

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

Doc. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

VYUŽITÍ KREVNÍ PLAZMY JAKO BIOINDIKÁTORU

USE OF BLOOD PLASMA AS A BIOINDICATOR

TEZE PŘEDNÁŠKY K PROFESORSKÉMU
JMENOVACÍMU ŘÍZENÍ



BRNO 2003

KLÍČOVÁ SLOVA

krvní plazma, bioindikátory, tkáně zvířat, perorální aplikace, distribuce, komerční produkty s obsahem PCB, prasata, indikátorové kongenery PCB, nížechlorované PCB, výšechlorované PCB

KEY WORDS

blood plasma, bioindicators, animal tissues, peroral application, distribution, commercial PCB-containing products, pigs, indicator PCB congeners, low-chlorinated PCB, high-chlorinated PCB

© Milada Vávrová, 2003

ISBN 80-214-2281-5

ISSN 1213-418X

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	BIOINDIKÁTORY A BIOMARKERY	6
2.1	Význam bioindikátorů pro hodnocení úrovně znečištění agrárních ekosystémů	6
2.2	Krev jako transportní médium a bioindikátor	6
2.3	Využití krve při hodnocení zátěže organickými polutanty	7
2.4	Porovnání obsahu PCB v krvi a v jiných komoditách	8
3	KREV JAKO BIOINDIKÁTOR PŘI HODNOCENÍ ZÁTĚŽE VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT	09
3.1	Analytický postup pro stanovení PCB	09
3.2	Porovnání obsahu PCB v krvi a ve tkáních	14
3.3	Využití krve jako bioindikátoru k určení míry metabolizace aplikovaného Deloru 103 a Deloru 106	18
4	ZÁVĚR	26

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABSTRACT

Představení autora:

Doc. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

14. 7. 1945, Brno, vedoucí laboratoře organických polutantů Ústavu veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno;
e-mail: vavrovam@vfu.cz

Střední všeobecně vzdělávací školu absolvovala v Brně v roce 1962 a vysokoškolská studia na přírodovědecké fakultě UJEP v Brně ukončila v roce 1967, v oboru fyzikální chemie. Zpracovala diplomovou práci na téma „Polarografické chování pteridinů v nevodném prostředí“. V letech 1967-1968 pracovala jako výzkumný pracovník n. p. Lachema Brno ve výzkumném oddělení detašovaného pracoviště v Blansku, kde zastávala funkci vedoucího laboratoře fyzikální chemie. V roce 1969 nastoupila po úspěšném konkurzu na místo odborného pracovníka výzkumu Katedry hygieny a technologie potravin, Vysoké školy veterinární v Brně, nyní Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (VFU Brno), kde pracuje dosud. Nejprve zde působila ve funkci výzkumného pracovníka, později ve funkci vědeckého pracovníka. Od roku 1992 je pedagogicko-vědeckým pracovníkem. Během svého působení na VFU zpracovala a obhájila na Ústavu analytické chemie přírodovědecké fakulty UJEP v Brně, rigorózní práci pro získání titulu RNDr. na téma „Využití instrumentálních analytických metod k analýze potravin a surovin živočišného původu“ a disertační práci k získání titulu kandidáta věd na téma „Stanovení polychlorovaných bifenyly (PCB) v biologickém materiálu“. V roce 1993 se habilitovala na VFU v Brně, v oboru veterinární chemie a biochemie. Zpracovala habilitační práci na téma: „Polychlorované bifenyly v agrárním ekosystému“. Od počátku působení na VŠ se zabývala vývojem a aplikací chemických metod pro analýzu potravin. První práce byly zaměřeny na průkaz a identifikaci stopových prvků v potravinách. Později se specializovala na využití separačních metod v hygieně potravin a v ekologii. V současné době se zabývá stopovou a ultrastopovou analýzou organických polutantů v environmentálních a biologických matricích. Specializovala se také na zavádění systémů jakosti a získala český a evropský certifikát QM.

Ještě jako vědecký pracovník participovala na výuce v předmětech Chemie potravin, Hygiena a technologie potravin, Obecná a racionální výživa a Produkce potravin. V současné době garantuje disciplíny „Obecná a anorganická chemie“ pro studenty Farmaceutické fakulty a „Chemie potravních řetězců“ pro studenty Fakulty veterinární hygieny a ekologie. V nově zavedeném bakalářském studijním programu je pověřena garancí disciplín „Ultrastopová analýza potravin“, „Cizorodé látky v potravinách“ a „ISO normy“.

1 ÚVOD

Agrární ekosystém je specifický ekosystém, kde má ekologická stabilita krajiny velký význam. V souvislosti s tím je nutné si uvědomit, že životní prostředí tvoří určitý rámec, ve kterém se také realizuje životní úroveň obyvatelstva.

V agrárním ekosystému je nezbytné zabránit negativnímu dopadu zemědělské prvovýroby na zdraví hospodářských zvířat, na jejich užitkovost a stav příslušného agrárního ekosystému. Narušení ekologické rovnováhy má v jakémkoliv ekosystému i nepříznivý dopad na zdraví lidské populace. Podstatné a současně i nejjednodušší řešení spočívá v plánovité prevenci vzniku ekologických rizik. Uvedený způsob řešení musí být aplikovatelný také v agrárních ekosystémech, kde se do životního prostředí mohou dostávat škodliviny anorganického i organického původu související s intenzifikačními faktory zemědělské výroby. V agrárních ekosystémech zasahují do ekologické rovnováhy velmi negativně i zemědělské odpady, především nekontrolovatelná aplikace kejdy a močůvky.

Pro hodnocení úrovně znečištění agrárních ekosystémů je prioritní sledování obsahu škodlivin v jednotlivých potravních řetězcích, pro něž je nezbytné:

- ✓ posouzení trendu výskytu určitých xenobiotik v zemědělských a potravinářských výrobcích
- ✓ zavedení biomonitoringu a sledování úrovně znečištění na podkladě zjišťování těchto škodlivin v bioindikátorech
- ✓ veškeré monitorizační studie i cíleně prováděné kontroly musí směřovat k ozdravení potravních řetězců.

System ozdravení potravních řetězců je v rámci agrárních ekosystémů důležitým technologickým procesem směřujícím k ochraně životního prostředí. Tato problematika je vysoce aktuální především z ekonomického hlediska, protože likvidace celých stád kontaminovaných určitých xenobiotikem je pro jejich majitele velkou finanční zátěží.

V rámci své přednášky se rovněž zaměřím na některé prioritní výsledky, které byly získány při řešení různých projektů na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, kde pedagogicky působím.

2 BIOINDIKÁTORY A BIOMARKERY

2.1 VÝZNAM BIOINDIKÁTORŮ PRO HODNOCENÍ ÚROVNĚ ZNEČIŠTĚNÍ AGRÁRNÍCH EKOSYSTÉMŮ

Z literatury je o bioindikátorech známo, že některé škodliviny se v nich nacházejí ve větším množství, než bývá běžně detekováno v atmosféře, hydrosféře a pedosféře. Dalším důležitým předpokladem pro jejich použití je to, že musí mít úzký vztah k dané lokalitě. Teprve potom mohou být zjištěné odchylky v obsahu vztaženy k danému ekosystému /1/. Pro soustavné sledování ekologických a ekotoxikologických změn v ekosystémech jsou vhodné takové rostlinné a živočišné druhy, které reagují na přítomnost nebo působení škodliviny podobně jako hospodářská zvířata, případně až člověk. Podle některých autorů by měl dobrý bioindikátor i biochemický marker vyhovovat řadě kritérií, z nichž je nutno upozornit na ta nejdůležitější /1, 2/:

- ✓ bioindikátor by měl mít schopnost „včasného varování“, tj. biochemická odezva by měla předvídat efekty na vyšších úrovních biologické organizovanosti a měla by ji předcházet
- ✓ bioindikátor by měl být specifický pro sledovaný kontaminant nebo skupinu kontaminantů
- ✓ bioindikátor by měl mít koncentračně závislou odezvu vzhledem k obvykle se vyskytující hladině příslušného kontaminantu
- ✓ měly by být známy veškeré biologické a fyziologické aspekty organismů používaných pro biomonitoring, což následně minimalizuje zdroje nekontrolovatelné proměnlivosti
- ✓ detekovaný obsah škodliviny v bioindikátoru by měl být vztažen ke zdravotnímu stavu organismu.

Při využívání biochemických markerů je nutné sledovat biochemické změny v živých organismech způsobené vlivem určité škodliviny. Potom lze na základě tohoto biochemického markeru hodnotit nejen expozici životního prostředí chemickými škodlivinami, ale také provádět hodnocení zdravotních rizik /3, 4/. U řady testovacích živočichů se využívá jako způsob bioindikace také vyšetření krve, které je optimální především pro zjišťování zátěže organismu /5/.

2.2 KREV JAKO TRANSPORTNÍ MÉDIUM A BIOINDIKÁTOR

Krev patří mezi ty komodity, které můžeme pro hodnocení zátěže xenobiotiky použít ještě za života zvířete. Příčinou je to, že krev působí jako transportní médium a může tedy sloužit i pro transport PCB, které jsou zařazeny mezi významná lipofilní xenobiotika. Krev i její jednotlivé komponenty

umožňují transport a distribuci xenobiotik do tkání, ve kterých jsou částečně stabilizovány. Z tohoto pohledu by mohly být excelentními systémy pro transport lipofilních xenobiotik lipoproteinové komplexy bohaté na lipidickou složku /6/.

2.3 VYUŽITÍ KRVE PŘI HODNOCENÍ ZÁTĚŽE ORGANICKÝMI POLUTANTY

Krev byla jako vhodné testační médium použita v několika studiích pojednávajících o působení polychlorovaných bifenyly (PCB). Většina z nich však byla prováděna pouze na laboratorních zvířatech. V jedné studii se autoři zabývali identifikací příslušných transportních systémů u holubů /7/. Holubům byl injekčně aplikován ^{14}C značený monochlorbifenyl a kongener 2,2', 5,5' (PCB 52). Tato studie byla ověřována s komerčním přípravkem Aroclor 1254. Bylo prokázáno, že frakce bohaté na lipidy, tj. chylomikrony a VLDL byly téměř výlučně spojeny s hexachlorbifenylem (2,2',4,4',5,5'), což je kongener PCB 153. Ostatní kongenery přítomné v Arocloru 1254 byly distribuovány mezi LDL a další frakce chudé na lipidy. Do frakce LDL byly rovněž distribuovány vysoce toxické kongenery (PCB 77). Kongener PCB 153 byl však ve všech případech dominantní.

V další publikaci se autoři zabývali distribucí PCB do tělních tekutin těhotných žen. Prokázali, že právě kongener PCB 153 byl ve vysoce průkazné korelaci s celkovým obsahem PCB v séru a folikulární tekutině u žen, které podstoupily umělé oplodnění /8/. Na podkladě literárních údajů je možno říci, že v jednotlivých frakcích krve byla identifikována celá řada kongenerů PCB. Lze proto konstatovat, že jednotlivé frakce krve mají významnou roli v transportu lipofilních xenobiotik. Z tohoto můžeme usuzovat, že distribuce PCB je více komplexní, než by se dalo vysvětlit pouhou rozpustností v lipidových frakcích krevní plazmy. Z presentovaných údajů vyplývá jejich spojení s apolipoproteiny a plazmovými proteiny, které hrají významnou roli v transportu PCB do tkání. Bifenyly substituované halogeny nejsou pravděpodobně vázány na specifická místa proteinů, spíše se předpokládá vazba na hydrofobní místa krevních proteinů nebo celulárních komponent krve /9/. Z publikované literatury vyplývá, že pro odhad zátěže lidské populace PCB se většinou používá celá krev nebo sérum; pro monitorizační studie v návaznosti na zátěž životního prostředí bývá naopak využívána plazma. Porovnáním hladin xenobiotik detekovaných u rozdílných komponent krve je možno odhadnout jejich distribuci do tkání. Tato problematika byla řešena v následujících studiích /10/. Bylo prokázáno, že většina tri a tetrachlorbifenyly měla větší zastoupení a výrazně vyšší hladiny v celé krvi, než v séru (25 %) nebo v plazmě (40 %). Naopak, pro výšechlorované bifenyly (hexa až oktachlorbifenyly), platila opačná distribuce. Z uvedených hodnot vyplývá, že v plazmě nebo v séru bylo jejich procentuální

zastoupení mezi 55 – 83 %. Na podkladě těchto údajů upozornili autoři na možný problém spojený s hodnocením výtěžnosti u PCB 153. Tvzení těchto citovaných autorů však nelze doložit žádným dalším údajem z literatury. Jiní autoři dávali naopak pokles výtěžnosti PCB 153 do souvislosti s čerstvostí krve. Ve své publikaci sice uvedli pokles výtěžnosti až o 50%, ale neposkytli žádné údaje o teplotě, při níž byla krev do doby provádění analýz skladována /11/.

2.4 POROVNÁNÍ OBSAHU PCB V KRVI A V JINÝCH KOMODITÁCH

V souvislosti s nálezy PCB bylo nutné řešit otázku, jakým způsobem je možno získat informaci o zátěži PCB u dosud žijících zvířat, což má značný význam zejména pro odhad kontaminace u mléka a masa. Pro tyto účely se podle některých autorů nejlépe osvědčilo hodnocení PCB v krvi /12/.

První pokusy, jejichž výsledky byly již publikovány, byly prováděny na skotu. Pokusy byly založeny proto, aby byla získána a ověřena data demonstrující příslušnou korelaci mezi obsahem PCB v krevní plazmě a ve svalovině zvířat. Autoři práce prokázali vysoce průkaznou korelaci ($R = 0,9100 - 0,9690$). Současně zjistili, že docházelo ke zvýšení korelačního koeficientu R v závislosti na zvyšujícím se počtu kusů sledovaných zvířat. Zvýšení počtu kusů skotu o osm již mělo za následek nárůst korelačního koeficientu R o 0,0590. V rámci tohoto pokusu byly sledovány individuální kongenery PCB, především PCB 138, 153 a 180. Na podkladě získaných údajů byly vypočteny maximální reziduální limity pro koncentraci PCB v krevní plazmě tak, aby na určité hladině významnosti korespondovaly s platnými maximálními reziduálními limity pro obsah PCB v intramuskulárním tuku hovězího dobytka. Spolehlivost autory použitého postupu byla demonstrována na základě hodnocení kontaminace PCB v intramuskulárním tuku po porážce dojníc a býků. Autoři se pokusili interpretovat experimentálně získaná data a v souladu s touto interpretací navrhli, aby sledování kongenerů PCB v krevní plazmě bylo využitelné pro monitorování živých zvířat žijících na farmách, kde je podezření, že se zde nachází zdroj kontaminace PCB. Experimentální data využili k výpočtu korelací. Prokázali, že existují určité korelace nejen mezi obsahem PCB v mléce a v krevní plazmě, ale také mezi PCB obsaženém v intramuskulárním tuku býků a prasat a v jejich krevní plazmě. Obdobnou problematikou se tito autoři zabývali i ve své další práci /13/, kde rovněž hodnotili kontaminaci PCB u hospodářských zvířat na základě stanovení obsahu PCB v krevní plazmě. Z hladin PCB zjištěných ve svalovině a v krevní plazmě třinácti ovcí, dvanácti býků a pěti dojníc byla vypočtena vysoká korelace hodnot stanovených u obou matric ($R = 0,845 - 0,989$), a to v závislosti na druhu zvířat a na typu kongeneru PCB. Na základě těchto údajů byly stanoveny tzv. varovné hodnoty pro PCB v krevní plazmě a stanoveny maximální přípustné limity v plazmě pro některé vybrané kongenery. Jejich překročení znamená, že obsah PCB

v intramuskulárním tuku by byl vyšší, než by povoloval příslušný maximální reziduální limit. Přestože obě studie byly prováděny a publikovány zatím pouze v Německu lze konstatovat, že zejména stanovení obsahu PCB 153 v krevní plazmě lze využít jako vhodnou bioindikaci pro průkaz kontaminace svaloviny zvířat PCB. Koncentrační rozpětí pro porovnání získaných hodnot není uvedeno, protože v obou případech byly sledovány jiné individuální kongenery než ty, které jsou běžně jako indikátorové kongenery používány k hodnocení v České republice. Pouze PCB 153 je, jako majoritní kongener, zjišťován v rámci všech monitorizačních studií platných v Evropě i ve světě. Hodnocením distribuce PCB u hospodářských zvířat se zabýval také EWERS /14/, který dojnicím po dobu 28 dní podával kongener 153. Prokázal, že poměr mezi obsahem PCB 153 v krevní plazmě a v mléce byl 1 : 1000.

Při zjišťování zdrojů kontaminace byla v Československu v letech 1989 – 1991 prováděna cílená depistáž, při které bylo posouzení kontaminace PCB v krvi použito na rozdělení stáda dojnic na více a méně kontaminované jedince. Výsledky prokázaly, že tento postup byl vhodný jako jedna z možných ozdravovacích technologií. Nutno ovšem upozornit na to, že v té době byl obsah PCB hodnocen metodou individuálních nebo reprezentativních píků, nikoliv jako suma indikátorových kongenerů, jak je tomu nyní. Výhodou při této depistáži byla možnost porovnání obsahu PCB zjištěného v krevní plazmě s obsahem PCB v bioticky odebraném tuku u stejných kusů dojnic/15/.

3 KREV JAKO BIOINDIKÁTOR PŘI HODNOCENÍ ZÁTĚŽE VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT PCB

V této části přednášky jsem se zaměřila na problematiku zhodnocení významu krve jako vhodného indikátoru při odhadu kontaminace PCB tkání volně žijících a hospodářských zvířat. Pro daný problém musela být dostatečně zvládnuta kompletní analytická problematika, což je uvedeno dále.

3.1 ANALYTICKÝ POSTUP PRO STANOVENÍ PCB

Tento postup je možno rozdělit na několik základních kroků, které musí být validovány a ověřeny pro veškeré komodity, u nichž je toto xenobiotikum sledováno. Nejdůležitější kroky analytického postupu jsou tyto:

- ✓ odběr vzorku podle zpracovaného Standardního operačního postupu (SOP)
- ✓ úprava odebraného vzorku na vzorek laboratorní a následně na vzorek analytický
- ✓ izolace lipidického podílu z analytického vzorku

- ✓ extrakce PCB z příslušné matrice
- ✓ přečištění extraktu zahrnující odstranění interferujících koextrahovaných složek (využívána je sloupcová chromatografie na florisilu, oxidu hlinitém nebo na směsné koloně, případně gelová permeační chromatografie (GPC); pokud extrakt není zcela zbaven koextrahujících složek, provádí se dočištění pomocí kyselé hydrolýzy
- ✓ frakcionace (separace majoritních a minoritních kongenerů)
- ✓ zjištění lineárního rozsahu měření pro jednotlivé sledované matrice na podkladě využití individuálních standardů a jejich směsí
- ✓ chromatografická separace pomocí HRGC/ECD, případně pomocí HRGC/MSD
- ✓ identifikace sledovaných analytů
- ✓ kvantifikace sledovaných analytů

Na následujících schématech jsou přehledně znázorněny postupy pro stanovení PCB v krevní plazmě a ve tkáních zvířat. Preanalytické postupy prováděné v rámci tohoto metodického postupu jsou velmi náročné a vyžadují předem ověření každého kroku. Při izolaci PCB z krve je kritickým bodem třepání krevní plazmy s organickými rozpouštědly, kdy může dojít k vytvoření zákalu až sraženiny, což snižuje výtěžnost příslušného analytického postupu; při zpracování tkání je to nedokonalá dehydratace zhomogenizované tkáně bezvodým síranem sodným. Oba dva postupy byly ověřeny pro krev i tkáň a byly pro ně stanoveny potřebné metrologické parametry /16/.

Plynová chromatografie: Podmínky analýzy, zejména teplotní program, bylo nutno v případě potřeby modifikovat tak, aby došlo k úplné separaci PCB 28 a PCB 31. Rovněž bylo nutné zajistit, aby došlo k separaci kongenerů PCB od dalších interferujících látek, např. o,p'- DDE (PCB 101) nebo p,p'- DDT (PCB 138).

Pracovní podmínky plynové chromatografie:

- ✓ přístroj k HRGC/ECD fy Hewlett-Packard, model 5890, série II; model 6890
- ✓ kolona HP 5 a HP 17 (Hewlett-Packard), délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,2 μm
- ✓ injektor: split/splitless (150 s), teplota 250 °C, nástřikové množství 1 μl , doporučena technika "hot needle"
- ✓ nosný plyn: helium – lineární rychlost 35,5 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
- ✓ teplotní program: 40°C po dobu 2,5 min, poté nárůst 30°C $\cdot\text{min}^{-1}$ do 180°C, nakonec po 2°C $\cdot\text{min}^{-1}$ do 280°C; 280°C po 10 min
- ✓ detektor: ^{63}Ni ECD, teplota 300°C
- ✓ programování tlaku: konstantní průtok 1,0 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$

KREV

plazma (4 ml) + methanol (2 ml) ⇒ třepání 1 minutu



ke směsi se přidá 12 ml hexanu a intenzivně se třepe 4 minuty



horní vrstva se oddělí do zkumavky, přidá se 1 ml H₂SO₄ a intenzivně se protřepe



organický extrakt se kvantitativně přenesse do zkumavky, rozpouštědlo se odpaří na RVO; odparek se rozpustí v 1 ml hexanu



čištění kolonovou chromatografií na florisilu a kyselou hydrolýzou



identifikace a kvantifikace pomocí HRGC/ECD

SVALOVINA

zhomogenizovaná tkáň se dehydratuje pomocí bezvodého síranu sodného



**extrakce směsí hexan – diethylether (94 : 6) v Soxhletově extraktoru
po dobu 6 až 8 hodin**



**odstranění lipidů pomocí kolonové chromatografie na sloupci florisilu
(0,1 – 0,2 g tuku; eluční činidlo hexan – diethylether)**



zahuštění extraktu na RVO; rozpuštění odparku v 10 ml hexanu



dočištění kyselou hydrolyzou



identifikace a kvantifikace pomocí plynové chromatografie (HRGC/ECD)

Vyhodnocení: Kvantitativní vyhodnocení se provádělo metodou vnějšího standardu (absolutní kalibrace) za předpokladu, že všechny hodnoty kalibrace ležely v lineárním rozsahu detektoru. Koncentrace jednotlivých kongenerů PCB lze hodnotit podle příslušných legislativních předpisů platných pro jednotlivé kongenery. Pro odhad celkového obsahu byla použita suma indikátorových kongenerů.

Pracovní charakteristiky metody:

SPRÁVNOST METODY: byla ověřena opakovanou analýzou certifikovaných referenčních materiálů, jejichž specifikace byla:

✓ Lard with Pesticides and PCB's; Dr. Ehrenstorfer GmbH, No: 40410.

Pro častější ověřování správnosti metody byly použity také zkoušené materiály z testů způsobilosti laboratoří, připravených referenční laboratoří na VŠCHT v Praze. Tyto materiály byly rovněž využity pro sestrojení regulačních diagramů, spolu s referenčními materiály Dr. Ehrenstorfer GmbH.

ZPĚTNÁ VÝTĚŽNOST METODY PRO SLEDOVANÉ KOMODITY: byla zjišťována tak, že k referenčním materiálům byly přidány standardy sledovaných analytů. Tyto analyty byly přidávány k referenčním materiálům ve formě hexanového roztoku. Inkubace probíhala 10 hodin. Poté byly vzorky zpracovány shodným způsobem, jako při zjišťování přirozeného obsahu PCB. Výtěžnost metody byla vypočtena v % a pro sledované kongenery se pohybovala v rozmezí 78 – 90%, což je z hlediska metody vyhovující; za vyhovující pro biologické materiály je možno brát výtěžnost v rozsahu 70 – 110 %.

ROZSAH METODY A LINEARITA: protože sledované analyty zaujímají v reálných vzorcích široké spektrum koncentrací, byl zvolen kalibrační rozsah pracovních standardních roztoků v rozmezí 0,1 – 500 ng/ml. Při objemu analyzovaného vzorku 1 µl bylo potom injektované množství analytů 0,1 – 500 pg, což přibližně odpovídalo hladinám kontaminace vyšetřovaných vzorků.

OSTATNÍ CHARAKTERISTIKY METODY:

Mez detekce (LOD) byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu detektoru a měla pro kongenery PCB hodnoty 0,3 – 0,5 µg/kg lipidů.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je zpravidla určována jako hladina použitého standardu o nejnižší koncentraci; v daném případě hodnota činila 0,2 ng/ml, což odpovídalo 1 µg/kg tuku (ppb).

Opakovatelnost metody byla charakterizována jako relativní směrodatná odchylka RSD (%), která byla získána z 10 opakovaných analýz

referenčního materiálu Lard (No: 40410). Odhad detekčního limitu byl stanoven jako trojnásobek relativní směrodatné odchylky pro $c \rightarrow 0$.

Kongener	RSD %	Detekční limit	Na množství tkáně
PCB 28	12	0,005	1,0
PCB 52	20	0,010	2,0
PCB 101	16	0,010	1,0
PCB 118	18	0,007	1,0
PCB 138	15	0,008	1,0
PCB 153	15	0,005	2,0
PCB 180	18	0,01	1,0

Statistické metody: pro zhodnocení možných závislostí mezi jednotlivými maticemi byly využity variačně statistické metody (ANOVA) podle Snedecora a Cochran /17/. Ze získaných hodnot byly vypočteny koeficienty korelace, sestaveny regresní rovnice a grafy pomocí statistického balíku UNISTAT, verze 5.01.

3.2 POROVNÁNÍ OBSAHU PCB V KRVI A VE TKÁNÍCH

V další části přednášky budu presentovat některé pokusy prováděné na našem pracovišti, při kterých jsme využívali krev jako indikátor kontaminace životního prostředí PCB /18, 19/. Při řešení projektu jsme se pokoušeli nalézt závislost mezi obsahem PCB v krvi a jejich obsahem ve tkáních. Pro ověření jsme z volně žijících zvířat použili bažanty, srny, zajíce a z hospodářských zvířat prasata a krávy. Vzhledem k vyšetřování uhynulého koně, u kterého bylo důvodné podezření na intoxikaci PCB, byla vyšetřována také krev koní z příslušné stáje. Aby mohlo být provedeno porovnání zjištěných hodnot u různých druhů zvířat, byl příslušný obsah vztažen na tukový podíl, přestože je v současné době, podle platné Vyhlášky Ministerstva zdravotnictví 298/1997 Sb., obsah PCB v bažantí zvěřině vztažen na čerstvou tkáň.

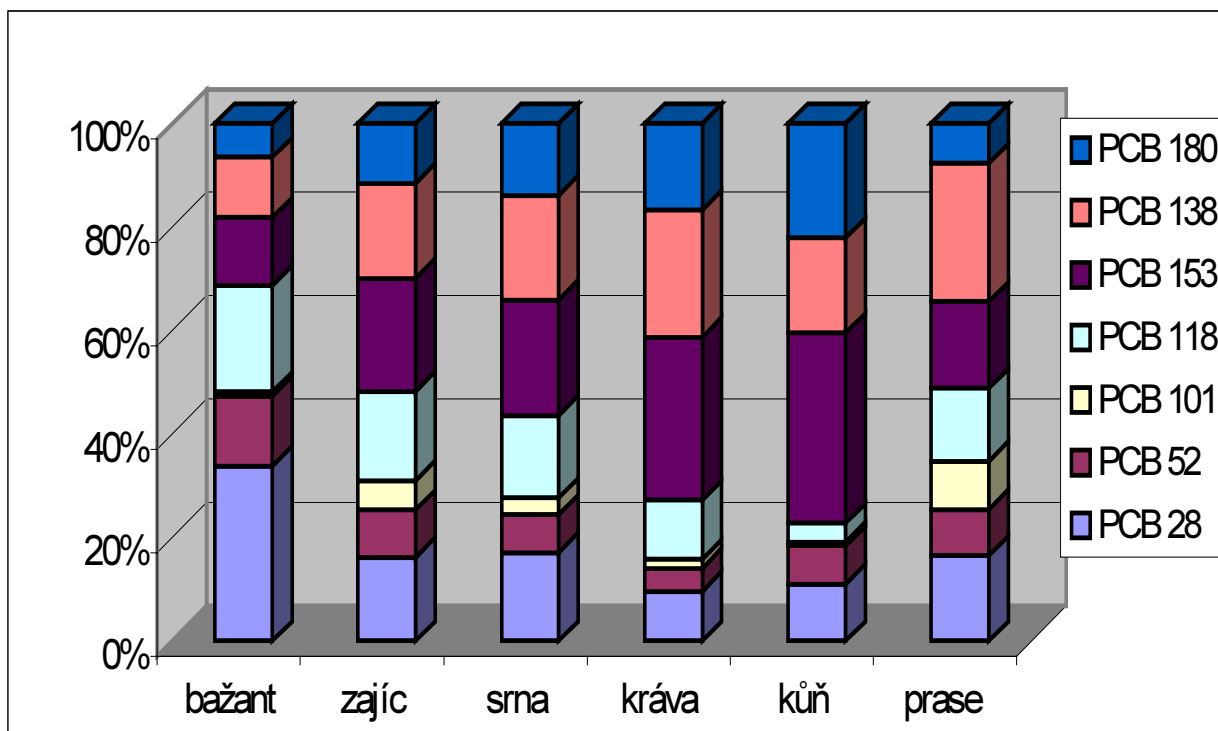
V následující tabulce je uveden průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB ve svalovině v $\mu\text{g}/\text{kg}$; přepočteno na tukový podíl. Z této tabulky vyplývá, že kromě bažantů, kde byl nejvyšší obsah PCB 28 a PCB 118, převládají u ostatních zvířat spíše PCB 153 a PCB 138.

Tabulka 1: Průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB ve svalovině (µg/kg)

Matrice	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
bažant	22,3	8,89	0,57	13,6	8,60	7,67	4,30
zajíc	10,6	6,06	3,79	11,4	14,4	12,1	7,58
srna	12,1	5,29	2,27	11,3	15,9	14,4	9,83
kráva	7,98	3,62	1,45	9,43	26,1	20,3	13,8
kůň	15,0	10,1	1,66	5,45	50,0	25,2	30,1
prase	1,76	0,95	0,99	1,50	1,78	2,85	0,81

Pro lepší porovnání zastoupení kongenerů u jednotlivých druhů vyšetřovaných zvířat je v grafu 1 uvedeno procentické zastoupení PCB ve tkáních, vztaženo na tuk.

Graf 1: Procentické zastoupení indikátorových kongenerů PCB ve tkáních vyšetřovaných zvířat při přepočtu na tukový podíl

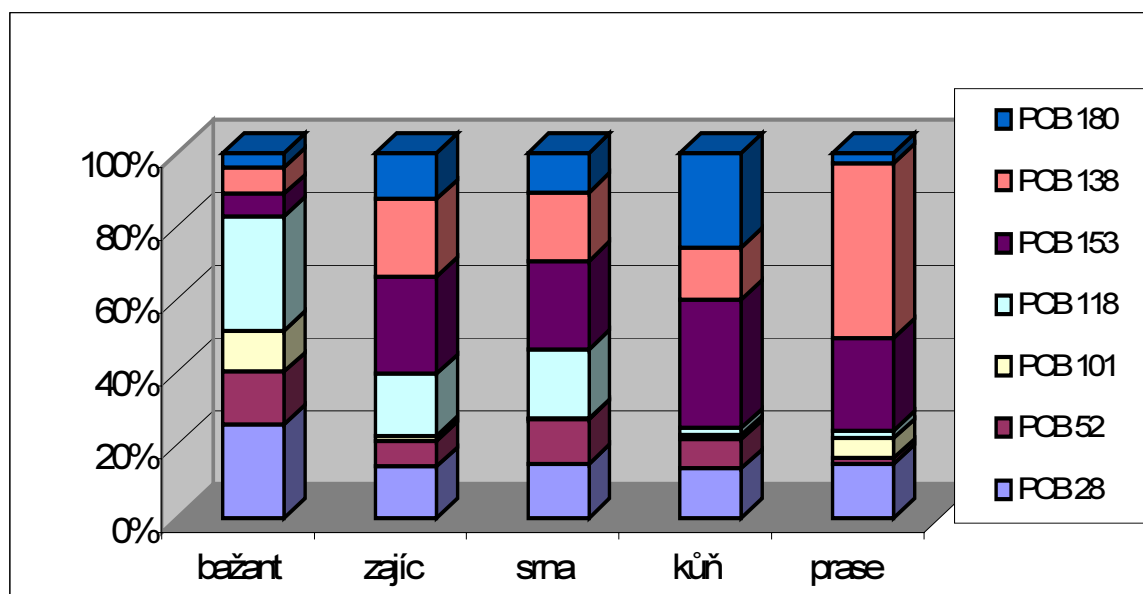


Obdobně jako v tabulce 1 je v tabulce 2 presentován průměrný obsah PCB v krvi u vyšetřovaných zvířat. Také údaje z této tabulky dokumentují převahu nížechlorovaných PCB u bažanta a výšechlorovaných PCB u hospodářských zvířat.

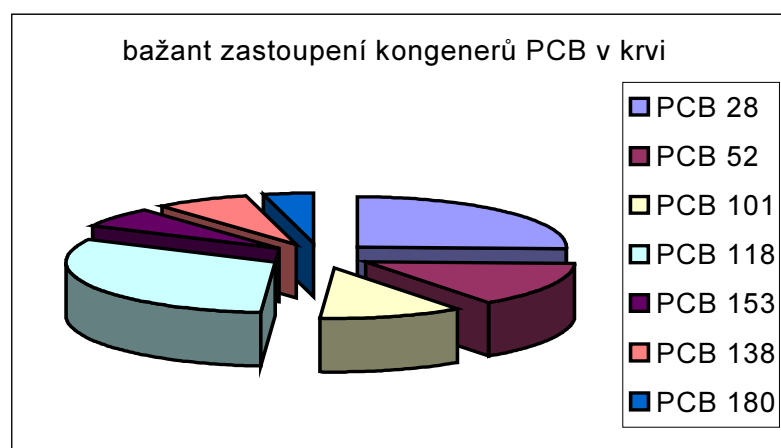
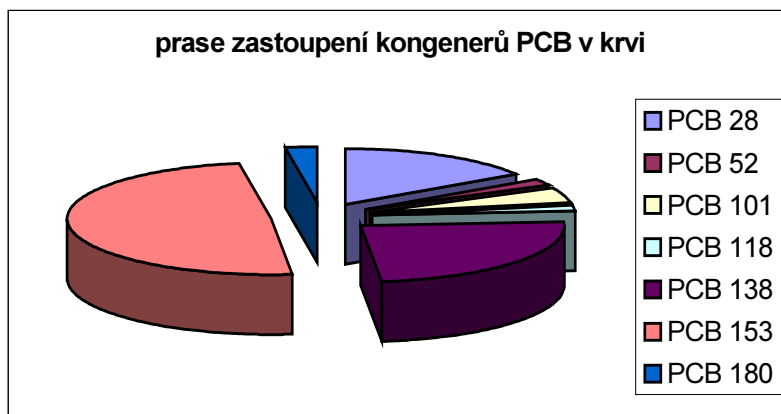
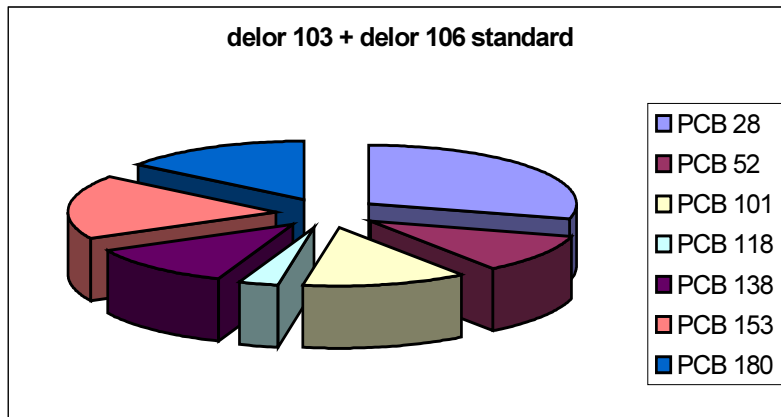
Tabulka 2: Obsah indikátorových kongenerů PCB v krvi vyšetřovaných zvířat (µg/kg)

Krev	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
bažant	0,78	0,44	0,34	0,96	0,19	0,22	0,12
zajíc	0,25	0,13	0,03	0,30	0,48	0,38	0,23
srna	0,28	0,23	0,01	0,35	0,45	0,35	0,21
kůň	0,13	0,08	0,01	0,02	0,34	0,14	0,25
prase	0,90	0,10	0,31	0,13	1,55	2,93	0,17

Graf 2: Procentické zastoupení indikátorových kongenerů PCB v krvi vyšetřovaných zvířat



Graf 3: Porovnání kongenerů PCB ve směsi Delor 103 + 106 a v krvi bažantů a prasat



Vzhledem k tomu, že hlavním zdrojem kontaminace PCB byly v Československu komerční přípravky Delor 103 a Delor 106 vyráběné v Chemko Strážské na Slovensku, je v grafu 3 uvedeno rozložení sledovaných indikátorových kongenerů PCB u směsi z těchto dvou přípravků, smíchaných v poměru (1 : 1) a dále obsah PCB v krvi bažantů a prasat. Z grafu vyplývá, že zastoupení těchto kongenerů v krvi se u vybraných druhů zvířat liší, a proto můžeme usuzovat na to, že zdroje kontaminace byly u obou druhů zvířat odlišné. Na základě výše specifikovaných údajů lze konstatovat, že krev se v tomto případě osvědčila jako vhodný bioindikátor při hodnocení zátěže škodlivinami organického původu. Na podkladě hladin stanovených v krvi je možné určit, zda primárním zdrojem kontaminace byly komerční přípravky obsahující nížechlorované nebo výšechlorované bifenyly. Při odběrech krve prováděných ještě v průběhu života hospodářských zvířat můžeme také předpovědět úroveň kontaminace PCB a podle potřeby provést ozdravná opatření, související například s řízeným odbouráváním tohoto xenobiotika z depotního tuku. Rozšíření nížechlorovaných bifenyly bývá především způsobeno buď atmosférickou depozicí nebo sekundární kontaminací ze znečištěného ekosystému.

Bylo zajímavé porovnat naše nálezy s údaji publikovanými na Slovensku. V blízkosti areálu Chemko Strážské, kde byly dříve produkovány komerční směsi PCB s názvem Delor 103 až Delor 106, Hydeler a Delotherm /20, 21/, byly sledovány hladiny PCB v séru, ve tkáních a v parenchymatózních orgánech lovné zvěře. Cílem této studie bylo také odhalení divokých skládek toxického odpadu z minulého období. V roce 1997 byly prokázány poměrně vysoké nálezy u bažantů zvěřiny, kde byla detekována nejvyšší hodnota u PCB 180, a to 3,39 mg/kg ve svalovině, vztaženo na tuk. Ke zvýšení obsahu PCB v séru došlo především v roce 1998. Autoři si tyto nálezy vysvětlili tím, že v roce 1998 byla vysoká hladina spodní vody a došlo k vyplavení perzistentních xenobiotik z divokých skládek na povrch. Nejvyšší hodnoty vykazovali jedinci pohybující se v blízkosti vlečky, odkud byly transportovány komerční směsi obsahující PCB. Z uvedených údajů je patrné, že také tyto souborné studie prokázaly vhodnost využití krve jako indikátoru úrovně znečištění ekosystému.

3.3 VYUŽITÍ KRVE JAKO INDIKÁTORU K URČENÍ MÍRY METABOLIZACE APLIKOVANÉHO DELORU 103

Tato část přednášky je zaměřena na zhodnocení distribuce PCB do tkání prasat a na význam krve jako indikátoru v rámci hodnocení této distribuce. Celý pokus byl prováděn ve stáji, kde na počátku pokusu bylo ověřeno, že zde nedošlo k sekundární kontaminaci z okolního prostředí. Prasata byla rozdělena do tří skupin; jedna skupina byla kontrolní a dvě pokusné. Prasatům byly v průběhu pokusu perorálně podávány tobolky obsahující Delor 103 a Delor 106

rozpuštěné ve vepřovém sádle (obsah 1 mg/kg sádla); časový interval aplikace byl jednou za 14 dní. V období mezi podáváním jim byla odebírána krev, celkem ve 13 odběrech. Po dosažení jatečné hmotnosti byla prasata poražena a provedeno jatečné bourání. Obsah PCB byl zjišťován rovněž v napájecí vodě, krmivu, kejďě, střevním obsahu a ve stájovém prachu.

Cílem této studie bylo:

- ✓ prokázat distribuci PCB do tkání prasat, jímž byl perorálně podáván Delor 103
- ✓ prokázat distribuci PCB do tkání prasat, jímž byl perorálně podáván Delor 106
- ✓ porovnat, do jaké míry dochází k metabolizaci jednotlivých kongenerů PCB v případě aplikace Deloru 103
- ✓ zhodnotit, zda lze využít nálezy prokázané v krevní plazmě pro odhad kontaminace v průběhu života hospodářských zvířat.

Vlivu vnějšího prostředí bylo na počátku pokusu zamezeno tak, že před započítím pokusu byl vepřín, kde byl pokus prováděn nově vybělen a stájové prostředí upraveno tak, aby případná sekundární kontaminace z vnějšího i ze stájového prostředí byla minimální. Vepřín však byl umístěn v obci nacházející se cca 16 km vzdušnou čarou od závodu Colorlak, kde byly do roku 1986 vyráběny barvy s přísadou Deloru 106, a proto muselo být uvažováno o možnosti sekundární kontaminace ze životního prostředí způsobené atmosférickým přenosem PCB, případně jeho uvolněním z legálních a černých skládek odpadu z Colorlaku.

V rámci našeho hodnocení byly získány následující výsledky: u skupiny, které byl aplikován Delor 103, docházelo v časovém horizontu prováděných odběrů ke snižování obsahu nížechlorovaných PCB, zatímco obsah výšechlorovaných PCB se zvyšoval. Jak je z literatury známo, tento trend je možno připsat snadnější vstřebatelnosti nížechlorovaných PCB a jejich rychlejší metabolizaci. Pro lepší názornost jsou uvedeny vypočtené poměry mezi nížechlorovanými PCB a výšechlorovanými PCB u prvního a třináctého odběru, které byly v krevní plazmě prasat následující: první odběr – prase č. 1 (1 : 0,91), prase č. 2 (1 : 1,03), prase č. 3 (1 : 0,97), prase č. 4 (1 : 0,87), prase č. 5 (1 : 0,88). Ve třináctém odběru se tento poměr podstatně změnil, došlo k nárůstu podílu výšechlorovaných PCB: prase č. 1 (1 : 1,99), prase č. 2 (1 : 2,48), prase č. 3 (1 : 2,44), prase č. 4 (1 : 2,46) a prase č. 5 (1 : 2,62). Z uvedených poměrů vyplynulo, že tento trend byl platný pro celou pokusnou skupinu, které byl perorálně aplikován Delor 103. V tabulce 3 jsou prezentovány průměrné koncentrace indikátorových kongenerů PCB za celé sledované období. Provedeme-li i v tomto případě výpočet podílu nížechlorovaných PCB ku výšechlorovaným PCB, dostaneme hodnotu 1 : 1,38; tento výpočet dokumentuje, že trend nárůstu výšechlorovaných PCB se projevil rovněž u průměrného obsahu

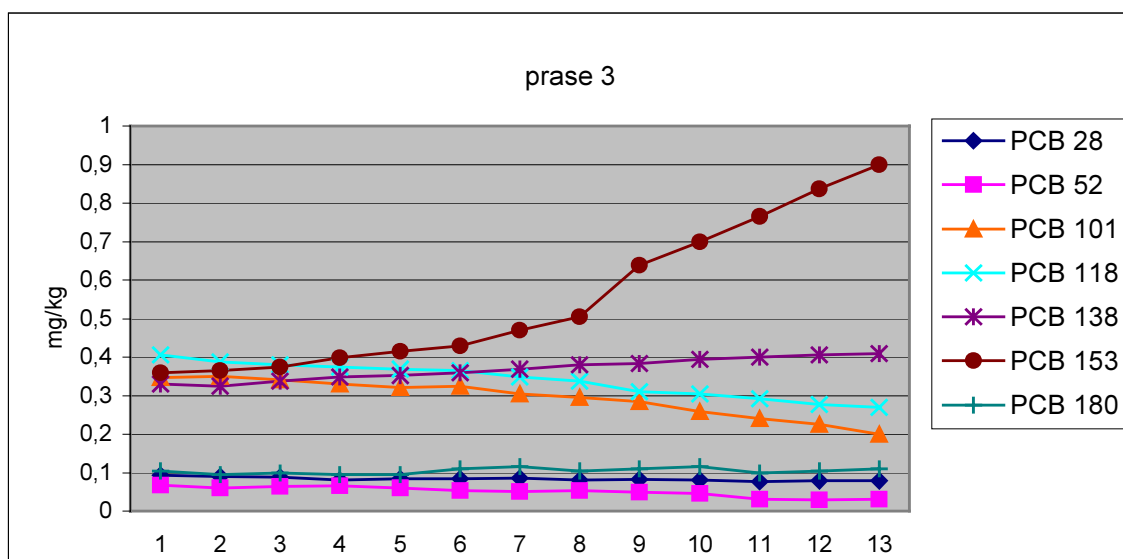
indikátorových kongenerů PCB pocházejících z Deloru 103 za celé sledované období.

Tabulka 3: Průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat, aplikován Delor 103 [mg/kg]

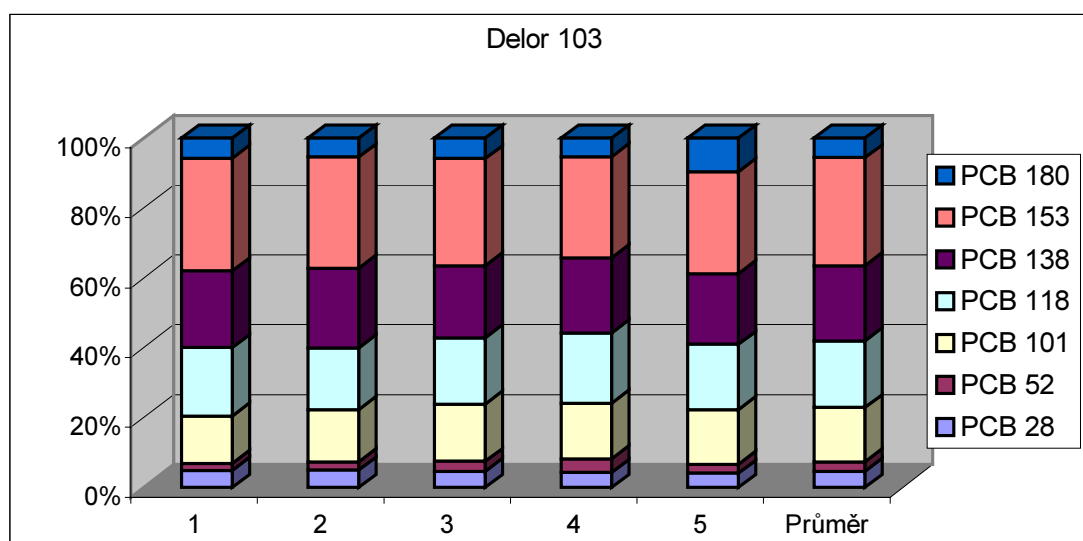
Prase číslo	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
1	0,081	0,034	0,225	0,325	0,365	0,537	0,095
2	0,084	0,040	0,256	0,301	0,390	0,542	0,091
3	0,083	0,051	0,294	0,340	0,369	0,551	0,105
4	0,072	0,068	0,270	0,344	0,367	0,493	0,091
5	0,072	0,047	0,283	0,337	0,366	0,528	0,101
průměr	0,078	0,048	0,266	0,329	0,371	0,530	0,097
medián	0,081	0,047	0,270	0,337	0,367	0,537	0,095

Průběh metabolizace je možno zhodnotit na základě grafu 4, kde je znázorněna dynamika PCB v krevní plazmě u prasete č. 3. Z grafu je zřejmé, že v průběhu pokusu došlo k poklesu nížechlorovaných PCB, zatímco obsah výšechlorovaných PCB, především kongeneru PCB 153 v průběhu 26 týdnů, ve kterých byly prováděny odběry krve, zřetelně vzrostl.

Graf 4: Dynamika PCB v krevní plazmě u prasete č. 3; aplikován Delor 103



Graf 5: Procentické zastoupení indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat za celé sledované období; aplikován Delor 103



V grafu 5 je prezentováno procentické zastoupení jednotlivých kongenerů PCB u prasat ze shodné skupiny, a to v průběhu všech třinácti odběrů. Na tomto grafu je zřetelněji vidět příspěvek jednotlivých kongenerů k celkovému obsahu PCB. Převládá sice kongener PCB 153, ale velký podíl na procentickém zastoupení mají také kongenery PCB 101, 118 a 138. Při hodnocení běžné kontaminace není zastoupení PCB 101 a 118 tak velké.

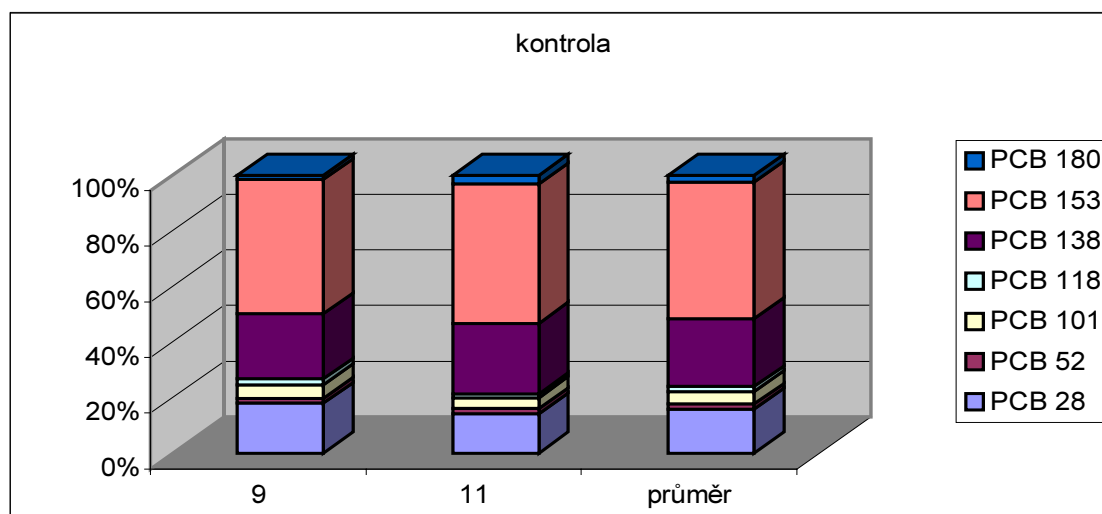
V tabulce 4 je uveden průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB u prasat pocházejících z kontrolní skupiny. Do hodnocení byla zahrnuta pouze ta prasata, u nichž se hladiny sledovaných analytů pohybovaly ve většině odběrů nad mezí detekce. Výpočet podílu nížechlorovaných PCB ku výšechlorovaným PCB nám umožnil odhadnout, zda zdrojem kontaminace byly níže nebo výšechlorované bifenyly. Pro prasata z kontrolní skupiny byl tento poměr následující: prase č. 9 (9. odběr 1 : 3,03; 13. odběr 1 : 2,72), prase č. 11 (7. odběr 1 : 3,37; 13. odběr 1 : 3,74). Pro průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě za celé sledované období byl vypočten podíl 1 : 3,19. Z hodnot uvedených v tabulce 4 vyplývá, že prasata kontrolní skupiny byla přirozeně kontaminována PCB; zjištěné hladiny byly na úrovni $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zdrojem kontaminace byl pravděpodobně Delor 106, pocházející z kontaminovaného stájového prostředí (stájový prach) a z kontaminovaných žlabových vzorků, kam bylo přidáváno objemné krmivo z příslušného agrárního ekosystému. Jak již bylo uvedeno, lokalita byla zatížena Delorem 106 z blízkého závodu na výrobu barev – Colorlak . Rozšiřování tohoto xenobiotika do vnějšího prostředí mohlo být způsobeno buď atmosférickým přenosem, nebo uvolňováním deponovaných reziduí PCB z hydrosféry a pedo-

sféry. V grafu 6 je uvedeno procentické zastoupení jednotlivých kongenerů PCB za celé sledované období u kontrolní skupiny; převládá PCB 153.

Tabulka 4: Průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat, kontrolní skupina [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

Prase číslo	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
9	0,848	0,084	0,234	0,098	1,11	2,28	0,076
11	0,787	0,101	0,223	0,077	1,41	2,78	0,177
průměr	0,820	0,009	0,230	0,090	1,26	2,53	0,130

Graf 6: Procentické zastoupení indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě kontrolní skupiny za celé sledované období



Následující výsledky, které uvádím, se vztahují ke krevní plazmě prasat, kterým byl perorálně aplikován Delor 106. V tomto případě převažovaly výšechlorované kongenery PCB nad nížechlorovanými kongenery PCB; pro průkaz rozdílu mezi jednotlivými odběry u prasat č. 13 až 18 byl, shodně s předchozími výpočty, zvolen 1. a 13. odběr. Poměr nížechlorovaných PCB ku výšechlorovaným PCB se u prvního odběru pohyboval u jednotlivých prasat od podílu 1 : 2,23 do podílu 1 : 7,11; u třináctého odběru od podílu 1 : 2,94 do podílu 1 : 14,98. Pokud byl výpočet poměru nížechlorovaných PCB ku výšechlorovaným PCB proveden u průměrných hodnot za celé sledované období, byla zjištěna hodnota 1 : 4,69. Průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB v krevní

plazmě prasat, kterým byl perorálně aplikován Delor 106, je uveden v tabulce 5. Z tabulky vyplynulo, že nejvyšší průměrný obsah byl zjištěn u kongenerů PCB 138 a PCB 153. Při aplikaci Deloru 106 došlo rovněž k podstatně větší kumulaci, než u Deloru 103, což pravděpodobně souvisí s chemickými, biologickými a environmentálními vlastnostmi výsechlorovaných PCB.

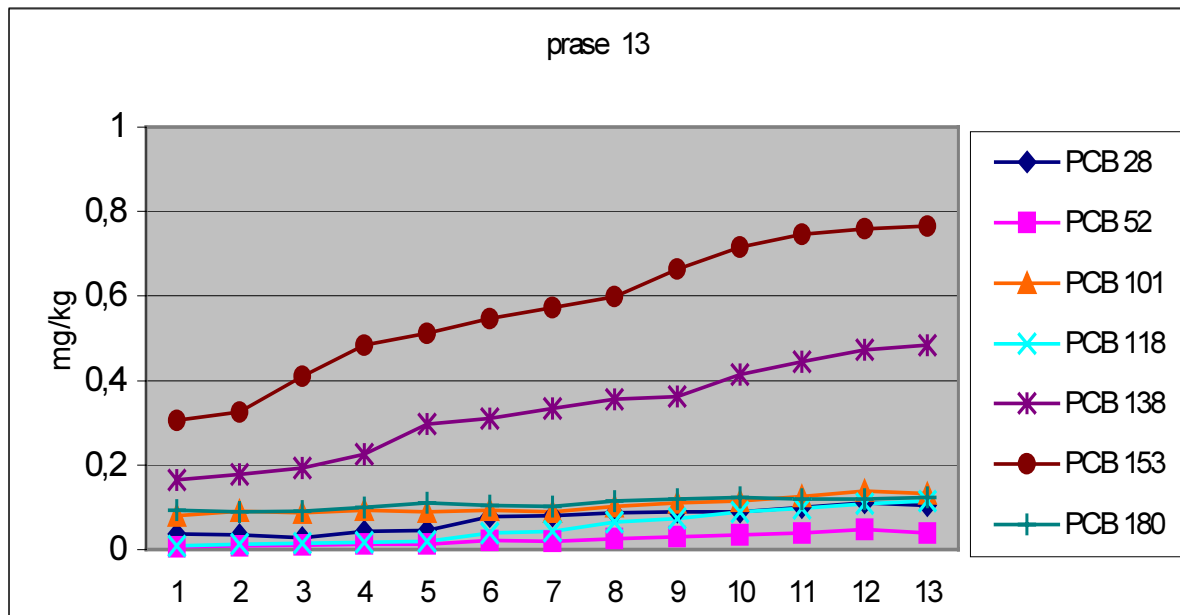
Tabulka 5: Průměrný obsah indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat, aplikován Delor 106 [mg/kg]

Prase číslo	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
13	0,071	0,024	0,104	0,054	0,326	0,570	0,109
14	0,062	0,016	0,102	0,027	0,210	0,405	0,090
15	0,064	0,021	0,093	0,054	0,316	0,417	0,147
16	0,080	0,033	0,097	0,140	0,429	0,768	0,098
17	0,433	0,115	0,292	0,169	2,051	2,882	0,940
18	0,562	0,278	0,495	0,306	3,190	4,509	1,638
průměr	0,212	0,081	0,197	0,125	1,087	1,592	0,504
medián	0,072	0,029	0,103	0,097	0,378	0,669	0,128

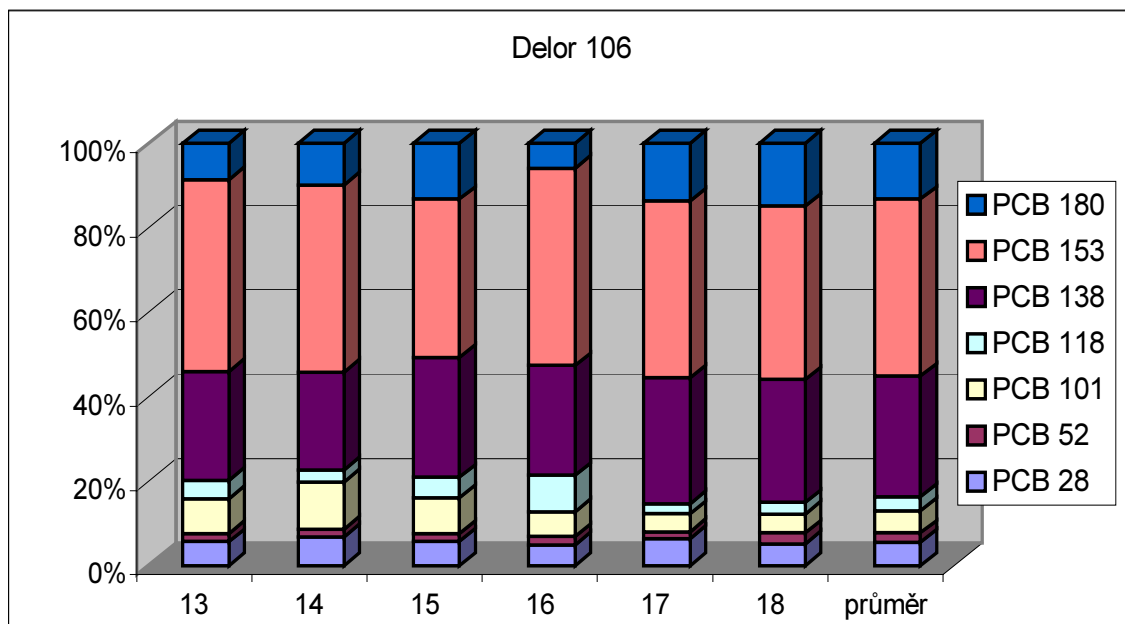
Také v tomto případě uvádím pro názornost dynamiku PCB v krevní plazmě prasete č. 13 v průběhu celého pokusu. Z grafu 7 je patrný zřetelný nárůst majoritních kongenerů PCB 138 a PCB 153, tj. těch, které tvoří vždy největší podíl ze sumy PCB, pokud suroviny a potraviny živočišného původu jsou kontaminovány Delorem 106.

Zhodnocení procentického zastoupení jednotlivých kongenerů PCB bylo provedeno také po perorální aplikaci Deloru 106 v celém časovém horizontu prováděných odběrů. Z grafu 8 je zřejmé, že u všech pokusných prasat převládal kongener PCB 153, poté následoval kongener PCB 138. Naopak nejnižší procentické zastoupení bylo prokázáno u PCB 52 a PCB 118. Tímto zastoupením se nejvíce odlišoval vliv perorální aplikace Deloru 106 od perorální aplikace Deloru 103. Zjištěné spektrum kongenerů PCB odpovídalo nálezům zjišťovaným ve tkáních, orgánech a tělních tekutinách hospodářských zvířat, při běžně prováděných kontrolách, které SVS ČR a ČZPI ČR publikují každoročně ve svých bulletinech i prostřednictvím internetu.

Graf 7: Dynamika PCB v krevní plazmě u prasete č. 13; aplikován Delor 106



Graf 8: Procentické zastoupení indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat za celé sledované období; aplikován Delor 106



Pro větší názornost bylo v grafu 9 provedeno porovnání Deloru 103 a Deloru 106 s indikátorovými kongenery zastoupenými v krevní plazmě prasat. Na levé straně grafu je znázorněno jejich zastoupení v technické komerční směsi Delor 103, Delor 106 a ve směsi Deloru 103 a Deloru 106 (1:1), na pravé straně potom zastoupení indikátorových kongenerů PCB v krevní plazmě prasat. Tento graf současně dokumentuje, že v těle pokusných prasat byla prokázána postupná přeměna nížechlorovaných PCB na výšechlorované PCB.

Zajímavé bylo zjištění, že u prasat kontrolní skupiny se v nezanedbatelném množství vyskytoval i kongener PCB 28. Ke shodným závěrům dospěli i autoři publikace zabývající se podobnou situací na Slovensku /20, 21/.

Graf 9: Porovnání Deloru 103 a Deloru 106 s indikátorovými kongenery zastoupenými v krevní plazmě prasat



Porovnání námi získaných výsledků s literárními údaji bylo velmi obtížné, protože pokusy, které byly publikovány jinými autory a byly nastaveny za účelem sledování dynamiky PCB, nebyly prováděny s perorálně podávanými přípravky. Obvykle bylo použito kontaminované krmivo /21/, nikoliv perorálně podávaný komerční přípravek, jak tomu bylo v našem případě. Naší snahou bylo zaručit, aby pokusný jedinec byl kontaminován námi určeným komerčním přípravkem. Uvedení autoři konstatovali, že jimi zjištěný pokles koncentrací sledovaných kongenerů PCB byl spíše způsoben ředěním v důsledku růstu prasat. Výše citovaní autoři také prokázali, že u některých kongenerů PCB docházelo v různých obdobích života pokusných jedinců k redistribuci v tuku. Redistribuce přitom vykazovala přímou závislost na stupni chlorace a nepřímou závislost na rozpustnosti PCB ve vodě.

Výsledky našeho rozsáhlého pokusu nebyly dosud, vzhledem k velkému množství zpracovaného materiálu, souhrnně publikovány; na různých mezinárodních symposiích byly publikovány pouze dílčí výsledky /22, 23/.

4 ZÁVĚR

V úvodní části přednášky byl zhodnocen význam bioindikátorů používaných pro hodnocení úrovně kontaminace. Kromě bioindikačních organismů byla diskutována také otázka významu využití krevní plazmy jako vhodného bioindikátoru při sledování distribuce xenobiotik do tkání hospodářských zvířat a volně žijících zvířat.

V části věnované vlastnímu experimentálnímu sledování bylo zhodnoceno využití obsahu PCB v krvi volně žijících hospodářských zvířat k odhadu předpokládané kontaminace tkání. Zhodnocené ověřovací pokusy prokázaly reálnou možnost odhadu hladin PCB ve tkáních na základě detekovaných hladin PCB v krevní plazmě.

Pro hlubší objasnění byl založen cílený pokus za účelem objasnění distribuce PCB do krve a do tkání prasat. Byla prokázána distribuce do krevní plazmy prasat, kterým byly perorálně aplikovány komerční přípravky s obsahem PCB, Delor 103 a Delor 106 rozpuštěné ve vepřovém sádle. U skupiny Delor 103 bylo prokázáno, že nízechlorované PCB se v průběhu života prasat metabolizují, o čemž svědčí poměr nízechlorovaných a výsechlorovaných PCB vypočtený z průměrných obsahů za celé sledované období (1 : 1,38). Současně docházelo k nárůstu obsahu PCB 153 a ke snižování obsahu PCB 52 a 101. U skupiny Delor 106 byla prokázána převaha výsechlorovaných PCB, která u prvního odběru byla v rozmezí 1:2.23 až 1:7.11; u třináctého odběru v rozmezí 1:2.94 až 1:14.98. Hodnoty prokázané v krevní plazmě nepotvrdily jednoznačně možnost odhadu kontaminace PCB ve tkáních na základě hodnot zjištěných v krvi. Na podkladě získaných výsledků proto doporučujeme analyzovat

současně krevní plazmu a bioticky odebraný tuk. Pouze na podkladě takto postaveného pokusu je možno určit poměr mezi obsahem PCB v krevní plazmě a ve tkáních, což by umožnilo výpočet korelace mezi obsahem PCB v těchto dvou komoditách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ZIMA, S. , Vávrová , M. Organické polutanty v bioindikátorech zo životného prostredia. *Ekológia & Život*, 1997, č. 6, s. 28-33.
2. SEBESTIANOVÁ, N. *Využití drobných zemních savců jako bioindikátorů znečištění agrárních ekosystémů*. Brno, 2000, 105 s., 19 s. příloh. Doktorská disertační práce na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické university Brno na Ústavu veterinární ekologie a ochrany životního prostředí. Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
3. HUX, C., Förling, L. *Mine selected assays for health status in natural fish populations. Chemicals in the aquatic environment: advanced hazard assessment*. L. Landner, Springer- Verlag, NY. 1989, 197 pp.
4. STEGEMAN, J.J. et al. *Molecular response to environmental contamination – enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1992. 235 pp.
5. ŠTASTNÝ, K., Šolc, J. *In Bioindikation auf der Ebene der Populationen und Biogeozonosen 2 (Bioindikation 5) KTB*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wissenschaftliche Beiträge, 1980, 28(P 12). 68 pp.
6. ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H. *Distribuce polychlorovaných bifenyliů (PCB) do tkání prasat*. Brno, 2001, 135 s., 14 s. příloh. Doktorská disertační práce na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické university Brno na Ústavu veterinární ekologie a ochrany životního prostředí. Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
7. BORLAKOGLU, J.T., Welch, V.A., Wilkins, J.P., Dils, R.R. Transport and cellular uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs). Association of individual PCB isomers and congeners with plasma lipoproteins and proteins in the pigeon. *Biochem. Pharmacol*, 1990, vol. 4, no. 2, pp. 265 – 272

8. PAUWELS, A., Covaci, A., Delbeke, L., Punjabi, U., Schepens, P.J. The relation between levels of selected PCB congeners in human serum and follicular fluid. *Chemosphere*, 1999, vol. 39, no. 14, pp. 2433 - 2441
9. MATTHEWS, H.B., Surles, J.R., Carver, J.G., Anderson, M.W. Halogenated biphenyl transport by blood components. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, vol. 4, no. 3, 420 – 428, pp. 420
10. MES, J.L., Marchand, D., Turton, P., Lau, Y., Ganz, P.R. The determination of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbon residues in human blood, serum and plasma. A comparative study. *Inter J. Environ. Anal. Chem.*, 1992, vol. 48, no. 3 – 4, pp. 175 – 176
11. MES, J., ARNOLD, D. L., Bryce, F. The elimination and estimated half-lives of specific polychlorinated biphenyl congeners from the blood of female monkeys after discontinuation of daily dosing with Aroclor 1254. *Chemosphere*, 1995, vol. 30, no. 4, pp. 789 - 800
12. HÄDRICH, J., Baum, F. Beurteilung der PCB Belastungssituation landwirtschaftlicher Nutztiere durch Bestimmung des PCB-Gehaltes im Blutplasma. II. Validierung, Erweiterung und praktische Anwendung des Berteilungsverfahren. *Archiv Lebensmittelhyg.*, 1993, vol. 44, no. 3, pp. 69 – 73
13. HÄDRICH, J., Baum, F. Beurteilung der PCB Belastungssituation landwirtschaftlicher Nutztiere durch Bestimmung des PCB-Gehaltes im Blutplasma. *Archiv Lebensmittelhyg.*, 1992, vol. 43, no. 3, pp. 81 – 86
14. EWERS, C., Reichmuth, J., Wetzell, S., Vemmer, H., Heeschen, W. Untersuchungen zum Verbleib lipophiler persistenter Organochlorverbindungen im Körper laktierender Rinder nach oraler Aufnahme am Beispiel des PCB-Kongeners Nr. 153. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1989, vol. 41, no. 2, pp. 75-95.
15. VÁVROVÁ, M. *Polychlorované bifenyly v ekosystému regionu Uherské Hradiště v letech 1991 – 1992 (Účelová publikace)*. 1. vyd. Brno: Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 1992. 12 s, 28 s. příloh.
16. VÁVROVÁ, M. *Příručka jakosti (písemná práce k získání certifikátu Manažer jakosti QM podle normy ČSN EN 45013 a požadavku EOQ)*. 1.vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1995. 35 s.

17. SNEDECOR, G.W., Cochran, W.G. *Statistical Methods*: 6th edition Iowa: State University Press. 1967, 579 p.
18. ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H., Chytilová, I. *Krevní sérum jako indikátor kontaminace životního prostředí*. Brno, 2001. 36 s. Závěrečná zpráva rozvojového projektu FRVŠ, číslo projektu 1322/2001.
19. GARGOŠOVÁ, H. *Distribuce polychlorovaných bifenylyů do tkání prasat – preanalytické stanovení*. Brno, 1998. Doktorandské spisy. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. s. 18-21.
20. CIBEREJ, J., Bílá, A., Breyl, I. Poznatky z monitoringu PCB u zveri v areáli Chemko Strážske a.s. In *Konferencia o životnom prostredí pri príležitosti odovzdávania certifikátu systému environmentálneho manažerstva podľa STN EN ISO 14001. Zborník prednášok*. Strážske. 1999. s. 16-21.
21. CIBEREJ, J., Breyl, I., Kováč, G. Vplyv prostredia na zdravotný stav zveri v areáli Chemko Strážske a.s. In *Konferencia o životnom prostredí pri príležitosti odovzdávania certifikátu systému environmentálneho manažerstva podľa STN EN ISO 14001. Zborník prednášok*. Strážske. 1999. s. 43-45
22. ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H., Vávrová, M. Sledování PCB v krevní plazmě zvířat v souvislosti s odhadem kontaminace. In *Sborník příspěvků z XIV. semináře s mezinárodní účastí „Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách“*. VŠCHT Praha. 2001. s. 219-223.
23. VÁVROVÁ, M. Zlámálová Gargošová, H. Distribution of polychlorinated biphenyls into the pig tissues. 7th Regional Meeting of the Central and Eastern European biphenyls. In *SECOTOX 2002, 7th Regional Meeting of the Central and Eastern European Section. Trend and advances in environmental chemistry and ecotoxicology*. Brno. 2002. p.70

SOUHRN

V úvodní části přednášky byl vymezen význam bioindikátorů pro hodnocení úrovně znečištění životního prostředí. Kromě bioindikátorů typu lovné zvěře a ryb bývá často využívána krev. Tato komodita je důležitá především proto, že nám umožní hodnotit úroveň kontaminace zvířat ještě v průběhu jejich života. Na základě zjištěných hodnot je možné potom stanovit vhodný způsob eliminace škodlivin ze tkání hospodářských zvířat.

V části věnované vlastnímu experimentálnímu výzkumu byl ukázán tento způsob při sledování transferu PCB do tkání zvířat. V rámci naší studie byla řešena problematika distribuce PCB do tkání prasat. Pokus byl založen tak, aby příslušná dávka xenobiotika se dostala do trávicího traktu prasat, a proto byly Delor 103 a Delor 106 podávány ve formě tobolek obsahujících sádlo s přídavkem příslušného komerčního přípravku. Po dosažení jatečné hmotnosti byla prasata poražena a následně byly analyzovány vzorky jednotlivých tkání (hřbetní sádlo, plstní sádlo, plec, bůček, kotleta, jazyk, lalok, tenké střevo, tlusté střevo) a současně vzorky krevní plazmy z krve, která byla ve čtrnáctidenních intervalech odebírána v průběhu celého pokusu. Dále byl u poražených prasat analyzován střevní obsah z tenkého i tlustého střeva. Aby byl zhodnocen i eventuální příspěvek kontaminace z vnějšího prostředí, byly analyzovány také krmné směsi pro prasata, žlabové vzorky, napájecí voda, kejda a stájový prach. Odběr žlabových vzorků, kejdy a stájového prachu byl prováděn současně s odběry krve.

V předkládané práci jsou presentovány dílčí výsledky pokusu, při kterém byla sledována distribuce PCB do tkání a krevní plazmy prasat. Byla prokázána distribuce do krevní plazmy prasat, kterým byly perorálně aplikovány ve vepřovém sádle rozpuštěné komerční přípravky s obsahem PCB Delor 103 a Delor 106. V průběhu pokusu došlo u pokusné skupiny Delor 103 ke snižování obsahu nízechlorovaných PCB a ke zvyšování výsechlorovaných PCB. Na počátku výkrmu byl u jednoho pokusného prasete poměr nízechlorovaných ku výsechlorovaným PCB v krvi 1:0.91; při 13. odběru 1:2.62. U skupiny Delor 103 bylo prokázáno, že nízechlorované PCB se v průběhu života prasat metabolizují, o čemž svědčí poměr nízechlorovaných a výsechlorovaných PCB vypočtený z průměrných obsahů za celé sledované období (1:1,38). Současně docházelo k nárůstu obsahu PCB 153 a ke snižování obsahu PCB 52 a 101. U skupiny Delor 106 byla prokázána převaha výsechlorovaných PCB, která u prvního odběru byla v rozmezí 1:2.23 až 1:7.11; u třináctého odběru v rozmezí 1:2.94 až 1:14.98. Poměr nízechlorovaných ku výsechlorovaným PCB byl za celé sledované období 1:4.69. Současně došlo k vyšší kumulaci majoritních

kongenerů než u skupiny Delor 103. U kontrolní skupiny byl tento poměr 1:3.19. Hladiny PCB detekované v krevní plazmě neprokázaly jednoznačně možnost odhadu kontaminace PCB ve tkáních na základě hodnot zjištěných v krvi. Na podkladě získaných výsledků proto doporučujeme analyzovat současně krevní plazmu a biopticky odebraný tuk. Pouze takto postavený pokus umožní exaktně určit poměr mezi obsahem PCB v krevní plazmě a ve tkáních, což by následně umožnilo výpočet korelace mezi obsahem PCB v těchto dvou komoditách.

ABSTRACT

In the opening part of the lecture the importance of bioindicators was defined from the point of view of environmental pollution assessment. Beside to game animals and/or fish is also blood often in use. This matrix is important in particular because it makes possible to assess the level of contamination during the period of animal life. Based upon values determined, it is possible to find out the appropriate way of elimination of pollutants from animal tissues. This approach was used in order to follow transfer of PCBs into tissues of pigs in the experimental part.

Within our study, the problems of PCB distribution into the pig's tissues has been solved. The experiment required a relevant amount of xenobiotic to be inserted into the digestive tract of pigs, for which reason Delor 103 and Delor 106 were given to the pigs in the form of capsules containing lard and dose of the respective commercial product. When the pigs reached the slaughterable weight, they were slaughtered and subsequently samples of individual tissues were analysed (dorsal lard, felt lard, shoulder, belly-pork, cutlet, tongue, lobe, intestine and colon) and also samples of the blood plasma from blood taken every second week during the whole experiment. Also the content of intestine and colon of the slaughtered pigs were analysed. In order to evaluate also possible contamination of outer environment, also the feed mixes, drinking water, samples of troughs, sewage and stable dust were analysed. The collection of troughs, sewage and stable dust samples was made concurrently with the blood samples.

This paper presents partial results of an experiment in which the levels of PCBs in tissues and blood plasma of pigs were monitored. The levels of PCBs in blood plasma of pigs after administration of capsules containing commercial products PCB Delor 103 and Delor 106 dissolved in lard were determined. In

the Delor 103 group the levels of low-chlorinated PCBs in pigs decreased while the levels of high-chlorinated PCBs increased. The ratio between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs in one experimental pig was 1:0.91 at the beginning of the experiment. In the 13th blood sample the ratio was 1:2.62. It was shown that the ratio between the levels of low-chlorinated and high-chlorinated PCBs (calculated from average values) over the whole monitoring period in the Delor 103 group was 1:1.38. This indicates that low-chlorinated PCBs underwent metabolic transformation. Furthermore, the content of PCB 153 increased while the levels of both PCB 52 and 101 decreased. For the Delor 106 group the ratio (i.e. low-chlorinated vs. high-chlorinated PCBs) was 1:4.69 over the whole monitored period compared to 1:3.19 in control pigs. Furthermore, the total level of PCB congeners in the Delor 106 group was higher than that in the Delor 103 group. A level of contamination in tissues resulting from PCBs cannot be assessed only on the basis of the concentrations of PCBs in blood plasma. On the basis of our results we suggest to analyse blood plasma and biopsy samples of lard at the same time. This ensures that the ratio between the levels of PCBs in blood plasma and tissues will be correct enabling one to correlate the PCB levels in these two biological materials.