



## **Středoškolská technika 2016**

**Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT**

### **Hodnocení účinků tonalidu na vodní organizmy**

**Barbora Kotková, Marie Hrdoušková**

Purkyňovo gymnázium, Strážnice  
Masarykova 379, příspěvková organizace

PURKYŇOVO GYMNÁZIUM  
STRÁŽNICE



StzeTech 2016

# Hodnocení účinků tonalidu na vodní organizmy





# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

## HODNOCENÍ ÚČINKŮ TONALIDU NA VODNÍ ORGANIZMY

## EVALUATION OF TONALIDE EFFECTS ON AQUATIC ORGANISMS

AUTOR	Barbora Kotková a Marie Hrdoušková
ŠKOLA	Purkyňovo gymnázium, Strážnice, Masarykova 379, příspěvková organizace
KRAJ	Jihomoravský
ŠKOLITEL	Ing. Jana Blahová, Ph.D.
OBOR	08 ochrana a tvorba životního prostředí

2015/2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou práci na téma Hodnocení účinků tonalidu na vodní organizmy jsme vypracovaly samostatně pod vedením Ing. Jany Blahové a RNDr. Jany Hálkové a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Ve Veselí nad Moravou dne 18. 2. 2016

Podpis:



# VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO



**Jihomoravský kraj**



## **Poděkování**

Na tomto místě bychom rády poděkovaly několika lidem. Především Ing. Janě Blahové, Ph.D. za umožnění realizace práce, za odborné konzultace a ochotnou pomoc. Dále bychom chtěly poděkovat Veterinární a farmaceutické univerzitě za poskytnuté pracoviště. A nakonec také RNDr. Janě Hálkové za vedení práce.

Tato práce byla realizována za finanční podpory Jihomoravského kraje.

## **Anotace**

Cílem této práce bylo na základě studia odborné literatury provést charakteristiku musk sloučenin a zhodnotit jejich negativní účinky na životní prostředí, především na vodní organizmy.

V experimentální části jsme hodnotily účinek tonalidu podávaného v krmivu na vybrané hematologické a biochemické ukazatele krve pstruha duhového.

V rámci biochemického vyšetření byl sledován obsah glukózy, cholesterolu, laktátu, celkového proteinu, albuminu, amoniaku a dále aktivita laktát dehydrogenázy, alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy a alkalické fosfatázy v krevní plazmě. Z hematologických ukazatelů byl sledován obsah hemoglobinu, hematokritová hodnota a počty červených a bílých krvinek. Testovány byly dvě koncentrace tonalidu (nízká a vysoká). Ze zjištěných výsledků je zřejmé, že nízká ani vysoká koncentrace nevedla ke statisticky významným změnám sledovaných ukazatelů. Byly zjištěny pouze rozdíly v případě hematokritové hodnoty.

## **Klíčová slova**

ryby; musk sloučeniny; znečištění vodního prostředí; testy toxicity; biochemické a hematologické ukazatele krve

## **Annotation**

The aim of this work was to show characteristic of musc compounds based on professional literature and also show negative consequence on environment, especially on water organism.

In the experimental part we evaluated impact of (tonalide) added in forage on selected hematological and biochemical indicators in blood of rainbow-colored trout.

From the shown photometrical determinations of concentration of glucose, cholesterol, lactate and total protein, albumin, ammonia and also activity of lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and also hematologic indicators of hemoglobin, hematocrit and count of white blood levels we have concluded that even high concentration of tonalid in forage had not affected hematological and biochemical indicators in blood plasma. The following haematological indicators were monitored: haemoglobin content, haematocrit and the count of erythrocytes and leucocytes. Two levels of tonalide concentration were tested (low and high). The obtained results show clearly that even the high concentration doesn't lead to statistically significant changes of the monitored indicators. Only haematocrit level has changed.

## **Keywords**

fish; musk compounds; contamination of aquatic environment; toxicity tests; biochemical and haematological blood indices

# Obsah

ÚVOD .....	2
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
1.1 MUSK SLOUČENINY .....	3
1.1.1 <i>Obecná charakteristika .....</i>	<i>3</i>
1.1.2 <i>Základní rozdělení musk sloučenin .....</i>	<i>3</i>
1.1.3 <i>Fyzikálně- chemické vlastnosti musk sloučenin .....</i>	<i>6</i>
1.1.4 <i>Musk sloučeniny ve vodním prostředí .....</i>	<i>6</i>
1.1.5 <i>Toxické účinky musk sloučenin .....</i>	<i>7</i>
1.2 PSTRUH DUHOVÝ .....	9
1.3 HEMATOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ UKAZATELE KRVE .....	10
1.3.1 <i>Hematologické ukazatele krve .....</i>	<i>10</i>
1.3.2 <i>Biochemické ukazatele krevní plazmy .....</i>	<i>10</i>
<b>2 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>13</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
3.1 SUBCHRONICKÝ TEST TOXICITY NA PSTRUHU DUHOVÉM .....	14
3.2 ODBĚR VZORKŮ .....	16
3.3 HEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KRVE .....	16
3.4 BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ KREVNÍ PLAZMY .....	16
3.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT .....	19
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>20</b>
4.1 BIOMETRICKÉ UKAZATELE RYB .....	20
4.2 HEMATOLOGICKÉ UKAZATELE .....	22
4.3 BIOCHEMICKÉ UKAZATELE .....	24
<b>5 DISKUZE .....</b>	<b>28</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>29</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>30</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>31</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>33</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>34</b>

# Úvod

Vodní ekosystémy jsou vystaveny stálému přísunu znečišťujících látek přirozeného i antropogenního původu. Tyto látky mohou mít v některých případech za následek negativní změny v kvalitě vody. Proto je národní a evropskou legislativou nařízeno sledování (monitoring) znečištění vodního prostředí. Cílem monitoringu je ochrana vod, která je jedním z nejdůležitějších úkolů v oblasti životního prostředí. Dále je monitoring vodního prostředí velice důležitý i z hlediska odhalování případných rizik konzumace vodních organismů. Počet sledovaných ukazatelů se stále rozrůstá, v současnosti se navíc sledují i další nová xenobiotika, například fluorované látky, léčiva, hormony a látky vyskytující se běžně v hygienických a kosmetických výrobcích. Do vodního ekosystému vstupují organické i anorganické sloučeniny, které mohou ovlivňovat biologickou rovnováhu v recipientech. Hlavním zdrojem znečištění je především antropogenní činnost.

Znečištění vodního prostředí se může projevovat poškozením stavu biocenózy, změnami fyzikálně-chemických vlastností vody, nánosy, estetickými závadami nebo chemickým a bakteriálním znečištěním. V rámci chemického monitoringu se sleduje koncentrace polutantů v různých abiotických (sediment, plaveniny, voda) a biotických (např. ryby, zoobentos, fytozobentos, fytoplankton, makrofyta, biofilm) složkách vodního prostředí. Mezi nejvyužívanější vodní organismy v rámci chemického i biologického monitoringu patří ryby.

Monitorování vodního ekosystému slouží pro zhodnocení míry kontaminace povrchových vod cizorodými látkami. Povrchové vody jsou monitorovány v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady č. 2000/60 ES ze dne 23. října 2000, která stanovuje rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Provozní monitoring se realizuje na lokalitách, které jsou určeny jako rizikové z hlediska výskytu nebezpečných prioritních látek a lze zde očekávat přímé dopady na životní prostředí. Konečným cílem směrnice je dosáhnout látek a přispět k dosažení koncentrací v prostředí, které jsou blízké hodnotám bez negativních dopadů na zdraví bioty a člověka. Seznam prioritních nebezpečných látek je neustále prozkoumáván, hodnocen a postupně doplňován. Do seznamu jsou zahrnuty následující sloučeniny: halogenové organické sloučeniny a látky, které takové sloučeniny mohou vytvářet ve vodním prostředí; organofosforové a organocínové sloučeniny; látky a přípravky nebo produkty jejich rozkladu, u kterých byly prokázány karcinogenní nebo mutagenní vlastnosti nebo vlastnosti, které mohou ovlivnit produkci steroidů, štítnou žlázu, rozmnožování nebo jiné endokrinní funkce organismů ve vodním prostředí.

Významnou skupinou novodobých polutantů jsou mimo jiných také musk sloučeniny, které se používají v kosmetickém průmyslu. Dělí se do čtyř skupin na nitro-, polycyklické, lineární a makrocyclické sloučeniny. Do polycyklických musk sloučenin patří například tonalid. Tonalid je chemická látka, která se přidává do kosmetických výrobků jako vonná složka. Tonalid se bohužel špatně odstraňuje, proto se dostane i přes ČOV a ukládá se v sedimentu a naplaveninách v řece. Tímto může následně ovlivnit vodní prostředí a organismy v něm se vyskytující (např.: problémy při reprodukci ryb).<sup>1,3,5</sup>



# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 MUSK SLOUČENINY

### 1.1.1 Obecná charakteristika

Musk sloučeniny (tzv. mošusové látky) jsou chemické sloučeniny, které vznikají pouze v důsledku antropogenní činnosti. Řadí se mezi relativně novou skupinu syntetických perzistentních organických polutantů, které se běžně vyskytují v životním prostředí. Jsou to syntetické analogy pižma, které se velice často využívají v prostředcích pro osobní péči nebo v různých pracích a čisticích prostředcích jako vonné složky. Každoročně dochází k nárůstu jejich produkce a následné spotřebě. Nyní je celosvětová produkce okolo deset tisíc tun ročně.

Od konce 19. století nahrazují syntetické vonné látky přírodní vonné látky, kterých je více jak dvě stě a byly využívány v průběhu celého historického období. Hlavními důvody širokého používání syntetických vonných látek jsou jejich nižší náklady na získávání. Syntetické musk sloučeniny jsou ve velké míře používány především jako vonné přísady nebo fixátory vůní u výrobků denní spotřeby, např. v kosmetice a hygienických produktech (parfémy, mýdla, šampóny, pleťová mléka) a dále se přidávají do prášků na praní nebo osvěžovačů vzduchu a vonných olejů.

Jedná se většinou o látky lipofilní a perzistentní, a proto se mohou bioakumulovat v tukové tkáni organismů.<sup>3,6</sup>

### 1.1.2 Základní rozdělení musk sloučenin

Podle chemické struktury a fyzikálně-chemických vlastností rozlišujeme 4 základní typy těchto sloučenin: nitro-, polycyklické, makrocyclické a lineární musk sloučeniny.

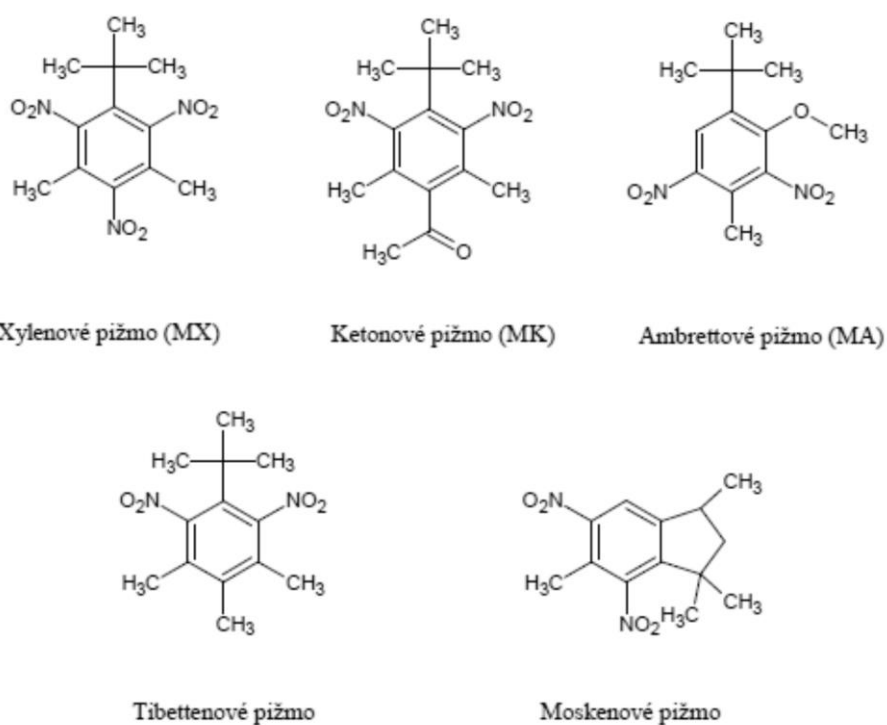
Z chemického hlediska se jedná o heterogenní skupinu organických látek s různorodými vlastnostmi. **Nitromusk sloučeniny** jsou tvořeny substituovanými dinitro- a trinitrobenzenovými deriváty s alkyl-, keto- nebo metoxy skupinou. Nejvýznamnější zástupci jsou: musk keton, musk xylen, musk ambrette, musk tibetene a musk moskene (obrázek č. 1). V experimentálních toxikologických studiích byly u nitromusk sloučenin prokázány nepříznivé účinky na vodní organismy, jako jsou například poruchy reprodukce a vývoje. Z toho to důvodu je jejich používání částečně omezeno a v některých případech zakázáno. Zakázány jsou musk ambrette a tibetene. Pro musk keton a xylen platí výjimka, která uvádí limitní koncentrace, které lze v kosmetických výrobcích používat.

**Polycyklické musk** sloučeniny patří v současnosti mezi nejrozšířenější a nejvyužívanější zástupce mošusových látek. Vykazují vyšší stabilitu, ale i u těchto sloučenin byly prokázány některé z negativních účinků na vodní organismy. Jsou podezřelé jako endokrinní disruptory a byla u nich mimo jiné prokázána vývojová toxicita. Mezi nejčastěji používané zástupce řadíme: galaxolid a tonalid. Lze je nalézt zhruba v 95 % výrobků, které obsahují polycyklické musk sloučeniny. Mezi další zástupce řadíme například traseolid, versalid a další (obrázek č. 2).

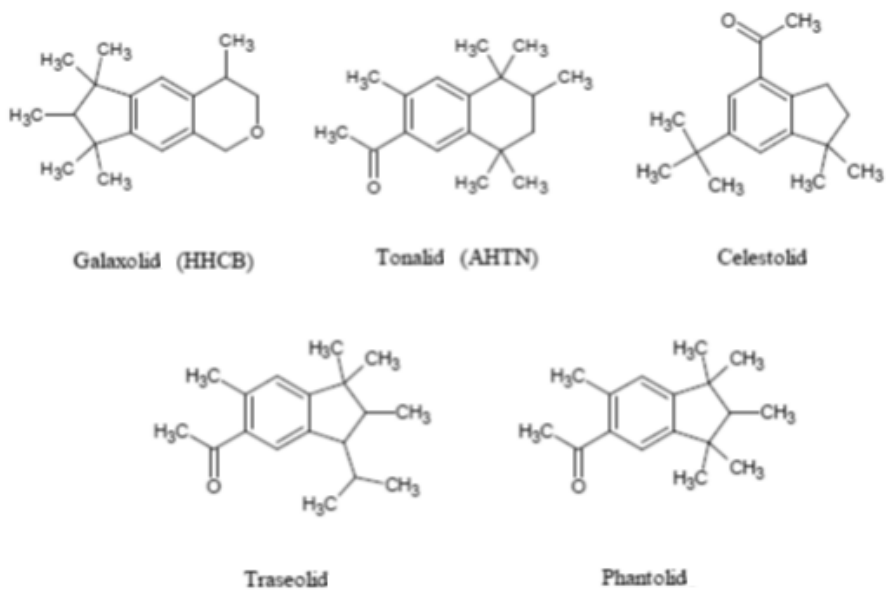
**Makrocyclické musk sloučeniny** představují novější skupinu mošusových látek, která v porovnání s nitro- a polycyklickými musk sloučeninami vykazují vyšší stabilitu a intenzivnější vůni. Z ekologického hlediska je velice důležité, že se uvedené látky snadněji odbourávají ze životního prostředí. Z

chemického hlediska se jedná o různorodou skupinu laktonů a ketonů. Svoji strukturou jsou nejvíce podobné přírodním pižmovým sloučeninám. I u této skupiny se mohou vyskytovat toxické účinky, které jsou spojené především s chronickým působením. V literatuře bohužel můžeme nalézt pouze omezené informace o toxických účincích těchto látek. Mezi nejvýznamnější zástupce patří: etylene brassylate, globalit, exaltolid, civettone a další (obrázek č. 3).

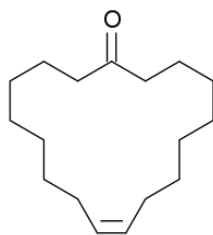
**Lineární musk sloučeniny** patří mezi nejnovější skupinu syntetických vonných látek. Je předpoklad, že tato skupina by alespoň částečně mohla nahradit perzistentní skupinu nitro- a polycyklických sloučenin. V porovnání s makrocyclickými sloučeninami mají výhodou v nižších výrobních nákladech. Informace o jejich osudu v životním prostředí a vlivu na živé organismy jsou velmi strohé. Nejznámější zástupci jsou helvetolid a romandolid (obrázek č. 4).<sup>3,6,7</sup>



Obrázek č. 1: Strukturní vzorce zástupců nitrovaných pižem

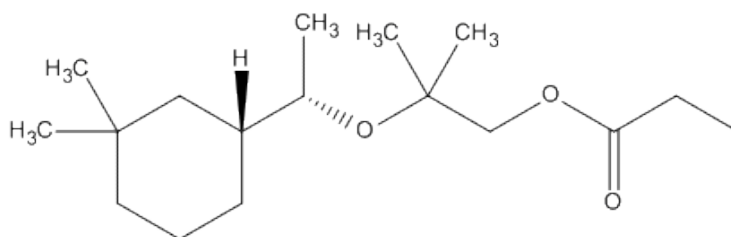


Obrázek č. 2: Strukturální vzorce polycyklických musk sloučenin

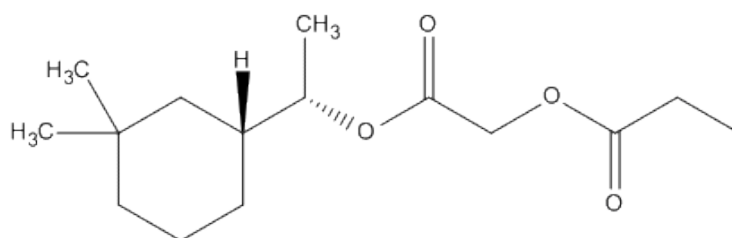


Civettone

Obrázek č. 3: Strukturální vzorec makrocyclických musk sloučenin



Helvetolide



Romandolide

### 1.1.3 Fyzikálně- chemické vlastnosti musk sloučenin

Syntetické musk sloučeniny jsou obvykle pevné krystalické látky nebo kapaliny nasládlé vůně. Patří mezi semivolatilní organické látky nepolárního charakteru. Díky své lipofilitě se dobře rozpouští v tucích a dobře se mísí s nepolárními organickými rozpouštědly. Relativní molekulová hmotnost musk sloučenin se běžně pohybuje v rozmezí 200 – 300 a tlak nasycených par stoupá od relativně málo těkavých nitromusk sloučenin k vysoce těkavým lineárním musk sloučeninám.

Z fyzikálně-chemických vlastností dále vyplývá, že skupiny nitromusk a polycyklické musk sloučeniny mají stabilnější struktury, což znamená větší odolnost vůči vnějším vlivům. Vykazují ubikvitární výskyt, a to zejména ve vodním prostředí, a proto jsou zařazeny mezi novodobé perzistentní organické polutanty.

Rychlost mineralizace musk sloučenin je sice nízká, avšak ve vhodném prostředí může docházet k částečné (bio)degradaci. Bylo prokázáno, že například galaxolid a tonalid degradují v aktivovaném kalu na polárnější oxidační produkty. V důsledku lipofilních vlastností a relativně snadné adsorpci na organickou hmotu se musk sloučeniny snadno akumulují v živých organismech a v sedimentech (kalech).

Sloučeniny ze skupiny makrocyclických a lineárních musk sloučenin mají relativně bezpečnější vlastnosti ve vztahu k životnímu prostředí, protože snadněji dochází k (bio)degradaci.<sup>3,6</sup>

### 1.1.4 Musk sloučeniny ve vodním prostředí

Primárním zdrojem kontaminace životního prostředí musk sloučeninami jsou zejména vypouštěné odpadní vody (efluent) z ČOV. Dalším nezanedbatelným zdrojem jsou čistírenské kaly, které se rozšířeně využívají a následně aplikují v zemědělství. Výskyt musk sloučenin v životním prostředí je proto intenzivně monitorován zejména ve vodních ekosystémech. Kontaminace říční vody, ryb a sedimentu syntetickými musk sloučeninami je nejvyšší pod velkými městskými aglomeracemi; jejich koncentrace dále po proudu v důsledku zředování, degradace a sorpčních jevů klesá. Mezi perzistentní musk látky, které lze běžně ve vodním prostředí detekovat, řadíme v největší míře zástupce nitro- a polycyklických musk sloučenin.

Musk sloučeniny jsou obecně hodnoceny jako látky perzistentní, v prostředí může ovšem docházet k jejich částečné degradaci (např. fotodegradace, mikrobiální degradace). Při čistírenských procesech dochází pouze k částečnému odstranění těchto kontaminantů v závislosti na chemické struktuře.

Musk sloučeniny jsou látky lipofilní. Jejich rozpustnost se pohybuje řádově v desítkách až tisících  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Přednostně se kumulují v sedimentu, můžeme je ovšem běžně detekovat i ve vodě.

V následující tabulce jsou uvedeny zjištěné hodnoty detekovaných sloučenin v různých lokalitách u nás i ve světě. Tabulka je zpracována z informací získaných z odborných prací publikovaných v recenzovaných vědeckých časopisech.<sup>1,3,6</sup>

Lokalita	Matrice	Detekované sloučeniny	Literatura
Česká republika ( řeka Svatka )	odtok ČOV	HHCB 1231 ng.l <sup>-1</sup>	Vávrová a kol. (2010)
		AHTN 143,6 ng.l <sup>-1</sup>	
		MK 20,22 ng.l <sup>-1</sup>	
		MX 55,22 ng.l <sup>-1</sup>	
Velká Británie (řeka Tamar)	odtok z ČOV	HHCB 987-2 098 ng.l <sup>-1</sup>	Summer a kol. (2010)
		AHTN 55-159 ng.l <sup>-1</sup>	
		ADBI 4-13 ng.l <sup>-1</sup>	
		AHMI 6-9 ng.l <sup>-1</sup>	
		MK 18-30 ng.l <sup>-1</sup>	
		MX 4-7 ng.l <sup>-1</sup>	
Německo (řeka Lippe)	voda	HHCB < 10-180 ng.l <sup>-1</sup>	Dsikowitzky a kol. (2002)
	sediment	ANTh < 10-70 ng.l <sup>-1</sup>	
		HHCB 5-191 µg.kg <sup>-1</sup> ANTh 2-1 399 µg.kg <sup>-1</sup>	
USA (New York – řeka Hudson)	voda	HHCB 3,95-25,8 ng.l <sup>-1</sup>	Reiner a Kannan (2011)
	sediment	ANTh 5,09-22,8 ng.l <sup>-1</sup>	
		HHCB 73-388 µg.kg <sup>-1</sup>	
		ANTh 113-544 µg.kg <sup>-1</sup>	
Hudson (USA)	voda	HHCB 3,95-25,8 ng.l <sup>-1</sup>	Ropková <sup>7</sup> (2014)
		ANTh 5,09-22,8 ng.l <sup>-1</sup>	
	sediment	HHCB 72,8-388 µg.kg <sup>-1</sup>	
		ANTh 113-544 µg.kg <sup>-1</sup>	
	ryby	HHCB 1-125 ng.g <sup>-1</sup>	
		ANTh 1-32,8 ng.g <sup>-1</sup>	
Korea (řeka Nakdong)	voda	HHCB 100-13 920 ng.l <sup>-1</sup>	Lee a kol. (2010)
		ANTh 30-2 800 ng.l <sup>-1</sup>	
		MK < 5-420 ng.l <sup>-1</sup>	

Tabulka č. 1: Koncentrace musk sloučenin v různých maticích vodního ekosystému v České republice a zahraničí (AHTN - tonalid, AHMI – phantolid, HHCB - galaxolid, MK- musk keton, MX – musk xylen)

### 1.1.5 Toxické účinky musk sloučenin

Akutní toxicita musk sloučenin je velmi nízká, mnohem závažnější roli mohou hrát potencionální chronické účinky, které přicházejí v úvahu při dlouhodobém zatížení organismu nízkými koncentracemi těchto látek. Syntetické musk sloučeniny se běžně nacházejí nejen v životním prostředí a biotě, ale dokonce i u lidí v tukové tkáni, mateřském mléku a krvi. V testech toxicity prováděných na rybách bylo zjištěno, že nitro- a polycyklické musk sloučeniny mohou působit jako endokrinní disruptory, byly prokázány jak antiestrogenní, tak estrogenní účinky.

Toxikologické studie také uvádějí, že musk sloučeniny mohou podpořit tvorbu reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů a indukovat oxidativní stres. Poruchy antioxidantního ochranného systému pak mohou vést k porušení struktury důležitých biomolekul. Dále bylo potvrzeno, že některé musk sloučeniny mohou způsobovat poruchy vývoje, zpomalení růstu nebo výskyt různých malformací u ryb, obojživelníků a vodních bezobratlých. V tabulce č. 2 jsou shrnuty výsledky získané z vybraných toxikologických studií.<sup>1,3,6</sup>

Organismus	Testovaná látka (koncentrace/dávka)	Expozice	Účinky na organismus	Literatura
<b>Karas stříbřitý</b> ( <i>Carassius auratus</i> )	HHCB (150 µg.l <sup>-1</sup> )	14 dnů	↑ SOD, CAT (játra) ↑ lipidní peroxidace, POD (játra)	Chen a kol. (2012)
<b>Morčák evropský</b> ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	HHCB (50 mg.kg <sup>-1</sup> ), jednorázová i.p. aplikace)	24 hodin od aplikace	↑ UGT ↓ CYP17 (gonády ♂)	Fernandes a kol. (2013)
<b>Medaka japonská</b> (♂) ( <i>Oryzias latipes</i> )	HHCB (500 µg.l <sup>-1</sup> ) AHTN (500 µg.l <sup>-1</sup> )	3 dny	↑ VTG (játra) ↑ exprese VTG a Era mRNA (játra)	Yamauchi a kol. (2008)
<b>Danio pruhované</b> ( <i>Danio rerio</i> )	HHCB (370 µg.l <sup>-1</sup> )	2 dny	↑ SOD, POD ↓ lipidní peroxidace	Zhang a kol. (2012)
<b>Danio pruhované</b> (♀) ( <i>Danio rerio</i> )	MK (10 mg.g <sup>-1</sup> krmiva)	8 týdnů	↓ délka a váha těla ↓ HSI, GSI poruchy fertility	Carlsson a kol. (2000)
<b>Drápatka vodní</b> ( <i>Xenopus laevis</i> )	MX (400 µg.l <sup>-1</sup> ) MK (400 µg.l <sup>-1</sup> ) MM (400 µg.l <sup>-1</sup> )	11 dnů (embryonální test)	↑ mortalita (25-30%)	Chou a Dietrich (1999)
<b>Škeble</b> ( <i>Lampsilis cardium</i> )	HHCB (1600µg.l <sup>-1</sup> ) AHTN (1200µg.l <sup>-1</sup> )	96 h	↑ mortalita zpomalení růstu	Gooding a kol. (2006)
<b>Plazivka</b> ( <i>Nitocra spinipes</i> )	MK (0,3 mg.l <sup>-1</sup> ) HHCB (0,2 mg.l <sup>-1</sup> ) ADBI (0,3 mg.l <sup>-1</sup> )	8 dnů	inhibice vývoje larválního stádia ↑ mortalita	Breitholtz a kol. (2003)
<b>Vznášivka</b> ( <i>Acartia tonsa</i> )	MK (2 mg.l <sup>-1</sup> ) HHCB (0,3 mg.l <sup>-1</sup> ) AHTN (0,4 mg.l <sup>-1</sup> ) ADBI (1,5 mg mg.l <sup>-1</sup> )	5 dnů (larvální vývojový test)	inhibice vývoje larválního stádia ↑ mortalita	Wollenberg a kol. (2003)

Tabulka č. 2: Účinky vybraných nitro- a polycyklických musk sloučenin na vodní organismy (ADBI – celestolid, AHTN – tonalid, HHCB - galaxolid MM – musk mosken, MK – musk keton, MX – musk xylen)

## 1.2 PSTRUH DUHOVÝ

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*, obrázek č. 5) u nás obývá především tekoucí vody pstruhového a lipanového pásma, vzácněji žije i v některých nádržích. Je náročný na čistotu vody a vysoký obsah kyslíku, který je limitujícím faktorem pro jeho další rozšíření. Právě chladná na kyslík bohatá voda umožnila přežívání pstruha v takzvaných sekundárních pstruhových pásmech pod údolními nádržemi.<sup>9</sup>

Pstruh duhový pro nás byl modelový živočich, na kterém jsme prováděly experimentální část.



Obrázek č. 5: Pstruh duhový

## 1.3 HEMATOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ UKAZATELE KRVE

Hematologické a biochemické ukazatele krve patří mezi významné ukazatele, které informují o aktuálním zdravotním stavu jedince.

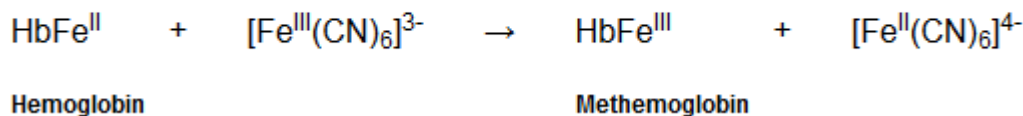
### 1.3.1 Hematologické ukazatele krve

**Hematokrit:-** Hematokritová hodnota vyjadřuje objem erytrocytů k celkovému objemu krve. Pro její stanovení je nutné v příslušném vzorku krve oddělit erytrocyty od plazmy tak, aby jako celek zaujaly skutečný objem. Toho lze docílit odstředěním krve ve speciálních kapilárách. Stanovení hematokritu se nejčastěji provádí v nesrážlivé krvi, kdy jako antikoagulační činidlo lze využít heparin nebo EDTA. Pro stanovení lze využít venózní i kapilární krev. <sup>10</sup>

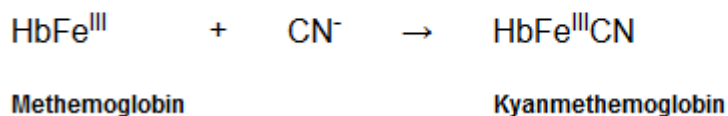
**Hemoglobin:-** Hemoglobin je metaloprotein, který funguje jako červené krevní barvivo erytrocytů. Jeho hlavní funkcí je schopnost vázat kyslík a jeho následný přenos do tkání. Biologicky aktivní je pouze v erytrocytech. Hemoglobin se skládá z hemu (vlastní barvivo s dvojmocným železem) a globinu (čtyři polypeptidové řetězce).

Ke stanovení hemoglobinu se využívá kyanohemoglobinová metoda. Princip metody spočívá v tom, že za pomoci Drabkinova roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a převede se na stálý kyanohemoglobin, který se následně stanovuje spektrofotometricky. Stanovení hemoglobinu se nejčastěji provádí v nesrážlivé krvi, kdy jako antikoagulační činidlo lze využít heparin nebo EDTA. Pro stanovení lze využít venózní i kapilární krev. <sup>10</sup>

*Oxidace hemoglobinu na methemoglobin:*



*Přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin:*



**Počty červených a bílých krvinek:-** Jsou to nejčastější tělní buňky. Červené krvinky (erytrocyty) se v organismu ryb podílejí na přenosu kyslíku do žaber. V červené krvince se nachází červené barvivo hemoglobin, které na sebe váže kyslík. V lidském těle se nachází 4,8 mil. červených krvinek na 1 mm<sup>3</sup> a u ryb se nachází 700 000-3,5 mil. na 1 mm<sup>3</sup>. Bílé krvinky neboli leukocyty se podílí na imunitním systému, bojují v těle proti virům, bakteriím a i proti nádorovým buňkám. V lidském těle se jich nachází 4000-10 000 na 1 mm<sup>3</sup> a u ryb se jich nachází kolem 30 000-100 000 na 1 mm<sup>3</sup>. <sup>4,8</sup>

### 1.3.2 Biochemické ukazatele krevní plazmy

Stanovení biochemických ukazatelů v krevní plazmě patří mezi základní vyšetřovací metody, které nás informují o aktuálním zdravotním stavu jedince.



**Glukóza:-** Glukóza je hlavní jednotkou sacharidového metabolismu a využívá se jako indikátor jeho úrovně. Měření koncentrace glukózy v séru nebo plazmě se používá zejména při stanovení diagnózy a monitorování léčby diabetu. K jiným aplikacím patří zjišťování neonatální hypoglykémie, vyloučení karcinomu buněk pankreatických ostrůvků, jakož i vyhodnocení metabolismu sacharidů při různých onemocněních.

**Cholesterol:-** Cholesterol je složkou buněčných membrán, předchůdce steroidních hormonů, žlučových kyselin syntetizovaných tělními buňkami absorbovanými jídlem. Cholesterol je transportován v plazmě pomocí lipoproteinů, a to komplexy mezi lipidy a apolipoproteiny. Existují čtyři třídy lipoproteinů: lipoproteiny s vysokou hustotou, lipoproteiny s nízkou hustotou, lipoproteiny s velmi nízkou hustotou a chylomikrony.

**Laktát:-** Laktát (kyselina mléčná) je produktem neoxidační glykolýzy. Jeho zvýšení se spojovává s hypoxickými stavy (šokové stavy), fyzickou námahou, dehydratací, orgánovou insuficiencí atd. Stanovení laktátu lze provádět jak v plazmě, tak i v séru.

**Celkový protein:-** Měření celkové bílkoviny je užitečné pro celou řadu onemocnění. Klesající koncentrace celkové bílkoviny může ukazovat na nedokonalou syntézu bílkovin v játrech, ztrátu bílkovin v důsledku poškození funkce ledvin, střevní malabsorpci nebo nutriční nedostatečnost. Zvýšené hladiny bílkovin jsou způsobeny chronickým zánětlivým onemocněním, cirhózou jater a dehydratací.

**Albumin:-** Albumin je důležitý vazebný a transportní protein pro mnoho substancí v plazmě a je hlavní činitelem plazmatického osmotického tlaku. Měření koncentrace albuminu v séru je používáno při diagnóze a monitorování jaterních onemocnění (cirhózy jater). Hodnoty koncentrace albuminu indikují nutriční stav jedince, a proto je používán pro detekci malnutrice a pro prognózu starších hospitalizovaných pacientů.

**Amoniak:-** Amoniak, pocházející z katabolismu aminokyselin a z působení střevních bakterií na proteiny potravin, je konvertován na ureu v jaterních hepatocytech a tak se stává netoxickým. Studie ukazují, že nadbytek amoniaku může mít toxický efekt na centrální nervový systém, manifestující se typickými neurologickými poruchami. Zvýšená hladina amoniaku může být také pozorována u těžkých jaterních selhání, které se mohou přihodit u Reyova syndromu, virových hepatitid nebo cirrhóz.

**Laktát dehydrogenáza (LDH):-** Laktát dehydrogenáza je enzym, který se skládá z pěti různých izoenzymů, které katalyzují vzájemnou přeměnu L-laktátu a pyruvátu. LDH je přítomna v cytoplazmě všech lidských tkání s vyššími koncentracemi v játrech, srdci a v kosterním svalu a s nižšími koncentracemi v erytrocytech, slinivce břišní, ledvinách a žaludku. Zvýšená aktivita LDH je pozorována při patologických stavech. Vzhledem k nedostatečné orgánové specifitě je ovšem stanovení jejich izoenzymů nebo jiných enzymů, jako např.: alkalické fosfatázy nebo ALT/AST, nezbytné pro diferenciální diagnostiku

**Alaninaminotransferáza (ALT) a Aspartátaminotransferáza (AST):-** Alaninaminotransferáza a aspartátaminotransferáza jsou nejdůležitějšími zástupci skupiny enzymů. Jakožto specifický ledvinový enzym je ALT významně zvýšen pouze u hepatobiliárních onemocnění. Zvýšené hladiny AST se však mohou vyskytovat i ve spojení se srdečními poruchami nebo poruchami kosterního svalu, jakož i u jaterního parenchymu. Souběžná měření ALT a AST se proto provádějí za účelem rozlišení, zda jde o poruchy srdce nebo o poškození kosterního svalu. Poměr AST/ALT se používá u diferenciální

diagnózy onemocnění jater. Poměry menší než 1 ukazují na mírné poškození jater, zatímco poměry větší než 1 jsou spojovány se závažnějším, mnohdy chronickým onemocněním jater.

**Alkalická fosfatáza (ALP):**- Alkalická fosfatáza je hydrolytický enzym optimálně působící při alkalickém pH, vyskytuje se v krvi v mnoha různých formách, které se vytváří v kostech a játrech, ale i v jiných tkáních, jako např.: v ledvinách, placentě, střevech, varlatech, brzlíku, plicích a tumorech.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se problematikou výskytu musk sloučenin ve vodním prostředí. Součástí literární rešerše jsou také informace o negativních účincích těchto látek na vodní organizmy.

Dalším cílem práce bylo provést zhodnocení účinků tonalidu podávaného v krmivu na vybrané hematologické a biochemické ukazatele krve pstruha duhového. V rámci hematologických ukazatelů byly sledovány změny koncentrace hemoglobinu, hematokritová hodnota a počty červených a bílých krvinek. V rámci biochemického profilu krevní plazmy byly sledovány koncentrace glukózy, cholesterolu, laktátu, celkového proteinu, albuminu, amoniaku a dále aktivity laktát dehydrogenázy, alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy, alkalická fosfatázy. Testovány dvě různé koncentrace tonalidu v krmivu - nízká a vysoká koncentrace.

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 SUBCHRONICKÝ TEST TOXICITY NA PSTRUHU DUHOVÉM

V roce 2015 byl realizován 6-týdenní subchronický test toxicity na pstruhu duhovém (obrázek 6). V rámci uvedeného testu toxicity byl hodnocen vliv tonalidu podávaného v krmivu. Testovány byly dvě různé koncentrace –  $854 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (nízká koncentrace) a  $8\,699 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (vysoká koncentrace). Nižší testovaná koncentrace odpovídá environmentální koncentraci tonalidu v tkáních ryb při běžném monitoringu. Test byl prováděn na Ústavu ekologie a chorob zvířete, ryb, včel (VFU Brno).

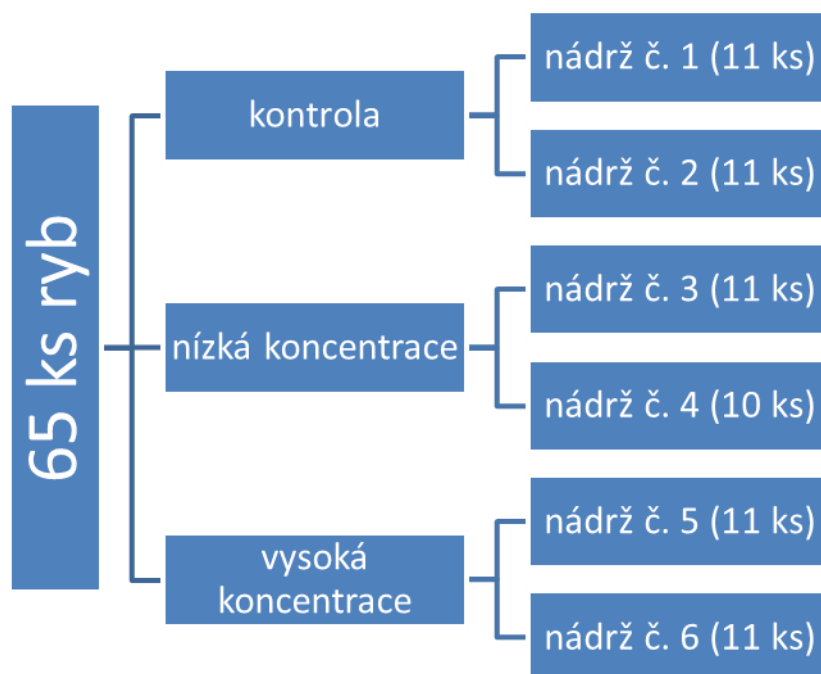
Experiment byl realizován v nádržích o objemu 1000 l, které byly vybaveny recirkulačním systémem (obrázek 7). Do experimentu bylo zaraženo celkem 65 kusů ryb, které byly rozděleny do šesti nádrží. V experimentu byla kontrolní skupina, která byla krmena krmivem bez přídavku tonalidu a dále zde byly dvě pokusné skupiny, kterým bylo podáváno krmení s přídavkem tonalidu (nízká a vysoká koncentrace). Všechny skupiny byly testovány duplicitně. Schéma experimentu je uvedeno na obrázku 8. Krmivo s přídavkem tonalidu bylo připraveno ve spolupráci s Ústavem technologie léku (Farmaceutická fakulta, VFU Brno) pomocí patentované metody. Ryby byly krmeny dvakrát denně dávkou, která odpovídá 1 % tělesné hmotnosti. Každý den bylo prováděno čištění nádrží a byla sledována teplota, pH a obsah kyslíku. Dále byla v jednotlivých nádržích kontrolována kvalita vody a byla sledována koncentrace chloridových iontů, obsah dusičnanů, dusitanů, amoniaku. Uvedené ukazatele byly stanovovány pomocí komerčních kitů.



Obrázek č. 6: Pstruh duhový



Obrázek č. 7: Recirkulační systém



Obrázek č. 8: Schéma experimentu

## **3.2 ODBĚR VZORKŮ**

Experiment byl ukončen po 6 týdnech. U ryb byl proveden odběr krve z ocasní cévy. Krev, která byla stabilizována přídatkem heparinu, byla odebírána pro následné hematologické a biochemické vyšetření. Hematologické vyšetření bylo provedeno ihned po odběru krve. Pro biochemické vyšetření byla krev nejprve centrifugována (10 minut, 4 °C, 3000 otáček min<sup>-1</sup>) a následně separovaná plazma byla zamražena do doby analýzy (- 85 °C, 1 měsíc).

## **3.3 HEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KRVE**

Ve vzorcích nesrážlivé krve bylo ihned po odběru provedeno stanovení základních hematologických ukazatelů. Byl hodnocen počet červených a bílých krvinek, dále bylo provedeno stanovení hematokritové hodnoty a koncentrace hemoglobinu.

Ke stanovení počtu červených a bílých krvinek byl použit mikroskop, počítání bylo provedeno v Bürkerově komůrce. Hematokrit byl stanoven mikrohematokritovou metodou za použití kapilár, do které byla zhruba do 2/3 výšky nasáta nesrážlivá krev. Po odstředění byl oddělený sloupec erytrocytů odečten za pomoci hematokritového měřidla. Hemoglobin byl stanoven pomocí kyanohemoglobinové metody. Princip metody spočívá v tom, že za pomoci Drabkinova roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a převede se na stálý kyanohemoglobin, který se následně stanovuje spektrofotometricky při 540 nm.

## **3.4 BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ KREVNÍ PLAZMY**

Ve vzorcích plazmy bylo po rozmražení provedeno vyšetření vybraných biochemických ukazatelů. Byla sledována koncentrace glukózy, cholesterolu, laktátu, celkového proteinu, albuminu, amoniaku a dále aktivity LDH, ALT, AST, ALP. Biochemické ukazatele byly analyzovány s využitím automatického analyzátoru Konelab 20i za použití komerčně dodávaných kitů (Biovendor, Brno).

## PRINCIPY JEDNOTLIVÝCH METOD:

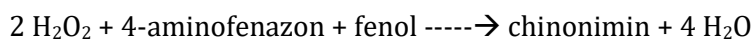
### **Glukóza**

Pro stanovení glukózy bude využita enzymatické fotometrické stanovení za použití glukózaoxidázy. Princip metody je založen na oxidaci glukózy za působení enzymu glukózaoxidázy a následné reakci vzniklého peroxidu vodíku s 4-aminofenazonem a fenolem a spolupůsobení enzymu peroxidázy, kdy dochází ke vzniku barevného komplexu (Rinderova reakce).<sup>2</sup>

GOD



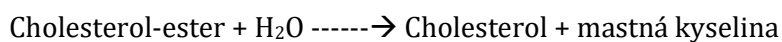
POD



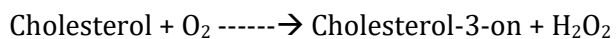
### **Cholesterol**

Cholesterol je stanoven po enzymatické hydrolýze a oxidaci. Barevným indikátorem je chinonimin, který vzniká z 4-aminofenazonu, fenolu a peroxidu vodíku za katalytického působení peroxidázy.<sup>2</sup>

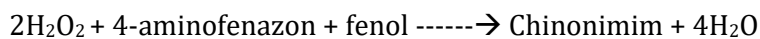
CHE



CHO



POD



### **Laktát**

Pro jeho stanovení je využívána spektrofotometrická metoda. Tato metoda je založena na oxidaci laktátu laktátoxidázou za vzniku pyruvátu a peroxidu vodíku, který v přítomnosti peroxidázy (POD) reaguje s N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidinem za vzniku barevné sloučeniny. Stanovení laktátu lze provádět jak v plazmě, tak i v séru.<sup>2,11</sup>

## Měření celkové bílkoviny

Stanovení provádíme pomocí biuretovy metody fotometricky. Celková bílkovina tvoří v alkalickém prostředí s ionty mědi fialově-modrý barevný komplex. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství celkové bílkoviny ve vzorku.<sup>2</sup>

## Albumin

Stanovení provádíme pomocí bromkresolové zeleně fotometricky. Sérový albumin v přítomnosti bromkresolové zeleně ve slabě kyselém pH způsobuje barevnou změnu indikátoru ze žluto-zelené na zeleno-modrou.<sup>2</sup>

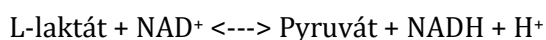
## Amoniak

Amoniak se za přítomnosti glutamát dehydrogenázy, váže s  $\alpha$ -ketoglutarátem a NADH za vzniku glutamátu a NAD<sup>+</sup>. Snížení absorbance (NADH  $\rightarrow$  NAD<sup>+</sup>) při 340 nm je proporciální koncentraci amoniaku ve vyšetřované plazmě. Reagent obsahuje laktát dehydrogenázu (LDH) v přebytku k rychlé redukci endogenního pyruvátu, který tak neinterferuje se systémem analýzy.<sup>2</sup>

## Laktát dehydrogenáza (LDH).

Optimalizované stanovení v souladu s IFCC a German Society of Clinical Chemistry (DGKC).<sup>2</sup>

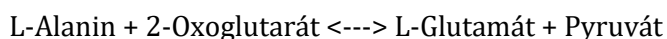
LDH



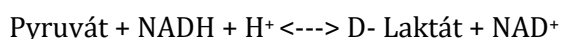
## Alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST)

Optimalizované UV stanovení v souladu s IFCC.<sup>2</sup>

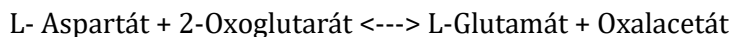
ALT



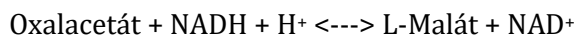
LDH



AST



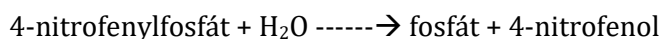
MDH



## Alkalická fosfatáza

Kinetické fotometrické stanovení se provádějí v souladu s International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).<sup>2</sup>

ALP





### **3.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

Získaná data byla následně statisticky zpracována pomocí statistického programu Unistat 5.6. U dat byla nejprve testována normalita pomocí statistického testu Shapiro-Wilk. Zjišťování rozdílů jednotlivých ukazatelů mezi skupinami bylo prováděno pomocí parametrických (Tukey HSD) a neparametrických testů (vícevýběrový mediánový test). Testování bylo prováděno na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

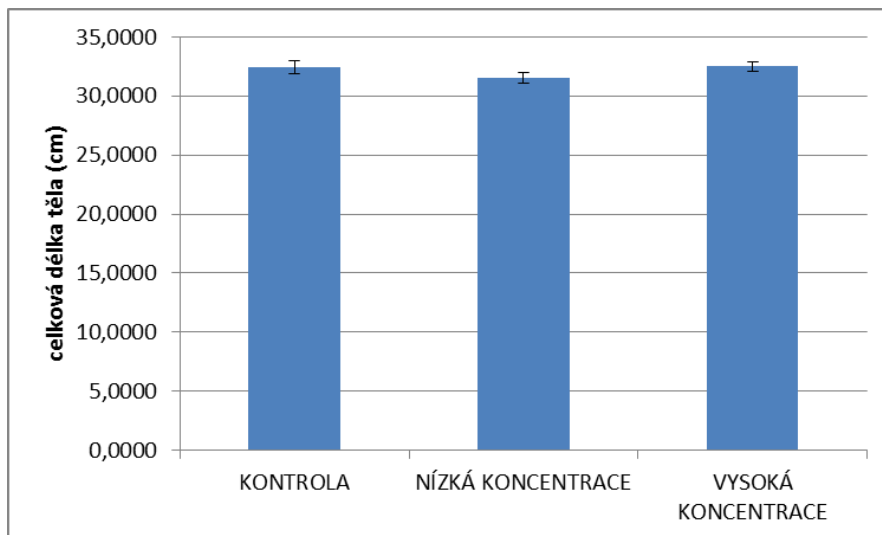
# 4 VÝSLEDKY

## 4.1 BIOMETRICKÉ UKAZATELE RYB

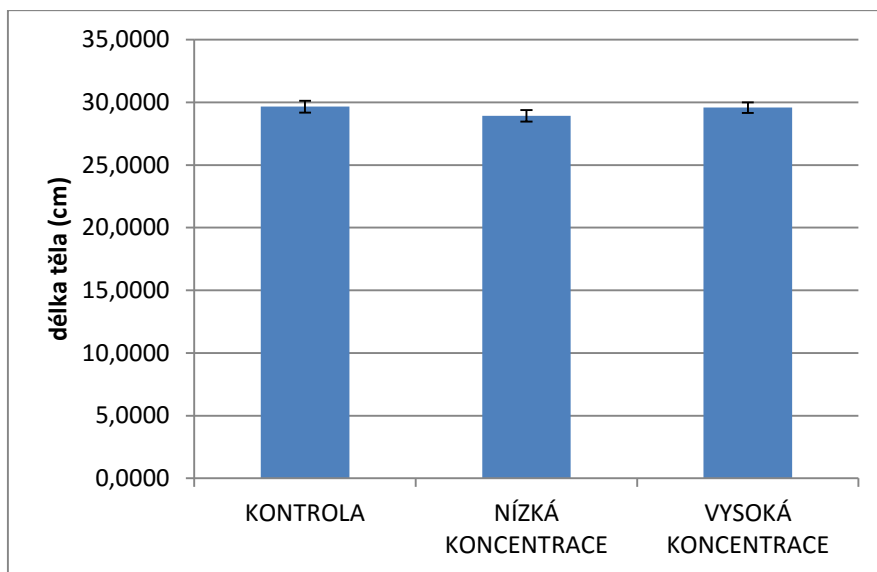
U testovaných ryb bylo prováděno měření základních biometrických ukazatelů. Hodnotila se délka těla, celková délka těla a váha těla. Výsledky jednotlivých ukazatelů jsou znázorněny v tabulce č. 3 a v grafech č. 1-3. Při statistickém hodnocení nebyly u jednotlivých ukazatelů zjištěny statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami. Data jsou v tabulce a grafech uvedena jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba průměru.

skupina	Celková délka těla (cm)	Délka těla (cm)	Váha těla (g)
Kontrola	32,4 $\pm$ 0,5	29,6 $\pm$ 0,5	525,8 $\pm$ 26,7
Nízká koncentrace	31,5 $\pm$ 0,5	28,9 $\pm$ 0,4	507,2 $\pm$ 17,0
Vysoká koncentrace	32,5 $\pm$ 0,4	29,5 $\pm$ 0,4	515,5 $\pm$ 24,2

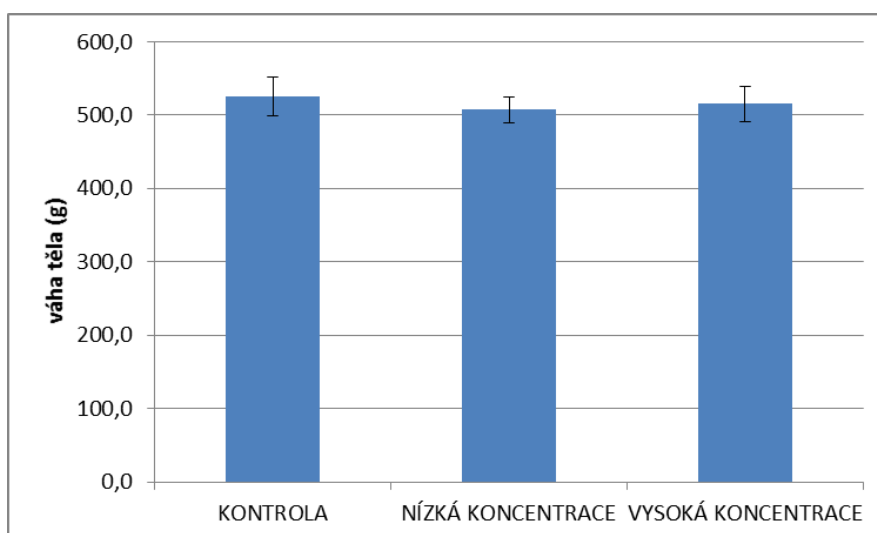
Tabulka č. 3: Výsledky měření biometrických ukazatelů



Graf č. 1: Výsledky měření celkové délky těla pstruha duhového



*Graf č. 2: Výsledky měření délky těla pstruha duhového*



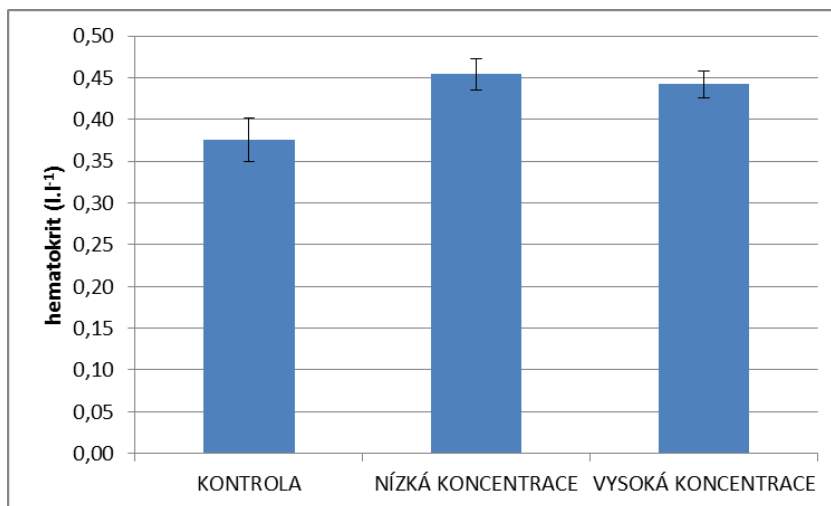
*Graf č. 3: Výsledky měření váhy pstruha duhového*

## 4.2 HEMATOLOGICKÉ UKAZATELE

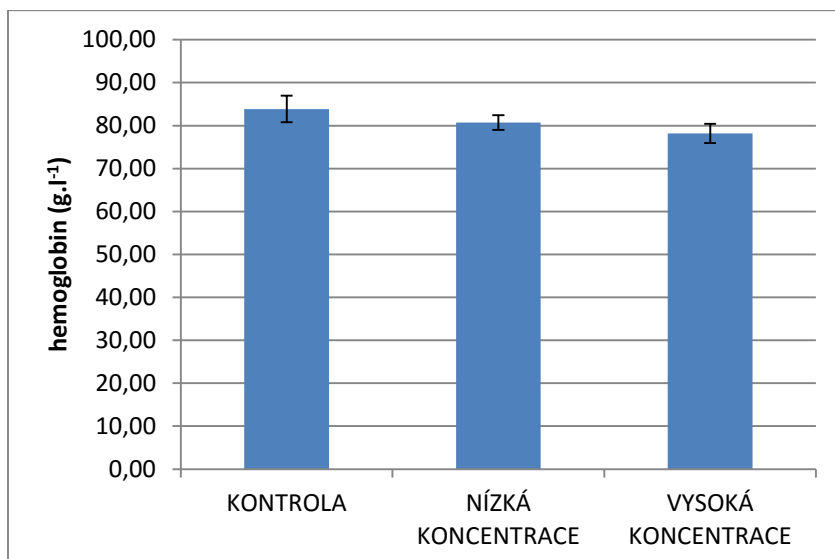
Ve vzorcích krve bylo prováděno vyšetření vybraných hematologických ukazatelů. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4. Výsledky jednotlivých parametrů jsou také uvedeny v grafech č. 4-7. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba průměru. Při statistickém vyhodnocení byly zjištěny statisticky významné rozdíly v případě hematokritu a to mezi kontrolní skupinou a experimentální skupinou vystavené nízké koncentraci tonalidu. V případě ostatních ukazatelů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

skupina	Hematokrit (l.l <sup>-1</sup> )	Hemoglobin (g.l <sup>-1</sup> )	Červené krvinky (10 <sup>12</sup> .l <sup>-1</sup> )	Bílé krvinky (10 <sup>9</sup> .l <sup>-1</sup> )
<b>Kontrola</b>	0,4 $\pm$ 0,03	83,9 $\pm$ 3,1	1,4 $\pm$ 0,1	18,0 $\pm$ 1,4
<b>Nízká koncentrace</b>	0,5 $\pm$ 0,02	80,7 $\pm$ 1,7	1,5 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 2,2
<b>Vysoká koncentrace</b>	0,4 $\pm$ 0,02	78,2 $\pm$ 2,2	1,5 $\pm$ 0,1	17,4 $\pm$ 1,5

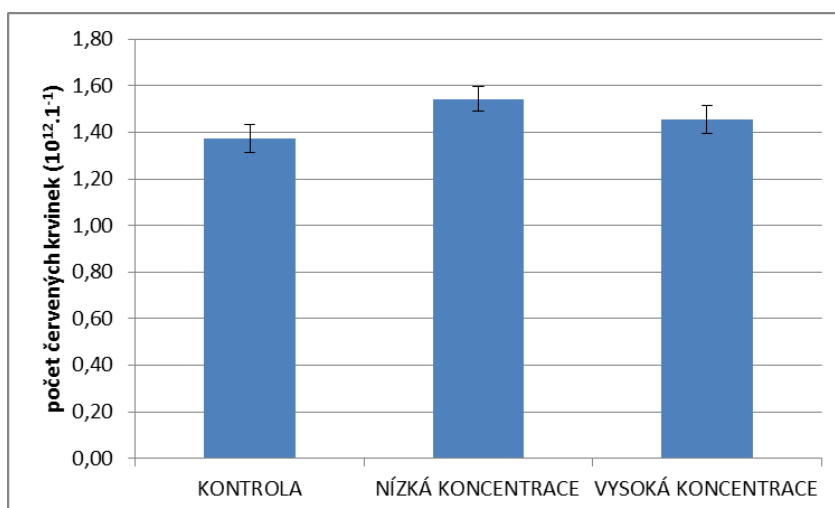
Tabulka č. 4: Výsledky hematologického měření



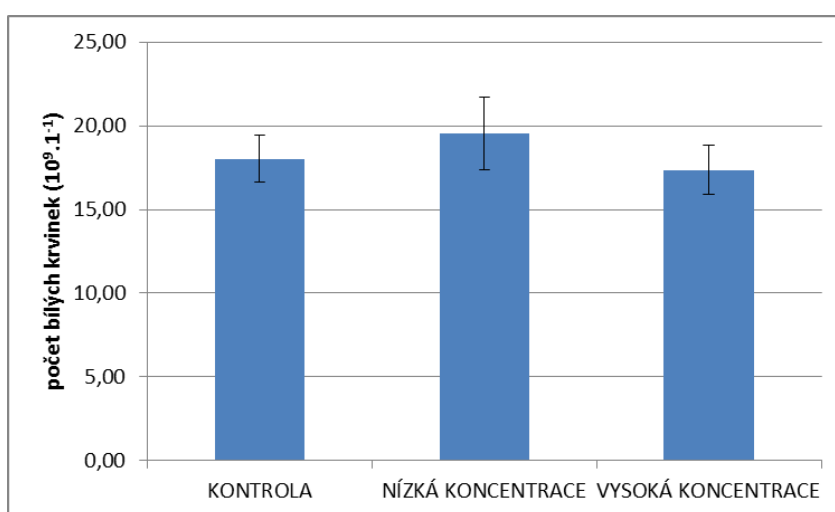
Graf č. 4: Výsledky měření hematokritu



Graf č. 5: Výsledky měření hemoglobinu



Graf č. 6: Výsledky měření počtu červených krvinek



Graf č. 7: Výsledky měření počtu bílých krvinek

### 4.3 BIOCHEMICKÉ UKAZATELE

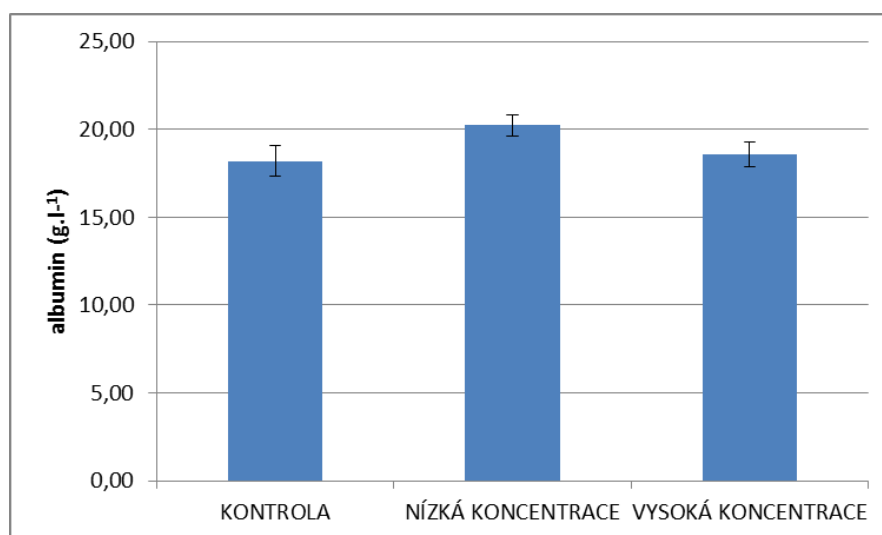
Ve vzorcích plazmy bylo prováděno vyšetření vybraných biochemických ukazatelů jako je stanovení koncentrace glukózy, cholesterolu, laktátu, celkového proteinu, albuminu, amoniaku a dále aktivity LDH, ALT, AST a ALP. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5-6. Výsledky jednotlivých parametrů jsou také uvedeny v grafech č. 8-17. Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná chyba průměru. Při statistickém vyhodnocení nebyly u žádných z testovaných ukazatelů zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

skupina	albumin (g.l <sup>-1</sup> )	ALP (μkatal.l <sup>-1</sup> )	ALT (μkatal.l <sup>-1</sup> )	AST (μkatal.l <sup>-1</sup> )	Amoniak (μmol.l <sup>-1</sup> )
<b>Kontrola</b>	18,2 ± 0,9	1,1 ± 0,1	0,3 ± 0,04	6,3 ± 0,8	240,3 ± 16,3
<b>Nízká koncentrace</b>	20,2 ± 0,6	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,02	5,8 ± 0,4	245,2 ± 18,1
<b>Vysoká koncentrace</b>	18,6 ± 0,7	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,01	6,1 ± 0,3	262,1 ± 21,5

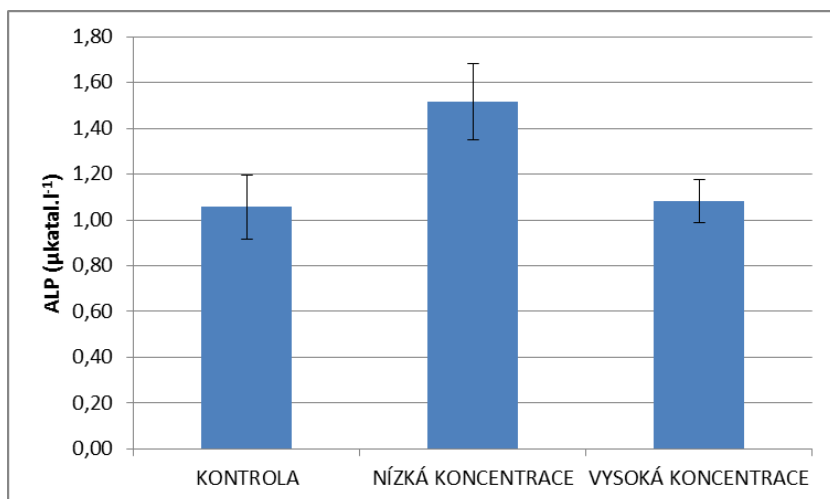
Tabulka č. 5: Výsledky biochemického měření (ALP – alkalická fosfatáza, ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza)

	celkový protein (g.l <sup>-1</sup> )	cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	glukóza (mmol.l <sup>-1</sup> )	LDH (μkatal.l <sup>-1</sup> )	laktát (mmol.l <sup>-1</sup> )
<b>Kontrola</b>	36,4 ± 1,3	7,5 ± 0,4	4,3 ± 0,2	12,0 ± 1,02	2,4 ± 0,3
<b>Nízká koncentrace</b>	39,7 ± 1,0	8,5 ± 0,3	4,9 ± 0,2	9,9 ± 0,8	2,5 ± 0,3
<b>Vysoká koncentrace</b>	36,4 ± 1,1	7,7 ± 0,4	4,2 ± 0,1	12,5 ± 1,8	2,6 ± 0,3

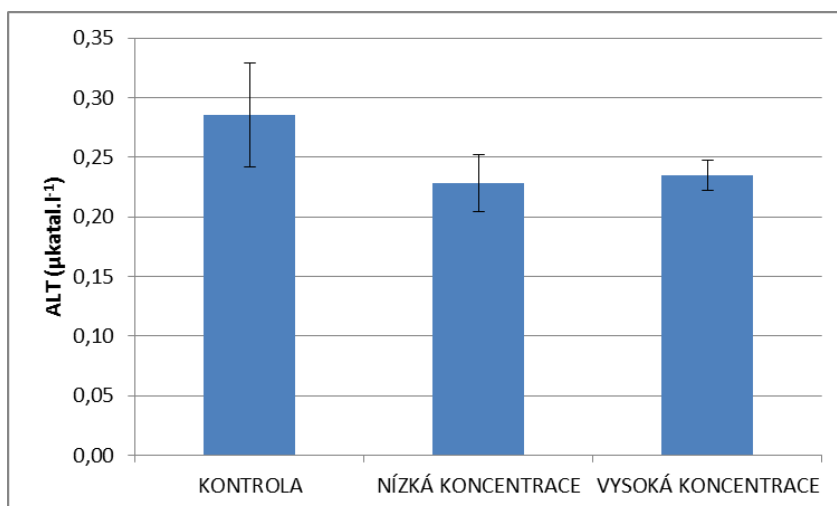
Tabulka č. 6: Výsledky biochemického měření (LDH – laktát dehydrogenázy)



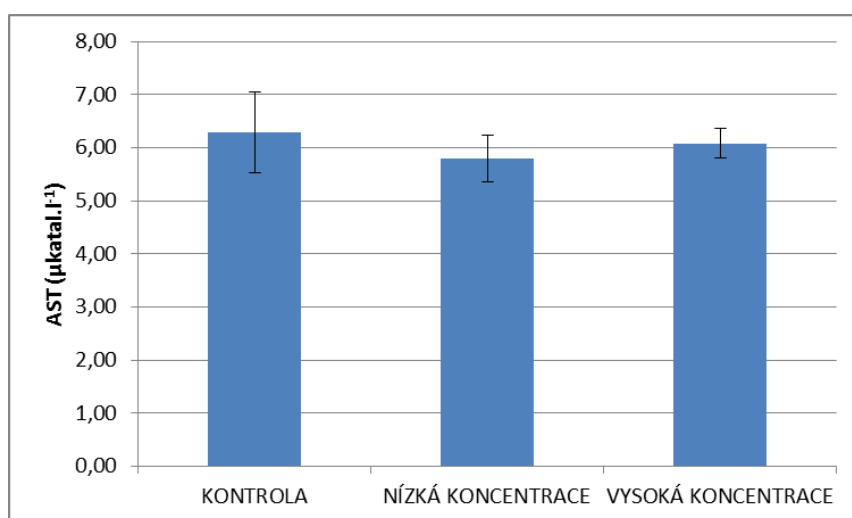
Graf č. 8: Výsledky měření albuminu



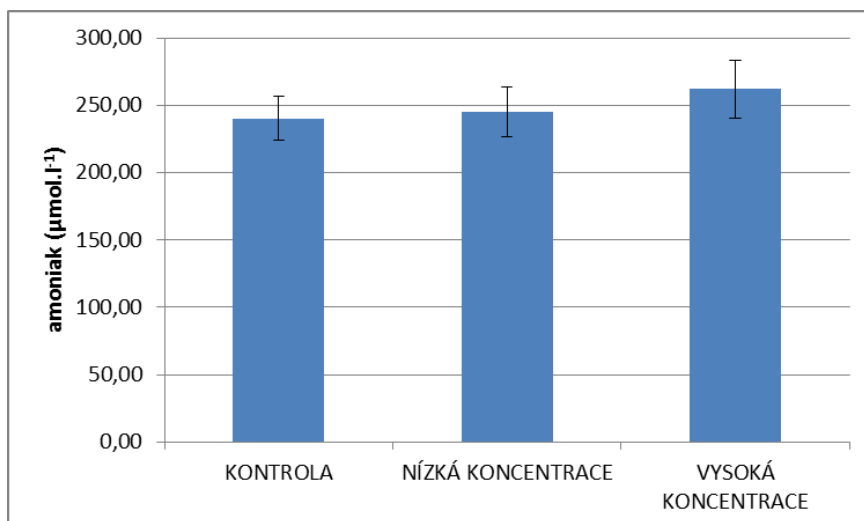
Graf č. 9: Výsledky měření aktivity alkalické fosfatázy (ALP)



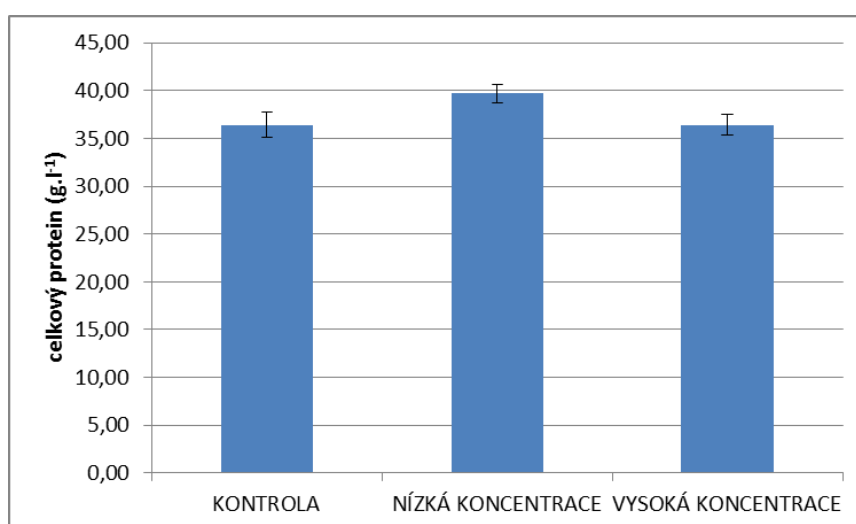
Graf č. 10: Výsledky měření aktivity alaninaminotransferázy (ALT)



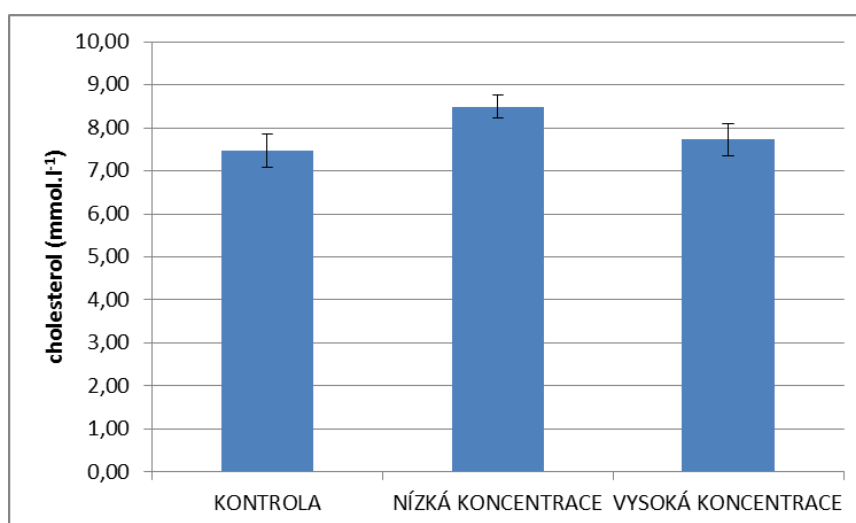
Graf č. 11: Výsledky měření aktivity aspartátaminotransferázy (AST)



Graf č. 12: Výsledky měření amoniaku

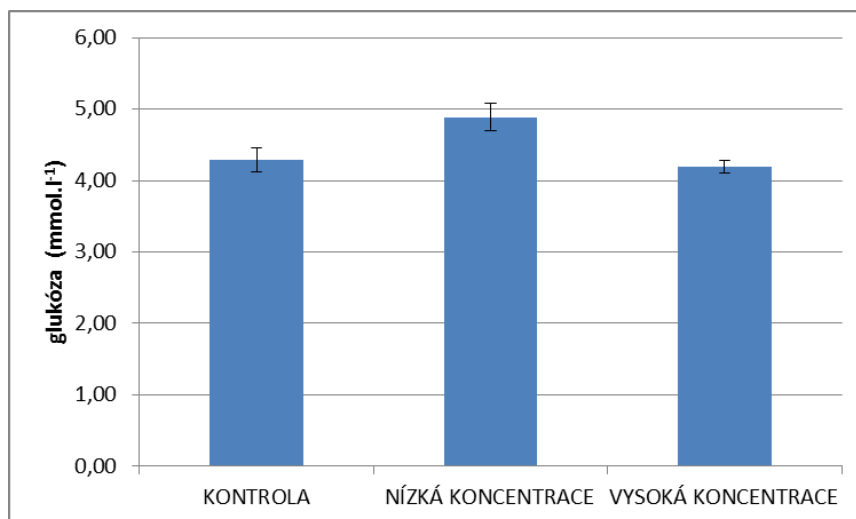


Graf č. 13: Výsledky měření celkového proteinu

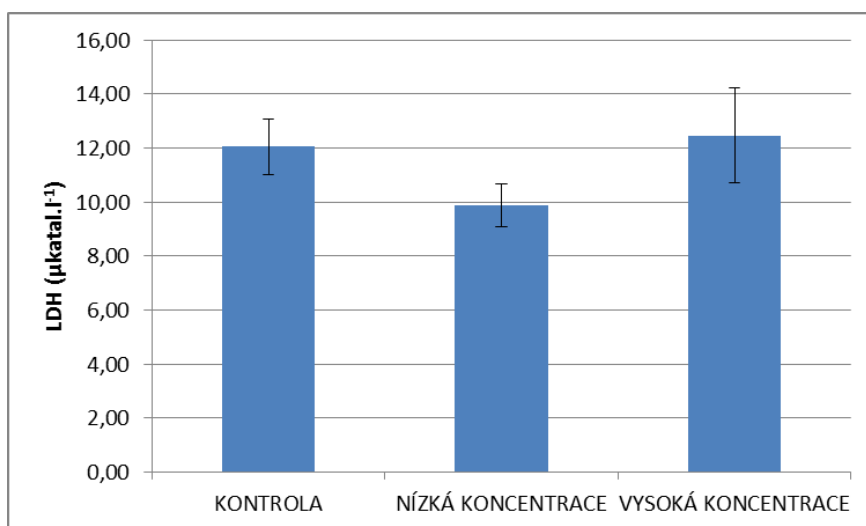


Graf č. 14: Výsledky měření cholesterolu

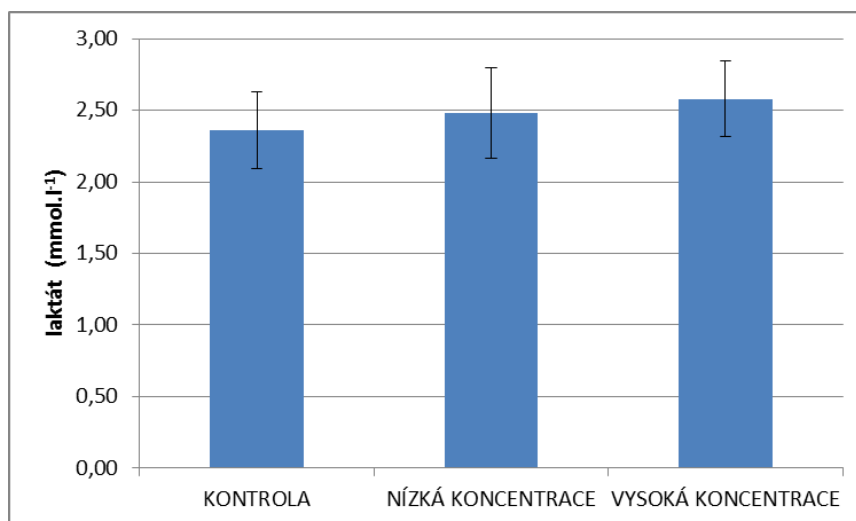




Graf č. 15: Výsledky měření glukózy



Graf č. 16: Výsledky měření aktivity laktát dehydrogenázy (LDH)



Graf č. 17: Výsledky měření laktátu

## 5 DISKUZE

Všechny námi zjištěné hodnoty měření odpovídají požadovaným normám. Z výsledku vyplývá, že ani nejvyšší koncentrace tonalidu, podávaného v krmivu, neohrožuje vývoj a život ryb. U pstruha duhového nebyla zjištěna při našich testech vyšší mortalita, poškození organismu ani špatná reprodukce. Vzhledem k tomu, že polycyklické musk sloučeniny se všeobecně špatně odstraňují z vodního prostředí, jsou výsledky získané touto studií pozitivní pro životní prostředí.

V odborné literatuře je uvedeno, že tonalid ovlivňuje vývoj ryb, poškozují zejména jejich reprodukci. Je nutné brát v úvahu, že autoři těchto studií dlouhodobě sledují výskyt tonalidu ve vodním prostředí v naplaveninách, sedimentu nebo i v tukové tkáni vodních živočichů, zatímco my jsme podávaly rybám tuto látku v krmivu. Jednalo se o laboratorní testy, tzn. v umělém prostředí, jejichž výsledky nelze přímo srovnávat s výslednými analýzami, prováděnými v reálném prostředí, a navíc také v časově delším úseku. Ty přitom ovlivňují i další chemicko-fyzikální faktory (pH vody, interakce s jinými chemickými látkami, teplota vody atd.).

Nitro a polycyklické musk sloučeniny, obsažené ve většině kosmetických přípravků, se ve vodním prostředí špatně odbourávají. Myslíme si, že vhodnou alternativou by bylo nahrazení těchto chemických látek látkami přírodními, čímž by se podstatně zamezilo zátěži životního prostředí.

# ZÁVĚR

Toxické a zdravotně závadné látky v životním prostředí je důležité důkladně sledovat. V rámci naší práce jsme se zabývaly sledováním polycyklických musk sloučenin, a to konkrétně tonalidu - zástupce ze skupiny polycyklických musk sloučenin. Tonalid představuje vonnou složku přidávanou do kosmetických výrobků.

V naší práci jsme se tedy zabývaly účinkem tonalidu aplikovaného v krmivu na vodní organizmy. Tento pokus jsme prováděly na pstruhu duhovém, který je velmi náchylný na kontaminaci vyskytující se ve vodním prostředí. Najdeme jej tedy pouze ve vodách bohatých na kyslík. Do realizovaného experimentu jsme zařadily tři skupiny. První, kontrolní, skupině bylo podáváno krmivo bez přídavku testované látky. Jedincům ze zbylých dvou testovaných skupin bylo krmivo doplněno o sledovaný tonalid, a to jak v nízké (854  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), tak i vysoké (8 699  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) koncentraci. Po ukončení experimentu byla u testovaných jedinců odebrána krev, která byla využita pro hematologické a biochemické vyšetření.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že testované koncentrace nevedly ke statisticky významným změnám sledovaných ukazatelů. Ty byly zaznamenány pouze v případě hematokritu. Zjištěné výsledky můžeme hodnotit jako pozitivní, protože i přesto, že musk sloučeniny jsou hodnoceny jako nebezpečné pro vodní prostředí, nevedla jejich expozice v našich podmínkách ke změnám sledovaných ukazatelů.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. VELÍŠEK, J. a kol. *Vodní toxikologie pro rybáře*. JČ univerzita v Českých Budějovicích, 2014, 600 s.
2. Internet: BioVendor, 2015. <https://www.biovendor.cz/rutinni-metody/c-135/>
3. BLAHOVÁ J., ENEVOVÁ V., SVOBODOVÁ Z., *Musk sloučeniny ve vodním ekosystému*. Veterinářství 2015; 65; 863 - 867.
4. Internet: *Červené krvinky, bílé krvinky*. Wikipedie [online]. 2015 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Červená\\_krvinka](https://cs.wikipedia.org/wiki/Červená_krvinka), [https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADl%C3%A1\\_krvinka](https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADl%C3%A1_krvinka)
5. Jedy v kosmetice. *Rodina dnes*. 2015, **2015**(45), 14-17.
6. ZOUHAR, L. *Studium průniku „musk“ sloučenin do abiotických a biotických složek vodních ekosystémů* [online]. Brno, 2013, 2013 [cit.2016-02-14]. Dostupné z: [https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/27388/teze\\_Zouhar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/27388/teze_Zouhar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. ROPKOVÁ, Z. *Analýza syntetických analogů pižma plynovou chromatografií* [online]. Olomouc, 2014, 2014 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: [https://theses.cz/id/k48zvr/Ropkova\\_Z\\_Diplomova\\_prace.pdf](https://theses.cz/id/k48zvr/Ropkova_Z_Diplomova_prace.pdf)
8. Internet: *Soustava krevního oběhu* [online]., 62-68 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/ichtyologie/SOUSTAVA%20KREVNIHO%20BEHU.pdf>
9. Internet: *Pstruh duhový. Mrk* [online]. [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.mrk.cz>
10. SVOBODOVÁ Z., PRAVDA D., MODRÁ H. *Metody hematologického vyšetření ryb*. VFU Brno, 2012.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADBI - celestolid

AHTN - tonalid

ALT - alaninaminotransferázy

ALP - alkalická fosfatáza

AST - aspartátaminotransferázy

ČOV - čistička odpadních vod

DGKC - German Society of Clinical Chemistry

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

GOD - enzym glukózaoxidáza

HHCB - galaxolid

IFCC - International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

LDH - laktát dehydrogenáza

MK - musk keton

MM - musk mosken

MX - musk xylen

POD - enzym peroxidáza

# SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Koncentrace musk sloučenin.....	7
Tabulka 2: Účinky vybraných musk sloučenin.....	8
Tabulka 3: Výsledky biometrického měření.....	20
Tabulka 4: Výsledky hematologického měření.....	22
Tabulka 5: Výsledky biochemického měření.....	24
Tabulka 6: 2 Výsledky biochemického měření .....	24

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorce zástupců nitrovaných pižem.....	4
Obrázek 2: Strukturní vzorce zástupců polycyklických musk sloučenin.....	5
Obrázek 3: Strukturní vzorce zástupců makrocyclických musk sloučenin.....	5
Obrázek 4: Strukturní vzorce zástupců lineárních musk sloučenin.....	5
Obrázek 5: Pstruh duhový.....	9
Obrázek 6: Pstruh duhový.....	14
Obrázek 7: Recirkulační systém.....	15
Obrázek 8: Schéma experimentu.....	15
Obrázek 9: Mikroskop pro stanovení počtu červených a bílých krvinek.....	34
Obrázek 10: Hematokritový rotor pro kapiláry.....	34
Obrázek 11: Centrifuga s hematokritovým rotorem pro kapiláry.....	35
Obrázek 12: Měřítka pro odečítání hematokritové hodnoty.....	36
Obrázek 13: Biochemický analyzátor Konelab 20i.....	36

# SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výsledky měření celkové délky těla pstruha duhového.....	20
Graf 2: Výsledky měření délky těla pstruha duhového .....	21
Graf 3: Výsledky měření váhy pstruha duhového.....	21
Graf 4: Výsledky měření hematokritu .....	22
Graf 5: Výsledky měření hemoglobinu.....	23
Graf 6: Výsledky měření počtu červených krvinek .....	23
Graf 7: Výsledky měření počtu bílých krvinek.....	23
Graf 8: Výsledky měření albuminu.....	24
Graf 9: Výsledky měření aktivity alkalické fosfatázy (ALP) .....	25
Graf 10: Výsledky měření aktivity alaninaminotransferázy (ALT) .....	25
Graf 11: Výsledky měření aktivity aspartátaminotransferázy (AST) .....	25
Graf 12: Výsledky měření amoniaku .....	26
Graf 13: Výsledky měření celkového proteinu.....	26
Graf 14: Výsledky měření cholesterolu.....	26
Graf 15: Výsledky měření glukózy.....	27
Graf 16: Výsledky měření aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) .....	27
Graf 17: Výsledky měření laktátu .....	27

# PŘÍLOHY



*Obrázek č. 9: Mikroskop pro stanovení počtu červených a bílých krvinek*

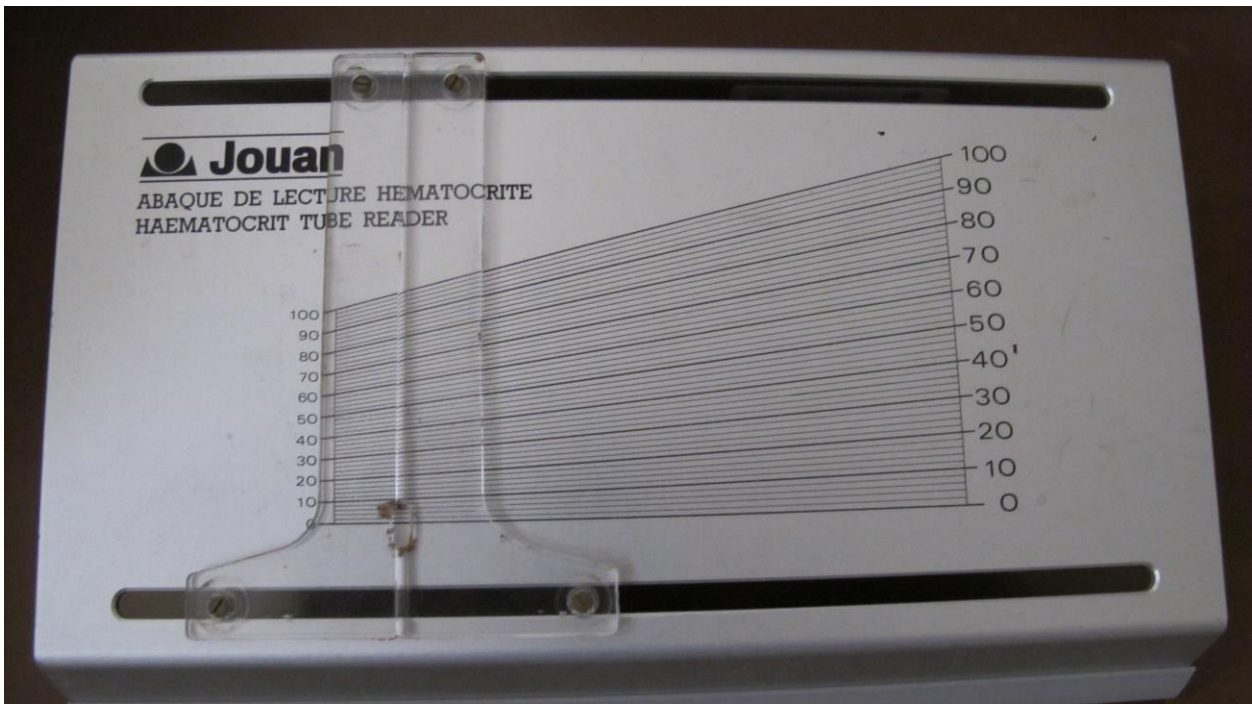


*Obrázek č. 10: Hematokritový rotor pro kapiláry*





Obrázek č. 11: Centrifuga s hematokritovým rotorem pro kapiláry



Obrázek č. 12: Měřítka pro odečítání hematokritové hodnoty



Obrázek č. 13: Biochemický analyzátor Konelab 20i