém. Atrazin byl prokázán například v Německu, a to na řece Labi v koncentraci okolo $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Götz a kol., 1998). Stejně tak byly triazinové herbicidy prokázány v polské Odře, ve které se naměřené koncentrace reziduí pohybovaly od hodnot pod mezí stanovitelnosti až po hodnotu $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Wolska a kol., 2003). Jak uvádí Loos a kol. (2010) povrchové vody na řece Dunaji byly taktéž kontaminovány různými druhy pesticidů. Množství těchto látek bylo nízké a lze ho vysvětlit odběry provedenými dlouho po aplikaci. Naměřené koncentrace reziduálních triazinů v řece Dunaji se pak pohybovaly v okolí Budapešti okolo $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a dále po toku byla koncentrace $0,005 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Největší problém s rezidui pesticidů v povrchových vodách mělo podle Maloschika a kol. (2007) Maďarsko,

kde se kromě atrazinu a acetochloru objevil i diazinon. Je tedy patrné, že rezidua aplikovaných pesticidních látek nejen z podskupiny herbicidů se mohou objevovat v povrchových vodách, ačkoliv jejich používání bylo již před několika lety zakázáno (Sehonová a kol., 2012).

2.3 Triaziny

Mezi nejstarší selektivní herbicidy, jež byly objeveny v roce 1952 J. R. Geiryneem, řadíme pesticidy na bázi triazinů. Triaziny patří mezi nejčastěji používané pesticidy na celém světě. V posledních letech vyvstávají obavy, které se týkají možné perzistence, mobility a také toxicity nejen samotných triazinů, ale i jejich metabolitů, jež se objevují v reziduálních koncentracích ve všech oblastech životního prostředí (Chapadense a kol., 2009). Triazin a jeho metabolity byly detekovány jak v pitné, tak i v podzemní vodě, rybách a dalších potravinách (Solomon a kol., 1996; Hogan, 2013). Triaziny jsou skupinou pesticidů, jež je charakterizována heterocyklickou strukturou, to znamená šestičlenný kruh skládající se z atomů uhlíku a dusíku (Kamrin, 1997). Nejznámějšími a nejpoužívanějšími triaziny jsou atrazin, simazin, cyanazin, hexazinon, terbutryn, prometryn, propazin, metribuzin a ametryn. Nyní se ve světě používá 14 pesticidů na bázi triazinů, avšak v České republice jsou v současné době registrované jen čtyři přípravky, u kterých jsou účinnými látkami metribuzin, metamitron, terbutylazin a tebuconazol (Velíšek a kol., 2014).

Triaziny můžeme dělit podle jejich chemické struktury na asymetrické a symetrické. Převážná část triazinů má svoji stavbu symetrickou s možným zaměněním nebo střídáním některých iontů uhlíku za atomy dusíku. Do symetrických triazinů řadíme simazin, atrazin, ametryn, propazin, terbutryn a prometron. Nejznámějším asymetrickým triazinem je pak metribuzin (Pauli a kol., 1990). Kamrin (1997) uvádí, že u látek s různými rozdíly ve struktuře nebyly nalezeny žádné rozdíly ani v toxicitě, ani v účinku. Podle Sandersona a kol. (2001) se triazinové sloučeniny používají primárně pro potlačení širokého spektra různých druhů širokolistých a travnatých plevelů. Tyto látky mohou být používány samostatně anebo v kombinaci s jinými herbicidními přípravky (Fishel, 2012). Jak uvedl Sanderson a kol. (2001) přibližně od 60. let minulého století se pesticidní látky na bázi triazinů využívaly hlavně na porosty kukuřice, a to jak v Evropě, tak i v Severní Americe. Předpokládané množství použitého samotného atrazinu činilo v roce 1993 ve Spojených státech 35 000 tun.

Bowmer a kol. (1995) popsal triaziny jako inhibitory fotosyntézy, které jsou aplikovány na půdu. Z ní jsou přeneseny do kořenů a odtud jsou rozšířeny do dalších částí rostlin (Kamrin, 1997). Následně Das a kol. (2000) a Hogan (2013) uvádí, že mechanismus účinku u rostlin spočívá v potlačení fotosyntézy v důsledku blokáce elektronů v průběhu Hillovy reakce fotosystému II (Pauli a kol., 1990; DeLorenzo a kol., 2001). Poločas rozpadu u pesticidů na bázi triazinů může být až 300 dní. V případě sedimentů, může trvat degradace triazinů a jejich metabolitů i několik let. I přes to, že používání většiny triazinů bylo v posledních letech zakázáno, najdou se na celém světě ve vodním prostředí tyto látky ve formě reziduí (Garmouma a kol., 2001; Belmonte a kol., 2005; Bocquene a Franco, 2005; Abrantes a kol. 2010; Vryzas a kol., 2011). Z tohoto důvodu jsou takzvané S-triaziny (atrazin, cyanazin, prometryn, propazin, sebutylazin, simazin, terbutylazin a terbutryn) považovány pro životní prostředí za nebezpečné a jsou podle Evropské komise (Evropská komise, 1999) a Agentury pro ochranu životního prostředí (US EPA, 1994) součástí seznamu prioritních látek.

Pesticidy na bázi triazinů můžeme řadit mezi látky toxické a škodlivé. Nejcitlivějším organismem vůči triazinům jsou buchanky, jejichž citlivost k těmto látkám je přibližně 5krát větší, než je tomu u ryb. Příznaky otravy triaziny u ryb nejsou nijak neobvyklé. Ve většině případů se vyznačují převážně útlumovou fází (Svobodová a kol., 1987). Patologickým obrazem při otravě triaziny podle Velíška a kol. (2011a) a Svobodové a kol. (1987) je ztmavnutí barvy povrchu těla a zejména vytvoření tak zvaného transudátu v tělní dutině a v trávicím ústrojí. Dále mohou být otravy také doprovázeny snížením koncentrací hemoglobinu a plazmatických bílkovin. I přes to se s akutní otravou triaziny ve vodním prostředí setkáváme jen minimálně.

2.3.1 Atrazin

Atrazin (1-chloro-3-ethylamino-5isopropylamino-2,4,6-triazin) patří mezi celosvětově nejvíce používané herbicidy (Jablonowski a kol., 2011). Jen v USA je každoročně v zemědělství použito 74-80 milionů liber a je tedy druhým nejpoužívanějším herbicidem po glykofosfátu. Tento druh herbicidu byl vyvinut v 50. letech minulého století a od té doby je v USA a dalších státech stále aplikován proti plevelům v monokulturách s cukrovou třtinou a kukuřicí. Atanor (2012) uvádí běžně používanou dávku 1-2 kg·ha⁻¹. Dopady atrazinu na vodní ekosystém byly

zkoumány již koncem 90. let (Huber, 1993). Během těchto výzkumů bylo zjištěno, že atrazin má afinitu k sorpci v půdě. Walther (2003) uvedl, že atrazin může v půdě přetrvat po dobu 3 let. Bohužel pozdější studie prokázaly, že kontaminace půdy může trvat až 22 let po jeho aplikaci (Jablonowski a kol., 2011). Díky své perzistenci představuje tento herbicid reálné riziko pro podzemní i povrchové vody (Walther, 2003). Comber (1999) uvedl, že poločas rozpadu atrazinu ve vodách je závislý na fyzikálně chemických parametrech vodního prostředí. Koncentrace atrazinu, které byly zjištěny v povrchových vodách po celém světě, se pohybují v rozmezí od $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ do $227 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2018; Herrero-Hernandez a kol., 2017; Zheng a kol., 2017). Dále bylo zjištěno, že se atrazin může vyskytovat i ve vzdálených vodních ekosystémech, přestože se v jejich okolí nikdy nepoužíval. Kontaminace těchto ekosystémů je zapříčiněna dešťovými srážkami, díky kterým se může atrazin šířit do vzdálenosti vyšší než 1000 km (Thurman a Cromwell, 2000).

Kromě těchto vlastností byly u tohoto herbicidu testovány i účinky na vodní organismy. Ve výsledcích těchto pokusů bylo zjištěno, že jak akutní, tak chronické působení atrazinu vede u živočichů ke změnám jak ve fyzikálním, tak i behaviorálním chování (Zhu a kol., 2011). Specifikovat přesný dopad na jednotlivé vodní organismy je obtížný, neboť efekt atrazinu se projevuje u každé skupiny organismů jiným způsobem. Na pokusných rybách (*Pimephales promelas*) a škeblích druhu (*Elliptio complanata*) bylo prokázáno, že akutní expozice atrazinu vedou k endokrinním poruchám, které mají za následek změnu pohlaví (Hayes a kol., 2010). U řady rybích druhů, které byly vystaveny stejnému herbicidu, byly zjištěny změny v chování. Tyto změny jsou s největší pravděpodobností způsobeny poruchami, které atrazin vyvolává v čichových chemosenzorech (Belanger a kol., 2016). Díky tomu byla například u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) pozorována jen velmi slabá reakce na poplachové signály, ryby v případě nebezpečí nevyhledávaly skupinové chování ani neměly tendence se ukrývat (Saglio a Trijasse, 1998). Zároveň bylo u pstruha a dalších ryb zjištěno, že poruchy chemorecepce vedou rovněž ke snížení schopnosti reprodukce. Tento jev je způsoben tím, že samci ryb nejsou schopni detekovat prostaglandin (F₂), který je produkován samicemi (Moore and Lower, 2001).

Díky výskytu atrazinu ve vodách, perzistenci a obavám z jeho účinků byl tento herbicid v roce 1991 zakázán v Německu a Itálii a v roce 2003 byl zakázán již v celé Evropě (Evropská komise, 2003).

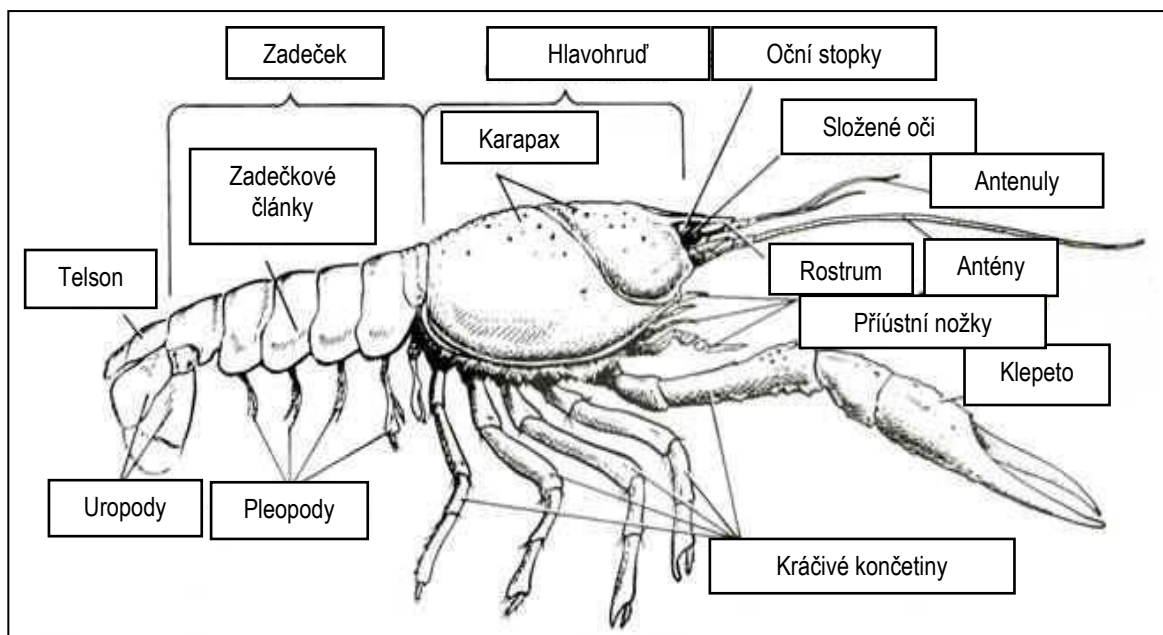
2.4 Raci

2.4.1 Obecná charakteristika raků

Raky řadíme mezi koryše náležící řádu *Decapoda*. Stejně jako u ostatních koryšů je povrch těla chráněn exoskeletem, který je tvořen hlavně chytinem, proteiny, polymerovanými lipidy a minerálními solemi. Je důležité říci, že krunýř (exoskelet) neroste spolu s tělem, proto jej jako ostatní členovci musí rak v pravidelných intervalech svlékat (Velíšek a kol., 2014).

Stavbu račího těla (Obr. 1) lze rozdělit na hlavohruď a zadeček. Hlavohruď vznikla srůstem 5 hlavových a 8 hrudních článků. Svrchní stranu a boky hlavohruď kryje krunýř, který se nazývá karapax. Na jeho povrchu se nachází cervikální a 2 branchio-kardinální brázdy. Přední část karapaxu se zužuje a vytváří rostrum, někdy také nazývané jako čelní trn. Rostrum je obvykle shora zploštělé, přičemž jeho boční strany mohou tvořit drobné trny. Zadní část rostra přechází v oční jamky, za nimi poté rostrum vybíhá do takzvaných post orbitálních lišt, které mohou spolu se samotným rostrem sloužit jako rozpoznávací znak. Z hlavohruď vyrůstá zároveň 5 párů kráčivých končetin, přičemž první pár končetin je výrazně zvětšený a tvoří klepeta. Skutečný počet končetin je však vyšší, celkem 19 párů končetin, včetně zadečkových, ústních končetin a tykadel (Kozák a kol., 2013).

Zadeček je u většiny raků přibližně stejně velký jako hlavohruď a skládá se z 6 pohyblivých článků. Články jsou uspořádány tak, aby se částečně navzájem kryly. Tyto štítky slouží podobně jako karapax k ochraně těla. Zároveň každý článek nese pár zadečkových končetin. U samic je zadeček vždy širší než u samců, a to z důvodu ochrany nakladených vajíček. Poslední zadečkový článek nese ocasní ploutvičku, která je složena celkem ze 4 uropodů a ploché destičky – takzvaný telson (Hobbs, 1974; Kozák a kol., 2013).



Obr. 1 Stavba račího těla (převzato a upraveno podle: www.biologyjunction.com, 2018).

2.4.2 Parastacidae

Na světě je popsáno více než 640 druhů raků. Taxonomicky je lze rozdělit do 2 hlavních nadčeledí – *Astacoidea* (severní polokoule) a *Parastacoidea* (jižní polokoule). *Astacoidea* se dále rozděluje do řádů *Astacidae* a *Cambaridae*, oproti tomu nadčeleď *Parastacoidea* je samostatná skupina (Richardson, 2007). *Parastacoidea* a z ní čeleď *Parastacidae* zahrnuje celkem 15 rodů a přes 170 druhů, přičemž jen 10 z 15 rodů se nachází v Austrálii. Zbylé rody obývají Jižní Ameriku (3 endemické rody s 12 druhy, vyskytující se především v jižní Chile, Uruguay a jižní Brazílii), Nový Zéland (1 endemický rod se 2 popsány druhy a Madagaskaru (1 endemický rod s 9 popsány druhy) (Crandall a Buhay, 2008). Do čeledě *Parastacidae* patří rovněž endemický a zároveň největší rak na světě – velerak tasmánský (*Astacopsis gouldi*) z oblasti Tasmánie (Hamr, 1992). Zvláštností čeledi *Parastacoidea* je i skutečnost, že z taxonomického hlediska jsou vývojově mnohem starší než taxony ze severní polokoule (Shull a kol., 2005).

Čeleď *Parastacidae* má rovněž značný akvakulturní význam. Mezi hlavní chované druhy z této čeledě patří především rod *Cherax* (*quadricarinatus*, *destructor* a *tenuimanus*). Je to dáno především jejich velikostí, kvalitou masa, snadnou reprodukcí a nízkými nároky na kvalitu chovu (Jones, 1989; Thompson a kol., 2005).

S chovem těchto druhů se započalo již v 70. letech minulého století, avšak díky selekčnímu programu v roce 1998 se jejich produkce masově zvýšila (Jerry a kol., 2005).

2.4.3 *Cherax destructor*

2.4.3.1 Zařazení

Říše: Živočichové – Animalia

Kmen: Členovci – Arthropoda

Třída: Rakovci – Malacostraca

Řád: Desetinožci – Decapoda

Nadčeleď: Parastacoidea

Čeleď: Parastacidea

Rod: *Cherax*

Druh: *Cherax destructor*

2.4.3.2 Popis a biologie druhu

Cherax destructor (česky označován také jako „rak ničivý“) je patrně jedním z nejznámějších a nejvýznamnějších raků z celé oblasti Austrálie.

Tento druh raka patří mezi středně velké druhy čeledi *Parastacidae*. V dospělosti může měřit okolo 15 cm a vážit až 150 g, výjimečně i 300-350 g. V ideálních podmínkách se může dožít 3-6 let (Kozák a kol., 2013).

Mezi jeho charakteristické znaky patří především hladká hlavohruď, která nese pouze jeden pár suborbitálních lišt. Tyto lišty jsou typicky protáhlé a vybíhají do dvou kýlů, na povrchu hlavohrudi jsou dobře rozeznatelné. Rostrum je krátké s širokou bází, bez výrazné střední rýhy. Zuzující se okraje lišty jsou rovněž hladké. Okolí týlní brázdy je charakteristické absencí trnů. Rak ničivý má značně vyvinutá klepeta, jejichž povrch je rovněž hladký (Hutchings, 1988; Mosig 1998).

Zbarvení povrchu těla je poměrně variabilní a velmi záleží na prostředí, ve kterém rak žije (Obr. 2). Jeho přírodním zbarvením jsou odstíny béžové až černé. Spodní strana klepet je většinou šedavá až bílá. Za zmínku jistě stojí i jedinci, kteří mohou nabývat modrého, žlutého nebo i červeného zbarvení. Tyto barevné mutace jsou vyhledávány především akvaristy (Withnall, 2000; Holdich a kol., 2006).

Původní areál rozšíření zasahuje především východní oblast Austrálie, konkrétně Victoria, Nový Jižní Wales a Jižní Austrálie (Holdich a kol., 2006). V roce 1936 byl introdukován za účelem akvakultury do západní Austrálie (Morrissy a Cassells, 1992). Během chovu však někteří jedinci unikli do volné přírody, kde obsadili nové biotopy v podobě řek, přehradních nádrží a podobně. Výsledkem této nezáměrné introdukce bylo postupné vytlačování původních druhů raků (například *Cherax quinquecarinatus*), včetně destrukce původních vodních ekosystémů (Jasinska a kol., 1993). K destrukci vodních ekosystému zároveň napomohla i jejich značná agresivita a teritorialita (Seebacher a Wilson, 2006). Do španělských vod byl rak ničivý introdukován v roce 1983. Tyto populace byly však postupně vyhlazeny račím morem, na který je rak ničivý extrémně citlivý (Holdich a kol., 2006). Další introdukce tohoto druhu za akvakulturními účely byla provedena i v Itálii, kde se rovněž uniklým rakům povedlo založit reprodukcující se populaci (Scalici a kol., 2009). Kozák a kol. (2013) poukazuje na skutečnost, že díky své adaptabilitě a snadné dostupnosti může představovat pro teplejší oblasti Evropy závažný problém.

Tento druh raka dokáže obývat různé typy biotopů. Byl nalezen jak v různých pramenných oblastech, tak i v řekách. Nejčastěji byli však jedinci raka ničivého nalezeni ve stojatých vodách, a to především v různých zavlažovacích kanálech, nádržích i rybnících, přičemž dává přednost nádržím, které mají zarostlý litorál a bahnitě dno (Holdich a kol., 2006). Často obývá lokality, jako jsou bažiny, které v letních měsících trpí přehříváním a následným vysycháním. Tyto extrémní podmínky je rak ničivý schopen přežít díky schopnosti využívat částečně atmosférický kyslík (Morris a Callaghan, 1998). Zároveň je tento druh odolný vůči změnám chemismu vody. Proti vysychání habitatu a s tím spojenými problémy se u raka ničivého vyvinula schopnost hloubit nory, které dosahují úrovně podzemní vody. V těchto norách je schopen přežít až po dobu několika let (Johnston a Robson, 2009). Díky těmto vlastnostem je tento druh schopen obývat široké spektrum vodních habitatů (Jasinska a kol., 1993).

Raci jsou obecně omnivorními druhy, přičemž díky svým potravním nárokům jsou schopni obsadit více trofických úrovní, bohužel při jejich přemnožení může dojít k poškození potravních vztahů (Lodge a kol., 1994). Rak ničivý má žaludek uzpůsobený k drcení měkkých materiálů, z toho důvodu tento rak upřednostňuje živočišné bílkoviny

(ryby, měkkýši, larvy hmyzu) a řasy (Linton a kol., 2009). V případě jejich nedostatku slouží jako potrava detrit a případně vyšší rostliny (Beatty, 2006).

Nástup pohlavní dospělosti začíná již velmi brzy. V případě, že má rak ničivý ideální podmínky, může pohlavně dospět již ve stáří necelého 1 roku, při hmotnosti okolo 20 g (Holdich a kol., 2006). K páření dochází při zvýšení teploty vody nad 15 °C a při prodlužování světelné periody. Samice v prvním roce života jsou schopné naklást v průměru 300–500 ks vajíček, se zvyšujícím se věkem a velikostí počet nakladených vajíček roste. Withnall (2000) uvedl, že dospělé samice jsou schopny naklást až 1 500 ks. Délka inkubační doby je variabilní a závisí na teplotě vody, v průměru se délka inkubace pohybuje mezi 30-40 dny (Morrissy, 1990). Během inkubační doby samice o vajíčka pečuje a poškozená či zaplísněná odstraňuje (Sandeman a Sandeman, 1990). Ráčata se osamostatňují ve třetím vývojovém stádiu. V tomto stádiu se ráčata živí planktonem, který dokáží velmi aktivně lovit (Meakin a kol., 2008).

Další růst rácat je rychlý, v akvakultuře dosahují tržní velikosti již ve stáří 1 roku a hmotnosti okolo 90-100 g (Leland a kol., 2012). Pro akvakulturní účely je výhodnější produkce celosamčích populací z důvodu jejich rychlejšího růstu a vyššího podílu masa v kletkách. Produkce celosamčích populací je výhradně zajišťována ručním sexováním juvenilních jedinců (Rodgers a kol., 2006). Pro rychlejší růst byla u raka ničivého rovněž testována i hybridizace s dalšími druhy z rodu *Cherax* (Lawrence a Morrissy, 2000).



Obr. 2 Rak ničivý (*Cherax destructor*) (Foto: M. Hlávková).

2.4.4 Použití raků v testech toxicity s triaziny

Raci jsou všeobecně řazeni mezi ekologicky velmi důležité bentické organismy (Momot, 1995). Jejich význam spočívá v tak zvaném polytrofismu, což znamená, že svými potravními nároky obsazují různé úrovně potravního řetězce, přičemž se sami stávají kořistí. Raci jsou rovněž důležitými organismy pro přenos energie mezi vodními a suchozemskými potravními sítěmi. Díky výše popsaným vlastnostem se raci stávají vhodným modelovým organismem, na kterém lze pozorovat výsledný stav a zatížení vodních ekosystémů. Zároveň se raci stávají ideálním organismem pro testování toxických účinků pesticidů, neboť raci využívají pro vyhledávání potravy nebo partnera primárně čichového vjemu, který je účinky pesticidů značně ovlivňován a má vliv na celkové chování (Belanger a kol., 2016). Z důvodu ochrany původních druhů raků se v České republice pro testy toxicity využívají primárně nepůvodní a invazní druhy (Kozák a kol., 2013). Takovým příkladem je studie Velíška a kol. (2014), který se zabýval účinky prometrynu na vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*). Podobně Stará a kol. (2014) popsala chronické působení prometrynu na raku červeném (*Procambarus clarkii*). Chování raka druhu *Orconectes virilis* po expozici atrazinem popsala i Belanger a kol. (2016).

2.5 Oxidativní stres a poškození organismů

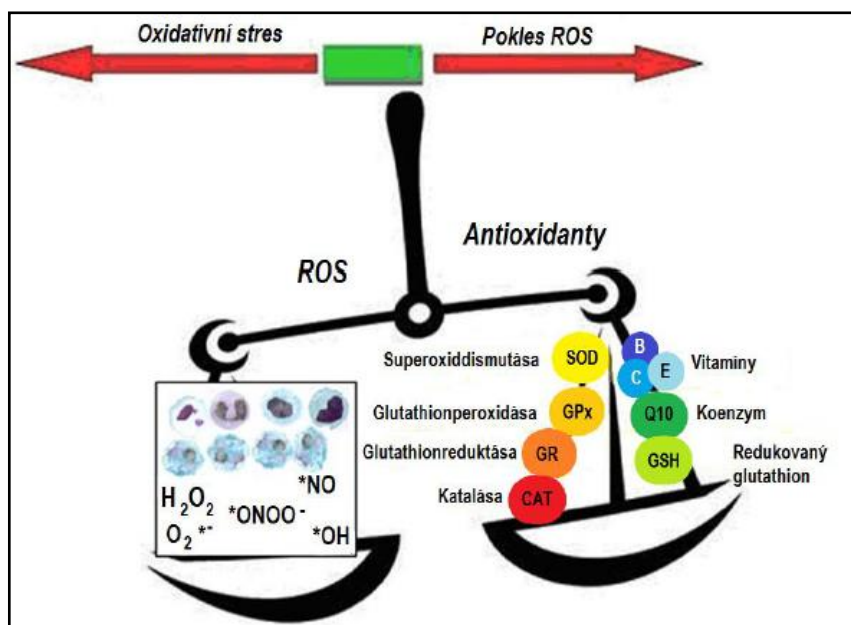
Vodní organismy jsou v současné době stále důležitějšími bioindikátory úrovně znečištění vodního prostředí. Jejich význam spočívá především ve schopnosti vypovídat o úrovni znečištění změnami na úrovni oxidativního stresu a antioxidantů (Livingstone, 2001). Jak uvádí Parihar a kol. (1997) rozpuštěný kyslík a teplota jsou ve vodních ekosystémech velmi důležité proměnné, které mají s vysokou pravděpodobností vliv na probíhající oxidační procesy. Van der Oost a kol. (2003) uvádí, že široké spektrum nepříznivých vlivů, jako jsou například xenobiotika, způsobují změnu oxidativního stresu nejen u člověka, ale i u dalších organismů včetně těch vodních.

Oxidativní stres je v práci Azzihho a kol. (2004) popsán jako nerovnováha mezi antioxidantními enzymy a oxidačními činidly (Obr. 3). Tato nerovnováha má afinitu k oxidačním činidlům a v důsledku toho může následně docházet k destrukci buněk, poškození organismu nebo smrti. Nerovnováha způsobuje v tkáních vyšší produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS = reactive oxygen species;

Toyokuni a kol., 1995). Reaktivní kyslíkové radikály vznikají při redukci molekulárního kyslíku a množství je usměřováno antioxidantními systémy. Jako ROS můžeme označit superoxidové anionty (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3) a v neposlední řadě také hydroxylové anionty (OH^-). Nebezpečí ROS spočívá ve schopnosti reakce s důležitými makromolekulami v buňkách. Van der Oost a kol. (2003) uvádí, že ROS může ovlivnit lipidní peroxidaci, oxidaci proteinů, narušení rovnováhy buňky a potlačení aktivity enzymů (Winston a Di Giulio, 1991).

V oblasti výzkumu volných radikálů je nejčastěji používanou metodou peroxidace lipidů. Lushchak (2011) ve své práci uvedl, že zmíněná metoda je založena na principu schopnosti oxidace lipidů za tvorby peroxidů. Velmi často je tento princip aplikován na organismy, a to zejména na vodní, protože jako substrát pro oxidaci se využívá vysoké množství lipidů s polynenasycenými zbytky mastných kyselin obsažených v jejich tkáních. Pomocí Hermesem-Limou metodou fermentace bylo umožněno charakterizovat vývoj oxidativního stresu u některých druhů ryb (Lushchak a kol., 2005a, 2005b, 2007) a dienní konjugáty v tkáních zlatých karasů (*Carassius auratus*; Lushchak, 2001). Nejčastěji se však používají metody, které jsou založeny na změření konečných produktů peroxidace lipidů. Tyto konečné produkty jsou dynamickými parametry, poněvadž mohou být katabolizovány nebo mohou vzájemně ovlivňovat další buněčné složky (Toroser a kol., 2007). I přesto princip metody peroxidace lipidů je doporučován za spolehlivý, reprodukovatelný, nenákladný a snadno použitelný při analýze oxidativního stresu u vodních organismů.

Oxidativní stres má negativní vliv na všechny buněčné orgány. Nejčastěji se projevuje v hepatopankreatu, žlázech a svalech raků a je měřen pomocí lipidní peroxidace a antioxidantních biomarkerů. Největší nebezpečí podle Finkela a Holbrooka (2000) však představuje poškození mitochondrií, které v důsledku poškození produkují vyšší množství ROS, následkem čehož dochází k vyšší úrovni poškození DNA. Výše zmíněné poškození je aplikováno i na vyšší úrovni, kdy dochází nejen ke ztrátě funkcí orgánů, ale i celých orgánových soustav (Lushchak, 2011).



Obr. 3 Zobrazení rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty (upraveno podle Amira a Adly, 2010).

2.5.1 Biomarkery

Biomarkery jsou označovány jako tak zvané varovné signály organismů, které jsou schopné vyvolat odpověď na stresory, které mohou být fyzikálně-chemického, toxického, biologického, antropogenního nebo přírodního původu (Buchelli a Fent, 1995). Dále mohou být biomarkery definovány jako změna biologické odpovědi v závislosti na expozici nebo negativnímu účinku toxické látky v životním prostředí (Van der Oost a kol., 2003).

Podle NRC (National Research Council, 1987) je schopnost měření biomarkerů v tělesných tekutinách, buňkách anebo tkáních, důležitá pro identifikaci změn v biochemických nebo buněčných modifikacích. V environmentální souvislosti jsou biomarkery hodnoceny jako ukazatele, jež jsou citlivé na toxické látky. Při zjištění změn v jejich hodnotách biomarkery dokládají nejen vstoupení toxických látek do organismu, ale i následnou distribuci mezi tkáněmi a v neposlední řadě vyvolání toxického účinku (McCarthy a Shugart, 1990).

Rozdělení biomarkerů (Van der Oost a kol., 2003):

- Biomarkery expozice – využívají se k potvrzení nebo zhodnocení expozice danou látkou či skupinou látek u jedinců nebo populací.
- Biomarkery účinku – využívají se jako doklad o předklinických změnách, nepříznivých účincích v závislosti na absorbované látce a její expoziční době.
- Biomarkery citlivosti – objasňují rozdíly mezi odpověďmi mezi jednotlivými organismy na expozici dané toxické látky.

Schopnost biomarkerů poskytnout rychlou odpověď organismu a poukázat na dostupnost toxikantu patří mezi nezaměnitelné výhody v jejich používání, protože většina stresových situací, které se naskytou, posléze vyvolává kaskádu odpovědí, jež mohou být považovány jako biomarkery. Naproti tomu špatné aplikace a interpretace odpovědí biomarkerů zapříčiní vznik chybných závěrů. Navíc je nutné podotknout, že výsledky odpovědí u jednoho druhu nemusí souhlasit s odpověďmi u jiných druhů. Stejně tak by se měla dodržovat opatrnost při využívání laboratorních dat ve vnějším prostředí (Van der Oost a kol., 2003).

2.5.2 Biomarker oxidativního poškození tkání

U vodních organismů vystavených cizorodým látkám se jako důsledek oxidativního stresu (poškození) nejčastěji používá metoda stanovení míry lipidní peroxidace, dále se využívá i míra peroxidace proteinů, oxidativní poškození DNA a podobně (Paskerová, 2009).

- Lipidní peroxidace

K lipidní peroxidaci, také nazývanou jako oxidace nenasycených mastných kyselin, dochází v případě, kdy funkce antioxidačního systému není dostačující. Jak uvádí Cazaneva a kol (2006) a Van der Oost a kol., (2003), při lipidní peroxidaci dochází k reakci mezi ROS s buněčnými nenasycenými mastnými kyselinami obsaženými v buněčných membránách. Poté dochází k narušení a změně propustnosti membrán pro ionty. Toto narušení může mít fatální vliv na změny struktury nejen celých buněk, ale také tkání a orgánů. Změny koncentrace lipidní peroxidace jsou měřeny pomocí TBARS, kdy dochází k reakci produktů lipidní peroxidace, jako je přirozeně

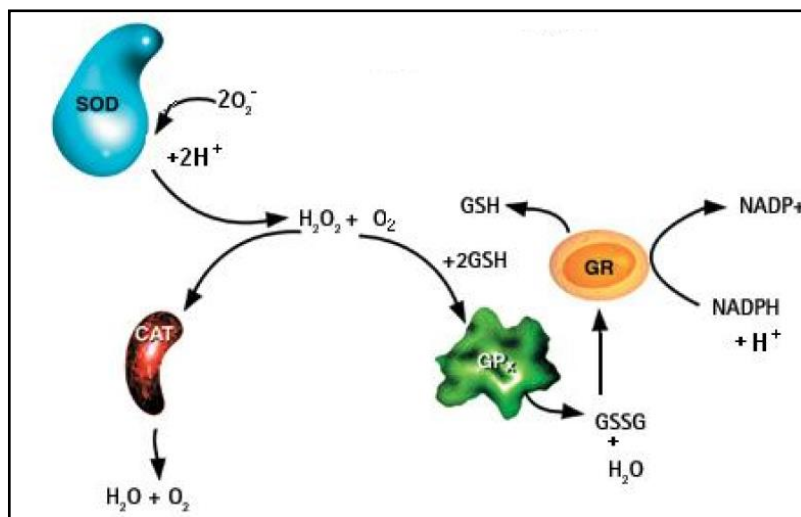
se vyskytující indikátor malondialdehyd (MDA), s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) (Cazaneva a kol., 2006).

2.5.3 Antioxidační biomarkery

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře před 2,5 miliardami let pravděpodobně způsobil stres, jenž patrně přežili jen takové druhy organismů, u kterých došlo k vyvinutí mechanismů, jež dokázaly ochránit organismy před vysoce reaktivními prvky. Díky tomu jsou organismy schopny využívat 3 typy ochrany (Štípek., 2000).

- Prvním nejbezpečnějším mechanismem je schopnost bránit se tvorbě vysokého množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí regulace aktivity enzymů nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic.
- Druhý mechanismus je založen na principu zachytávání a odstranění již vzniklých radikálů.
- Třetí možnost antioxidační ochrany je založena na reparačních mechanismech poškozených biomolekul. Příkladem reparačních enzymů může být oprava poškozené DNA.

Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které jsou založené na vzájemné souhře. Jsou schopné se navzájem doplňovat, regulovat aktivitu látek produkujících volné radikály a také transformovat nebo snižovat reaktivitu volných radikálů, a to i s ostatními nitrobuněčnými neenzymovými antioxidanty. Antioxidanty by se měly vyskytovat v rovnováze s látkami produkujícími volné radikály (Obr. 4) (Racek, 2003; Lushchak, 2011).



Obr. 4. Zobrazení vzájemného působení antioxidantních enzymů (upraveno podle Amira a Adly, 2010).

Antioxidanty není jednoduché rozdělit pouze podle jednoho kritéria, protože většinou se jednotlivá stanoviska překrývají. Existují takzvané přirozené antioxidanty, což jsou látky, které jsou živé organismy schopné sami vyprodukovat anebo je přijmout v potravě. Další skupinou jsou hydrofilní antioxidanty. Ty dělíme na enzymové, kam řadíme superoxid dismutázu (SOD), katalázu (CAT), peroxidázy – například glutathion peroxidázu (GPx), glutathion reductázu (GR). Jako neenzymový antioxidant je považován glutathion (GSH) společně s β – karotenem (vitamin B), kyselinou askorbovou (vitamin C), α -tokoferolem (vitamin E), ubichinolem (koenzym Q10), kyselinou močovou, melatoninem, polyfenolickými antioxidanty, antioxidanty s přechodnými kovy a dalšími. (Racek, 2003). Většina zmíněných látek se v organismech nachází v závislosti na příjmu potravy, ve které jsou obsaženy, jelikož buňky nemají schopnost dané látky samovolně vytvářet (Lushchak, 2011).

2.5.3.1 Enzymové antioxidanty

- Kataláza – CAT

Katalázy čili H_2O_2 oxidoreduktázy jsou enzymy, které ve svých strukturách obsahují čtyři tetraedicky uspořádané podjednotky, které obsahují porfyrinové skupiny s Fe^{3+} (Šípek a kol., 2000) nebo atomy manganu, které mají významný vliv na jejich reaktivitu. Klíčová funkce katalýzy CAT spočívá ve štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík v peroxizomech, přičemž oproti peroxidázám CAT působí na peroxid vodíku

ve vysokých koncentracích (Aebi, 1984). Nejvyšší aktivita CAT v buňkách živých organismů se nachází v mitochondriích, cytoplazmě erytrocytů (Gaetani a kol. 1996), ale také v peroxisomech hepatocytu (Zamocky a kol., 2008). Význam pro organismy je zřejmý, díky CAT jsou buňky chráněny před toxickými vlivy vyšších koncentrací peroxidu vodíku (Racek, 2003).

- Superoxid dismutáza – SOD

Superoxid dismutáza je základním antioxidačním enzymem, který je schopen odstranit volný radikál. Tento radikál vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku a je jedním z nejčastěji se objevujících radikálů u živých organismů (Babior, 1997; Bowler a kol., 1995). Superoxid sám o sobě není příliš reaktivní, to znamená, že není ani nebezpečný. Nebezpečí u superoxidu je spojeno s možností vzniku dalších škodlivějších forem kyslík. Mezi tyto formy například patří hydroxylový radikál, který je v důsledku velmi krátkého biologického poločasu rozpadu nemožné pomocí nějakého mechanismu odstranit (Racek, 2003). Jak uvádí Paoletti a Mocali (1990) SOD se vyskytují u všech aerobních organismů a spadají do skupiny metaloenzymů, které ve své struktuře obsahují ionty kovů (Mn^{2+} , Fe^{2+} u prokaryotických řas a protozoí, Cu^{2+} , Zn^{2+} u živočichů) zodpovídající za reaktivitu SOD. Funkce SOD je založena na katalýze přeměny reaktivních superoxidových radikálů na molekulární kyslík a peroxid vodíku, který je následně za pomoci enzymů katalázy a glutathion peroxidázy detoxikován (Van der Oost a kol., 2003).

- Glutathion S-transferáza - GST

Glutathion S-transferázy jsou primárně rozputstnými multifunkčními enzymy, které se nacházejí zejména v cytosolické frakci jater (Ballantyne a kol., 1999). Jsou to enzymy II. fáze detoxikace a katalyzují konjugaci redukovaného glutathionu s nukleofilními xenobiotiky vstupujícími do organismu (Carlberg a Mannervik, 1975). Podle Ballantyne a kol. (1999) je možné díky aktivitě glutathion S-transferázy sledovat citlivost různých druhů ryb k chemické karcinogenezi.

- Glutathion reduktáza - GR

Princip glutathion reduktázy spočívá ve schopnosti katalyzovat přeměnu oxidované formy glutathionu na redukovanou formu za přítomnosti nikotinamid adenin dinukleotid

fosfátu (NADPH). Tím dochází k udržení rovnovážného stavu mezi formami glutathionu (Van der Oost a kol., 2003; Voet a Voet, 2004).

2.5.3.2 Neenzymové antioxidanty

Neenzymatické antioxidanty lze rozlišit na přímé a nepřímé. Přímě působící antioxidanty jsou nezastupitelné během počáteční obrany v boji s oxidativním stresem (Racek, 2003).

- Glutathion - GSH

Glutathion je nejvýznamnějším intracelulárním neenzymovým antioxidantem. Je to tripeptid vyskytující se buď v redukované formě (GSH), nebo oxidované (GSSG). Tento tripeptid se účastní jak v detoxikačních, tak i metabolických a transportních procesech (Voet a Voet, 2004). Hlavní funkce glutathionu je založena na ochraně bílkovin se sulfhydrylovými (-SH) skupinami (Cardoso a kol., 1998). Spear a Aust (1995) uvádí, že se GSH neprojevuje jen v cytoplasmě, ale také před oxidačním poškozením DNA uložené v buněčném jádře. Dále se GSH podílí nejen na odstranění peroxidu vodíku a lipidových hydroperoxidů, ale také při reakcích, kde se jako katalyzovaný enzym využívá glutathion S-transferáza. Jde o detoxikační reakce zahrnující likvidaci produktů při lipoperoxidaci (Racek, 2003; Lushchak, 2011).

2.5.4 Biochemický profil hemolymfy

Biochemické vyšetření krve u ryb nebo hemolymfy u raků se stalo neodmyslitelnou součástí při celkovém vyšetření zdravotního stavu (Doubek a kol., 2003; Hawkins a Mawdesley-Thomas, 2006). Jak uvádí Thrall (2004) a Pimpao a kol. (2007) provedený biologický profil nám demonstruje jedny z nejzákladnějších informací o procesech ve vnitřním prostředí organismů. V rámci všech laboratorních vyšetření při stanovení biochemického profilu poskytuje 60-70 % informací o testovaných organismech (Masopust, 2000).

Vnitřní stav organismu je podle Sala-Rabanala a kol. (2003) ovlivněn působením jak exogenních faktorů jako je teplota vody, koncentrace kyslíku, sezónní cykly v přírodě a dalšími., tak i faktory endogenními kam řadíme druh ryby, věk, pohlaví, zdravotní stav, reprodukční cyklus a jiné. V porovnání s teplokrevnými živočichy mohou výše zmíněné faktory mít neblahý vliv na vysokou variabilitu biochemických

ukazatelů (Lusková, 1996; Svobodová a kol., 2005). Při hodnocení výsledků akutních a chronických testů toxicity je využití biochemického vyšetření plazmy nepostradatelné (Gallardo a kol., 2003). Zároveň pokud některé orgány nevyklučují nebo nesyntetizují důležité látky správně, například v důsledku závažného poškození (hepatopankreas nebo játra), může to mít následně implikaci na snížení některých biochemických faktorů v krvi nebo v hemolymfě zvířat, která byla vystavena působení pesticidu (Banaee, 2010).

Sledované parametry biochemického vyšetření krve

O biochemických parametrech hemolymfy raků po expozici pesticidy zatím není provedeno mnoho studií, které by přesněji popisovaly, jak jsou zmíněné parametry ovlivněny, a proto vycházíme z parametrů ryb (Kolářová a Velíšek, 2012).

- Glukóza - GLU

Hlavním zdrojem energie u všech organismů je glukóza. Její zvýšení koncentrace v krvi ryb je indikátorem stresu. Oproti tomu výrazné snížení hodnoty GLU v krvi pak indikuje akutní selhání jater zapříčiněné akutním vyčerpáním glykogenu (Svobodová a kol., 1986).

- Celkové proteiny - TP

Koncentrace celkových proteinů zahrnuje všechny bílkoviny. U zdravých organismů do TP řadíme hlavní jednoduchou složku nazývanou albumin (ALB) se zbývajícími alfa, beta a gama globuliny (GLOB). Při stanovování TP je sledováno možné poškození funkce ledvin a jater u ryb (Kolářová a Velíšek, 2012). Jak uvádí Walmsley a kol. (1992) zvýšená hodnota TP indikuje poškození buněk jater a ledvin. Oproti tomu podle Velíška a kol. (2008) snížení hodnoty TP má za následek dlouhodobý průběh infekce nebo otravy například pesticidy na bázi triazinů.

- Albuminy - ALB

Syntéza ALB probíhá především v játrech a ta jsou tvořena z 40-60 % plazmatickými bílkovinami. Význam ALB je založen na regulaci osmotického tlaku a transportu metabolických produktů, iontů, hormonů. Za podmínky, že ALB unikne a dostane se do mezibuněčných prostor, je to odpověď organismu na prožité trauma.

Při stanovování ALB je sledováno možné poškození funkce jater a ledvin (Svobodová a kol., 1986).

- Globuliny - GLOB

Stanovení koncentrace GLOB bývá prováděno například oddělením albuminu od celkového proteinu. Zvýšená koncentrace GLOB poukazuje na probíhající zánětlivé procesy (Kaplan a Pesce, 1989).

- Amoniak - NH₃

Je výsledným produktem katabolického produktu trávení a metabolismu bílkovin a je značně toxický. Hladina NH₃ v krevní plazmě je variabilní a působením vnějších a vnitřních faktorů je intenzivně ovlivňována. Zvýšené hodnoty NH₃ jsou vypovídajícím indikátorem možného selhání funkce jater nebo metabolických defektů amoniaku v Krebsově cyklu (Svobodová a kol., 1986).

- Triglyceridy - TAG

Jsou produkovány v játrech, a to zejména jako karbohydráty poskytující sekundární zdroj energie, a navíc jejich přítomnost bývá obsažena v předkládaném krmivu. Triglyceridy jsou součástí tukové tkáně, a proto je jejich stanovení založeno na zjišťování abnormality lipidového metabolismu (Colombo, 1994).

- Aspartát aminotransferáza - AST

Vyskytuje se převážně v mitochondriích a cytoplazmatické tekutině a je nejaktivnější hlavně ve svalových buňkách a v játrech. Uvolnění mitochondriálního AST je doprovázeno těžším poškozením buněk, které narušují i mitochondriální membrány. Výrazně zvýšené hodnoty AST upozorňují na nekrózy jaterního parenchymu (Folmar, 1993).

- Alanin aminotransferáza - ALT

Jde o cytoplazmatický enzym nacházející se zejména v cytoplazmě jaterních buněk. Do oběhu se dostává vyplavováním při zvýšené permeabilitě hepatocytární membrány. Intenzivní zvýšení aktivity ALT poukazuje na toxické poškození jater (Neff, 1985).

- Laktát dehydrogenáza - LDH

Jedná se o všudypřítomný enzym v cytoplazmě. Stanovení aktivity LDH poukazuje na poškození jaterních buněk, kosterní a srdeční svaloviny a na možnost výskytu některých nádorových onemocnění (Svobodová a kol., 1986).

- Kreatinkináza - CK

Jedná se o enzym, který katalyzuje reverzibilní fosforylaci kreatinu na kreatinfosfát a ten je hlavním zdrojem vysokoenergetického fosfátu využívaného při svalové kontrakci. Kreatinkináza je složena ze dvou podjednotek, a to M (v kosterním svalstvu) a B (v mozku). Maximální aktivity CK je docíleno 6 hodin po poškození tkáně, navíc poločas odbourání je 15 hodin. Změna aktivity pak poukazuje na poškození svaloviny anebo intoxikaci (Svobodová a kol., 1986; Musil, 1991).

- Laktát - LACT

Jedná se o sůl kyseliny mléčné, jež je produktem anaerobní glykolýzy. Aktivita LACT je dána poměrem mezi jeho tvorbou a odbouráváním. Vysoká produkce LACT způsobuje hyperlaktémii, která zapříčiní vznik tkáňové hypoxie a laktátové acidózy. Při běžném působení je LACT zpracováván v játrech. Kumulace LACT ve svalech je příčinou svalové únavy a bolesti (Schneiderka, 2004).

- Vápník - Ca^{2+}

Jedná se o esenciální prvek, který je součástí mnoha tělních systémů. Snížená hladina koncentrace vápníku může mít vliv na onemocnění kosterního aparátu, ledvin, a nakonec i na defekt metabolismu vápníku (Svobodová a kol., 1986).

- Hořčík - Mg^{2+}

Jedná se o prvek, který hraje nezastupitelnou roli při aktivaci enzymů během anabolických a katabolických procesů. Změny hodnot hořčíku se v biochemickém profilu objevují jen mimořádně (Svobodová a kol., 1986).

- Anorganický fosfát - PHOS

Fosfor je prvek, který hraje nezastupitelnou roli v metabolických procesech. Fosfáty jsou součástí pufrujících systémů v tkáňových tekutinách. Změny hladiny PHOS poukazují na těžké poškození ledvin (Svobodová a kol., 1986).

- Alkalická fosfatáza - ALP

Jde o enzym nacházející se v mnoha tkáních, převážně ve výstelkách žlučových cest. Alkalická fosfatáza má vliv na membránový transport, metabolismus glykogenu a syntézu proteinů. Změny v aktivitě ALP charakterizují onemocnění jater a zvýšené hodnoty se pak vyskytují například po podání léků (Bhavan a Geraldine, 2001).

3 Materiál a metodika

Vliv atrazinu na úroveň oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů byl u raka ničivého hodnocen pomocí subchronického testu toxicity. Pokus probíhal 28 dní v akvaristické místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie na Fakultě rybářství a ochrany vod, ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém JU ve Vodňanech.

3.1 Princip a podmínky subchronického testu

Subchronické testy toxicity jsou používány k posouzení vlivu nízkých koncentrací testovaných chemických látek na vodní organismy. Experimentální organismy jsou po určitou dobu vystaveny koncentraci testované látky rozpuštěné ve vodě nebo v jiném rozpouštědle (například DMSO – dimethylsulfoxid). V průběhu konání celého subchronického testu bylo nezbytné pravidelně, v jednotlivých akváriích, sledovat změny v chování a případnou mortalitu raků. Jednou za 24 hodin byly zaznamenávány fyzikálně-chemické parametry vody (teplota, hodnoty pH, množství rozpuštěného kyslíku). Všechny naměřené hodnoty dále zmíněných parametrů byly pravidelně zaznamenávány do protokolů. V průběhu experimentu byla naměřena průměrná teplota $19,13 \pm 0,25$ ° C, pH $8,19 \pm 0,25$, nasycení vody kyslíkem $92,64 \pm 7,36$ %. Pro splnění validity probíhajícího testu byly po jedné hodině a po 24 hodinách před výměnou lázně odebrány vzorky vody z pokusných akvárií. Obsah atrazinu byl měřen pomocí kapalinové chromatografie (LC-MS). Koncentrace atrazinu ve vzorcích odpovídala ± 5 % nominální koncentraci. Zároveň byli raci v pravidelných intervalech krmeni komerčním krmivem (Crabs Natural, Sera GmbH, Německo) a to v dávce, která odpovídala 1 % jejich tělesné hmotnosti.

Délka testu byla stanovena na 28 dní, přičemž raci byli exponováni roztoku atrazinu pouze 14 dní. Po uplynutí prvních 14 dní následovala takzvaná fáze zotavovací. Během zotavovací fáze byli raci vystaveni čisté vodě, bez atrazinu. Tato fáze byla zařazena z důvodu pročištění a regenerace testovaných raků.

3.2 Experimentální materiál

Pro účely experimentu byl použit rak ničivý z čeledi *Parastacidae*, který je nepůvodním druhem na území České republiky, a proto je vhodným druhem pro toxikologické studie. Původní druhy raků vyskytující se na našem území

jsou zařazeni mezi ohrožené druhy. Z toho důvodu jsou chráněni předpisy jak České republiky, tak i předpisy Evropské unie (Kozák a kol., 2011).

Pro tuto studii byli použiti dospělí jedinci raka ničivého (Obr. 5), kteří byli získáni z chovu Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Pro experiment byli vybráni jedinci přibližně stejně velcí, vykazující dobrý zdravotní stav. Před samotným experimentem bylo provedeno jejich individuální měření a vážení.



Obr. 5. Rak ničivý použitý pro experiment (Foto: M. Hlávková).

3.3 Příprava experimentálních akvárií a rozdělení raků do skupin

Pro experiment bylo celkem použito 9 akvárií, každé o objemu 100 l. Do každého z nich bylo přidáno 50 l vody. Z důvodu simulace přírodních podmínek a omezení kanibalismu, byly do jednotlivých akvárií instalovány úkryty v podobě odřezků z plastových biobloků (Obr. 6).

Celkem bylo použito 72 ks raků, ti byli rozděleni do 3 skupin (každá po 8 ks), přičemž každé skupině odpovídaly 3 opakování. První skupinu tvořila kontrola. Tato skupina nebyla vystavena účinkům atrazinu. Pro 2. a 3. skupinu byly již pro atrazin stanoveny jeho přesné koncentrace. Použitý atrazin měl chemickou čistotu 98,9 % a byl pořízen od firmy Sigma Aldrich. Pro přesné dávkování byl z tohoto atrazinu vytvořen roztok, který vznikl smícháním 640 mg čistého atrazinu s 50 ml DMSO (v 1 ml roztoku bylo 12,8 mg atrazinu). Pro test byly pro jednotlivé skupiny použity následující dávky roztoku atrazinu.

1. **Skupina (Kontrola):** Kontrola bez atrazinu.
2. **Skupina (ATRenv):** environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ zjištěná v povrchových vodách České republiky (ČHMÚ). Dávka roztoku atrazinu v množství $26,80 \mu\text{l}$ na 50 l .
3. **Skupina (ATR10%):** koncentrace atrazinu $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, která odpovídá 10 % LC50 pro raka ničivého. Dávka roztoku atrazinu v množství $4,75 \text{ ml}$ do 50 l .



Obr. 6. Na obrázku je zobrazena kontrolní skupina společně s experimentálními skupinami obsahujícími atrazin. Akvária obsahují úkryty v podobě odřezků plastových černých biobloků (Foto: M. Hlávková).

3.4 Odběr vzorků

Vzorky tkání byly odebírány po stanovené expoziční době a to po 7, 14 a po 28 dnech. V období mezi 14 a 28 dnem probíhala zotavovací fáze všech raků v čisté vodě bez testované látky. Z každého akvária byli náhodně odebráni 2 raci (celkově vždy 6 raků z každé posuzované skupiny). Každý rak byl položen do mísy se šupinkovým ledem kvůli zklidnění a částečnému zpomalení jeho životních funkcí. Raci byli poté postupně změřeni pomocí digitálního posuvného měřítka (Obr. 7), následně zváženi na váze typu Mettler toledo (Obr. 8). Průměrná hmotnost raků byla $5,69 \pm 1,61$ gramů a délka hlavohruď činila $25,00 \pm 2,37$ mm.



Obr. 7. Jednotlivé vážení jedinců raka ničivého na váhách Mettler toledo (Foto: M. Hlávková).



Obr. 8. Měření délky a průměrné postorbitální délky hlavohruďi digitálním posuvným měřítkem u raka ničivého (Foto: M. Hlávková).

Následně byli raci umístěni zpět do mísy se šupinkovým ledem. Tentokrát zde byli ponecháni po delší dobu, což vedlo k jejich humánnímu usmrcení. Poté proběhl odběr vzorků hemolymfy, hepatopankreatu, svalů a žaber od každého jedince pro další analýzy (Obr. 9).



Obr. 9. Odběr vzorků hemolymfy, pankreatu a svalu u raka ničivého (Foto: M. Hlávková).

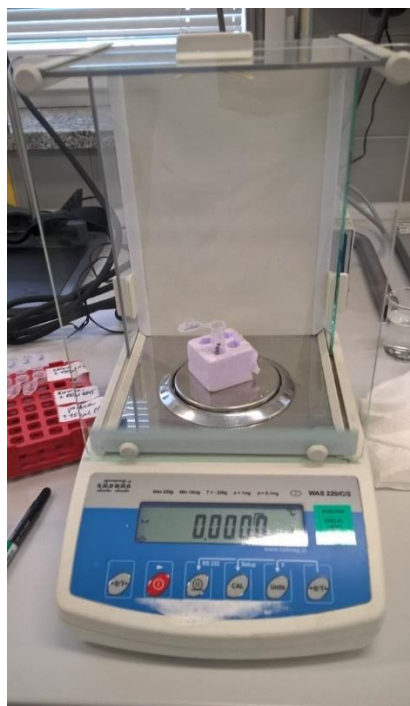
Takto odebrané vzorky byly uchovány v hluboko mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zde byly vzorky ponechány do doby, než proběhly jejich analýzy.

3.5 Metody stanovení oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů

Před samotnými analýzami byly vzorky po vyjmutí z mrazicího boxu ponechány a následně rychle zpracovány na šupinkovém ledu, který zamezil jejich znehodnocení. Jednotlivé vzorky hepatopankreatu, svalu a žaber byly položeny na Petriho misku, kde byly za pomoci skalpelu zpracovány na drobnější části (Obr. 10), které byly následně váženy na analytických vahách typu WAS 220/C/2 společnosti RADWAG (Obr. 11). Takto upravené vzorky byly poté vloženy do předpřipravených plastových zkumavek typu ependorf.



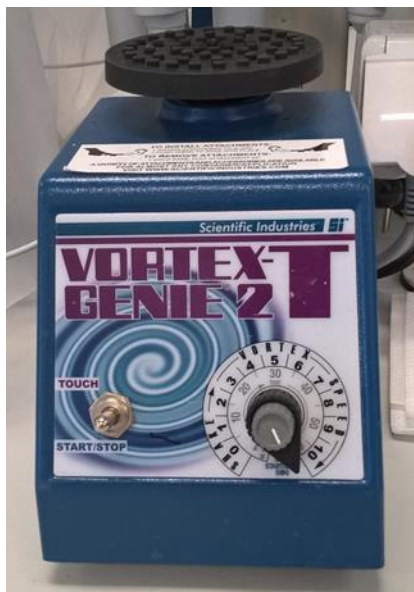
Obr. 10. Zpracování vzorků hepatopankreatu, žaber a svalu na menší části pro další analýzy (Foto: M. Hlávková).



Obr. 11. Vážení zpracovaných vzorků na analytických váhách typu WAS 220/C/2 (Foto: M. Hlávková).

Do zkumavek byl dále přidán fosfátový pufr. Pro stanovení CAT a SOD byl použit 50 mM PP pufr (KH_2PO_4 -fosforečnanu draselného) s obsahem 1 mM EDTA o pH 7,4. Pro ostatní parametry (GST, GSH, GR, TBARS) byl použit PBS pufr (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 % KH_2PO_4). Množství použitého pufru se odvíjelo podle hmotnosti vzorku, to znamená, že ke 100 mg vzorku byl přidán 1 ml pufru. Následně byly vzorky homogenizovány v Ultra Turrax homogenizátoru (od firmy Ika, Německo) po dobu 8 minut. Po homogenizaci byl homogenát rozdělen na dvě části. První část homogenátu byla připravena pro měření lipidní peroxidace (TBARS) a druhá část homogenátu byla rozdělena do předem připravených zkumavek pro měření antioxidantních enzymů a pro stanovení proteinů (typ ependorf). Takto připravené homogenáty vzorků byly zamrazeny na -80°C pro měření jednotlivých anlyz. Před započítím každé analýzy byly vzorky pomalu rozmrazeny na ledu. Po rozmrazení byly vzorky promíchány na Vortexu typu Vortex-Genie 2T (Obr. 12) a centrifugovány na centrifuze Mikro 200R značky Maneko (Obr. 13). Pro analýzu CAT a SOD byla doba centrifugace 30 minut, při 4°C a otáčkách 15 000 rpm. Pro ostatní parametry (GR, GST, GSH) byla doba centrifugace 15 minut, při 4°C a otáčkách 10 000 rpm. Homogenát pro lipidní peroxidace byl bez centrifugace.

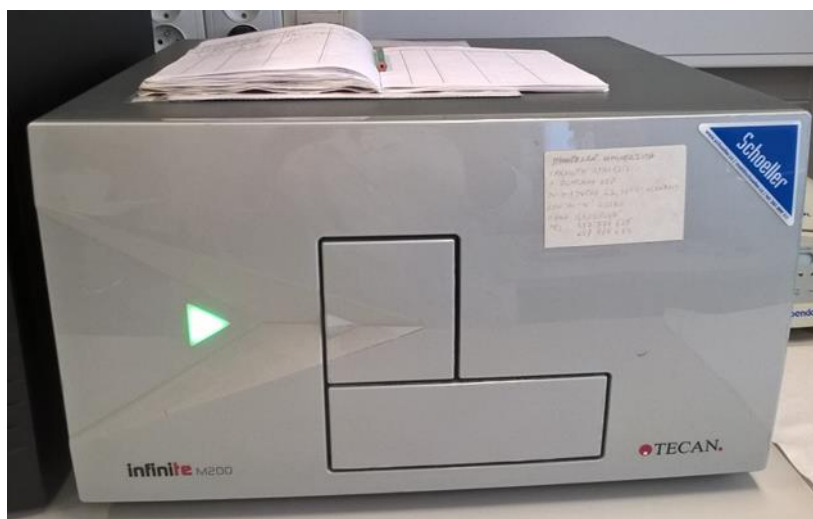
Dále byly vzorky zpracovány podle jednotlivých metod. Všechny metody sledovaných biomarkerů byly měřeny spektrofotometricky za použití mikrotitračních destiček v přístroji Infinite M200PRO (TECAN; Obr. 14).



Obr. 12. Promíchávání vzorků na vortexu typu Vortex-Genie 2T (Foto: M. Hlávková).



Obr. 13. Centrifuga Mikro 200R (Foto: M. Hlávková).



Obr. 14. Měření na přístroji Infinite M200Pro (TECAN) (Foto: M. Hlávková).

3.5.1 Metoda stanovení lipidní peroxidace (TBARS)

Princip

Lipidní peroxidace se stanovuje pomocí TBARS testu (thiobarbituric acid reactive substances, což jsou látky, jež jsou reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou = TBA). Princip této metody je založen na stanovení barevných aduktů, které vznikají během reakcí produktů lipidní peroxidace s TBA. Malonaldehyd (MDA) je sekundární lipidický oxidační produkt lipidní peroxidace, který vzniká reakcí reaktivních forem kyslíku spolu s nenasycenými mastnými kyselinami. Při interakci MDA s TBA vzniká barevný komplex spektrofotometricky měřitelný (Livingstone a kol., 1990; Surai a kol., 1996; Uchiyama a Mihara, 1978).

Výsledná aktivita TBARS byla změřena podle metodiky Lushchak (2005a) spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm.

Chemikálie a reagenty

TCA-BHT (20% kyselina trichloroctová (w/v), 2% butylovaný hydrotoluen (w/v), v poměru 200:1 TCA : BHT)

0,6 M HCl

TRIS-TBA (25 mM TRIS, 100 mM TBA v destilované vodě o pH 7,4)

Standard MDA (0,22 % 1,1,3,3 – tetraethoxypropan (w/v) v 1 % H₂SO₄)

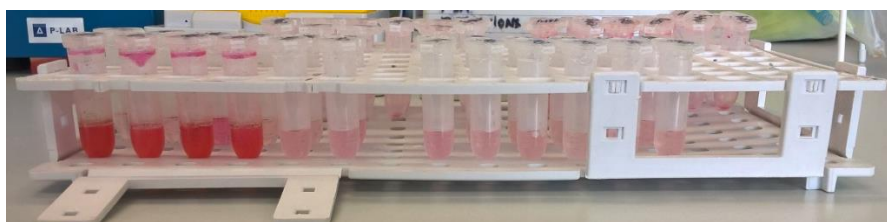
2 mM FeSO₄ v PBS

Postup

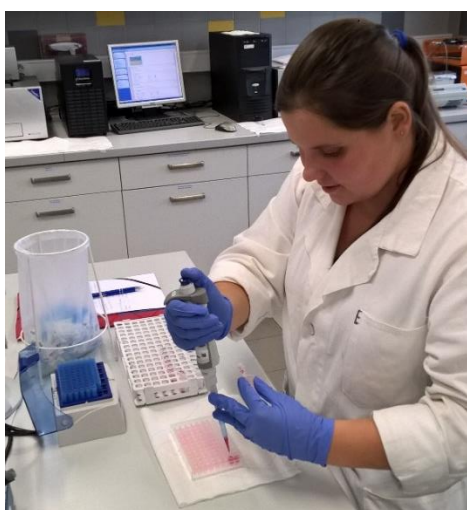
Pro analýzu lipidní peroxidace byl použit necentrifugovaný homogenát vzorku raků. Vzorek o objemu 250 μ l smíchaný s 12,5 μ l 2 mM FeSO₄ byl po dobu 30 minut inkubován v termoboxu (Biological Thermostat BT 50) při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubace byl vzorek zvortexován a k homogenátu byl v poměru 250 μ l : 75 μ l přidán roztok TCA – BHT. Vzorek byl promíchán na vortexu a centrifugován při otáčkách 4000 rpm a 4 °C 20 minut. Poté bylo do zkumavek typu eppendorf odpipetováno 250 μ l supernatantu z centrifugovaného vzorku a k němu bylo přidáno 50 μ l HCl a 200 μ l TRIS-TBA. Připravený vzorek byl 45 minut vařen při 90 °C v termobloku značky Termomixer comfort (Obr. 15). Po uplynutí 45 minut bylo 250 μ l zchlazeného vzorku (Obr. 16) odpipetováno do mikrotitrační destičky (Obr. 17). Výsledné zbarvení bylo měřeno spektrofotometricky nejprve při vlnové délce 550 nm a následně 590 nm po dobu 15 minut.



Obr. 15. Termoblok značky Termomixer comfort (Foto: M. Hlávková).



Obr. 16. Zchlazené vzorky z termobloku (Foto: M. Hlávková).



Obr. 17. Odpipetování zchlazených vzorků do mikrotitrační destičky a následný výsledek TBARS po změření ve spektrofotometru (Foto: A. Stará, vedoucí práce).

Vyhodnocení

Naměřené hodnoty byly vypočteny pomocí rovnice, která byla zjištěná z kalibrační křivky (Tab. 1). Kalibrace byla připravena a změřena za použití standardu MDA. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako $\text{nmol TBARS} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

Tab. 1. Tabulka pro kalibraci TBARS.

Nmol/reakci	100 μ M roztok MDA (μ l)	PBS (μ l)
Blank	0	750
0,5 (tzn. 2 μ M)	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

3.5.2 Metoda stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Princip

Principem této metody podle Ewinga a Janera (1995) je schopnost SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. K produkci superoxidů je použit systém NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a phenazin methosulfonátu (PMS). Tyto superoxidy jsou stanovovány za pomoci NBT (nitrobluetetrazolium), které je po reakci se superoxidy měněno na barevný stabilní formazanový produkt, jež je následně spektrofotometricky měřen.

Aktivita SOD měřená v mikrotitračních destičkách byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm (Marklund a Marklund, 1974).

Chemikálie a reagenty

Homogenizační pufr: 50 mM PP pufr (KH_2PO_4) s 1 mM EDTA (0,68 g KH_2PO_4 , 229,22 mg $\text{EDTA} \cdot 100^{-1}$ ml destilované vody o pH 7,4)

PP pufr: 50mM PP pufr s 0,1 mM EDTA (0,68 g KH_2PO_4 , 2,922 mg $\text{EDTA} \cdot 100^{-1}$ ml destilované vody o pH 7,4)

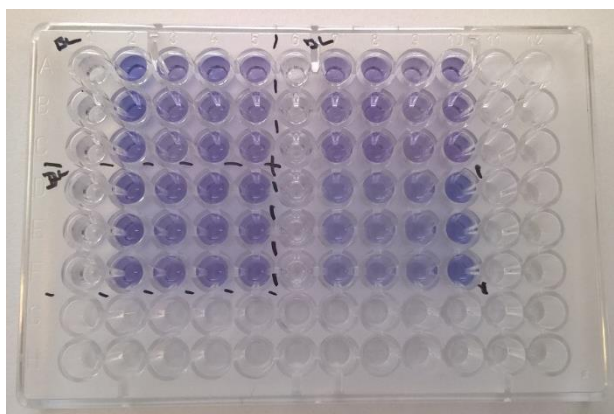
60 μ M NBT (nitrobluetetrazolium) v PP pufru (4,9056 mg $\text{NBT} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ PP pufru)

100 μ M NADH (7,9 mg $\cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ 60 μ M NBT)

35 μ M PMS (phenazine methosulfonate) (1,072 mg $\cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ PP pufru)

Postup

Do mikrotitrační destičky bylo odpipetováno 25 μl supernatantu vzorku (pro blank 25 μl PP pufru) spolu s 200 μl 50 mM PP pufru, NTB a NADH. Celý objem byl důkladně promíchán a následně měřen při vlnové délce 560 nm ve 20 sekundových intervalech po dobu 2 minut. Samotná reakce byla odstartována po přidání 25 μl 35 μM PMS. Po 5 sekundovém protřepání byla změřena kinetika reakce opět při vlnové délce 560 nm ve 20 sekundových intervalech po dobu 5 minut. Analýza se prováděla ve třech opakováních (Obr. 18).



Obr. 18. Výsledek SOD po měření ve spektrofotometru (Foto: M. Hlávková).

Vyhodnocení

V průběhu měření byla sledována inhibice tetrazoliové soli na formazan. Hodnota aktivity SOD byla vyjádřena v $\text{nmol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$\text{SOD aktivita} = \frac{(\text{Směrnice křivky blanku} + \text{směrnice křivky se vzorkem/min}) - \text{směrnice křivky s PMS se vzorkem/min}}{0,679 * 15000 * (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ protein})} * 10^6$$

3.5.3 Metoda stanovení enzymatické aktivity kataláz (CAT)

Princip

Klíčovou funkcí kataláz je katalýza. Tato metoda je založena na schopnosti katalázy přeměnit peroxid vodíku na vodu a kyslík. V průběhu měření je sledován úbytek peroxidu vodíku v důsledku poklesu absorbance směsi vzorku s H_2O_2 v mikrodestičkách na spektrofotometru při vlnové délce 240 nm (Aebi, 1984).

Chemikálie a reagenty

Homogenizační pufr: 50 mM PP pufr (KH₂PO₄) s 1 mM EDTA (0,68 g KH₂PO₄, 229,22 mg EDTA · 100⁻¹ ml destilované vody o pH 7,4)

TRIS EDTA pufr: 50 mM TRIS pufr s 0,1 mM EDTA o pH 7,6 (1,5125 g TRIS, 7,306 mg EDTA · 250 ml⁻¹ destilované vody)

0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufr s 0,1 mM EDTA o pH 7,6 (600 μl 3 % H₂O₂ · 19,8 ml⁻¹ TRIS EDTA pufru)

Postup metody

Do mikrodestiček bylo odpipetováno 50 μl supernatantu z scentrifugovaného vzorku a k tomu bylo přidáno 250 μl 0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS – EDTA pufru s 0,1 mM EDTA. Vše bylo promícháno a ihned měřeno v jednotlivých intervalech. Intervaly byly vždy po 5 sekundách po dobu 1 minuty při vlnové délce 240 nm vždy ve 3 opakováních.

Vyhodnocení

Výsledná hodnota aktivity CAT byla vyjádřena jako směrnice křivky, od níž byla odečtena směrnice blanku a následně vypočtena podle níže zobrazené rovnice. Výsledná hodnota byla vyjádřena jako μmol H₂O₂ min⁻¹ · mg⁻¹ proteinů.

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{39,4 \cdot 10^3 (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})} \cdot 10^3$$

3.5.4 Metoda stanovení redukováného glutathionu (GSH)

Princip

Podle Ellmana (1959) je princip této metody založen na reakci thiolektivní Ellmannovy reagentie (DTNB = 2,2'-dithiobenzoová kyselina) s volnými-SH skupinami za produkce barevného produktu, který je stanovován. Volné-SH skupiny se vyskytují ve vzorcích zbavených proteinů, zejména pak v molekule GSH.

Výsledná aktivita GSH byla změřena spektrofotometricky na mikrotitrační destičce při vlnové délce 420 nm.

Chemikálie a reagentie

TRIS pufr (0,8 M TRIS; 0,02 M EDTA, pH 8,9)

0,02 M DTNB (2,2-5,5,-dithiobenzová kyselina, MW = 396,3) v methanolu

GSH (1mg/ml PBS roztok, MW = 307,3)

TCA (25 % kyselina trichloroctová)

Postup

1. Odstranění proteinů ze vzorku

K 180 μl supernatantu vzorku bylo přidáno 18 μl TCA. Pro kalibraci bylo k 500 μl blanku a GSH standardů přidáno 50 μl TCA (v poměru 10:1). Po smíchání byl obsah vzorku zvortexován a ponechán stát 15 minut při pokojové teplotě 20 °C. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a otáčkách 8 000 rpm.

2. Stanovení GSH

Do mikrotitrační destičky se postupně napipetovalo 190 μl TRIS pufru společně s 50 μl supernatantu z centrifugovaného vzorku a 10 μl DTNB. Takto připravené se promíchaly a nechaly se inkubovat po dobu 5 minut a při teplotě 22 °C. Po dokončení inkubace proběhlo měření vzorků ve 3 opakováních na spektrofotometru při vlnové délce 420 nm proti blanku a na pozadí při 680 nm.

3. Kalibrace

Kalibrace GSH v rozsahu 0,005-0,075 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (s body 0,005-0,0075-0,01-0,015-0,025-0,05-0,075).

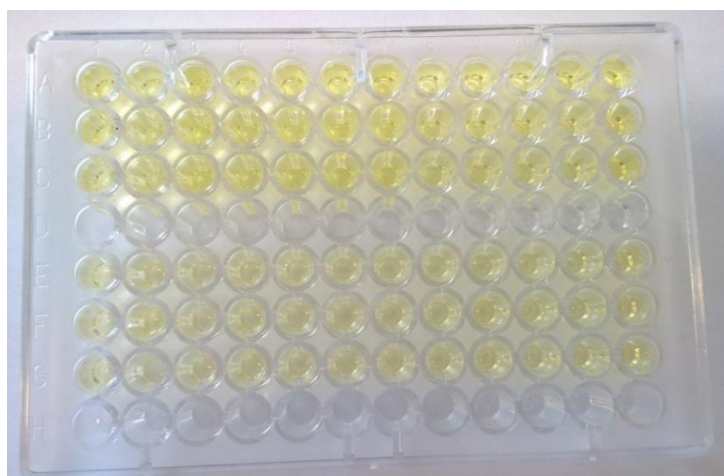
Standart GSH (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS roztoku o MW = 307,3) se 10 krát vyředil na 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS a následně se připraví koncentrační řada (Tab. 2).

Tab. 2 Tabulka pro kalibraci GSH.

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

K 500 μl GSH standardů bylo přidáno 50 μl TCA. Obsah byl zvortexován a ponechán odstát 15 minut.

Následně bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 190 μl TRIS pufru společně s 50 μl standardu a 10 μl DTNB, postup byl dále stejný jako u stanovení GSH ve vzorku/supernatantu (Obr. 19).



Obr. 19.: Výsledek GSH po spektrofotometrii (Foto: M. Hlávková).

Vyhodnocení

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

3.5.5 Metoda stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST)

Princip

Princip této metody je podle Habiga a kol. (1974) založen na detekci konjugátu mezi redukovaným glutathionem a CDNB (1-2,4-dinitrobenzen) - substrátem běžným pro všechny isoformy glutathion S-transferázy.

Výsledná aktivita GST byla změřena spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm.

Chemikálie a reagenty

PBS pufr (0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,29 % Na₂HPO₄·12H₂O; 0,02 % KH₂PO₄ v deionizované vodě, pH 7,2).

10 mM roztok redukovaného GSH (MW = 307,7)

50 mM CDNB (1chloro-2,4 - dinitrobenzen; MW = 202,55) v 96 % ethanolu

Postup

Supernatant vzorku byl nejprve vyředěn s PBS v poměru 1:1 a poté byla tato směs zvortexována. Následně byla tato směs napipetována do mikodestičky 10 µl zředěného a zvortexovaného supernatantu spolu se 180 µl PBS a 10 µl CDNB. Samotná reakce byla odstartována přidáním substrátu 50 µl redukovaného GSH a ihned měřena ve 3 opakováních spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm po dobu 5 minut s 3 sekundovým třepáním před každým měřením.

Vyhodnocení

Celková hodnota aktivity GST byla vyjádřena jako směrnice křivky, od níž je odečtena směrnice blanku a přepočtena dle následující rovnice na nmol·min⁻¹·mg proteinu.

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

3.5.6 Metoda stanovení enzymatické aktivity glutathion reduktázy (GR)

Princip

Hlavním principem této metody je schopnost enzymu glutathion reduktázy katalyzovat přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný (GSH) za spotřebování nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu (NADPH). Podle metodiky Carlberga a Mannervika (1975) byla stanovena aktivita glutathion reduktázy spektrofotometricky měřením oxidace NADPH při vlnové délce 340 nm.

Chemikálie a reagensie

GR pufr (0,1 M KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, pH 7,0)

GSSH (10 mM ve vodě) (MV = 656,6)

NADPH (1 mM v GR pufru) (MV = 833,4)

Postup

Do mikroadestiček bylo postupně napipetováno 80 μl GR pufru, 20 μl NADPH, 20 μl GSSH a nakonec 30 μl destilované vody vychlazené z ledničky. Takto smíchaný roztok byl 20 sekund promícháván na vortexu při pokojové teplotě 25 °C. Po promíchání byla měřena spotřeba NADPH, pokles absorbance při 340 nm bez vzorku po dobu 2 minut. Reakce byla nastartována přidáním 50 μl vzorku a poté bylo provedeno měření při 340 nm v jednotlivých intervalech vždy po 15 sekundách. Doba celkového měření trvala 5 minut a analýza každého vzorku byla měřena ve 3 opakováních.

Vyhodnocení

Molární extinční koeficient NADPH je při 340 nm $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Aktivita GR byla vyjádřena jako počet jednotek na ml: $\text{mU/ml} = \text{nmol NADPH min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

$$\begin{array}{l} \text{Pozadová přeměna} \\ \text{NADPH} \\ \text{- bez vzorku} \end{array} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,4075 * 6220 * (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ protein})} * 10^6$$

$$\begin{array}{l} \text{GR aktivita} \\ \text{- se vzorkem} \end{array} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,5433 * 6220 * (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ protein})} * 10^6$$

3.5.7 Metoda stanovení hladiny koncentrace proteinů

Princip

Hlavním principem stanovení koncentrace proteinů podle metody Lowryho a kol. (1951) je využití Folin-Ciocalteu fenolové reakce za vzniku modře zabarveného komplexu.

Výsledné stanovení koncentrace bílkovin bylo provedeno na mikrodestičkách při vlnové délce 562 nm.

Chemikálie a reagenty

BSA standard (bovinní albumin): P0914-Sigma Aldrich (1mg BSA·ml⁻¹ ampule)

BCA reagent A: Bicinochonic acid solution-Sigma Aldrich (B-9643)

BCA reagent B: Copper(II)sulfate-Sigma Aldrich (C-2284)

0,1 M NaOH

Postup

Do zkumavek typu ependorf s 30 µl rozmrazeného zhomogenizovaného vzorku bylo přidáno 570 µl 0,1 M NaOH a suspenze byla promíchána. Takto připravené vzorky byly ponechány do druhého dne při pokojové teplotě ±20 °C. Další den byla připravena kalibrační řada (Tab. 3). Vyředené vzorky standardu pro kalibraci i vzorky připravené z předchozího dne byly opět zvortexovány a jednotlivě napipetovány po 10 µl vzorku, standardu nebo blanku do mikrodestiček, následně bylo přidáno 200 µl A+B reagentů. Po smíchání byla na titrační destičku přiložena fólie a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut v termoboxu při teplotě 37 °C. Po dokončení inkubace proběhlo měření vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm proti blanku.

Vyhodnocení

Koncentrace proteinů v homogenátu vzorků raků byla vypočtena podle kalibrační křivky (Tab. 3) pro BSA.

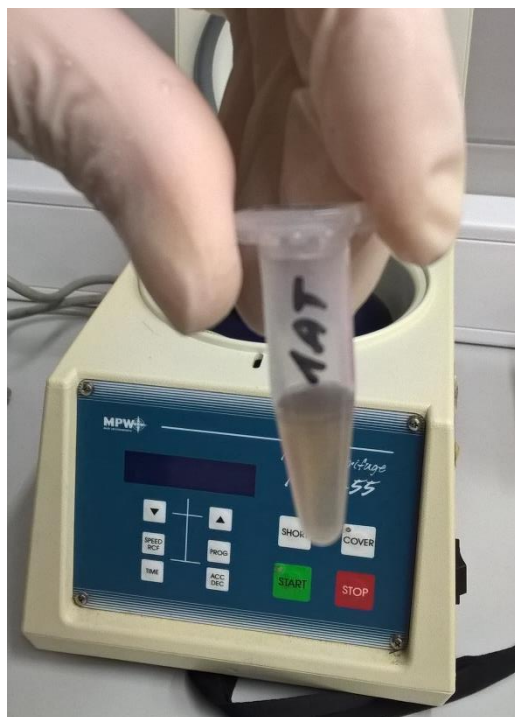
Tab. 3: Tabulka pro kalibraci proteinů.

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA (μl)	0,1 M NaOH (μl)
1000	250	0
800	200	50
400	100	100
200	100	100
100	100	100
50	100	100
25	100	100
12,5	100	100
blank	0	100

3.6 Metoda stanovení biochemického profilu hemolymfy

Pro biochemické stanovení hemolymfy byla pomocí injekční stříkačky odebrána hemolymfa od každého raka z oblasti pod posledním párem kráčivých končetin (Obr. 9). Takto odebrané vzorky hemolymfy byly aplikovány do předem heparinem ošetřených zkumavek typu ependorf, které byly uzavřeny a přibližně po dobu 15 sekund promíchávány z důvodu promíchání vzorku s heparinem. Aby nedošlo ke znehodnocení vzorků, byly takto připravené vzorky uchovávány na šupinkovém ledu. Po provedení veškerých odběrů byly vzorky vloženy do vychazené centrifugy (4°C), ve které byly centrifugovány po dobu 4 minuty při otáčkách 10 000 rpm (Obr. 20). Po centrifugaci byla opatrně ze zkumavek (typ ependorf) pomocí mikropipety odebrána plazma (Kolářová a Velíšek, 2012).

Na biochemickém analyzátoru VETTEST 8008 byly následně stanovovány jednotlivé parametry hemolymfy mezi něž řadíme: GLU, TP, ALB, GLOB, NH_3 , TAG, AST, ALT, LDH, CK, Ca^{2+} , Mg^{2+} , PHOS, ALP, LACT, CREA a AMYL.



Obr. 20 Přípravené vzorky pro stanovení biochemického profilu hemolymfy
(Foto: M. Hlávková).

3.7 Statistické vyhodnocení

Pro porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit software STATISTICA v. 12.0. pro Windows (Statsoft). Před započítím analýzy byly všechny naměřené hodnoty zkontrolovány na normalitu dat (Kolmogorovův-Smirnovův test) a na homoskedasticitu rozptylů (Bartlettův test). Po splnění těchto podmínek byly dále použity T-testy pro stanovení rozdílů mezi exponovanými skupinami v porovnání s kontrolní skupinou. V jiných případech byly použity Mann-Whitney U testy. Nulová hypotéza byla ve všech testech zamítnuta při $\alpha < 0,05$. Všechna data jsou prezentována jako průměr \pm SD.

4 Výsledky

4.1 Chování raků

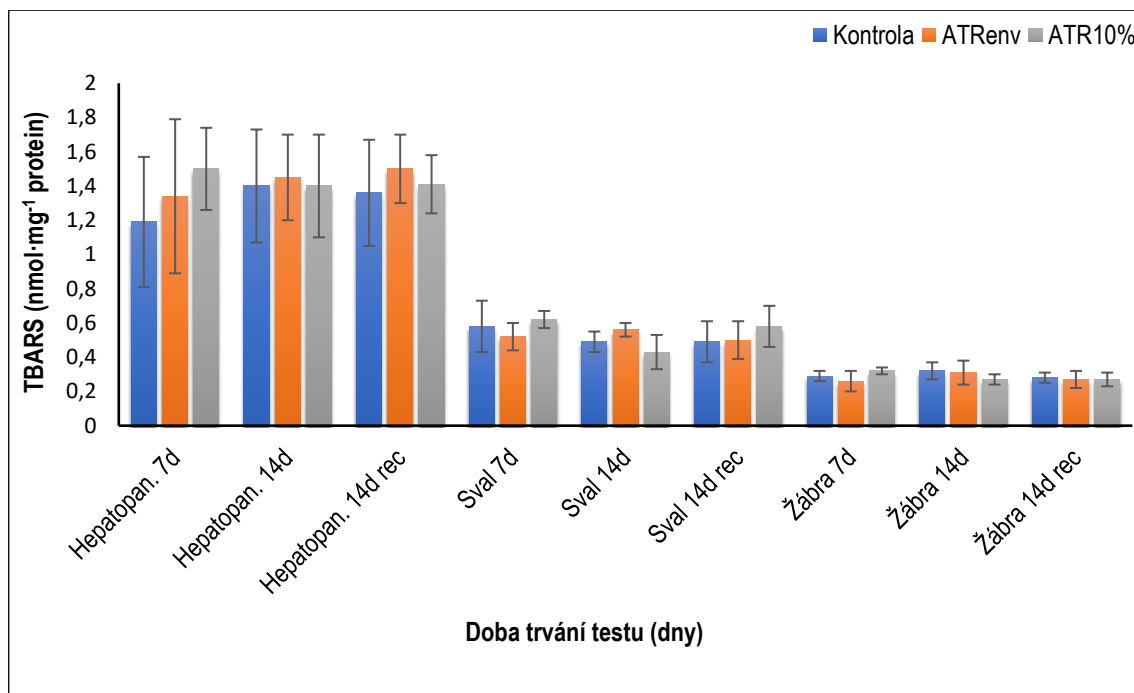
V průběhu experimentu bylo u raka ničivého sledováno chování (příjem krmiva, pohybová aktivita) a mortalita v jednotlivých experimentálních skupinách a v kontrole. Raci, jež byli vystaveni environmentální koncentraci atrazinu vykazovali v porovnání s kontrolou srovnatelné chování, aktivitu i příjem potravy. U raků vystavených koncentraci atrazinu odpovídající 10 % 96LC50 nebyl shledán rozdíl v příjmu potravy v porovnání s kontrolou, avšak naproti tomu byla zaznamenána viditelně nižší aktivita. U této skupiny byla v průběhu expozice zaznamenána 12 % mortalita. Během fáze zotavení nebyl zjištěn úhyn v žádné skupině.

4.2 Biomarker oxidačního stresu

4.2.1 Lipidní peroxidace

Účinky subchronické expozice atrazinu na hladinu TBARS v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 1.

V tkáních raka ničivého (hepatopankreas, sval a žábra) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly hladiny TBARS v experimentálních skupinách raků vystavených atrazinu v porovnání s kontrolou.



Graf 1. Aktivita lipidní peroxidace (TBARS) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. N = 6. ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. ART10% = 10 % 96hLC50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas.

4.3 Antioxidační biomarkery

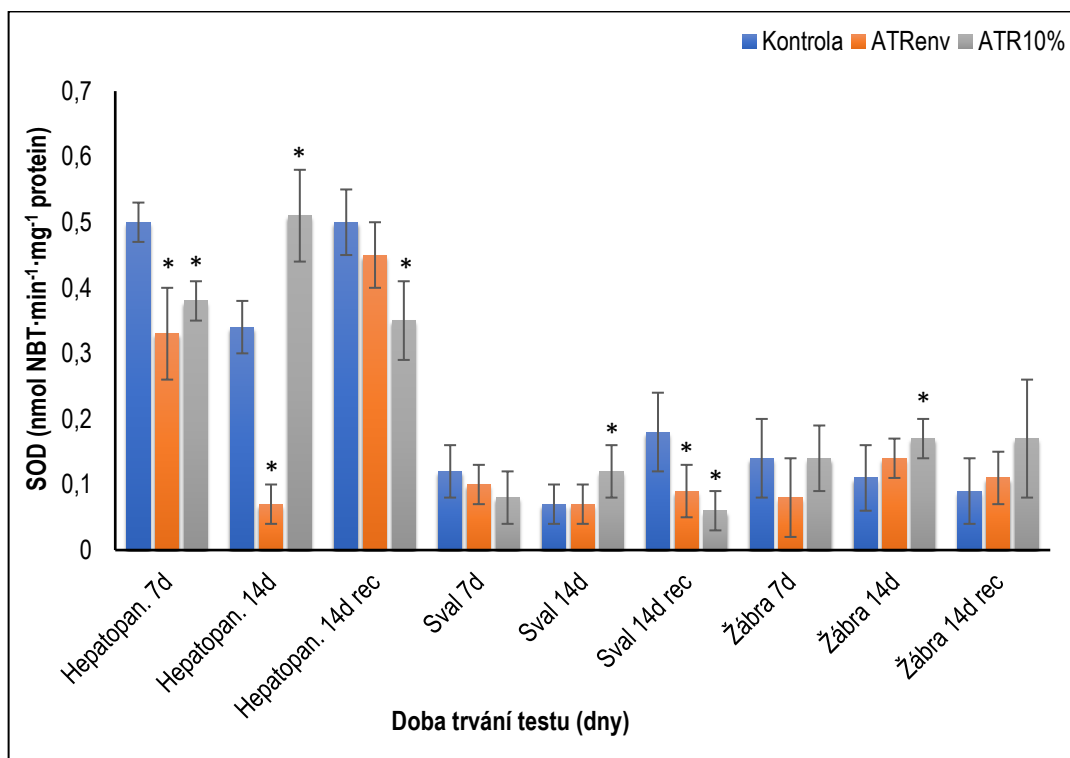
4.3.1 Superoxid dismutáza

Účinky subchronické expozice atrazinu na aktivitu superoxid dismutázy (SOD) v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 2.

Statisticky významné ($P < 0,05$) snížení aktivity SOD v hepatopankreatu bylo zjištěno po 7denní expozici v první a druhé experimentální skupině raků v koncentracích $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ve srovnání s kontrolou. Po 14denní expozici bylo taktéž zaznamenáno statisticky významné ($P < 0,05$) snížení SOD u obou experimentálních skupin vystavených atrazinu v hepatopankreatu v porovnání s kontrolní skupinou. Ke snížení aktivity SOD došlo i u druhé skupiny po 14denní zotavovací fázi v porovnání s kontrolou.

Ve svalovině raků vystavených koncentraci $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ atrazinu po dobu 14 dní bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,05$) zvýšení aktivity v porovnání s kontrolní

skupinou. Snížená aktivity SOD byla statisticky významně zjištěna po 14denní zotavovací fázi u obou experimentálních skupin raků (ATRenv a ATR10%) ve porovnání s kontrolou. Statisticky významné ($P < 0,05$) zvýšení hladiny SOD bylo zjištěno na žábrách po 14denní expozici u druhé experimentální skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Po této expozici byly hodnoty aktivity SOD v experimentálních skupinách na úrovni kontroly.



Graf 2. Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. $N = 6$. Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou ($*P < 0,05$). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. ART10% = 10 % 96hLC50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas

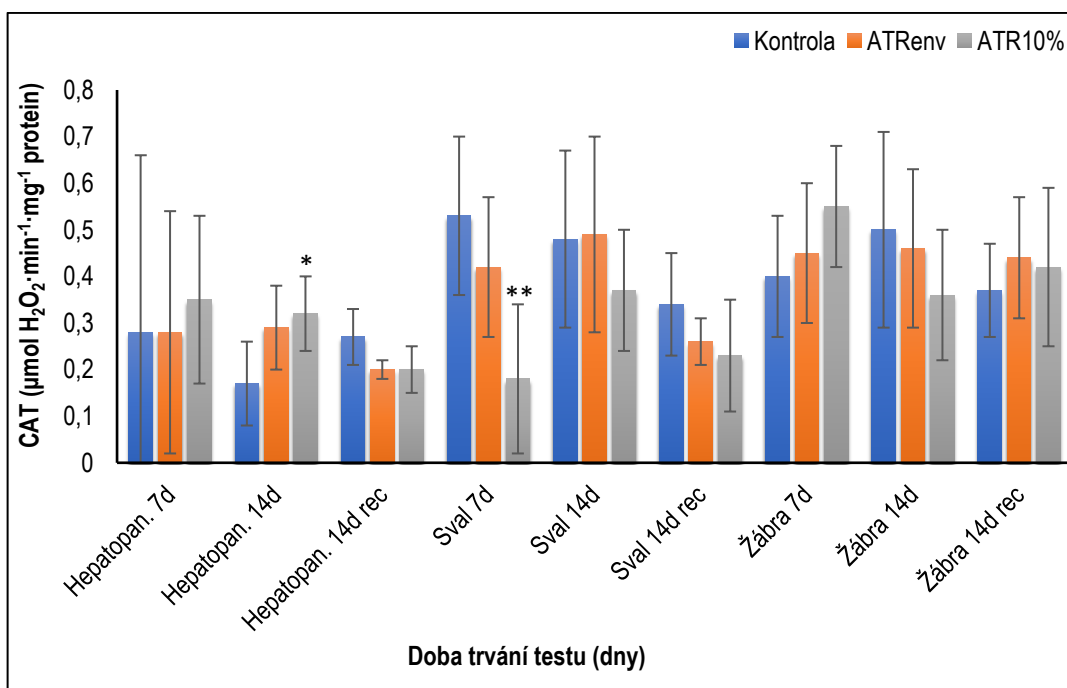
4.3.2 Kataláza

Účinky subchronické expozice atrazinu na aktivitu katalázy (CAT) v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 3.

Po 14denní expozici atrazinu v koncentraci $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo zjištěno statisticky významné ($P<0,05$) zvýšení aktivity katalázy v hepatopankreatu v druhé experimentální skupině raků v porovnání s kontrolní skupinou. U 7denní a 14denní fázi zotavení nebyl v tkáni hepatopankreatu prokázán statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou.

Po 7denní expozici bylo zaznamenáno statisticky významné ($P<0,05$) snížení aktivity kataláz ve svalovině raků u druhé experimentální skupiny ATR10% v porovnání s kontrolní skupinou.

V ostatních skupinách svalů, žaber i hepatopankreatu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v aktivitě kataláz.

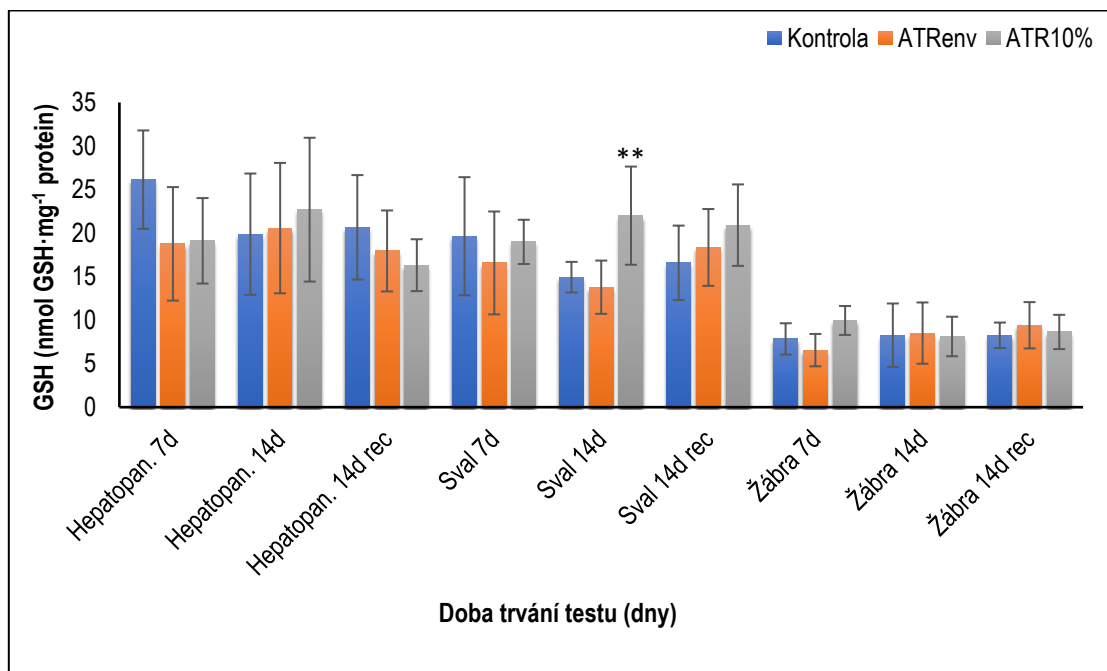


Graf 3. Aktivita katalázy (CAT) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. $N = 6$. Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou (* $P<0,05$; ** $P<0,01$). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. ART10% = 10 % 96hLC50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas.

4.3.3 Redukovaný glutation

Účinky subchronické expozice atrazinu na aktivitu redukovaného glutathionu (GSH) v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 4.

Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity GSH bylo zjištěno jen po 14denní expozici ve svalu raků v experimentální skupině ATR10% ($1,21 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) v porovnání s kontrolní skupinou. V ostatních expozicích tkání hepatopankreatu, svalu a žaber nebyla zjištěna statisticky významná aktivita redukovaného glutathionu v porovnání s kontrolou.



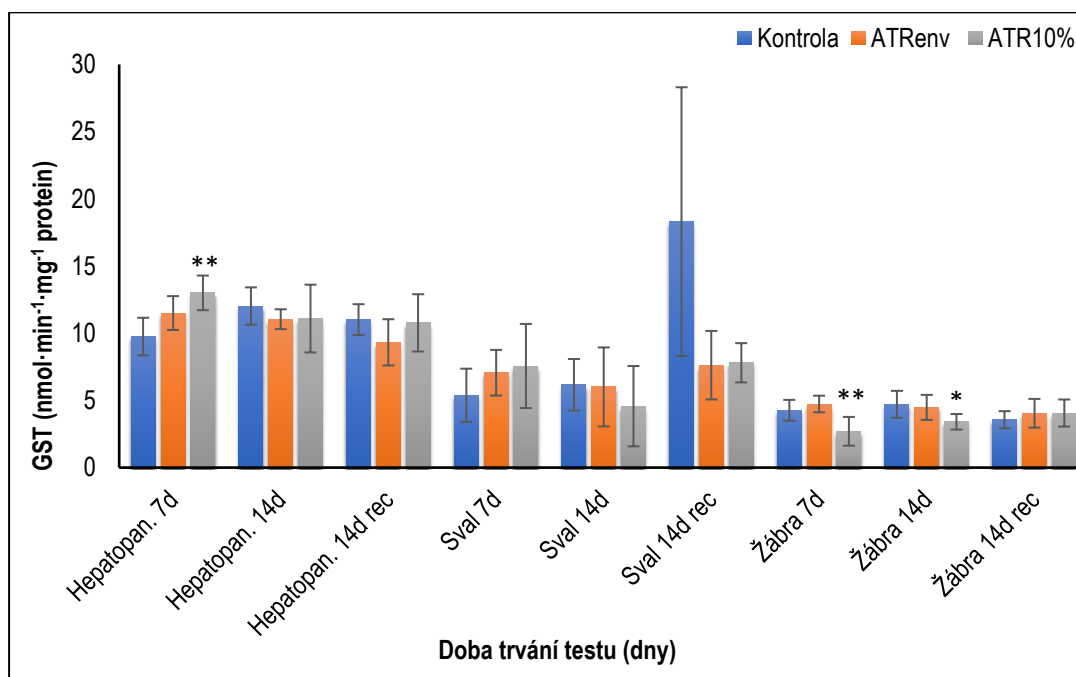
Graf 4. Aktivita redukovaného glutathionu (GSH) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. $N = 6$. Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou (** $P < 0,01$). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. ART10% = 10% 96hL50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas.

4.3.4 Glutathion S-transferáza

Účinky subchronické expozice atrazinu na aktivitu glutathion S-transferázy (GST) v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 5.

Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity GST bylo zjištěno v hepatopankreatu po 7denní expozici v druhé experimentální skupině raků vystavené koncentraci atrazinu $1,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v porovnání s kontrolní skupinou. V ostatních expozicích tkáně hepatopankreatu a svalů nebyla zjištěna statisticky významná změna v aktivitě glutathion S-transferázy.

Po 7denní expozici bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení aktivity GST v tkáni žaber u druhé experimentální skupiny ($1,21 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) v porovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významné ($P < 0,05$) snížení bylo detekováno i po 14denní expozici v žábách u druhé experimentální skupiny.



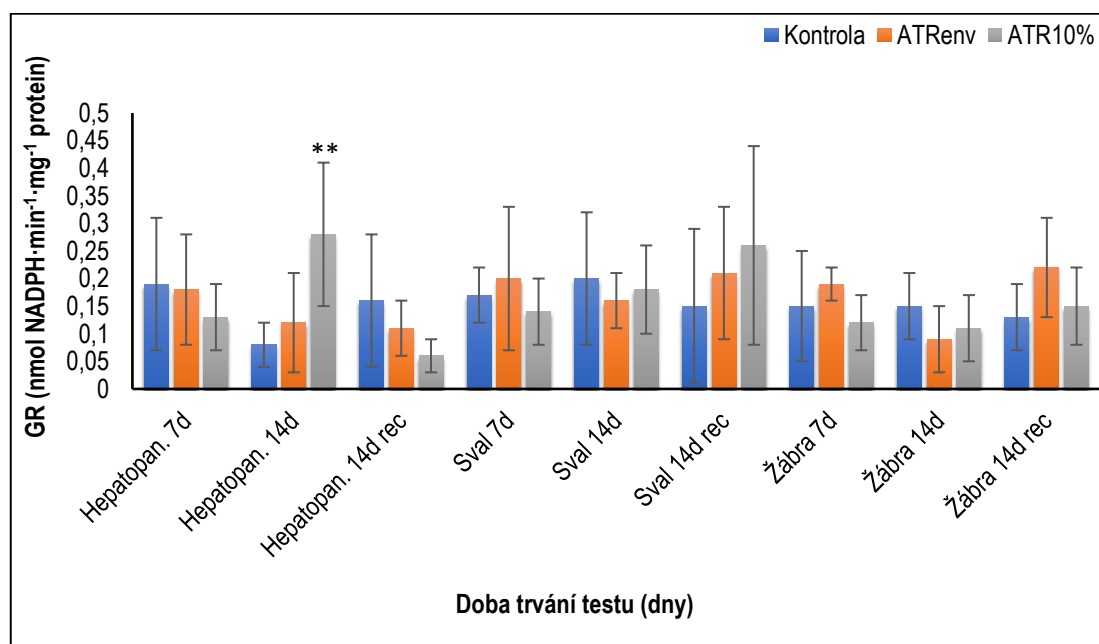
Graf 5. Enzymatická aktivita glutathion S-transferázy (GST) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. $N = 6$. Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. ART10% = 10 % 96hLC50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas.

4.3.5 Glutathion reduktáza

Účinky subchronické expozice atrazinu na aktivitu glutathionreduktázy (GR) v tkáních raka ničivého jsou uvedeny v Grafu 6.

Z grafu je zřejmé, že expozice atrazinu v koncentracích $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,21 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ neměla statisticky významný ($P < 0,05$) vliv na aktivitu GR v tkáních svalů a žaber u obou testovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou.

Statisticky významné ($P < 0,05$) zvýšení aktivity glutathionreduktázy bylo zjištěno pouze v hepatopankreatu po 14denní expozici v druhé experimentální skupině raků ve vystavené koncentraci $1,21 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v porovnání s kontrolou.



Graf 6. Aktivita glutathion reduktázy (GR) v tkáních raka ničivého po dlouhodobé expozici atrazinu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm směrodatnou odchylku. $N = 6$. Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou (** $P < 0,01$). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. ART10% = 10 % 96hLC50 atrazinu pro raka ničivého $1,21 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. d = denní expozice; 14d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě. Hepatopan. = hepatopankreas.

4.4 Biochemické ukazatele hemolymfy

Na základě biochemického vyšetření hemolymfy byly zjištěny celkem 4 významné změny. Zjištěné hodnoty jednotlivých parametrů biochemického profilu hemolymfy raků ničivých jsou uvedeny v Tab. 4. Hladina hlavního stresového faktoru-glukózy (GLU) byla statisticky výrazně zvýšena ($P < 0,01$) po 7, 14 a 14denní zotavovací fázi

u testované skupiny ATR10% v porovnání s kontrolou. Významné zvýšení ($P < 0,01$) amoniaku (NH_3) bylo detekováno po 14denní expozici u testované skupiny ATR10% v porovnání s kontrolou. Prokazatelně zvýšené hodnoty ($P < 0,01$) byly také zjištěny u laktázy (LACT) po 14denní expozici u testované skupiny ATREnv a taktéž u 7, 14 a 14denní zotavovací fázi u skupiny ATR10% v porovnání s kontrolní skupinou. Rovněž hladina alkalické fosfatázy (ALP) vykazovala statisticky významné zvýšení ($P < 0,01$) po 14denní fázi expozice a 14denní zotavovací fázi u ATREnv a taktéž tomu bylo i u skupiny ATR 10%, ve které se zvýšení projevilo po 7, 14 a 14 denní fázi zotavení. U ostatních parametrů nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl: celkový protein (TP), albuminy (ALB), globuliny (GLOB), triglyceridy (TAG), aspartát aminotransferáza (AST), alanin aminotransferáza (ALT), laktát dehydrogenáza (LDH), kreatinkináza (CK), Ca^{2+} (vápník), Mg^{2+} (hořčík), anorganický fosfát (PHOS) a kreatinu (CREA).

Tab. 4. Zobrazuje naměřené biochemické parametry v hemolymfě raka ničivého po dlouhodobé expozici v atrazinu. Data jsou vypočtena pomocí mediánu (minimum – maximum). Statisticky významné rozdíly experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou (**P<0,01). ATRenv = environmentální koncentrace atrazinu 6,86 µg·l⁻¹. ART10% = 10 % 96hL50 atrazinu pro raka ničivého 1,21 mg·l⁻¹. d = denní expozice; 14 d rec = 14denní zotavovací fáze v čisté vodě.

Parametr	Doba expozice (dny)	Testované koncentrace atrazinu		
		Kontrola (0)	ATRenv (6,86 µg/L)	ATR 10 % (1,21 mg/L)
GLU (mmol/L)	7	1,36 ± 0,34	1,35 ± 0,27	1,94 ± 0,25**
	14	1,28 ± 0,21	1,30 ± 0,15	2,23 ± 0,34**
	R14	1,23 ± 0,16	1,33 ± 0,23	2,05 ± 0,38**
TP (g/L)	7	24,00 ± 2,58	25,50 ± 1,12	24,83 ± 1,77
	14	24,83 ± 2,41	24,17 ± 2,27	24,17 ± 2,57
	R14	25,17 ± 1,57	24,50 ± 2,14	24,17 ± 0,69
ALB (g/L)	7	3,00 ± 0,82	2,83 ± 0,90	3,33 ± 0,94
	14	3,17 ± 0,90	3,50 ± 1,26	3,17 ± 0,69
	R14	2,83 ± 0,69	2,67 ± 0,47	2,68 ± 0,48
GLOB (g/L)	7	21,00 ± 2,58	25,50 ± 1,12	21,50 ± 1,61
	14	21,67 ± 2,87	20,67 ± 3,04	21,00 ± 1,53
	R14	22,33 ± 1,80	21,83 ± 1,77	21,50 ± 0,76
NH ₃ (µmol/L)	7	121,83 ± 13,56	130,00 ± 12,26	131,33 ± 20,60
	14	128,67 ± 11,16	131,00 ± 21,44	184,50 ± 20,76**
	R14	129,67 ± 13,06	134,67 ± 21,01	128,50 ± 19,49
TAG (mmol/L)	7	0,18 ± 0,08	0,17 ± 0,05	0,18 ± 0,03
	14	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,08	0,18 ± 0,05
	R14	0,19 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,03
AST (mkat/l)	7	0,61 ± 0,23	0,62 ± 0,27	0,73 ± 0,15
	14	0,69 ± 0,20	0,73 ± 0,14	0,82 ± 0,17
	R14	0,65 ± 0,14	0,68 ± 0,20	0,65 ± 0,16
ALT (mkat/L)	7	1,09 ± 0,30	1,34 ± 0,21	1,39 ± 0,11
	14	1,34 ± 0,23	1,26 ± 0,20	1,21 ± 0,33
	R14	1,27 ± 0,29	1,31 ± 0,24	1,32 ± 0,17
LDH (µkat/L)	7	5,00 ± 1,16	5,48 ± 0,72	5,52 ± 0,56
	14	5,38 ± 0,65	5,83 ± 0,75	5,71 ± 0,83
	R14	5,72 ± 0,50	5,71 ± 0,44	5,34 ± 0,39
CK (µkat/L)	7	0,058 ± 0,029	0,058 ± 0,023	0,084 ± 0,027
	14	0,075 ± 0,029	0,072 ± 0,018	0,092 ± 0,016
	R14	0,067 ± 0,022	0,072 ± 0,018	0,075 ± 0,032
LACT (mmol/L)	7	1,53 ± 0,30	1,45 ± 0,23	2,46 ± 0,23**
	14	1,60 ± 0,20	1,91 ± 0,14**	3,13 ± 0,31**
	R14	1,38 ± 0,10	1,49 ± 0,10	2,18 ± 0,17**
Ca ²⁺ (mmol/L)	7	2,77 ± 0,27	2,43 ± 0,35	2,65 ± 0,26
	14	2,57 ± 0,30	2,60 ± 0,18	2,60 ± 0,25
	R14	2,62 ± 0,28	2,65 ± 0,29	2,64 ± 0,35
Mg ²⁺ (mmol/L)	7	1,03 ± 0,16	1,07 ± 0,16	1,18 ± 0,52
	14	1,10 ± 0,26	0,95 ± 0,12	1,08 ± 0,15
	R14	0,95 ± 0,17	0,92 ± 0,12	0,94 ± 0,14
PHOS (mmol/L)	7	0,33 ± 0,09	0,34 ± 0,11	0,31 ± 0,16
	14	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,12	0,34 ± 0,10
	R14	0,37 ± 0,11	0,39 ± 0,14	0,39 ± 0,10
ALP (mkat/L)	7	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,05	0,33 ± 0,08**
	14	0,14 ± 0,04	0,33 ± 0,08**	0,53 ± 0,08**
	R14	0,19 ± 0,08	0,34 ± 0,11**	0,78 ± 0,19**
CREA (µmol/L)	7	7,17 ± 2,41	8,00 ± 3,51	8,33 ± 4,11
	14	8,83 ± 2,91	7,33 ± 2,62	7,67 ± 4,38
	R14	8,50 ± 3,35	8,83 ± 4,18	8,17 ± 4,52

5 Diskuze

Životní prostředí je často znečišťováno celou řadou látek, včetně jejich metabolitů, které mohou v závislosti na jejich toxicitě souviset se změnami oxidativního stresu a tím zapříčinit poškození vodních organismů (Lushchak a kol., 2005a; Stara a kol., 2013a, 2014). Raci jsou díky své citlivosti hojně využíváni jako bioindikátory životního prostředí. Proto jsou i vhodnými modelovými druhy při hodnocení účinků xenobiotik. I přes jejich malý vzrůst, poskytují dostatečné množství tkání vhodných pro laboratorní analýzy (Gedik a kol., 2017; Buric a kol., 2013; Arceo a kol., 2015).

5.1 Chování raků

Atrazin (ATR) je považován za nejrozšířenější herbicid, který je díky své perzistenci v půdě a ve vodě považován za běžnou kontaminující látku (Gianessi a Reigner, 2007). U raků, jež byli vystaveni $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ atrazinu, což odpovídá 10 % 96hLC50 (ATR10%), byla zjištěna významně nižší aktivita v pohybové aktivitě oproti kontrole a skupině raků vystavených environmentální koncentraci atrazinu $6,86 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ATRenv), zatímco příjem potravy nebyl ovlivněn. Belanger a kol. (2015, 2016) ve svých pracích uvádí, že vystavení raka *Orconectes rusticus* a *Orconectes virilis* ATR o koncentraci $80 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 72 hodin mělo za následek snížení schopnosti lokalizace a zájmu o potravu. Naproti tomu působení atrazinu neovlivnilo chování a aktivitu těchto raků. Druh *Pacifastacus leniusculus* exponovaný ATR $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 96 hodin podle Veliška a kol. (2013) nevykazoval žádné rozdíly v chování. Avšak raci, jež byli vystaveni vyšší koncentraci než $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ATR, se obtížně pohybovali, zůstávali v rozích akvárií nebo se pohybovali v kruhu uprostřed akvária. Velišek a kol. (2011a) ve své práci došel k závěru, že u kaprů obecných (*Cyprinus carpio*) vystavených triazinům, simazinu o koncentraci $0,06\text{--}4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a terbutrynu o koncentraci v rozmezí $0,02\text{--}2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyl zaznamenán rozdíl ani v příjmu potravy, ani v pohybu. K podobnému závěru došla i Stará a kol. (2016), v jejíž studii byly raci červení (*Procambarus clarkii*) vystaveni subchronickému působení terbuthylazinu včetně jeho derivátů při koncentraci $2,9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $580 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Rutkoski a kol. (2018) došla k podobným závěrům a to, že letální a subletální působení ATR má vliv už na embryonální vývoj hvízdalky křehké (*Physalaemus gracilis*).

5.2 Oxidativní stres a antioxidační enzymy

Oxidativní stres a antioxidační biomarkery jsou indikátory poukazující na toxické účinky xenobiotik u vodních organismů (Banaee, 2010). Subchronické působení ATR v této studii nevedlo k významným změnám v hladině TBARS. Naproti tomu koncentrace ATR_{env} způsobila ve sledovaných tkáních raka ničivého změny v aktivitě SOD. U testované skupiny ATR10% byly pozorovány změny u hepatopankreatu a svalu ve všech námi testovaných antioxidační biomarkerech, a to SOD, CAT, GR, GST a GSH. K podobnému závěru rovněž došla i Stará a kol. (2014), která ve své studii testovala vliv prometrynu o koncentraci 0,51 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 0,144 a 1,144 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v tkáních (hepatopankreas, sval) raka červeného a jeho enzymatickou aktivitu při expoziční době 25 dní. Přestože nezjistila významné rozdíly na úrovni peroxidace lipidů mezi jednotlivými skupinami, byl projev prometrynu patrný na snížené aktivitě antioxidačních enzymů CAT, SOD a GR.

Většina studií, které se zabývají vlivem triazinových herbicidů na vodní živočichy, provádí testy toxicity primárně na rybách. Bláhová a kol. (2013) ve své práci porovnávali vliv ATR o koncentracích 0,3; 3, 30 a 90 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 28 dní na dániu pruhovaném (*Danio rerio*). Došli k závěru, že vysoké koncentrace (90 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) ATR v tkáních dánia mohou způsobovat sníženou aktivitu SOD, CAT, GR, GST, avšak zvyšovat úroveň TBARS. U slunečnice velkoploutvé (*Lepomis macrochirus*) vystavené atrazinu (0, 3, 6, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) ve studii Elia a kol. (2002) byla v tkáních zaznamenána zvýšená aktivita GSH, GST, SOD a snížená aktivita GR už po 96 hodinách. Rossi a kol. (2011) provedli v laboratorních podmínkách experiment založený na působení herbicidů na ryby žijící v tropických oblastech, ve kterých se nejčastěji používá roundup a hexaron. Došli k závěru, že zvýšená aktivita GST u hexaronu souvisela se sníženou hodnotou CAT. Studie provedená Nwaniem a kol. (2010) popisuje účinky vlivu ATR v tkáních ryby *Channa Punctatus*. Lipidová peroxidace, která byla stanovována pomocí TBARS testu, měla signifikantně nelineárně vzrůstající trend. Naproti tomu aktivity antioxidačních enzymů byly různorodé. Aktivita SOD se v závislosti na čase a koncentraci dané látky postupně zvyšovala, naproti tomu aktivita CAT a GR zaznamenala postupné snížení. Dalším zajímavých případem bylo použití 2,4-dichlorfenolu na karase stříbrného (*Carassius auratus*) v práci Zhang a kol. (2004) po dobu 40 dní o koncentracích v rozmezí 0,005-1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Autoři uvádí, že se zvyšující se koncentrací této látky dochází

ke zvyšování aktivity CAT, ustálené aktivitě GR, ale naproti tomu enzymy SOD, GSH, GST byly v důsledku tohoto trendu spíše inhibovány. Dále pak Xiang a kol. (2012) provedli studii na kapru obecném, kde došli k podobným závěrům jako Blahová a kol. (2013), že se zvyšující se koncentrací nejen atrazinu, dochází ke snižování aktivity CAT, SOD během dlouhodobé expozice této látky. K podobným výsledkům dospěli i Santos a Martinez (2012), kteří testovali koncentrace 2 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ATR po dobu 24 a 48 hodin na prochilodusu čárkovaném (*Prochilodus lineatus*). Aktivita CAT a SOD byla se vzrůstající koncentrací významně snížena, ale aktivita GR se zvyšovala. Jako v ostatních studiích, i zde došlo při vyšších koncentracích této látky ke snížení aktivity CAT, SOD a GST. Dalším zajímavým příkladem je studie Staré a kol. (2012), která popisuje vliv prometrynu (o koncentracích 0,51; 80; 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) na oxidativní stres a antioxidační biomarkery u vývojových stádií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) po dobu 35 dní. Z výsledků je zřejmé, že na aktivitu CAT a SOD společně s tvorbou TBARS výše uvedené koncentrace prometrynu neměly vliv. Na druhou stranu vyšší aktivita byla zaznamenána jen u GR při koncentraci 0,51 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. K rozdílným výsledkům však došel Velíšek a kol. (2011b) také u kapra obecného po 90 dnech. Hladiny lipidní peroxidázy (měřené pomocí TBARS) byly po působení terbutrynu zvýšené v tkáních mozku a jater. Naproti tomu aktivita SOD a GR byla ve všech experimentálních skupinách snížena. Podobný pokus provedla Stará a kol. (2013b) na kapru obecném za použití prometrynu po dobu 60 dní a dospěla k velmi podobným výsledkům. Hladina TBARS nebyla touto látkou nijak ovlivněna, nýbrž aktivita SOD, CAT i GR byla na konci pokusu jako u předešlých studií snížena. Dále je tato studie podobná se studií Staré a kol. (2012) při použití simazinu na kapra obecného po dobu 60 dní v koncentracích 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 2 a 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V tomto případě došlo ke zvýšení hladiny TBARS převážně při 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ simazinu v tkáni jater v porovnání s kontrolou. Ačkoliv aktivita SOD a CAT, GR měla zpočátku u všech zvyšující se trend, po 60 denní expozici simazinu došlo skoro u všech tkání k jejímu snížení. Zvýšená aktivita GSH byla zaznamenána hlavně u tkáně jater při koncentraci 2 a 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.3 Biochemický profil hemolymfy

U ryb se jako cenný ukazatel stresu využívá hematologický a biochemický profil krve (Bláhová a kol., 2014; Velíšek a kol., 2012). Podobně je tomu u raků, kdy se k analýzám souvisejícím s vyhodnocováním vlivu změn životního prostředí

využívá primárně jejich hemolymfy (Digilio a kol., 2016; Faggio a kol., 2016). V této studii bylo zjištěno, že u raků, kteří byli vystaveni environmentální koncentraci atrazinu (ATR_{env}), se projevilo zvýšení koncentrace LACT a ALP. Naproti tomu hladiny GLU a NH₃ byly zvýšené u skupiny ATR10%. Glukóza patří mezi přední zdroje energie, navíc se považuje za jeden z mnoha markerů, které mají odezvu na stresové situace (Zahedi a kol., 2013). Koncentrace LACT jak uvádí Kolářová a Velíšek (2012) je dána rovnováhou mezi jeho tvorbou a odbouráváním probíhajícím v játrech. Navíc hromadění LACT, jak uvádí Schneiderka (2004), způsobuje bolesti a svalovou únavu. Analýza ALP je schopná detekovat narušení funkce jater. Podobně i zvýšené koncentrace NH₃ nám indikují selhávání funkce jater či metabolické vady v Krebsově cyklu (Kolářová a Velíšek, 2012). Bláhová a kol. (2014) ve své práci zaznamenala změny při použití ATR o koncentraci 5 mg·l⁻¹ po dobu 96 hodin u následujících parametrů GLU, TP, PHOS, Ca²⁺, ALB, ALT, AST, ALP, LDH u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Avšak po 7denní zotavovací fázi se u parametru LDH, ALT a LACT projevily trvalé rozdíly ve srovnání s kontrolou. Podobně tomu bylo i v této studii, kdy i po 7 a 14denní expozici ATR a 14denní zotavovací fázi parametry GLU, LACT a ALP vykazovaly trvalé narušení. Velíšek a kol. (2012) uvádí, že 90denní vystavení kapra obecného simazinu (o koncentraci v rozmezí 0,06-4 µg·l⁻¹) mělo vliv na významně vyšší aktivitu ALP, AST, TP, ALB v různých koncentracích oproti kontrole. Zbylé měřené indexy GLU, GLOB, NH₃, LACT a podobně, vyšly ve všech testovaných skupinách beze změny. Z toho můžeme usuzovat, že výsledky uvedené ve studii Velíška a kol. (2012) na kapru obecném jsou odlišné od námi zjištěných výsledků a každý organismus může být pesticidními látkami ovlivněn různě. Výsledky této studie se podobají práci, kterou publikovala Stará a kol. (2016). V její studii byl rak červený vystaven triazinovému derivátu terbuthylazin-desethylu v koncentraci 2,9 µg·l⁻¹ a 580 µg·l⁻¹, při délce expoziční doby 28 dní. Podobně jako u raka ničivého, bylo v koncentraci 580 µg·l⁻¹ zjištěno zvýšení koncentrace LACT. Zvýšená koncentrace LACT byla patrná jak po 14denní expozici, tak i po 14denní zotavovací době. Aktivita ALP byla naopak u raka červeného snížena. V tomto ohledu se tento výsledek neshoduje s výsledky získanými u raka ničivého. Zvýšení aktivity ALP bylo rovněž zjištěno ve studii, kterou zpracovali Banaee a Ahmadi (2011). V jejich publikaci byl rak bahenní (*Astacus letodactylus*) exponován účinkům endosulfanu v koncentracích 32,5 µg·l⁻¹ a 65 µg·l⁻¹, při expoziční době dlouhé 30 dní.

Při koncentraci $65 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo u raka bahenního zjištěno nejen zvýšení aktivity ALP, ale i zvýšení úrovně kyselé fosfatázy (ACP) a LDH. I Velíšek a kol. (2011a) zaznamenal po expoziční době 90 dní u kapra obecného vystaveného účinkům dvou triazinových herbicidů změnu. V prvním případě bylo pozorováno zvýšení aktivity ALP, LACT, GLU, AST a LDH při použité koncentraci 0,2 a $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ terbutrynu v porovnání s kontrolou. Podobně tomu bylo i u druhého triazinového herbicidu, simazinu, u kterého byla při koncentraci $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ zaznamenána zvýšená aktivita ALP a ALT, a při koncentraci $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k výraznému zvýšení aktivity TP, ALB, ALP a ALT v porovnání s kontrolou.

Z výše uvedených studií vyplývá, že působení triazinových pesticidů na vodní prostředí je ovlivňováno druhem, věkem, prostředím, fyzikálně-chemickými vlastnosti a dalšími neméně důležitými faktory. Používání herbicidů je v dnešní době velmi obtížné omezit, především z důvodu neustále se zvyšujícímu růstu potřeby produkce, související se vzrůstající populací, s čímž souvisí zlepšující se technika a možnosti používání nových funkčně přesných herbicidů, které obsahují stejnou funkční látku, která se jeví účinnější. Nicméně v konečném důsledku tyto nové látky mohou být toxičtější než původní, dříve používané. Pro další výzkumy by bylo potřebné se zaměřit nejen na výše zmíněné látky, ale i na jejich rezidua, která bývají v prostředí ještě dlouho po aplikaci základních látek.

6 Závěr

Cílem této práce bylo hodnocení subchronického působení atrazinu na raka ničivého. Na základě provedených analýz a získaných výsledků lze konstatovat, že subchronické působení atrazinu sice zásadně neovlivnilo chování raků a nezpůsobilo oxidativní stres. Expozice atrazinu však měla vliv na aktivitu sledovaných antioxidantních enzymů v tkáních a na některé ukazatele biochemického profilu hemolymfy (glukózu, amoniak, alkalickou fosfatázu a laktát). Touto skutečností lze potvrdit, že již velmi nízká koncentrace atrazinu, která odpovídá skutečné koncentraci zjištěné v povrchových vodách České republiky, již může ovlivnit homeostázu račího těla. Z tohoto důvodu lze tedy raky doporučit jako vhodné organismy k monitoringu atrazinu a jiných pesticidů v ekotoxikologických studiích. Subchronické působení atrazinu u raka ničivého nevyvolalo žádné významné změny v chování, avšak důvodem pro jejich nezjištění mohla být příliš krátká expoziční doba, neboť je třeba si uvědomit, že raci a ostatní vodní živočichové jsou chronickému působení atrazinu vystaveny již od útlého věku. Pro vyšší průkaznost testu by bylo pro příští studie vhodné použití stejné koncentrace atrazinu, avšak za využití chronického testu toxicity.

7 Přehled literatury

- Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, 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, Air and Soil Pollution*, 212(1-4), 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase *In vitro*. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Ahrens, W. H., Hatzios, K. K., Edwards, M. T., 1994. Herbicide Handbook Committee. Lawrence, Kansas: Weed Science Society of America, 352 p.
- Amira, A., Adly, M., 2010. Oxidative stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of Immunology* 3, 129-145.
- Arceo, S. D. B., Martinez-Tabche, L., Alvarez-Gonzalez, I., Lopez, E. L., Madrigal-Bujaidar, E., 2015. Toxicity induced by dieldrin and chlorpyrifos in the freshwater crayfish *Cambarellus montezumae* (Cambaridae). *Revista de Biología Tropical*, 63, 83-96.
- Atanor, 2012. Agroquímicos: Atrazina. Available from: <http://www.atanor.com.ar/index.php/>, (visited online 10. 1. 2018).
- Azzi, A., Davies, K. J. A., Kelly, F., 2004. Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, 558(1), 3-6.
- Babior, B. M., 1997. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(2), 141-155.
- Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalid, A., Al-Rawi, N. Y., Tikriti, S., Dhahir, H. I., Clarkson, T. W., Smith, J. C., Doherty, R.A., 1973. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science*, 181(4096), 230-241.
- Ballantyne, B., Marrs, T. C., Syversen, T., 1999. General and Applied Toxicology. 3, 1842-1897.
- Banaee, M., 2010. Influence of silymarin in decline of sub-lethal diazinon-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, University of Tehran, Iran.
- 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.
- Beatty, S. J., 2006. The diet and trophic positions of translocated, sympatric populations of *Cherax destructor* and *Cherax cainii* in the Hutt River, Western Australia: evidence of resource overlap. *Marine and Freshwater Research*, 57, 825-835.
- Belanger, R. M., Peters, T. J., Sabhapathy, G. S., Khan, S., Katta, J., Abraham, N. K., 2015. Atrazine exposure affects the ability of crayfish (*Orconectes rusticus*) to localize a food odor source. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(4), 636-645.
- Belanger, R. M., Mooney, L. N., Nguyen, H. M., Abraham, N. K., Peters, T. J., Kana, M. A., May, L. A., 2016. Acute atrazine exposure has lasting effects on chemosensory responses to food

- odors in crayfish (*Orconectes virilis*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(2), 289-300.
- Belmonte, A., Garrido, A., Martinez, J. L., 2005. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 538, 117-127.
- Bermudez-Saldana, J. M., Escuder-Gilabert, L., Medina-Hernandez, M. J., Villanueva-Camanas, R. M., Sagrado, S., 2005. Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides. *Journal of Chromatography B*, 814, 115-125.
- Biologyjunction.com, 2018. Dostupné na:
http://www.biologyjunction.com/crayfish_dissection.htm, (navštíveno online: 16. 2. 2018).
- Bhavan, P. S., Geraldine, P., 2001. Biochemical stress response in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70(1), 27-41.
- Bláhová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., Štěpánová, S., Svobodová, Z., 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 82-85.
- Bláhová, J., Modrá, H., Ševčíková, M., Maršálek, P., Zelničková, L., Škořič, M., Svobodová, Z., 2014. Evaluation of biochemical, haematological, and histopathological responses and recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after acute exposure to atrazine herbicide. *BioMed Research International*, 2014, 8.
- Bocquene, G., Franco, A., 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin*, 51(5-7), 612-619.
- Bowler, C., van Montagu, M., Inze, D., 1995. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83-116.
- Bowmer, K. H., Jacobs, S. W. L., Sainty, G. R., 1995. Identification, biology and management of *Elodea canadensis*, hydrocharitaceae. *Journal of Aquatic Plant Management*, 33, 13-19.
- 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.
- Bucheli T. D., Fent, K., 1995. Induction of Cytochrome-P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25(3), 201-268.
- Buřič, M., Kouba, A., Máchová, J., Mahovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(3), 607-610.

- Cardoso, S. M., Pereira, C., Oliveira, C. R., 1998. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(3), 703-710.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5475-5480.
- Carson, R., 1962. Silent Spring. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 16 pp.
- Cazaneva, J., Bistoni, M. D. A., 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., Kufrevioglu, O. I., 2010. In vitro and in vivo effect of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(3), 177-181.
- Codex Alimentarius Commission, 2013. International food standards. Rome: World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. Available from: <http://www.codexalimentarius.org/>, (visited online 18. 2. 2018).
- Colombo, J. P., 1994. Klinisch-chemische Urindiagnostik. Labofile-Verlagsgemeinschaft, Rotkreuz Schweiz, pp. 153.
- Comber, S. D. W., 1999. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pesticide Science*, 55(7), 696-702.
- Crandall, K. A., Buhay, J. E., 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae-Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 295-301.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2018. Pasport látky. Dostupný na: <http://hydro.chmi.cz/>, (navštíveno online 14. 2. 2018).
- Das, P. C., McElroy, W. K., Cooper, R. L., 2000. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicological Sciences*, 56(2), 324-331.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., Ross, P. E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 84-98.
- Digilio, G., Sforzini, S., Cassino, C., Robotti, E., Oliveri, C., Marengo, E., Musso, D., Osella, D., Viarengo, A., 2016. Haemolymph from *Mytilus galloprovincialis*: Response to copper and temperature challenges studied by 1H-NMR metabonomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 183-184, 61-71.
- 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. ISBN 80-86542-02-5.

- Ecobichon, D. J., 1991. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M. O., Doull, J., Klaassen, C. D. (Eds.), Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill, New York, pp. 193-213.
- Elia, A. C., Waller, W. T., Norton, S. J., 2002. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(6), 809-816.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue Sulphydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Evropská komise (European Commission), 1999. Study on the prioritisation of substances dangerous to the aquatic environment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Evropská komise (European Commission), 2003. Review report for the active substance atrazine; Finalized in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 3 October 2003 in support of a decision concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I of Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorization for plant protection products containing this active substance: European Commission Health and Consumer Protection Direc-torate-General;2003. SANCO/10496/2003-final.
- Ewing, J. F., Janero, D. R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, 232(2), 243-248.
- Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., Felice, M. R., 2016. Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 180, 258-265.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., Reis-Henriques, M. A., 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(2), 97-103.
- Finkel, T., Holbrook, N. J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fishel, F. M., 2012. Pesticide Toxicity Profile: Triazine Pesticides. University of Florida, IFAS; Extension. Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PI/PI15800.pdf>, (visited online 10. 2. 2018), 3 pp.
- Folmar, L. C., 1993. Effect of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effect. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(2), 337-375.
- Fuerst, E. P., Norman, M. A., 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*, 39(3), 458-464.

- Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., Kirkman, H. N., 1996. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87(4), 1595-1599.
- Gallardo, M. A., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padros, F., Blasco, J., Fernández-Borra, J., Sánchez, J., 2003. Functional alterations associated with „winter syndrome“ in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 223(1-4), 15-27.
- Garmouma, M., Blanchoud, H., Teil, M. J., Blanchard, M., Chevreuil, M., 2001. Triazines in the marine and the seine rivers (France): longitudinal evolution and flows. *Water, Air and Soil Pollution*, 132(1-2), 1-17.
- Gedik, K., Kongchum, M., DeLaune, R. D., Sonnier, J. J., 2017. Distribution of arsenic and other metals in crayfish tissues (*Procambarus clarkii*) under different production practices. *Science of the Total Environment*, 574, 322-331.
- Gianessi, L. P., Reigner, N. P., 2007. The value of herbicides in U.S. crop production. *Weed Technology*, 21(2), 559-566.
- Götz, R. B. O. H., Bauer, O. H., Fiesel, P., Roch, K., 1998. Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg. Part II. *Chemosphere*, 36 (9), 2103-2118.
- 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.
- Hamr, P., 1992. A revision of the Tasmanian freshwater crayfish genus *Astacopsis* Huxley (*Decapoda: Parastacidae*). *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, 126, 91-94.
- Hawkins, R. I., Mawdesley-Thomas, L. E., 2006. Fish haematology-A bibliography. *Journal of Fish Biology*, 4, 193-232.
- Hayes, W. J., 1982. Organic phosphorus pesticides. *Pesticides Studied in Man*, 333-340.
- Hayes, W. J., Laws, E. R., 1991. *Handbook of Pesticide Toxicology. Classes of Pesticides*. New York, NY: Academic Press, 3: 1451 pp.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617.
- Herrero-Hernandez, E., Rodriguez-Cruz, M. S., Pose-Juan, E., Sanchez-Gonzalez, S., Andrades, M. S., Sanchez-Martin, M. J., 2017. Seasonal distribution of herbicide and insecticide residues in the water resources of the vineyard region of La Rioja (Spain). *Science of The Total Environment*, 609, 161-171.
- Hobbs Jr., H. H., 1974. Synopsis of the families and genera of crayfishes (*Crustacea: Decapoda*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 164: iii + 32 pp.

- Hogan, C. M., 2013. Herbicide. The Encyclopedia of Earth, online version. Available from: <http://www.eoearth.org/article/Herbicide?topic=49494>, (visited online 1. 3. 2018).
- Holdich, D. M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Śmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D., Haffner, P., (Eds.), Atlas of Crayfish in Europe. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Huber, W., 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(10), 1865-1881.
- Hutchings, R., 1988. A review of the Australian freshwater crayfish fauna with reference to aquaculture. *Freshwater Crayfish*, 7, 13-18.
- Chapadense, P. F. G., Castro, F. D. J., Almeida, J. A., Moron, S. E., 2009. Toxicity of atrazine herbicide in *Colossoma macropomum*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10(2), 398-405.
- Jablonowski, N.D., Schaffer, A., Burauel, P., 2011. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 328–331.
- Jager, G., 1983. Herbicides, in Büchel KH (ed): Chemistry of Pesticides. New York. John Wiley and Sons, pp. 322-392.
- Jasinska, E. J., Knott, B., Poulter N., 1993. Spread of the introduced yabbie, *Cherax* sp. (Crustacea: Decapoda: Parastacidae), beyond the natural range of freshwater crayfishes in Western Australia. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, 76, 67–69.
- Jerry, D. R., Purvis, I. W., Piper, L. R., Dennis, C. A., 2005. Selection for faster growth in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Aquaculture*, 247(1-4), 169-176.
- Johnston, K., Robson, B. J., 2009. Habitat use by five sympatric Australian freshwater crayfish species (Parastacidae). *Freshwater Biology*, 54(8), 1629-1641.
- Jones, C. M., 1989. The biology and aquaculture potential of *Cherax quadricarinatus*. Final report submitted by the Queensland Department of Primary Industries to the Reserve Bank of Australia Rural Credits Development Project No. QDPI/8860, pp. 1-116.
- Kamrin, M. A., 1997. Pesticide profiles. Lewis Publishers, Boca Raton Florida, USA, pp. 676.
- Kaplan, L. A., Pesce, A. J., 1989. Clinical Chemistry. CV Mosby Company, St. Louis, pp. 186.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. FROV JU Vodňany, 135, 54 s.
- Kozák, P., Föderer, L., Kouba, A., Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. Current conservation strategies for European crayfish. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 401, 1.

- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková-Balcarová, E., Polícar, T., 2013. Biologie a chov raků. Vodňany: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod., 418 s.
- Lawrence, C. S., Morrissy, N. M., 2000. Genetic improvement of marron *Cherax tenuimanus* Smith and yabbies *Cherax* spp. in Western Australia. *Aquaculture Research*, 31(1), 69-82.
- Leland, J. C., Coughran, J., Furse, J. M., 2012. Further translocation of the Redclaw, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae), to Lake Ainsworth in northeastern New South Wales, Australia. *Crustacean Research*, 7, 1-4.
- Linton, S. M., Allardyce, B. J., Hagen, W., Wencke, P., Saborowski, R., 2009. Food utilisation and digestive ability of aquatic and semi-terrestrial crayfishes, *Cherax destructor* and *Engaeus sericatus* (Astacidae, Parastacidae). *Journal of Comparative Physiology B.*, 179(4), 493-507.
- 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.
- Livingstone, D., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666.
- Lodge, D. M., Kershner, M. W., Aloï, J. E., Covich, A. P., 1994. Effects of an omnivorous crayfish (*Orconectes rusticus*) on a freshwater littoral food web. *Ecology*, 75(5), 1265-1281.
- Loos, R., Locoro, G., Contini, S., 2010. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2. *Water Research.*, 44 (7), 2325-2335.
- Loughlin, C. M., Canosa, I. S., Silveyra, G. R., Greco, L. S. L., Rodríguez, E. M., 2016. Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 96-103.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxy genation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), 100-107.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, O. V., Storey, K. B., 2005a. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(8), 1670-1680.

- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., Storey, K. B., 2005b. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(6), 1319-1330.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., Storey, K. B., 2007. Diethyldithiocarbamate injection induces transient oxidative stress in goldfish tissues. *Chemico-Biological Interactions*, 170, 1-8.
- Lushchak, V. I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 153(2), 175-190.
- Lusková, V., 1996. Sezónní dynamika hematologických a biochemických ukazatelů u modelových druhů lososovitých a kaprovitých ryb. Disertační práce, AV ČR Brno, 163 s.
- Maloschik, E., Ernst, A., Hegedűs, G., Darvas, B., Székács, A., 2007. Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. *Microchemical Journal*, 85 (1), 88-97.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474.
- Marquis, J. K., 1986. Contemporary Issues in Pesticide Toxicology and Pharmacology. Basel: Karger, 6, pp. 87-95.
- Masopust, J., 2000. Klinická biochemie. Karolinum, Praha, 429 s.
- McCarthy, J. F., Shugart, L. R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J. F., Shugart, L. R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- Meakin, C. A., Qin, J. G., Mair, G. C., 2008. Feeding behaviour, efficiency and food preference in yabbies *Cherax destructor*. *Hydrobiologia*, 605(1), 29-35.
- Mikulka, J., Kneifelová, M., 2004. Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy, Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné na: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>, (navštíveno online 15. 2. 2018).
- Momot, W. T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*, 3(1), 33-63.
- Moore, A., Lower, N., 2001. The impact of two pesticides on olfactory-mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 129(2-3), 269-276.
- Morris, S., Callaghan, J., 1998. The emersion response of the Australian yabby *Cherax destructor* to environmental hypoxia and the respiratory and metabolic responses to consequent air-breathing. *Journal of Comparative Physiology B*, 168, 389-398.

- Morrissy, N. M., 1990. Optimum and favourable temperatures for growth of *Cherax tenuimanus* (Smith 1912) (Decapoda: Parastacoidea). *Marine and Freshwater Research*, 41(6), 735-746.
- Morrissy, N. M., Cassells, G., 1992. Spread of the introduced yabbie *Cherax albidus* Clark 1936 in Western Australia. Fisheries. *Research Bulletin of Western Australia*, 92, 1-27.
- Mosig, J., 1998. The Australian yabby farmer. Ladlinks press, Collingwood, 214 pp.
- Musil, J., 1991. Základy biochemie chorobných procesů. Avicenum, Praha, 321 s.
- Narahashi, T., 2010. Neurophysiological effects of insecticides. In: Krieger, R., (Ed.), Hayes' Handbook of pesticides toxicology. Volume 2, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 799-817.
- Neff, J. M., 1985. Use of biochemical measurement to detect pollutant – mediated damage to fish. In: Aquatic toxicology and hazard assessment. ASTM Special Technical Publication, 854, 155-183.
- NRC (National Research Council), 1987. Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3-9.
- Nwani, C. D., Lakra, W. S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S. K., 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(8), 3298-3312.
- Paoletti, F., Mocali, A., 1990. Determination of Superoxide-Dismutase Activity by Purely Chemical-System Based on Nad(P)H Oxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 209-220.
- Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K., Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22(2), 151-156.
- Paskerová, H., 2009. Subletální účinky a biomarkery ekotoxicity sinic. Diplomová práce. Masaríkova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, 80 s.
- Patočka, J., Fusek, J., Bajgar, J., Kassa, J., Herink, J., Štětina, R., Cabal, J., 2004. Vojenská toxikologie. Grada Publishing, Praha, první vydání, 178 s. ISBN 80-47-0608-3.
- Pauli, B. D., Kent, R. A., Wong, M. P., 1990. Canadian water guidelines for metribuzin. *Environmental Canada Sciences Serie*, 179, 135-145.
- Pimpao, C. T., Zampronio, A. R., Silva de Assis, H. C., 2007. Effect of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 122-127.

- Plhalová, L., Haluzová, I., Mácová, S., Doležalová, P., Prásková, E., Maršálek, P., Škořič, M., Svobodová, Z., Pisteková, V., Bedanova, I., 2011. Effects of subchronic exposure to simazine on zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroendocrinoly Letters*, 32, 89-94.
- Racek, J., 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galén, Praha, 92 s. ISBN 80-7262-231-5.
- Richardson, A. M. M., 2007. Evolutionary ecology of social and sexual systems: Crustaceans as model organisms. Behavioral ecology of semiterrestrial crayfish. Oxford University Press, Oxford, pp. 319-338.
- Rodgers, L. J., Saoud, P. I., Rouse, D. B., 2006. The effects of monosex culture and stocking density on survival, growth and yield of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in earthen ponds. *Aquaculture*, 259(1-4), 164-168.
- Rossi, S. C., Da Silva, M. D., Piancini, L. D. S., Ribeiro, C. A. O., Cestari, M. M., de Assis, H. C. S., 2011. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87(6), 603-607.
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Kolcenti, C., Vanzetto, G. V., Sturza, P. F., Hartmann, P. A., Hartmann, M. T., 2018. Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(4), 587-593.
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), 484-491.
- Sala-Rabanal, M., Sanchez, J., Ibarz, A., Fernandez-Borras, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., 2003. Effect of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(2), 105-115.
- Sandeman, R., Sandeman, D., 1990. Development and identified neural systems in the crayfish brain. In: Wiese, K., Krenz, W. D., Tautz, J., Reichert, H., Mulloney, B., (eds) *Frontiers in crustacean neurobiology*. Advances in life sciences. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 498-508.
- Sanderson, J. T., Letcher, R. J., Heneweer, M., Giesy, J. P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloros-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 1027-1031.
- Santos, T. G., Martinez, C. B., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89(9), 1118-1125.
- Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Ruffini, M., Gibertini, G., Marzano, F. N., 2009. The new threat to Italian inland waters from the alien crayfish “gang”: the Australian *Cherax destructor* Clark, 1936. *Hydrobiologia*, 632(1), 341-345.

- Seebacher, F., Wilson, R. S., 2006. Fighting fit: thermal plasticity of metabolic function and fighting success in the crayfish *Cherax destructor*. *Functional Ecology*, 20(6), 1045-1053.
- Sehonová, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Svobodová, Z., 2012. Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. 48 VÚRH Vodňany, s. 5-19.
- Shepard, H. H., 1939. The chemistry and toxicology of insecticides. Burgess Publishing Company, Minneapolis, pp. 383.
- Shull, H. C., Pérez-Losada, M., Blair, D., Sewell, K., Sinclair, E. A., Lawler, S., Ponniah, M., Crandall, K. A., 2005. Phylogeny and biogeography of the freshwater crayfish *Euastacus* (*Decapoda: Parastacidae*) based on nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1), 249-263.
- Schneiderka, P., 2004. Kapitoly z klinické biochemie. Karolinum, Praha, 365s.
- Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, D. R., Klaine, S. J., LaPoint, T. W., Kendal, R. J., Weisskopf, C. P., Giddings, J. M., Giesy, J. P., Hall, L. W., Williams, W. M., 1996. Ecological risk assesment of atrazine in North America surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 31-74.
- Spear, N., Aust, S. D., 1995. Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324, 111-116.
- Stará, A., Máchová, J., Velíšek, J., 2012. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in early life stages of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Neuroendocrinol Letters*, 33(3), 130-135.
- Stará, A., Steinbach, Ch., Wlasow, T., Gomulka, P., Ziemok, E., Máchová, J., Velíšek, J., 2013a. Effect of zeta-cypermethrin on common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Neuroendocrinol Letters*, 34(2): 37-42.
- Stará, A., Kříšťan, J., Zusková, E., Velíšek, J., 2013b. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105, 18-23.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International*, 2014, 6.
- 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.
- 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.

- Svobodová, Z., Pravda, D., Palaková, J., 1986. Unified methods of haematological examination of fish. *Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany. Methods*, 22, pp. 31.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 231 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Poleszczuk, G., Hůda, J., Hamáčková, J., Kroupová, H., 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Veterinaria Brno*, 74, 129-137.
- Štípek, S., 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada, Praha, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- Thompson, K. R., Muzinic, L. A., Engler, L. S., Webster, C. D., 2005. Evaluation of practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, for juvenile Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*, 244(1-4), 241-249.
- Thrall, M. A., 2004. Veterinary haematology and clinical chemistry. Williams and Wilkins cap., Philadelphia, pp. 277-289.
- Thurman, E. M., Cromwell, A. E., 2000. Atmospheric transport, deposition, and fate of triazine herbicides and their metabolites in pristine areas at Isle Royale National Park. *Environmental Science and Technology*, 34(15), 3079-3085.
- Toroser, D., Orr, W. C., Sohal, R. S., 2007. Carbonylation of mitochondrial proteins in *Drosophila melanogaster* during aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2), 418-424.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H., 1995. Persistent oxidative stress in cancer – hypothesis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 358(1), 1-3.
- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-278.
- US EPA (United States Environmental protection agency), 1994. Atrazine, simazine and cyanazine: notice of initiation of special review. 59, pp. 30-60.
- 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.
- Velíšek, J., 1999. Chemie potravin 3. OSSIS Tábor, 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Plačková, V., Novotný, L., Bláhová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinární Medicína*, 53(6), 324-332.
- Velíšek, J., Stará, A., Svobodová, Z., 2011a. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. In: Stoytcheva, M. (Ed.), Pesticides in the modern world – pests control

- and pesticides exposure and toxicity assessment. InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, pp. 377-402.
- Velíšek, J., Stará, A., Kolářová, J., Svobodová, Z., 2011b. Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio L.*) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 305-313.
- Velíšek, J., Stará, A., Máchová, J., Svobodová, Z., 2012. Effects of long-term exposure to simazine in real concentrations on common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Ecotoxicology and Environmetal Safety*, 76, 79-86.
- Velíšek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters*, 34, 31-36.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Maršálek, P., Kocour Kroupová, H., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 600 s.
- Voet, D., Voet, J. G., 2004. Biochemistry. Hoboken. John Wiley and Sons, 1, pp. 591.
- Vryzas, Z., Alexoudisa, C., Vassilioua, 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.
- Walmsley, R. N., Watkinson, L. R., Koay, E. S. C., 1992. Cases in chemical pathology-a diagnostic approach. World Scientific, pp. 125-136.
- Walther, J. S., 2003. Surface water pesticide contamination in the upper Terrebonne Basin of Louisiana. Master's thesis. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Winston, G. W., Di Giulio, R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19(2), 137-161.
- Withnall, F., 2000. Biology of Yabbies (*Cherax destructor*). In: Aquaculture notes, State of Victoria, Department of Natural Resources and Environment. Available from: <http://www.growfish.com.au/Grow/Files/fn082.pdf>, (visited online 15. 12. 2017).
- Wolska, L., Zygmunt, B., Namieśnik, J., 2003. Organic pollutants in the Odra river ecosystem. *Chemosphere*, 53 (5), 561-569.
- Xiang, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 74-80.
- Xing, H., Liu, T., Zhang, Z., Wang, X., Xu, S., 2015. Acute and subchronic toxic effects of atrazine and chlorpyrifos on common carp (*Cyprinus carpio L.*): Immunotoxicity assessments. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 327-333.

- Zahedi, S., Mirvaghefi, A., Rafati, M., Mehrpoosh, M., 2013. Cadmium accumulation and biochemical parameters in juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, upon sublethal cadmium exposure. *Comparative Clinical Pathology*, 22(5), 805-813.
- 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., Ruprich, J., Dvořáková, D., Nepejchalová, L., Vránová E., 2001. Speciální veterinární toxikologie (pro posluchače FVHE a posluchače FVL. Editační středisko VFU, Brno, 148 s. ISBN: 80-7305-403-5.
- Zhang, J. F., Shen, H., Wang, X. R., Wu, J. C., Xue, Y. Q., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55(2), 167-174.
- Zheng, L., Zhang, Y., Yan, Z., Zhang, J., Li, L., Zhu, Y., Zhang, Y., Zheng, X., Wu, J., Liu, Z., 2017. Derivation of predicted no-effect concentration and ecological risk for atrazine better based on reproductive fitness. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 464-470.
- Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, J., Wang, J., Su, J., Yu, C., 2011. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazin exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 26(5), 480-488.

8 Seznam zkratek

96hLC50: koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá 50% úhyn testovaných organismů za 96 hodin

ALB: albuminy

ALP: alkalická fosfatáza

ALT: alanin aminotransferáza

AST: aspartát aminotransferáza

ATR: atrazin

BCA reagent A: Bicinochonic acid solution-Sigma Aldrich (B-9643)

BCA reagent B: Copper(II)sulfate-Sigma Aldrich (C-2284)

BHT: butylovaný hydroxy toluen

BSA: bovinní albumin

Ca²⁺: vápník

CAT: kataláza

CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

CK: kreatinkináza

Cu²⁺: měďnaté ionty

ČHMÚ: Český hydrometeorologický ústav

DDT: dichlordifenyltrichlorethan

DMSO: dimethylsulfoxid

DNA: deoxyribonukleová kyselina

DTNB: 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina

EDTA: ethylendiaminotetraoctová kyselina

Fe²⁺: železnaté ionty

FeSO₄: síran železnatý

GLOB: globuliny

GLU: glukóza

GPx: glutathion peroxidáza
GR: glutathion reduktáza
GSH: redukovaný glutathion
GSSG: oxidovaný glutathion
GST: glutathion S-transferáza
H₂O₂: peroxid vodíku
H₂SO₄: kyselina sírová
HCl: kyselina chlorovodíková
KCl: chlóríd draselný
KH₂PO₄: dihydrogenfosforečnan draselný
LACT: laktát
LDH: laktátdehydrogenázy
LPO: lipidní peroxidace
MDA: malonaldehyd
Mg²⁺: hořčík
Mn²⁺: manganaté ionty
Na₂HPO₄ · 12 H₂O: dodekahydrát dihydrogenfosforečnan sodný
NaCl: chlóríd sodný
NADH: nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NaOH: hydroxid sodný
NBT: nitrobluetetrazolium
NCR: national research council
NH₃: amoniak
O₂⁻: superoxidový aniont
O₃: ozon
OH⁻: hydroxylové anionty

PHOS: anorganický fosfát

PMS: phenazin methosulfonát

ROS: reactive oxygen species-reaktivní kyslíkové radikály

-SH: sulfhydrolové skupiny

SOD: superoxiddismutáza

TAG: triglyceridy

TBA: kyselina 2-thiobarbiturová

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, to znamená látky, jež jsou reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou

TCA: kyselina trichloroctová

TP: celkové proteiny

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethan

Zn²⁺: zinečnaté ionty

9 Abstrakt

Hodnocení subchronického působení atrazinu na raka ničivého

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv subchronického působení atrazinu na chování, hladinu oxidativního stresu, aktivitu antioxidantních biomarkerů a biochemický profil hemolymfy raka ničivého a tím doplnit stávající informace pro posouzení vlivu této látky na životní prostředí.

Celková doba trvání testu byla 28 dní, během prvních 14 dní byli raci vystaveni dvěma koncentracím atrazinu: $6,86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ATR_{env} = environmentální koncentrace zjištěná v povrchové vodě České republiky) a $1,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (ATR10% = odpovídá 10% 96hLC50) následovaných 14denní zotavovací fází v čisté vodě bez chemické látky.

Subchronické působení atrazinu neprokázalo vliv na chování raků a na hladinu oxidativního stresu (měřenou pomocí TBARS). Naproti tomu subchronické působení atrazinu vyvolalo změny v aktivitě antioxidantních enzymů (tkáň hepatopankreatu, svalu a žaber) sledovaných raků, kdy byly pozorovány změny aktivity superoxidodismutázy (SOD) ve všech tkáních. Dále pak byly změny aktivity prokázány u katalázy (CAT; tkáň hepatopankreatu a svalu), glutathionu S-transferázy (tkáň hepatopankreatu a žaber), u glutathionreduktázy (GR) (hepatopankreas) a redukovaného glutathionu (sval). Koncentrace ATR_{env} měla vliv na biochemický profil hemolymfy u následujících parametrů – laktát a alkalická fosfatáza, naproti tomu vliv ATR10% byl prokázán u glukózy, amoniaku, laktátu a alkalické fosfatázy.

Výsledky představené touto studií doplňují informace o vlivu atrazinu na raky a na životní prostředí jako celek. Společně se jeví jako ideální nástroj pro hodnocení testů toxicity při užití triazinových herbicidů.

Klíčová slova: herbicidy, triaziny, atrazin, oxidativní stres, antioxidantní biomarkery, biochemický profil hemolymfy, *Cherax destructor*.

10 Abstract

The evaluation of the sub-chronic exposure to atrazine on crayfish

The aim of this study is to evaluate the sub-chronic effect of atrazin on a behaviour, oxidative stress, antioxidant enzyme activities and biochemical profile of haemolymph in. These complex data should help to appraise the impact of this substance in the environment.

The total test duration was 28 days and was divided into two periods. The first 14 days the crayfish were exposed to two concentrations of atrazine: $6.86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ATRenv = environmental concentration in the water in the Czech Republic) and $1.21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (ATR10% = is coincident to 10% LC50). After the atrazine treatments the depuration 2 weeks phases in water without any chemicals followed.

The results indicate that sub-chronic effect of atrazine influenced neither the behaviour of the crayfish nor the level of oxidative stress (measured by TBARS), whereas the changes of superoxiddismutase (SOD) were observed in all tissues (muscles, gills and hepatopancreas). The changes of enzyme activity were observed in catalase (CAT; hepatopancreas and the muscle tissue), glutathione S-transferase (hepatopancreas and the gills tissue), glutathione reductase (GR; the hepatopancreas tissue) and reduced glutathione (the muscle tissue). The influence of ATRenv on the biochemical profile of haemolymph at the following parameters was estimated only for lactate and alkaline, however phosphatase changes made by ATR10% were significant for glucose, ammonia, lactate and alkaline phosphatase measurements. The sub-chronical effect changed the activity of all antioxidant enzymes in hepatopancreas, muscles and the gills tissue of the observed crayfish.

The presented results in this study are giving compact information of impact of atrazine on the crayfish and the whole water environment. The suggestion of using the crayfish for tests of toxicity looks like an ideal supplement for triazine herbicide estimations.

Key words: herbicides, triazine, atrazine, oxidative stress, antioxidant biomarkers, biochemical profile of haemolymph, *Cherax destructor*.