

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie, geologie



Vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry u mláďat sýkory koňadry (*Parus major*)

Natalie Salem
Hlavní město Praha

Praha 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie, geologie

**Vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a
kondiční parametry u mlád'at sýkory koňadry
(*Parus major*)**

**The effect of heavy metal contamination on
hematological and condition parameters in great tit
(*Parus major*) nestlings**

Autor: Natalie Salem

Škola: Gymnázium, Praha 8, U Libeňského zámku 1, 180 00 Praha

Kraj: Hlavní město Praha

Školitel: doc. RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 2.3.

Natalie Salem

Poděkování

Chtěla bych srdečně poděkovat svému školiteli, doc. RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D., za víceleté odborné vedení, ohromnou trpělivost, ochotu, motivaci a cenné rady ke zlepšení. Velmi si vážím veškerého času, který mi věnoval – ať už při konzultacích, či zpětných vazbách, které mě posouvaly dál. Možnost pracovat na své SOČ pod jeho vedením byla nesmírně obohacující zkušeností, za kterou budu vždy vděčná.

Velké poděkování patří mému konzultantovi, RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D., za laboratorní vedení chemické analýzy, cenné rady, trpělivost při vysvětlování metod a veškerý čas strávený v laboratoři.

Srdečné poděkování patří Mgr. Kateřině Markové za nesmírnou pomoc a čas strávený na terénních výpravách, ochotu vždy poradit, motivaci a také konzultace při statistickém zpracování dat. Velké poděkování patří také konzultantce Mgr. Tereze Krajzingrové za praktické rady a veškerou obětavou pomoc a čas, který mi věnovala při zpracování statistických analýz. Děkuji Zdeňce Cscibrejové za laboratorní vedení při barvení krevních nátěrů a za seznámení s metodou, kterou mi s laskavostí a trpělivostí poskytla. Velmi děkuji Lyddii Leino, M.Sc. a doc. Tapiu Eevovi, Ph.D. za poskytnutí dat z finských vzorků a analýzy trusu, stejně jako za jejich vstřícnost a ochotu při zodpovídání mých dotazů. Jiřímu Šantavému velice děkuji za celodenní pomoc při sběru vzorků v Nymburku. Dále bych ráda ocenila příjemnou atmosféru v Laboratoři evoluční a ekologické imunologie, zejména RNDr. Martina Těšického, Ph.D., Tao Li a Balraje Melepata. Děkuji také paním profesorkám Mgr. Zuzaně Stojanové, Mgr. Petře Červenské a celé mé škole za podporu při této činnosti.

Velké poděkování patří paní profesorce Mgr. et Mgr. Kateřině Remišové – nebýt jí, ani bych nevěděla o možnosti psaní SOČ a zapojení do Ornitologické akademie. Ve mně probudila zájem aktivně se rozvíjet jako středoškolačka a pomohla mi vkročit do reálného pole přírodních věd. A v neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi byli podporou během celého procesu tvorby této práce.

Děkuji vám všem.



Anotace

Těžké kovy představují toxickou zátěž pro ekosystémy kvůli své perzistenci v půdě, bioakumulaci v živých organismech a přenosu v potravních řetězcích. Synantropní pěvci, jako je sýkora koňadra (*Parus major*), mohou sloužit jako bioindikátory v ekotoxikologii díky své tendenci setrvávat v jedné oblasti, konzumaci hmyzu bohatého na těžké kovy a ochotě hnízdit v budkách, což umožňuje efektivní monitorování populací na různých lokalitách a v čase. Cílem této práce je prozkoumat vztah mezi kontaminací těžkými kovy a zdravotní kondicí mlád'at sýkor koňader v ekosystémech vystavených antropogennímu znečištění. Byla zjištěna korelace mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu mlád'at, srovnány dva metodické postupy měření koncentrací těžkých kovů v krevních vzorcích, analyzován vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a hematologickými a kondičními parametry a vyhodnocena prostorová variabilita kontaminace těžkými kovy v trusu mlád'at sýkor koňader mezi znečištěnými a kontrolními lokalitami v České republice (Praha, Nymburk) a Finsku (Harjavalta). Mezi koncentracemi chromu, železa a vápníku ve vzorcích krve a trusu byla zaznamenána významná korelace, která může odrážet podobné metabolické dráhy a detoxifikační mechanismy. Srovnání dvou metod měření těžkých kovů v krevních vzorcích ukázalo, že koncentrace většiny analyzovaných prvků byly mezi metodami konzistentní, avšak některé vykazovaly výrazné rozdíly, což poukazuje na nutnost zohlednit stabilitu jednotlivých prvků při volbě metodického postupu. I když jednoznačný vliv kontaminace na fyziologické parametry nebyl prokázán, některé trendy pozorované u olova a niklu naznačují, že i subletální koncentrace těžkých kovů mohou potenciálně ovlivňovat imunitní systém a růst mlád'at. Výsledky potvrdily vyšší koncentrace těžkých kovů v trusu mlád'at z kontaminovaných lokalit oproti kontrolním, s nejvýraznějšími rozdíly u niklu a olova, což potvrzuje vliv urbanizace a průmyslové činnosti na jejich zvýšenou přítomnost v prostředí a následnou akumulaci v živých organismech.

Klíčová slova

těžké kovy; sýkora koňadra (*Parus major*); bioindikátory; kontaminace; ekotoxikologie

Annotation

Heavy metals pose a toxic risk to ecosystems due to their persistence in soil, bioaccumulation in living organisms, and trophic transfer. Synanthropic passerines, such as the great tit (*Parus major*), can serve as bioindicators in ecotoxicology due to their tendency to remain in one site, diet consisting of insects rich in heavy metals, and their acceptance of nest boxes for nesting, which facilitates efficient monitoring of populations across different locations and time periods. This study aims to examine the relationship between heavy metal contamination and the health condition of great tit nestlings in ecosystems exposed to anthropogenic pollution. The study observed the correlation between heavy metal concentrations in blood and feces, compared two methodological approaches for measuring heavy metal concentrations in blood samples, analyzed the relationship between heavy metal levels in blood and hematological and condition parameters, and assessed the spatial variability of heavy metal contamination in feces of great tit nestlings between polluted and control sites in the Czech Republic (Prague, Nymburk) and Finland (Harjavalta). A significant correlation was observed between chromium, iron, and calcium concentrations in blood and fecal samples, which may reflect similar metabolic pathways and detoxification mechanisms. The comparison of two measurement methods for heavy metals in blood samples showed that while most analyzed elements had consistent concentrations across methods, some exhibited substantial differences, highlighting the importance of considering the stability of individual elements when selecting a methodological approach. Although a direct effect of contamination on physiological parameters was not confirmed, certain trends observed for lead and nickel suggest that even sublethal concentrations of heavy metals may affect the immune system and nestling growth. The results confirmed higher heavy metal concentrations in the feces of nestlings from polluted sites compared to control sites, with the most pronounced differences found for nickel and lead. This finding supports the influence of urbanization and industrial activity on the elevated presence of these metals in the environment and their subsequent accumulation in living organisms.

Keywords

heavy metals; great tit (*Parus major*); bioindicators; contamination; ecotoxicology

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Těžké kovy.....	10
3.2	Zdroje těžkých kovů	10
3.3	Zdravotní dopady těžkých kovů	11
3.4	Volně žijící ptáci jako bioindikátory kvality prostředí	12
3.5	Typy biologických vzorků u ptáků	13
3.6	Vliv těžkých kovů na kondiční parametry ptáků	14
4	Metodika	16
4.1	Modelový druh: Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>).....	16
4.2	Výzkumné lokality.....	16
4.3	Sběr dat v terénu	17
4.4	Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů	19
4.5	Stanovení koncentrace těžkých kovů pomocí metodou ICP-MS	20
4.5.1	Příprava vzorků.....	20
4.5.2	Metoda ICP-MS	22
4.6	Statistické zpracování dat	23
5	Výsledky	26
5.1	Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu	28
5.2	Srovnání metodických postupů měření koncentrace těžkých kovů.....	32
5.3	Vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry	37
5.4	Porovnání míry kontaminace mezi lokalitami	39
6	Diskuze	44
6.1	Vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu	44
6.2	Srovnání koncentrací těžkých kovů mezi „wet“ a „dry“ metodou	45
6.3	Potenciální vliv těžkých kovů na hematologické a kondiční parametry mláďat	46
6.4	Faktory ovlivňující rozdíly v kontaminaci těžkými kovy mezi lokalitami.....	47
7	Závěr	50
8	Použitá literatura	51
	Seznam obrázků a tabulek	58
8.1	Obrázky.....	58

8.2	Tabulky	60
9	Přílohy.....	62
9.1	Úvodní ilustrace sýkory koňadry	62
9.2	Přehled repeatability pro jednotlivé parametry v rámci stejného hnízda.....	62
9.3	Korelační matice vztahů mezi kondičními parametry	63
9.4	Terénní dokumentace sýkory koňadry.....	63

1 Úvod

Přirozený výskyt těžkých kovů a jejich sloučenin v prostředí existoval v nízkých koncentracích odjakživa, důsledkem geochemických procesů, jako jsou zvětrávání hornin a vulkanická činnost (Kabata-Pendias 2010). Vzhledem k antropogenním vlivům a urbanizaci je to rostoucím problémem zejména v průmyslových oblastech, kvůli jejich rozsáhlému využití. Zvýšená přítomnost těchto toxických látek vede k závažnému znečištění půd. Toxicita rizikových prvků souvisí s jejich nerozložitelností v půdě, která může trvat až tisíce let, ukládání do tkání organismů a biomagnifikací v potravních řetězcích (Ali a kol. 2019).

Představují potenciální riziko nejen pro biosféru, ale také pro lidský organismus, o kterém je známo, že může způsobovat akutní nebo chronické otravy orgánů. Např. studie WHO (2007) naznačuje, že expozice kadmium (Cd) souvisí s poškozením ledvin a kostí a bylo také identifikováno jako potenciální lidský karcinogen způsobující rakovinu plic.

Ačkoliv se emise těžkých kovů do životního prostředí v České republice v posledních desetiletích snížily, tyto relativně nebezpečné prvky stále pronikají do těl synantropních organismů v množství, které negativně ovlivňuje jejich fyziologii a zdraví (Bauerová 2020).

Jedna z možností, jak zjišťovat vlivy lidské činnosti na zdraví organismů, funkci ekosystémů i na strukturu a fungování celé krajiny, je využití živých organismů jako indikátorů kvality (Boháč 1999). Jako bioindikátory označujeme organismy nebo jejich společenstva, jejichž životní funkce jsou korelovány s faktorem prostředí tak těsně, že mohou sloužit jako jejich ukazatele (Schubert 1985). Jejich chování, změny v populacích nebo kondice mohou poskytnout cenné informace a sloužit jako zrcadlo kvality životního prostředí.

2 CÍLE PRÁCE

Tato práce si klade za hlavní cíl objasnit vztah mezi kontaminací těžkými kovy a zdravotní stavem mlád'at sýkor koňader (*Parus major*) v antropogenních ekosystémech. Zaměřuje se na sýkoru koňadru jako modelový ptačí druh pro bioindikaci stavu životního prostředí. Díky jejich běžnému výskytu, tendenci setrvávat v jedné oblasti, ochotě hnízdit v budkách je možné efektivně monitorovat širokou škálu lokalit (Eens a kol. 1999). Tento druh je snadno odchytitelný, dostatečně velký pro neinvazivní odběr vzorků a jejich získávání nepředstavuje riziko pro volně žijící populace. Výsledky mohou přispět k ekotoxikologickému výzkumu a poskytnout cenné informace o kvalitě prostředí. Zároveň mohou být aplikovány na ochranu organismů i lidského zdraví a podpořit povědomí o dlouhodobém vlivu těžkých kovů na ekosystémy.

Díličími cíle této práce jsou:

Cíl 1 (C1): Zjistit, zda spolu korelují koncentrace různých těžkých kovů v krvi a trusu mlád'at sýkor. Hypotéza 1 (H1): Na rozdíl od krve, která odráží okamžitou expozici jedince těžkým kovům, trus reflektuje jejich dlouhodobou akumulaci a vylučování nadbytku z těla. Přímá korelace mezi těmito typy vzorků proto nebude pravděpodobně pozorována, avšak lze očekávat podobný trend vlivu těžkých kovů na kondice sýkor koňader bez ohledu na délku expozice.

C2: Srovnat dva metodické postupy v měření koncentrace těžkých kovů sýkor. H2: Předpokládáme, že mezi výsledky analýzy krevních vzorků odebraných na objemovou jednotku krve v tekuté formě a těch uchovávaných v ethanolu a standardizovaných na hmotnost vzorku nebudou výrazné rozdíly. Dle analytických principů detekce a kalibrace ICP-MS lze očekávat, že oba způsoby přípravy vzorků by měly poskytovat srovnatelné výsledky při stanovení koncentrací těžkých kovů, jelikož před samotnou analýzou procházejí všechny vzorky stejným procesem digesce (rozkladu) bez ohledu na jejich původní formu či množství.

C3: Zjistit vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry sýkor koňader. H3: Dá se očekávat, že vyšší míra kontaminace jedince těžkými kovy může způsobit fyziologický stres, což se projeví poruchami růstu a imunity, včetně snížení tělesné hmotnosti, velikosti běháku, křídel, a také změnami v hematologických parametrech, jako je zvýšený poměr heterofilů k lymfocytům.

C4: Porovnat míru kontaminace trusu mlád'at mezi znečištěnými a kontrolními lokalitami v ČR (Praha, Nymburk) a ve Finsku (Harjavalta). H4: Průmyslové emise a další antropogenní činnost mohou obecně vést ke zvýšeným koncentracím toxických látek v prostředí. Dá se proto očekávat, že úroveň kontaminace těžkými kovy bude vyšší v urbanizovaných a průmyslových oblastech oproti lokalitám vzdálenějším od zdrojů znečištění.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Těžké kovy

Těžké kovy představují skupinu kovů a metaloidů (polokovů) s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 , přičemž jejich přesná definice není jednotná a závisí na kontextu a zvyklosti v oboru. Například rozsah hustoty se pohybuje od více než $3,5 \text{ g/cm}^3$ do více než 7 g/cm^3 (Duffus 2002). Rovněž škála fyzikálních vlastností se liší od těch biologických a chemických. Mohou být také klasifikovány na základě Lewisovy teorie kyselin a zásad, protože kovové ionty se chovají jako Lewisovy kyseliny (akceptor elektronů v živých systémech). V rámci této práce je podstatná definice z hlediska ekotoxikologie, která uvádí kovy nejčastěji měď (Cu), zinek (Zn), kadmium (Cd), rtuť (Hg), olovo (Pb), chrom (Cr), nikl (Ni), mangan (Mn) a železo (Fe), i polokovy arsen (As) a selen (Se) a jejich sloučeniny jako potenciálně škodlivé pro životní prostředí. Tyto látky jsou charakterizované toxicitou, kterou souvisí s perzistencí v půdě, bioakumulativní povahou a biomagnifikací v potravních řetězcích (Ali a kol. 2019; Suedel a kol. 1994).

Podle významu a dopadu na fyziologické procesy lze dále rozlišit ve dvou kategoriích: esenciální (nepostradatelné) a neesenciální kovy. Pro organismy jsou esenciální kovy (např. Fe, Cu, Zn) v stopové množství nezbytné pro základních biologických funkcí; tvoří nezbytné proteinové kofaktory. Typickým příkladem je iont Fe v hemoglobinu. Naopak i malá přítomnost neesenciálních těžkých kovů (např. Cd, Pb, Hg) může představovat riziko akutního nebo chronického poškození významných orgánových soustav. Bez ohledu na to, zda je kov esenciální nebo neesenciální, vystavení jeho nadměrnému množství může mít závažné zdravotní důsledky.

3.2 Zdroje těžkých kovů

Těžké kovy se podle jejich zdrojů rozdělují na přirozené a antropogenní. Mnoho těžkých kovů je přirozeně zastoupeno v zemské kůře (Cu, Zn, Pb), kde jsou chemicky vázány do sloučenin oxidů, síranů a uhličitánů. Při geomorfologických procesů jako je eroze a zvětrávání hornin jsou uvolněny ve stopovém množství do pedosféry, hydrosféry a atmosféry. Na Zemi je přirozeně najdeme pouze v nízkých koncentracích, s pár výjimkami zejména vulkanické oblasti (Kabata-Pendias 2010; Dolenský 2023).

Od počátku antropogenní činnosti a industrializace se akumulace těžkých kovů mnohonásobně zvýšila. Jejich uvolňování probíhá především lidskou činností v technických a průmyslových odvětvích, např. při spalování uhlí pro energetické a hutnické účely, či při výrobě skla a cementu. Mezi další zdroje těžkých kovů v prostředí patří spalování odpadů a kalů z čistíren nebo výfukové plyny ze spalovacích motorů (Dolenský 2023).

V důsledku antropogenní činnosti dochází k nepřirozené akumulaci těžkých kovů v půdě, což vede k výrazné znečištění. To způsobuje negativní účinky na její úrodnost a problémy v zemědělství. Toxicita rizikových prvků souvisí se setrváním v půdě, které může trvat až tisíce let. Kumulace těžkých kovů v půdě má výrazný ekologický dopad, protože v orniční vrstvě probíhá

nejen intenzivní mikrobiální aktivita, a tím regulace rychlosti koloběhu prvků, ale i jejich vazba na primární produkty, kterými jsou zapojovány do potravinového řetězce (Richter 2004).

3.3 Zdravotní dopady těžkých kovů

Dříve zmíněny esenciální kovy jsou strukturně a funkčně důležité pro proteiny jako jsou enzymy s nimiž fungují jako kofaktory, což umožňuje zásadní metabolické procesy, syntézu biomolekul a udržení buněčné homeostázy. Hrají významnou roli pro udržení iontové rovnováhy v buňkách. Například kobalamin obsahující Co přispívá ke krvetvorbě a syntéze některých aminokyselin. Rostliny potřebují k růstu kořenů a tvorbu listů Zn, který podporuje syntézu auxinů (hormony stimulující růstu). Tyto prvky jsou obvykle vyžadovány ve stopovém množství míry 10-15 ppm a zařadí se mezi mikrobiogenní prvky (Raychaudhuri 2021), ačkoli jsou toxické, pokud koncentrace překročí prahovou hodnotu. Jak prokázal Paracelsus (1492-1541): „Všechny sloučeniny jsou jedy. Neexistuje sloučenina, která by jedním nebyla. Rozdíl mezi lékem a jedem tvoří dávku” (citováno v Patočka 2007).

Těžké kovy a jejich sloučeniny jsou do těla živočichů nejčastěji přijímány inhalací (vzduchem; absorbováno plicemi) či ingescí (ve vodě a v potravě; absorbováno gastrointestinálním traktem) (Bauerová 2020). Jejich toxicita závisí na několika faktorech, zahrnující dávky, způsob přijímání a chemického prvku. Dále hraje roli věk, pohlaví, genetika a nutriční stav jedinců vystavených těmto účinkům (Tchounwou a kol. 2012). Nebezpečí těchto prvků spočívá v jejich schopnosti vytvářet pevné vazby s funkčními skupinami biomolekul (karboxylové kyseliny, aminoskupiny nebo skupiny obsahující síru), což zabraňuje samovolnému vyloučení z těla. Po vstupu do organismu se toxické kovy váží většinou na proteiny, kde nahrazují původní esenciální kovy v jejich přirozených vazebných místech, čímž narušují buněčné funkce a mohou vést až k otravě (Järup 2003; Ali a kol. 2019). Tyto prvky mají také schopnost vytvářet vysoce reaktivní volné radikály (oxidativní stres), které vedou k dalšímu poškození buněk, jako je vyčerpání enzymové aktivity, poškození lipidové dvojvrstvy a samotné DNA, či mohou vést ke vzniku různých karcinomů (Flora a kol. 2008; Stohs a Bagchi 1995).

Ptáci představují významnou skupinu bioindikátorů kontaminace prostředí díky svému rozšířenému výskytu v různých ekosystémech a citlivosti na environmentální změny (Bauerová 2020; Eens a kol. 1999). Akumulované toxické látky v jejich tělech mají negativní vliv, ačkoliv nemusí být na první pohled patrné. Těžké kovy negativně ovlivňují jejich kondici (viz kap. 6) (Eeva a kol. 2012). Některé aspekty mohou být snížení reprodukční úspěšnosti (menší snůšky, deformace vajec), poškození vitálních orgánových systémů, a narušení funkce imunitního systému, což způsobuje autoimunitní reakce a zvyšuje náchylnost k infekčním chorobám. (Blanco a kol. 2004; Koivula a Eeva 2010; Eeva a kol. 2012; Snoeijis a kol. 2004). V případě ptáků byl zjištěn například zhoršený vývoj motorických a kognitivních schopností u mláďat racků stříbřitých (*Larus argentatus*), kterým bylo po vylíhnutí experimentálně dodáváno Pb (intraperitoneální aplikace acetátu Pb (Burger 1998; Burger a Gochfeld 1994).

3.4 Volně žijící ptáci jako bioindikátory kvality prostředí

V posledních desetiletích se volně žijící ptáci ukázali jako vhodné bioindikátory s potenciálem pro systematickou a nákladově efektivní detekci kvality životního prostředí.

Ve srovnání s jinými obratlovci (nejčastěji ryby, drobní savci jako jsou hlodavci a příp. obojživelníci) jsou zkoumány i z relativně pragmatických důvodů; za prvé již bylo shromážděno velké množství dat o ptačích populacích a za druhé jejich snadnější dostupnosti, například jejich přítomnost v širokém spektru ekosystémů včetně v antropogenních biotopů a jejich denní aktivity (Eens a kol. 1999; Bauerová a kol. 2020). Mnohé ptačí druhy jsou četné a široce rozšířené. Navíc jsou mnozí ptáci dlouhověcí, což umožňuje sledovat dlouhodobou akumulaci kontaminantů v jejich tělech. Pokud dojde k nárůstu koncentrace těžkých kovů nebo dalších stresů (např. pesticidy a patogeny), tak jsou cennými bioindikátory kvůli citlivosti a rychlé reakci na změny v prostředí v krátkém časovém horizontu (Snoeijs a kol. 2004; Blanco a kol. 2004; Koivula a Eeva 2010).

Ptáci se mohou pohybovat v rámci místních potravních oblastí, ale pokud jsou stěhovaví, mohou být využity k porovnání expozice v různých regionech (Pereira 2009). Ačkoli stěhovaví ptáci také mají nevýhody jako je nekonzistence vystavení kontaminantům při migraci mezi hnízdišti a zimovišti. To komplikuje analýzu a interpretaci dat, protože je nutné zohlednit migrační trasy, které mohou zasahovat celé kontinenty.

Výzkumy v oblasti ekotoxikologie se podle zájmu specializují na různé skupiny ptáků, které souvisejí nejen s biotopem výskytu, ale především potravními preferencemi. Nejvyšší kontaminace těžkými kovy obecně dosahují karnivorní druhy, nižší omnivorní a hmyzožravé druhy a nejnižší pak semenožravé druhy ptáků (Abbasi a kol. 2015). Například studie zaměřené na dravce (*Accipitriformes*) a sovy (*Strigiformes*) jsou početné, protože jako predátoři mají v potravním řetězci vrcholové místo, což asociuje s dlouhodobou akumulací těžkých kovů ve tkáních. Ptáci s vysokou mírou bioakumulace těžkých kovů jsou nejčastěji také vodní druhy, zejména rybožravé druhy obývající mořské ekosystémy. Pobřežní ptáci jsou dobrými bioindikátory, protože odhalují současnou expozici životního prostředí a poměrně rychle reagují na kontaminaci (O'Halloran a kol. 2003).

Poslední nejčastěji studovanou kategorií ptáků jsou typické všežravé druhy pěvců (*Passeriformes*) a také holubi (*Columbidae*). Detekce míry kontaminace těžkými kovy může u těchto druhů přitahovat větší pozornost veřejnosti, jelikož se běžně vyskytují v blízkosti člověka a jejich kontaminace může částečně vyvodit i zdravotní rizika z pohledu lidského zdraví (Bauerová 2020). Z tohoto důvodu jsou ve výzkumech (Sánchez-Virosta a kol. 2015; Janssens a kol. 2002; Bauerová a kol. 2020; Bauerová 2020; Geens 2010) využívány především synantropní druhy živočichů, což jsou druhy, které jsou vázány na blízkost člověka a jeho obydlí. Převážná většina dosavadních studií se ovšem zaměřila spíše na kontaminaci těžkými kovy u ptáků žijících v bezprostřední blízkosti průmyslových zdrojů znečištění (kovohutě a různé metalurgické závody) (Bauerová 2020).

Mnoho studií o koncentracích těžkých kovů u pěvců bylo provedeno u sýkory koňadry (*Parus major*), následovaná lejskem černohlavým (*Ficedula hypoleuca*) (Sánchez-Virosta a kol. 2015) a kosem černým (*Turdus merula*).



Obrázek 1: Sýkora koňadra (*Parus major*). Foto: Natalie Salem

3.5 Typy biologických vzorků u ptáků

Nejčastěji používané typy odběru biologických vzorků pro detekci míry kontaminace těžkými kovy u ptáků zahrnují odběr krve, trusu a peří. Zároveň je důležité zvážit použití co nejméně invazivní (destruktivní) metody, zejména při práci s drobnými pěvci.

Krev představuje jeden z běžně analyzovaných biologických materiálů pro stanovení aktuální expozice těžkým kovům, protože reflektuje jejich přítomnost v krevním oběhu v době odběru. Její využití však není tak časté jako u jiných vzorků, například peří nebo trusu, které umožňují posoudit dlouhodobější akumulaci a vylučování těchto látek z těla (Sánchez-Virosta a kol. 2015). Krev je zásadním biologickým materiálem pro fyziologické procesy obratlovců. Umožňuje transport dýchacích plynů mezi tkáněmi, přenáší živiny, hormony, lipidy a minerály a podílí se na udržování homeostázy. Obsahuje také buňky imunitního systému, které zajišťují obranu organismu proti patogenům. Vzhledem k tomu, že reflektuje aktuální stav vnitřního prostředí organismu, její kontaminace odráží tedy okamžitou expozici těžkým kovům (Geens a kol. 2010; Scheifler a kol. 2006). Při stanovení kontaminace těžkých kovů z krve nebo jiných vnitřních tkání jako monitorovacích jednotek je nezbytné porovnávat údaje podle populace stejného druhu na různých lokalitách, jelikož mohou existovat mezidruhové rozdíly v parametrech ukládání těžkých kovů, které znesnadňují srovnání mezi různými druhy. Ve většině publikovaných studií bylo pro úspěšnou chemickou analýzu nutné alespoň 5 μ L krve, kvůli omezené citlivosti detekčních přístrojů. Potřebné množství je ovšem silně závislé na konkrétně zvolené metodě analýzy kovů (Hraniček, in verb. 2023). Zvláště u drobných druhů je důležité opatrně získat minimální objem krve tak, aby nedošlo k ublížení nebo ohrožení zdraví ptáka.

Peří je vhodné pro dlouhodobé studium, a to díky snadnější dostupnosti vzorků a možnosti pozorovat po delší dobu. Bylo zdokumentováno, že těžké kovy usazené v ocasních (rýdovacích) perrech odrážejí hladiny v klíčových vnitřních tkáních vyplývající z dlouhodobé

akumulace (Janssens a kol. 2002). Bauerová (2020) vysvětluje, že tato depozice ovšem probíhá pouze v období růstu per (tj. během přepeřování po dobu cca 3 týdny). Navíc bylo prokázáno, že těžké kovy se do peří ukládají během jeho růstu a následně v něm zůstávají stabilně uchovány, což umožňuje zpětnou rekonstrukci expozice jedince během pelichání (Dauwe a kol. 2003). Z těchto důvodů obsah těžkých kovů v peří nemusí odpovídat jejich koncentraci v krvi.

Vejce mohou sloužit jako významný biologický materiál, protože mohou odrážet expozici matky v období tvorby skořápky a vaječného obsahu, což je podloženo zjištěným, že samice mohou vylučovat některé stopkové prvky do vajec před snůškou (Donaldson a Braune 1999). Vejce jsou dobrým indikátorem místní expozice, protože většina ptáků v tropických a mírných oblastech tráví mnoho týdnů na hnízdištích, než nakladou vajíčka, a získávají tak dostatečné zdroje (a tím i těžké kovy) lokálně k produkci vajec (Burger 2002). Nevýhodou je invazivnost (vyžaduje usmrcení embrya) a reprezentují pouze jeden krátký úsek životních stadia ptáků.

Další způsob zjištění míry kontaminace těžkých kovů je analýza trusu, která není invazivní, je obecně spolehlivá a koreluje se vzorky peří; tedy neodráží aktuální stav jednice, ale dlouhodobou akumulaci a jejich nadmíra je vyloučena z těla (Belskii a Grebennikov 2014; Eeva a kol. 2012; Ruiz a kol. 2016). Analýzy trusu jako neinvazivně získávaného biologického materiálu jsou široce využity v mnoho dalších oblastech jako je např. studie mikrobioty, genetiky a imunitní reakce. Nevýhodou je, že detekovaná míra kontaminace nesouvisí pouze s bioakumulací v těle ptáků, ale může být ovlivněna i kvalitou a dostupností potravy na dané lokalitě (Eeva a kol. 2003; Ruiz a kol. 2017). Jiné aspekty mohou být např. potravní preference a deficit vápníku v prostředí (Eeva a kol. 2012).

3.6 Vliv těžkých kovů na kondiční parametry ptáků

Rizikové prvky mohou v organismech vyvolávat nepříznivé fyziologické účinky, a to i při nízkých, neletálních koncentracích. Kontaminace těžkými kovy nemusí být na první pohled patrná, neboť jedinci při nízkých hladinách těžkých kovů většinou neprojevují žádné vnější známky jakékoli otravy (Bauerová et al. 2017).

Tělesná hmotnost, délka běháku a délka křídel odrážejí zdravotní stav a růst ptáků a jsou také ukazatelem přežití a reprodukčního úspěchu (Tinbergen a Boerlijst 1990). Indikátorem dopadu škodlivých kovů (jako jsou Cd, Cu, Pb, Hg, Se a Ni) na kondiční stav ptáků může být snížení tělesné hmotnosti a poruchy růstu a narušení metabolických procesů. Zejména Pb, Cd a Cu také přímo mění antioxidační kapacitu (Geens a kol. 2009), imunitu a zdraví volně žijících ptáků (Blanco a kol. 2004; Fair a Myers 2002; Geens a kol. 2010; Snoeijs a kol. 2004). Ots a kol. (1998) vysvětluje, že některé hematologické parametry, jako je hematokrit nebo koncentrace hemoglobinu, indikují kapacitu přenosu kyslíku v krvi, zatímco jiné, například poměr heterofilů k lymfocytům, mohou odrážet stav imunitního systému nebo fyziologickou reakci na stres.

Je známo, že některé těžké kovy, jako Cd a Pb, mohou snižovat střední korpuskulární objem erytrocytů (MCV), hematokrit (HCT) a koncentraci hemoglobinu (Hb), což může negativně ovlivnit okysličování tkání (Geens a kol. 2010). Změny hematologických parametrů souvisejících s erytrocyty vyvolané těžkými kovy (hematokrit, počet erytrocytů a obsah

hemoglobinu) odrážejí anémii způsobenou intoxikací (Geens a kol. 2010; Papanikolaou 2005). Při vyšší míry kontaminace toxických kovů může dojít k poruchám tvorby leukocytů, které hrají roli ve funkci imunitního systému. Tento stav se může projevit zvýšeným poměrem heterofilů k lymfocytům (H/L ratio), což je zároveň indikátorem stresové odpovědi organismu (Krajsingrová 2019). Dlouhodobé změny v těchto parametrech mohou vést k alergickým a autoimunitním reakcím a zvýšené náchylnosti k infekčním chorobám (Černá 2019).

4 METODIKA

4.1 Modelový druh: Sýkora koňadra (*Parus major*)

Sýkora koňadra (*Parus major*) je pěvec z čeledi sýkorovitých, největší a nejrozšířenější druh sýkory v Evropě. Původně obývala především listnaté lesy, avšak dnes se běžně vyskytuje také v parcích, zahradách a dalších plochách v blízkosti člověka. Spolu se sýkorou modřinkou (*Cyanistes caeruleus*) jsou často využívané druhy pro výzkum akumulace těžkých kovů v tělech živočichů díky jejich přítomnosti v různých prostředích, tendenci setrávat v jedné oblasti a ochotě hnízdit v budkách vytvořených člověkem. Hnízdící populace tak mohou být rychle založeny a snadno monitorovány v téměř jakékoli oblasti zájmu (Eens a kol. 1999). Vzhledem k tomu, že sýkory koňadry představují všežravé druhy krmící svá mláďata hmyzem (Cramp a kol. 1993), lze akumulaci těžkých kovů v jejich tělech vysvětlit vyšším příjmem prostřednictvím stravy bohaté na kovy (jmenovitě housenky, pavouci nebo brouci) (Fritsch a kol. 2012; Heikens a kol. 2001).



Obrázek 2: Sýkora koňadra (*Parus major*) během kroužkování. Foto: Natalie Salem

4.2 Výzkumné lokality

Tato práce srovnává volně žijící populace sýkory koňadry hnízdících na dvou lokalitách v České republice a Finsku. Jednotlivé lokality byly vybrány na základě předpokládané úrovně znečištění těžkými kovy. Sběr dat a vzorků byl proveden během období hnízdění od března do srpna 2022. Terénní část práce, kterou jsem prováděla, probíhala v České republice. Jako znečištěná lokalita byly vybrány pražské městské lesy Čimický háj (50.1289058°N, 14.4375833°E) a Ďáblický háj (50.1353294°N, 14.4659506°E), které se nacházejí v hustě obydlené oblasti hlavního města, a proto jsou pravděpodobně vystaveny vyšší úrovni antropogenního znečištění. Jako kontrolní lokalita byl zvolen les v nymburské obci Jizbice, kde sběr dat probíhal v okolí Stračího potoka (50.2576808°N, 14.9938525°E). Výzkum byl součástí širší mezinárodní spolupráce, a proto byly kromě českých lokalit do práce zahrnuty také vzorky sýkor koňader pocházející z finského města Harjavalta. Odběr těchto vzorků byl proveden finským týmem z Univerzity v Turku, kde se ekotoxikologii dlouhodobě věnují Lyydia Leino, M.Sc. a doc. Tapio Eeva, Ph.D. Pro Finsko byla zvolená znečištěná lokalita městská část

Harjavalty, která se nachází v blízkosti hutního průmyslu zaměřeného na zpracování mědi a niklu, a je proto předpokládána vyšší environmentální expozice těžkým kovům. Kontrolní lokalita byla venkovská oblast Harjavalty, vzdálené od přímého vlivu průmyslových emisí. Vzorky byly odebírány v rámci těchto lokalit v rozmezí přibližně 61.3067–61.3282°N, 22.0977–22.1445°E pro znečištěnou lokalitu a 61.2397–61.3649°N, 21.9407–22.2386°E pro kontrolní lokalitu.

4.3 Sběr dat v terénu

Během raného období hnízdění v březnu bylo nutné náhodně najít a zaznamenat veškeré budky v lokalitách, které obsahovaly hnízdní základy nebo případně hotovou kotlinku. Hnízda byla pravidelně kontrolována od začátku období hnízdění, aby se získaly údaje o odhadnutém datu vylíhnutí, velikosti snůšky, počtu a růstu vylíhnutých mláďat. V terénu byly zaznamenány také budky obsazené jinými druhy, jako jsou sýkora modřinka, brhlík lesní (*Sitta europaea*) a pravděpodobně i plch velký (*Glis glis*). Proto bylo nejprve důležité při opakovaných návštěvách identifikovat, které budky byly úspěšně osídleny pouze sýkorami koňadrami. Hnízda tohoto druhu jsou charakteristická svou stavbou z mechu, trávy, kořínků, lišejníků a jsou vystlaná rostlinným chmýřím, srstí a někdy peřím. Tímto způsobem byly vyloučeny budky obsazené jinými druhy, jako je brhlík lesní, jejichž hnízdo obsahuje úlomky kůry a jejichž budka má často otvor zúžený směsí bláta a slin. Obtížnější bylo rozlišit hnízda sýkor modřinek, jelikož stavební materiál hnízda je podobný. Ve většině případů bylo možné druhy rozlišit podle samiček, které seděly v budkách. Pokud však samičky přítomné nebyly, identifikace druhu se prováděla na základě rozdílů ve velikosti a vzhledu vajíček, který popisuje Hudec a kol. (2005). Vajíčka obou druhů sýkor jsou bílá a červenohnědě skvrnitá, ale mírně se liší ve velikosti a počtu ve snůškách. Snůšky sýkor koňader obvykle obsahují 8-12 vajíček o rozměrech 17,6 × 13,4 mm. Snůšky sýkor modřinky jsou v porovnání s koňadrami většinou početnější a obsahují 9-13 menších vajíček o rozměrech 15,5 × 11,9 mm (Hudec a kol., 2005). Dalším důvodem vyloučení některých zkoumaných budek byla predace plchem velkým a strakapoudem velkým (*Dendrocopos major*). Figura (2013) popisuje, že úspěšnost hnízdění a úmrtnost jsou značně ovlivněny především predací a počasím.



Obrázek 3: Vlevo ptačí budka určená k monitorování hnízdění dutinových pěvců, včetně sýkory koňadry. Vpravo kontrola snůšky sýkory koňadry v terénu. Foto: Natalie Salem.

Ze všech lokalit bylo zkoumáno celkem 56 úspěšně obsazených budek a byla nasbírána data od celkem 260 jedinců. Z toho pocházelo 25 hnízd a 202 mlád'at z Česka a 31 hnízd a 58 jedinců z Finska. Z českých lokalit bylo pro chemickou analýzu těžkých kovů využito 13 hnízd ze znečištěné lokality (Praha) a 12 hnízd z kontrolní lokality (Nymburk). Výzkum probíhal na základě povolení č. MZP/2019/630/1778. Odběry krve byly provedeny mým vedoucím práce, doc. RNDr. Michalem Vinklerem, Ph.D., a Mgr. Kateřinou Markovou, v souladu s etickými předpisy pro práci s volně žijícími zvířaty. Odchycení ptáci byli mezitím umístěni do látkových ornitologických sáčků určených pro krátkodobé uchovávání ptáků během manipulace. Jedincům ve věku 7–16 dní byly odebrány vzorky krve a trusu a byli okroužkováni pro účely identifikace standardním ocelovým kroužkem Kroužkovací stanice Národního muzea v Praze.

Pro každý odběr krve byla vždy použita nová sterilní injekční stříkačka o objemu 500 μ l. Před odběrem byla stříkačka vypláchnuta antikoagulantem heparinem. 70 μ l krve bylo odebráno z jářmové žíly (*vena jugularis*) pomocí jemného tlaku tenkou jehlou. Proces trval pouze několik sekund. Dále byla mlád'ata morfometricky měřena na délku běháku a křídla pomocí digitálního posuvného měřítka (přesnost na 0,01 mm; Kinex, Praha, Česká republika) a zvážena pomocí digitální váhy (přesnost 0,02 g; Pesola AG, Baar, Švýcarsko, typ PPS200). Ptáci byli po pečlivém měření veškerých údajů vráceni do hnízda, přičemž doba manipulace nepřesáhla 30 minut.



Obrázek 4: Měření hmotnosti mláděte sýkory koňadry pomocí digitální váhy v terénu. Foto: Natalie Salem.

Pro každý vzorek krve jedince byly provedeny následující kroky:

Z injekční stříkačky byla nanесena jedna kapka krve (2–3 μ l) na dva sklíčka, ze kterých byly připraveny krevní nátěry. Druhé sklíčko bylo použito pro každého jedince jako záloha. Barvení a vyšetření krevních nátěrů probíhalo později v laboratoři. Zbytek krve byl rozdělen do dvou vzorků. Jedna část krve (50 μ l) byla nanесena do prázdné, suché, sterilní kryozkumavky o objemu 1,5 ml jako vzorek čisté krve. Druhá část krve (30 μ l) byla nanесena do mikrozkuhavky se šroubovacím víčkem o objemu 1,5 ml obsahující 96% ethanol, aby byl získán suchý vzorek v ethanolu.



Obrázek 5: Příprava krevních nátěrů v terénu během sběru dat. Foto: Natalie Salem.

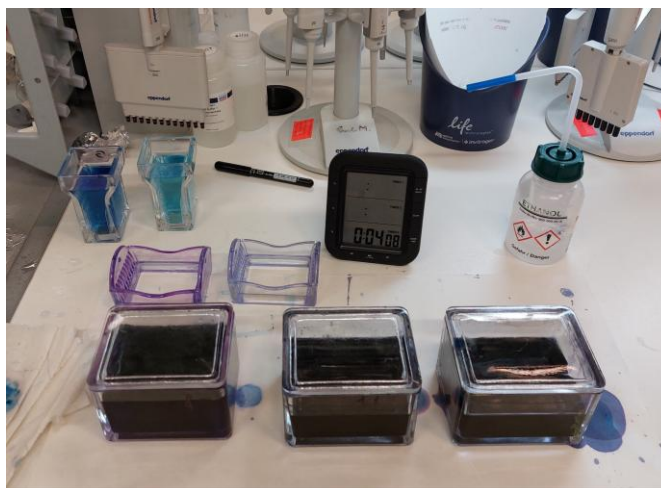
Mláďata z hnízd byla dočasně umístěna do přepravky s čistým filtračním papírem, kde se vyloučený trus mohl sbírat. Pro každé hnízdo byla použita větší sterilní zkumavka, do které byl trus všech mláďat umístěn pomocí sterilní pinzety. Veškeré vzorky ve zkumavkách byly následně umístěny do transportní chladničky a uchovány do doby, než bylo možné je přesunout do ledničky.

Stejně probíhal sběr dat a vzorků ve Finsku na lokalitách v Harjavalte, kde tým z Univerzity v Turku odebíral trus a krev. Krevní vzorky z Finska však nebyly využity pro analýzu těžkých kovů, ale byly k dispozici pro hematologické analýzy krevních nátěrů. Trus z finských lokalit byl stejně jako trus z českých lokalit později využit pro analýzu těžkých kovů.

4.4 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů

Pro mikroskopické vyšetření diferenciální rozpočtu leukocytů byly krevní nátěry nejdříve barveny panoptickou metodou podle Pappenheima. Nejprve byl k přípravě barvicíh lázní navážen 0,75 g práškového May-Grünwaldova barviva, které bylo záhy rozmícháno v kádince na míchadle ve 300 ml methanolu. Dále bylo provedeno ředění 5 ml Giemsa v 200 ml destilované vody. Těsně před barvením byla část rozmíchaného roztoku May-Grünwald naředěna v poměru 1:1 s destilovanou vodou (na 200 ml).

Krevní nátěr byl nejprve fixován po dobu 3 minut v koncentrovaném roztoku May-Grünwald. Následně byl nátěr barven zředěným roztokem May-Grünwald v destilované vodě (v poměru 1:1) po dobu 2 minut. Poté následovalo barvení naředěným roztokem barviva Giemsa po dobu 15 minut. Po ukončení barvení byly sklíčka přenesena do kyvety s destilovanou vodou, kde byly postupně vyjímány a důkladně oplachovány stříčkou s destilovanou vodou, aby bylo odstraněno přebytečné barvivo.



Obrázek 6: Barvení krevních nátěrů panoptickou metodou podle Pappenheima. Foto: Natalie Salem.

Každý nátěr byl analyzován pod mikroskopem CX-41 (Olympus, Tokyo, Japan) při celkovém zvětšení 1000x (objektiv 100×, okulár 10×). V celkovém vzorku přibližně 100 leukocytů na nátěr byly manuálně spočítány frekvence lymfocytů, heterofilů, eosinofilů, bazofilů a monocytů. Jednotlivé leukocyty bylo možné identifikovat podle metodiky Lucase a Jamroze (1961), která popisuje krevní elementy u slepic, díky morfologické podobnosti v hematologii ptáků. Vzhledem k tomu, že heterofily a lymfocyty byly nejhojnějšími typy leukocytů, byl poměr H/L vypočítán jako míra dlouhodobého fyziologického stresu (Davis a kol. 2008).

Pro ověření konzistence výsledků opakovaného počítání diferenciálního rozpočtu leukocytů u stejných jedinců byla vyhodnocena opakovatelnost (repeatability) hematologických analýz pomocí statistiky v jazyce R prostřednictvím RStudio (R verze 4.1.1, 2021 The R Foundation for Statistical Computing). Hodnoty opakovatelnosti pro jednotlivé typy leukocytů byly následující: lymfocyty = 0,765, heterofily = 0,809, bazofily = 0,339, eosinofily = 0,573 a monocyty = 0,743. Vyšší hodnoty odrážejí vyšší míru shody mezi opakovanými počítáními u stejného jedince, což potvrzuje spolehlivost metody. Naopak nižší opakovatelnost u bazofilů (0,339) a eosinofilů (0,573) může souviset s jejich zřídčným výskytem v krevním obrazu, což může vést k vyšší variabilitě mezi jednotlivými počítáními. Jako úvodní statistický výpočet byla dále testována repeatabilita hematologických a kondičních parametrů v rámci stejného hnízda. Přehled hodnot pro jednotlivé parametry je uveden v Příloze 2.

4.5 Stanovení koncentrace těžkých kovů pomocí metodou ICP-MS

4.5.1 Příprava vzorků

Před analýzou byly všechny vzorky čisté krve a krve uchovávané v ethanolu vysušeny v laboratorním laminárním boxu. U vzorků v ethanolu se při tomto procesu zároveň odpařil zbývající ethanol. Následně byly vzorky zváženy na analytických vahách (přesnost na 0,01 mg; Sartorius, Goettingen, Německo, typ R160P), přičemž byla nejprve změřena hmotnost zkumavky s krví a hmotnost prázdné zkumavky, aby byla stanovena skutečná hmotnost vzorku. Hmotnost vzorků čisté krve se pohybovala mezi přibližně 0,016 mg a 0,028 mg, zatímco krve v ethanolu mezi 0,005 mg a 0,053 mg. Vzhledem k omezené citlivosti přístrojů a malému

objemu vzorku, který bylo možné odebrat od jednotlivých mláďat, byly krevní vzorky kombinovány z jedinců v rámci stejného hnízda, aby bylo zajištěno dostatečné množství pro úspěšnou chemickou analýzu.

Vzorky krve z každého hnízda byly umístěny do teflonových patron pro následnou digesti pomocí tlakového mikrovlnného rozkladného zařízení Speedwave Xpert (Berghof Instruments GmbH, Tübingen, Německo). Před rozkladem byly vzorky ředěny přidáním směsi 1,5 ml koncentrované kyseliny dusičné (HNO_3), 1,5 ml peroxidu vodíku (H_2O_2) a 3,5 ml deionizované vody. Stejným procesem prošly i prázdné teflonové patrony, označované jako blanky, aby bylo zajištěno monitorování procesu digestce a přesnost analýzy. Na každou sadu vzorků byla použita jedna prázdná patrona, do které byly přidány stejné reagenty (HNO_3 , H_2O_2 , deionizovaná voda) jako do patron obsahujících krevní vzorky.

Cílem mikrovlnného rozkladu bylo převést vzorky na homogenní směs, která je vhodná pro následnou chemickou analýzu. Rozklad probíhal za použití přednastavené metody „BLOOD“, optimalizované pro krevní vzorky. Proces začal zahřátím na 160 °C s náběhem (ramp) 10 minut a výdrží 5 minut při tlaku 30 bar a výkonu 50 %. Poté byla teplota zvýšena na 190 °C s náběhem 2 minuty a výdrží 10 minut při tlaku 30 bar a výkonu 60 %. V poslední fázi byly vzorky ochlazeny na 50 °C při tlaku v rozmezí 25–40 bar. Po dokončení digestce byly homogenní vzorky přeneseny z teflonových patron do centrifugačních zkumavek VWR® Ultra-High Performance o objemu 15 ml (VWR International, Radnor, USA), do kterých byla přidána deionizovaná voda pomocí stříkačky, dokud objem vzorku nedosáhl 10 ml, což zajistilo požadovanou koncentraci pro analýzu.



Obrázek 7: Vlevo tlakové mikrovlnné rozkladné zařízení Speedwave Xpert použité pro digestci vzorků. Vpravo ředění vzorků po digestci pro následnou analýzu metodou ICP-MS. Foto: Natalie Salem.

Příprava všech fekálních vzorků k analýze těžkých kovů byla provedena v laboratoři SACE na Univerzitě Murcia (SACE = Servicio de Apoyo a las Ciencias experimentales) v únoru 2024. Analyzovány byly vzorky z českých (Praha, Nymburk) a finských lokalit (venkovská a městská oblast Harjavalta). Stejně jako v případě krevních vzorků byly fekální vzorky podrobeny mikrovlnné digestci, avšak s mírně odlišným složením reagentů a laboratorním postupem přizpůsobeným pro trus.

Vzorky byly umístěny do uzavřených teflonových PFA patron za použití 4,5 ml koncentrované kyseliny dusičné (HNO_3 , 69 %) a 1 ml peroxidu vodíku (H_2O_2 , 30 %). Digesce probíhala v mikrovlnném systému (Milestone, Model Ultrawave) při teplotě 220 °C po dobu 20 minut. Po dokončení rozkladu a ochlazení byly vzorky zředěny 10 ml destilované a deionizované vody (Milli-Q), aby bylo dosaženo požadované koncentrace pro následnou analýzu ICP-MS. Data z této analýzy byla poskytnuta pro tuto práci.

4.5.2 Metoda ICP-MS

Pro analýzu těžkých kovů byla použita hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS) pomocí přístroje Agilent 7900 ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). ICP-MS je analytická spektrální technika kombinující ICP (Inductively Coupled Plasma – indukčně vázaná plazma) jako zdroj kladně nabitých částic (např. Na^+ , Pb^{2+}) a hmotnostní spektrometrii (MS – Mass Spectrometry), která tyto částice detekuje (Mihaljevič 2004). Mezi přednosti metody ICP-MS patří zejména vysoká citlivost, široký lineární dynamický rozsah a možnost víceprvkového stanovení. Další předností je i možnost měření izotopových poměrů (Městek a kol. 1997). Mihaljevič a kol. (2004) zdůrazňují, že metoda ICP-MS umožnila nebyvalý pokrok v prvkové a izotopové analýze materiálů, přírodnin, tkání a tělních tekutin.

Mezi základní části přístroje patří zmlžovač, mlžná komora, plazmový výboj a detektor. Roztok vzorku byl nejprve zmlžen pomocí koncentrického zmlžovače MicroMist ve tvaru písmene T, který byl napojen na Scottovu mlžnou komoru a následně veden do plazmové hlavice. Plazma z inertního plynu (argon) při teplotě až 10 000 K (většinou však 7000–8000 K) je schopna ionizovat většinu prvků (Mihaljevič a kol. 2004). Ionty byly poté převedeny do hmotnostní spektrometru, kde byly odděleny na základě poměru m/z (m = hmotnost, z = náboje), což umožňuje identifikaci jednotlivých prvků. Detektor zaznamenával množství iontů pro každý poměr hmotnosti k náboji a převáděl jej na elektrický signál, který byl následně zpracováván pro kvantifikaci prvků.

Přístroj je během několika sekund schopný změřit koncentrace široké škály prvků, která je dána počtem prvků v kalibračním roztoku (Mihaljevič a kol. 2004). Ke kalibraci byla použita metoda vnějších standardů s koncentracemi 0,00 (kalibrační blank), 0,008; 0,04; 0,2; 1,0 a 5,0 mg/L. Pro zajištění přesnosti měření byl při úvodních experimentech analyzován certifikovaný referenční materiál (CRM) BCR-185R Bovine Liver (trace elements; Joint Research Centre, Evropská komise, Belgie), avšak CRM specifický pro krevní vzorky nebyl použit. Limit detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly stanoveny na základě změřených blanků a kalibračních roztoků a vyjádřeny formou BEC (koncentrace ekvivalentní pozadí). Tento parametr popisuje citlivost přístroje a je definován jako koncentrace prvku ve vzorku, která produkuje signál ekvivalentní signálu produkovanému pozadím přístroje. Skutečný detekční limit odpovídá konkrétním analytickým podmínkám a může být vyšší než ideální přístrojový detekční limit (Hraníček, in verb. 2023).

Výsledky byly vyjádřeny jako množství kovu na gram suché váhy, kde makroprvky (Ca, Fe, Zn) byly udávány v mg/g, zatímco stopové a toxické prvky (Cr, Ni, Cu, As, Cd, Pb) v $\mu\text{g/g}$, v souladu s jejich běžnými koncentracemi v biologických vzorcích. Naměřené koncentrace v

mg/L byly následně přepočítány na hmotnost vzorku odebraného k rozkladu a následnému ředění.

Pro zajištění spolehlivosti měření byl do každého vzorku přidán roztok obsahující inertní standardy v koncentraci 0,05 mg/L, konkrétně skandium (Sc, m/z 45), yttrium (Y, m/z 89), indium (In, m/z 115, 118) a bismut (Bi, m/z 209). Analýza byla provedena na následujících izotopech: Ca (m/z 43, 44), Cr (m/z 52), Fe (m/z 56), Ni (m/z 60), Cu (m/z 63), Zn (m/z 66), As (m/z 75, 77, 82), Cd (m/z 106, 108, 111) a Pb (m/z 206, 207, 208). Měření bylo provedeno v módu „No Gas“ pro všechny analyzované prvky, tedy bez použití kolizního nebo reakčního plynu. Laboratorní analýza těžkých kovů byla provedena pod dohledem konzultanta RNDr. Jakuba Hraníčka, Ph.D., z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK, který poskytl metodické vedení při laboratorních postupech.

Data pro fekální vzorky z českých a finských lokalit byla získána metodou ICP-MS v laboratoři SACE na Univerzitě Murcia a poskytnuta pro tuto práci. K jejich analýze byla použita mírně upravená metoda stanovení koncentrace těžkých kovů pomocí přístroje Agilent 7900 ICP-MS. Ke kalibraci měření byla použita víceprvková standardní roztoková směs (Certipur, Merck). Pro zajištění přesnosti a detekce možné kontaminace byly také analyzovány dvě kontrolní patrony (blanky) obsahující pouze reagenty. Přesnost měření byla dále ověřena prostřednictvím analýzy certifikovaného referenčního materiálu (ICP multi-element standard solution IV Certipur de Merck, Mercury ICP standard Certipur Merck a Initial Calibration Verification Standard de Agilent Technologies).



Obrázek 8: Přístroj Agilent 7900 ICP-MS použitý pro analýzu koncentrace těžkých kovů metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS). Foto: Natalie Salem.

4.6 Statistické zpracování dat

Statistické analýzy byly provedeny v jazyce R pomocí programu RStudio (R verze 4.1.1, 2021 The R Foundation for Statistical Computing). Opakovatelnost (repeatabilita) byla vyhodnocena pomocí funkce rptGaussian v balíčku rptR (Stoffel et al. 2017). Ověření opakovatelnosti hematologických analýz již bylo uvedeno v metodické kapitole 4.3. Repeatabilita byla dále

aplikována pro hodnocení podobnosti hematologických a kondičních parametrů mezi jedinci v rámci stejného hnízda. Výpočet zahrnoval procentuální zastoupení vybraných leukocytů (lymfocyty, heterofily, basofily, monocyty) a H/L poměr, dále kondiční znaky (tělesná hmotnost, délka křídel a délka běháku). Pro ověření vztahů mezi jednotlivými hematologickými parametry byla provedena korelační analýza. Normalita rozdělení dat byla testována pomocí Shapiro-Wilkova testu (`shapiro.test`) a v případě nenormálního rozdělení byl zvolen neparametrický Spearmanův korelační koeficient (`cor.test` s metodou `spearman`). Vizualizace byla provedena pomocí grafické korelační matice (`corrplot`, Wei and Simko 2024). Stejným způsobem byla testována i korelace mezi věkem mláďat z pražských lokalit a jejich kondičními parametry jako úvodní krok pro následné lineární modely.

Pro zjištění, zda spolu korelují koncentrace různých těžkých kovů v krvi a trusu byl také použit Spearmanův korelační koeficient, protože hodnoty koncentrací nevykazovaly normální rozdělení (ověřeno pomocí histogramů), což vylučovalo možnost použití Pearsonovy korelace. Korelace byla stanovena pro Ca, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd a Pb. Pro celkové zhodnocení vztahů mezi koncentracemi byla dále vytvořená korelační matice (`cor` v jazyce R), na jejímž základě byly pro další analýzy vybrány pouze prvky Fe, Ni, Pb, Ca a Cd. Vizualizace korelace mezi jednotlivými kovy byla znázorněna pomocí bodových grafů (`dotplot` z `ggplot`, Wickham 2016) a vztahů mezi všemi kovy byla provedena pomocí grafické korelační matice z balíčku `corrplot`.

Stejným postupem jako při analýze korelací těžkých kovů mezi krví a trusem byl Spearmanův korelační koeficient použit i pro porovnávání koncentrací těžkých kovů mezi vzorky krve odebraným na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry), která byla standardizovaná na hmotnost. Pro celkové zhodnocení vztahů mezi jednotlivými prvky v krvi a výběru prvků vhodných pro analýzy byla vytvořena další korelační matice. Vizualizace byla opět stejně provedena stejným způsobem: Bodové grafy (`dotplot`) znázornily jednotlivé vztahy mezi kovy v jedné metodě vzorků krve (wet nebo dry) a grafická korelační matice (`corrplot`) zobrazovala celkové vztahy mezi všemi kovy v obou metodách. Kromě těžkých kovů byla provedena i korelace mezi hmotností, délkou tarsu a délkou křídel. Normalita těchto proměnných byla opět ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu a následně byl použit Spearmanův test (v případě nenormálního rozdělení). Výsledky byly vizualizovány pomocí `dotplotů`.

Pro analýzu vlivu kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry byly použity lineární modely (`lm`). Výběr vysvětlujících proměnných pro model byl proveden na základě předchozí korelační analýzy (Fe, Ni, Pb, Ca a Cd). Před samotnou analýzou byl nejprve ověřen předpoklad normálního rozdělení vysvětlovaných proměnných pomocí Shapiro-Wilkova testu. V případě, že data nevykazovala normální rozdělení, byla provedena Tukeyho transformace z balíčku `rcompanion` (Mangiafico 2024) pro proměnné (Ni) nebo zlogaritmování pro ostatní vysvětlované proměnné (Fe, Ni, Pb, Ca a Pd). Modely byly posuzovány pomocí funkce `summary` (`lm`), který poskytl stupně volnosti (df), F-hodnotu modelu a P-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných. Hodnota hladiny významnosti byla pro všechny testy stanovena jednotně na $\alpha = 0,05$. Vizualizace byla provedena pomocí `boxploty` (`ggplot`,

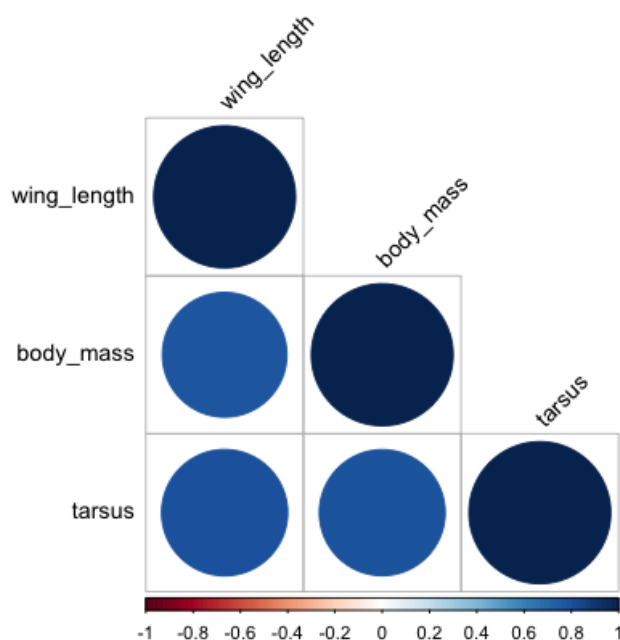
Wickham 2016) pro porovnání mezi lokalitami a pomocí regresního vizualizace (visreg, Breheny a Burchett 2017) pro zobrazení vztahů mezi jednotlivými proměnnými. Regresní vizualizace zobrazovaly adjustované (vycentrované) hodnoty.

Závislosti hmotnosti, délky běháku a délky křídel na věku mlád'at byla analyzována na základě z tří samostatných lineárních modelů (lm). Modely zahrnovaly věk mlád'at jako vysvětlující proměnnou a jednotlivé kondiční parametry jako závislé proměnné. Před analýzou byla opět ověřena normalita dat a případně aplikována Tukeyho nebo logaritmická transformace. Výsledky byly shrnuty pomocí summary (lm) a vizualizovány pomocí dotplotů.

K porovnání míry kontaminace těžkými kovy mezi znečištěnými a kontrolními lokalitami ve ČR (Praha, Nymburk) a Finsku (Harjavalta) byla analýza provedena pomocí summary lineárních modelů (lm). Vysvětlovanými proměnnými byly koncentrace těžkých kovů (Pb, Fe, Ca, Cd, Ni), zatímco vysvětlujícími proměnnými byly věk mlád'at, země sběru vzorků (Česká republika vs. Finsko), typ oblasti (kontrolní vs. znečištěná) a případně stupeň urbanizace. Před analýzou byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. U vysvětlovaných proměnných (koncentrace těžkých kovů), byla aplikována transformace v případě, nevykazovaly normální rozdělení. Pro prvky Pb, Fe, Ca, Cd byla použita logaritmická transformace, zatímco pro prvek Ni Tukeyho transformace. Vizualizace výsledků byla provedena pomocí boxplotů pro porovnávání mezi lokalitami a regresních vizualizací pro zobrazení vztahu mezi lokalitou (věk, stát, stupeň urbanizace).

5 VÝSLEDKY

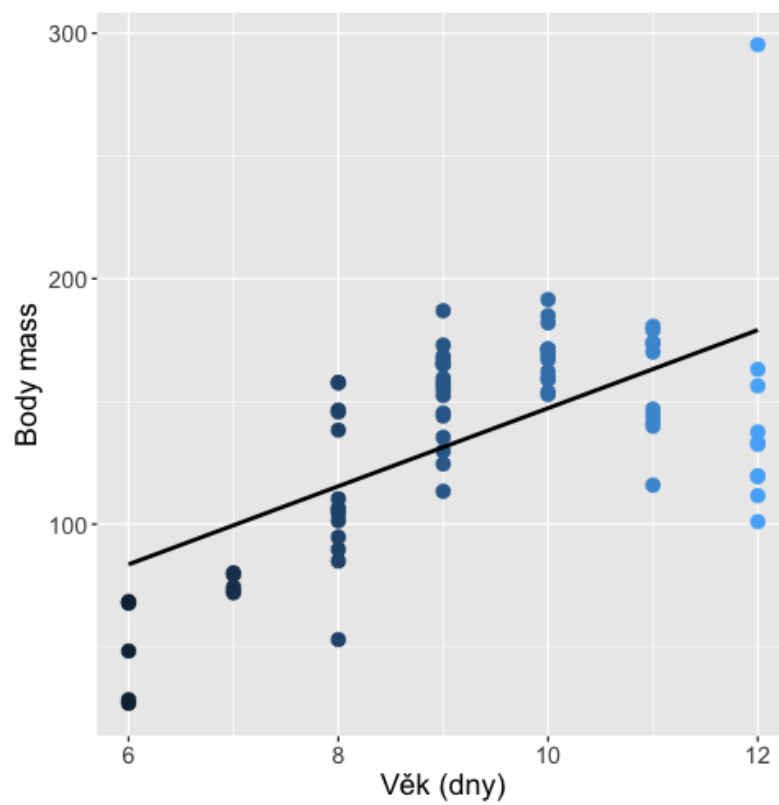
Pro posouzení vztahů mezi kondičními parametry mládřat sýkor koňader na pražských lokalitách byla sestavena korelační matice (Obr. 9), která ukazuje vzájemné vztahy mezi tělesnou hmotností, délkou běháku a délkou křídel. Podrobnější přehled korelační matice je uveden v Příloze 2. Dále byla testována závislost těchto kondičních parametrů na věku mládřat pomocí lineárních modelů. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 1 a vizualizovány pomocí bodových grafů (Obr. 10–12).



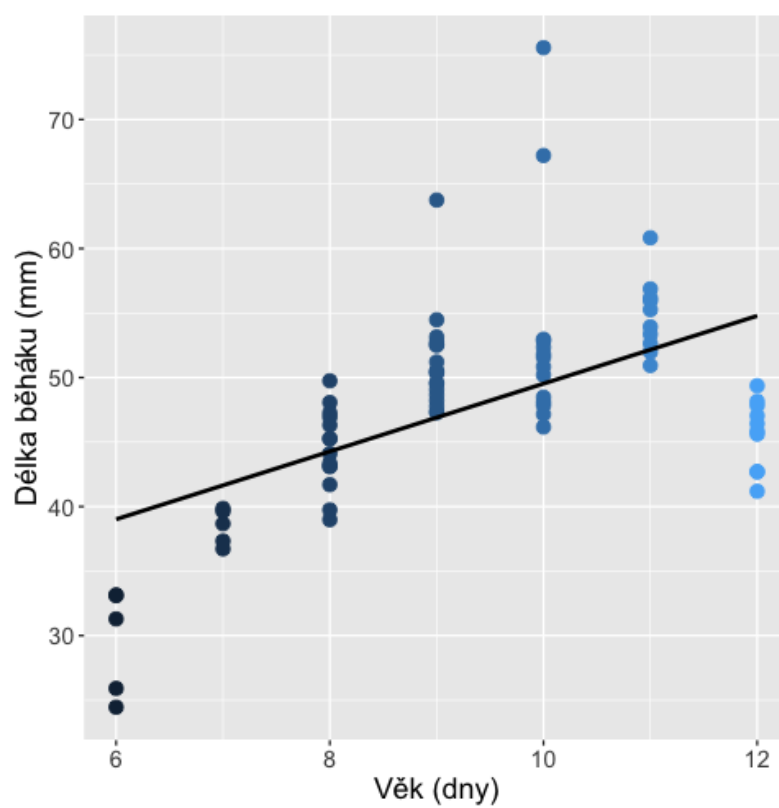
Obrázek 9: Korelační matice znázorňující vztahy mezi kondičními parametry mládřat sýkor koňader z pražských lokalit. Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).

Tabulka 1: Výsledky lineárních modelů testujících vztah věku mládřat sýkor koňader na jejich kondiční parametry. Uvedeny jsou hodnoty F-statistiky, stupně volnosti (df) a p-hodnoty pro jednotlivé modely. Statisticky významné výsledky ($p < 0.05$) jsou označeny hvězdičkou.

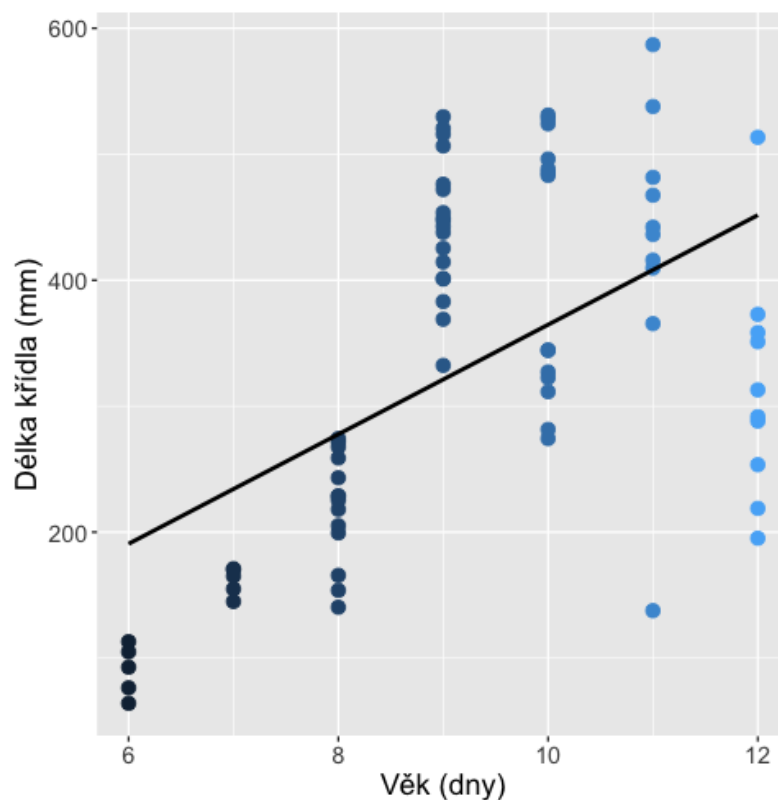
Kondiční parametr	F-statistika	df	p-hodnota
Hmotnost ~ věk	45.19	1,74	<<0.001 ***
Délka běháku ~ věk	32.79	1,74	0.026 *
Délka křídla ~ věk	29.27	1,74	<<0.001 ***



Obrázek 10: Závislost tělesné hmotnosti (g) mláďat sýkor koňader na jejich věku.



Obrázek 11: Závislost délky běháku (mm) mláďat sýkor koňader na jejich věku.



Obrázek 12: Závislost délky křídel (mm) mládřat sýkor koňader na jejich věku.

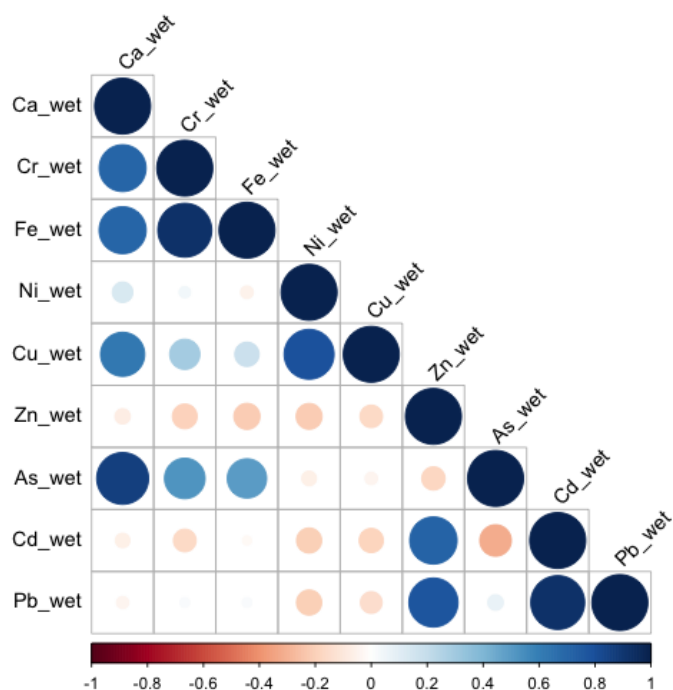
5.1 Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu

Koncentrace těžkých kovů v krvi byly vzájemně korelovány (Obr. 13–14). Podobně byly nalezeny i korelace mezi koncentracemi různých těžkých kovů v trusu mládřat sýkor (Obr. 15–16).

	Ca	Cr	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Ca (wet)		0.70	0.71	0.13	0.62	-0.07	0.86	-0.07	-0.05
Cr (wet)	0.0003		0.93	0.04	0.29	-0.20	0.52	-0.16	0.03
Fe (wet)	0.0002	0.0000		-0.05	0.19	-0.22	0.49	-0.03	0.03
Ni (wet)	0.5632	0.8531	0.8189		0.80	-0.21	-0.07	-0.20	-0.20
Cu (wet)	0.0020	0.1659	0.3763	0.4843		-0.16	-0.05	-0.19	-0.15
Zn (wet)	0.7431	0.3493	0.2952	0.3257	0.4514		-0.17	0.71	0.77
As (wet)	0.0000	0.0121	0.0193	0.7765	0.4515	0.4416		-0.32	0.08
Cd (wet)	0.8462	0.5912	0.9343	0.5103	0.4516	0.0062	0.3729		0.93
Pb (wet)	0.8377	0.8942	0.8950	0.3533	0.4517	0.0000	0.7343	0.0000	

Obrázek 13: Korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty a jejich statistickou významnost (p-hodnoty) pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích krve (wet). Statisticky významné hodnoty jsou podbarveny

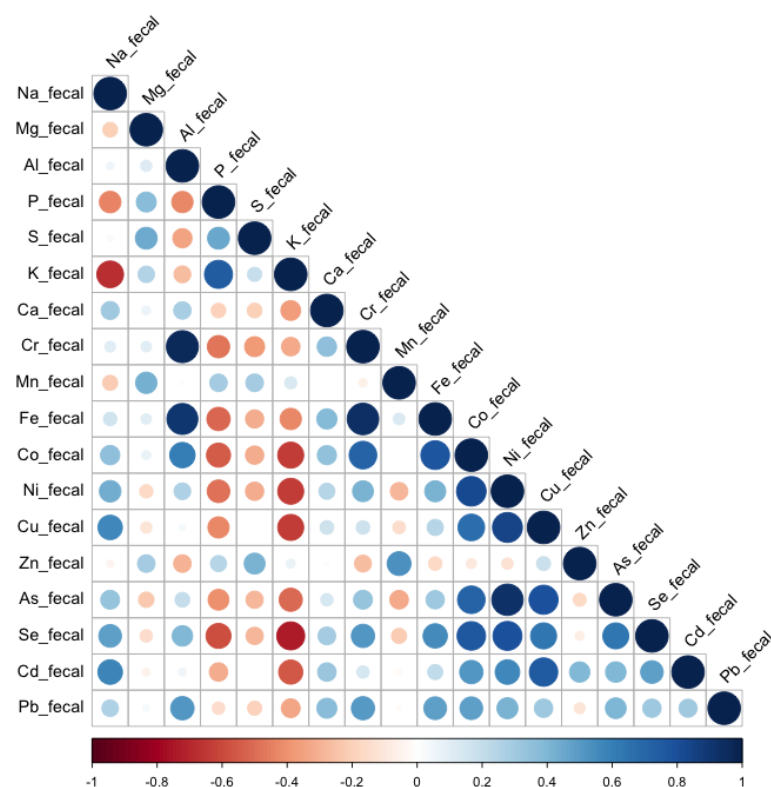
zeleně (tmavší odstíny značí nižší p-hodnoty), zatímco síla korelace je vyjádřena odstíny oranžové (tmavší barvy značí silnější vztah).



Obrázek 14: Grafická korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích krve (wet). Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).

	Na	Mg	Al	P	S	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
Na (trus)		-0.20	0.05	-0.44	0.03	-0.67	0.31	0.11	-0.21	0.17	0.35	0.44	0.57	-0.04	0.34	0.49	0.57	0.26
Mg (trus)	0.1454		0.12	0.38	0.45	0.25	0.07	0.10	0.43	0.10	0.07	-0.17	-0.12	0.29	-0.22	-0.15	-0.05	0.03
Al (trus)	0.7216	0.4012		-0.43	-0.35	-0.27	0.29	0.96	-0.01	0.90	0.61	0.26	0.03	-0.29	0.21	0.40	0.06	0.52
P (trus)	0.0010	0.0056	0.0014		0.45	0.74	-0.20	-0.47	0.29	-0.51	-0.55	-0.48	-0.42	0.24	-0.41	-0.59	-0.32	-0.15
S (trus)	0.8505	0.0007	0.0106	0.0007		0.19	-0.20	-0.38	0.29	-0.31	-0.32	-0.32	-0.01	0.41	-0.28	-0.28	0.01	-0.19
K (trus)	0.0000	0.0654	0.0529	0.0000	0.1715		-0.37	-0.32	0.14	-0.43	-0.64	-0.63	-0.64	0.07	-0.51	-0.74	-0.55	-0.33
Ca (trus)	0.0258	0.6325	0.0376	0.1535	0.1483	0.0064		0.35	-0.01	0.38	0.35	0.24	0.17	0.01	0.14	0.30	0.32	0.38
Cr (trus)	0.4469	0.4651	0.0000	0.0004	0.0054	0.0186	0.0091		-0.06	0.94	0.72	0.41	0.17	-0.27	0.34	0.51	0.14	0.51
Mn (trus)	0.1254	0.0013	0.9299	0.0346	0.0323	0.3276	0.9616	0.6635		0.13	0.01	-0.29	-0.15	0.53	-0.33	-0.22	-0.02	-0.02
Fe (trus)	0.2312	0.4720	0.0000	0.0000	0.0226	0.0013	0.0045	0.0000	0.3634		0.78	0.42	0.25	-0.17	0.32	0.56	0.21	0.49
Co (trus)	0.0097	0.5949	0.0000	0.0000	0.0209	0.0000	0.0109	0.0000	0.9636	0.0000		0.82	0.67	-0.09	0.71	0.77	0.51	0.48
Ni (trus)	0.0011	0.2326	0.0570	0.0003	0.0215	0.0000	0.0794	0.0023	0.0352	0.0019	0.0000		0.84	-0.12	0.93	0.79	0.57	0.42
Cu (trus)	0.0000	0.3992	0.8068	0.0015	0.9550	0.0000	0.2126	0.2200	0.2879	0.0760	0.0000	0.0000		0.18	0.80	0.64	0.76	0.32
Zn (trus)	0.7575	0.0344	0.0340	0.0790	0.0021	0.6069	0.9166	0.0521	0.0000	0.2239	0.5118	0.3897	0.1879		-0.16	-0.07	0.39	-0.11
As (trus)	0.0138	0.1073	0.1398	0.0025	0.0420	0.0001	0.3094	0.0140	0.0171	0.0199	0.0000	0.0000	0.0000	0.2523		0.63	0.40	0.41
Se (trus)	0.0002	0.2988	0.0033	0.0000	0.0408	0.0000	0.0311	0.0000	0.1178	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6072	0.0000		0.48	0.32
Cd (trus)	0.0000	0.6979	0.6910	0.0198	0.9677	0.0000	0.0186	0.3070	0.8624	0.1266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0039	0.0032	0.0003		0.31
Pb (trus)	0.0596	0.8047	0.0000	0.2901	0.1726	0.0147	0.0053	0.0001	0.8896	0.0002	0.0002	0.0019	0.0197	0.4297	0.0026	0.0206	0.0249	

Obrázek 15: Korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty a jejich statistickou významnost (p-hodnoty) pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích trusu. Statisticky významné hodnoty jsou podbarveny zeleně (tmavší odstíny = nižší p-hodnoty), zatímco síla korelace je vyjádřena odstíny oranžové (tmavší odstíny = silnější vztah).

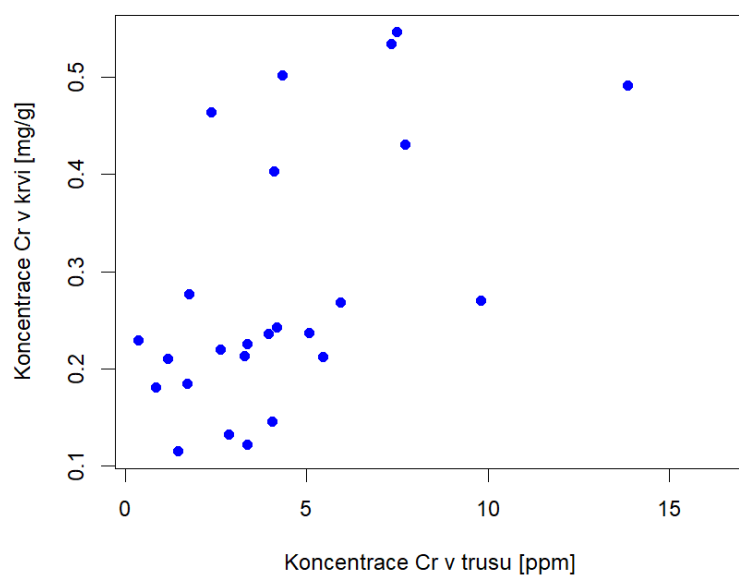


Obrázek 16: Grafická korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích trusu (fecal). Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).

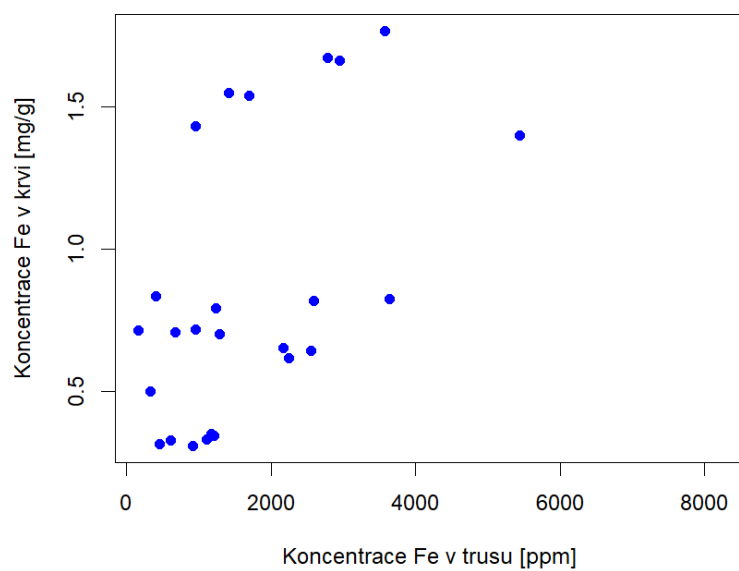
Následně byla testována korelace mezi koncentracemi devíti těžkých kovů (Ca, Cr, Fe, Ni, Cd, Pb, As, Cu, Zn) v krvi a trusu mláďat sýkor koňader, které je uvedena v Tab. 2. Statisticky signifikantní korelace ($p \leq 0.05$) byly nalezeny u vápníku (Ca, $r_s = 0.426$, $p = 0.049$), chromu (Cr, $r_s = 0.605$, $p = 0.002$) a železa (Fe, $r_s = 0.537$, $p = 0.006$). Výsledky jsou znázorněny na bodových grafech (Obr. 17–19).

Tabulka 2: Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu. Hodnoty představují Spearmanův korelační koeficient (r_s) a odpovídající p -hodnotu testu statistické významnosti.

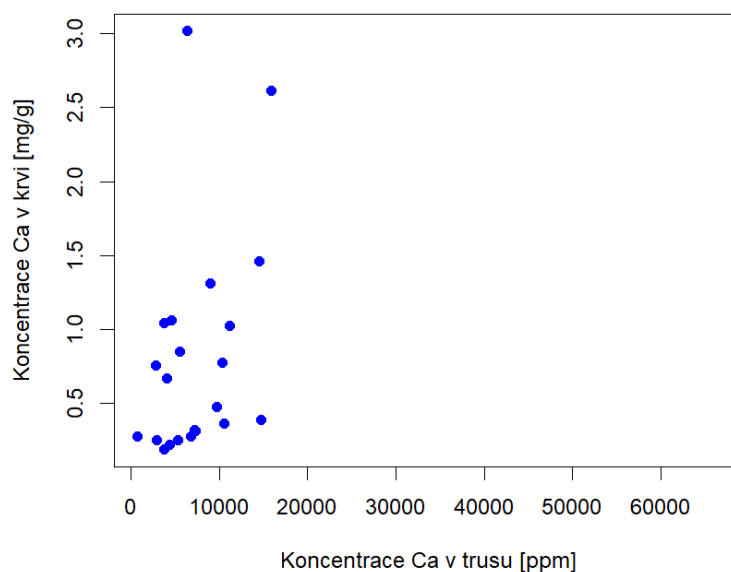
Kov	r_s	p -hodnota
Cr	0.6046154	0.002 **
Fe	0.5369231	0.006 **
Ca	0.426	0.049 *
Ni	0.3438735	0.108
Cd	0.467033	0.110
Pb	0.086923080	0.679
As	0.1236589	0.582
Cu	-0.1078261	0.615
Zn	-0.01846154	0.931



Obrázek 17: Spearmanova korelace mezi koncentrací Cr (chrom) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.604$, $p = 0.002$).



Obrázek 18: Spearmanova korelace mezi koncentrací Fe (železa) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.536$, $p = 0.006$).



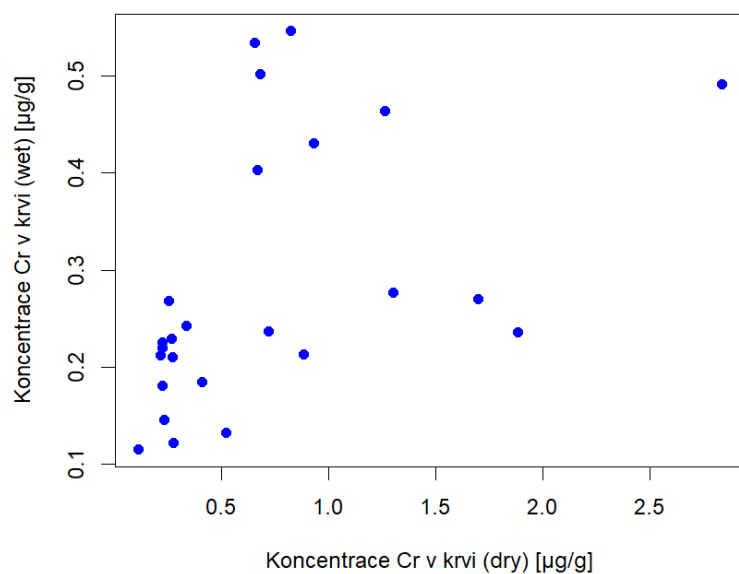
Obrázek 19: Spearmanova korelace mezi koncentrací Ca (vápník) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.426$, $p = 0.049$).

5.2 Srovnání metodických postupů měření koncentrace těžkých kovů

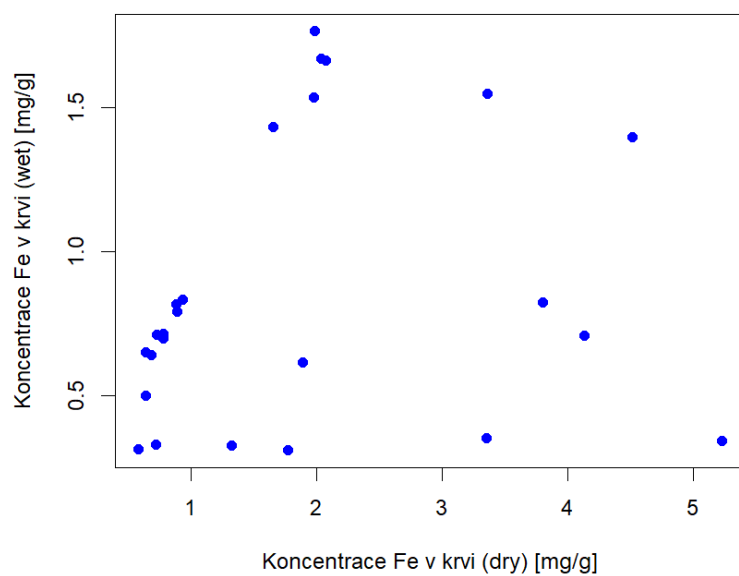
Byla testována korelace mezi koncentracemi těžkých kovů ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve fixované do ethanolu a následně vysušené (dry). Většina prvků vykazovala pozitivní korelaci mezi oběma metodami, zatímco zinek (Zn), kadmium (Cd) a olovo (Pb), korelovaly negativně. Nejsilnější statisticky signifikantní korelace byly nalezeny pro Ni ($r_s = 0.861$, $p < 0.001$), Ca ($r_s = 0.710$, $p < 0.001$), Cr ($r_s = 0.631$, $p < 0.001$). Výsledky jsou znázorněny v tabulce (Tab. 3) a na bodových grafech. (Obr. 20–28).

Tabulka 3: Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry). Hodnoty představují Spearmanův korelační koeficient (r_s) a odpovídající p-hodnotu testu statistické významnosti.

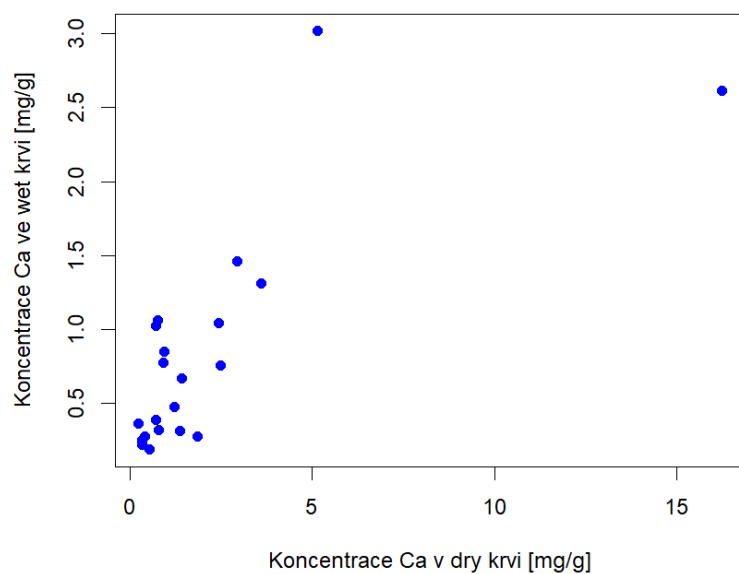
Kov	r_s	p-hodnota
Ni	0.861	<<0.001 ***
Ca	0.710	<<0.001 ***
Cr	0.631	<<0.001 ***
Pb	-0.609	0.002 **
Cu	0.615	0.003 **
Zn	-0.561	0.004 **
As	0.441	0.053
Cd	-0.833	0.008 *
Fe	0.392	0.054

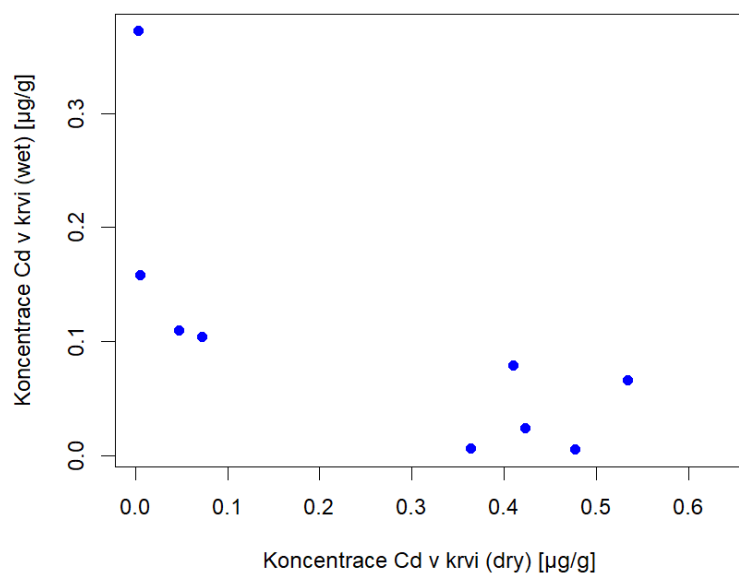


Obrázek 20: Korelace mezi koncentracemi Cr (chrom) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.631$, $p < 0.001$ ***).

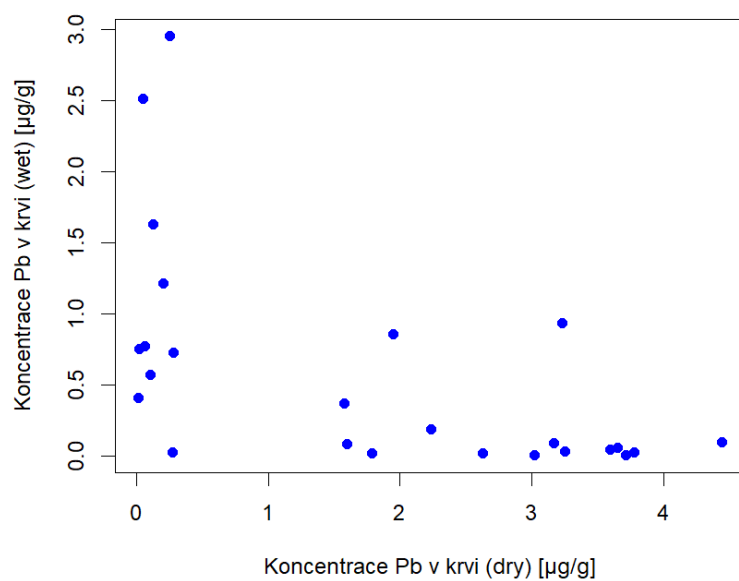


Obrázek 21: Korelace mezi koncentracemi Fe (železo) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.392$, $p = 0.054$).

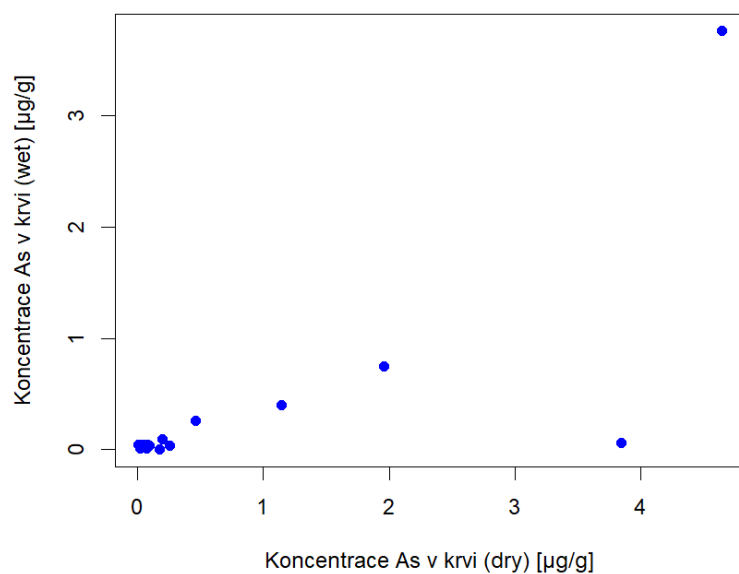


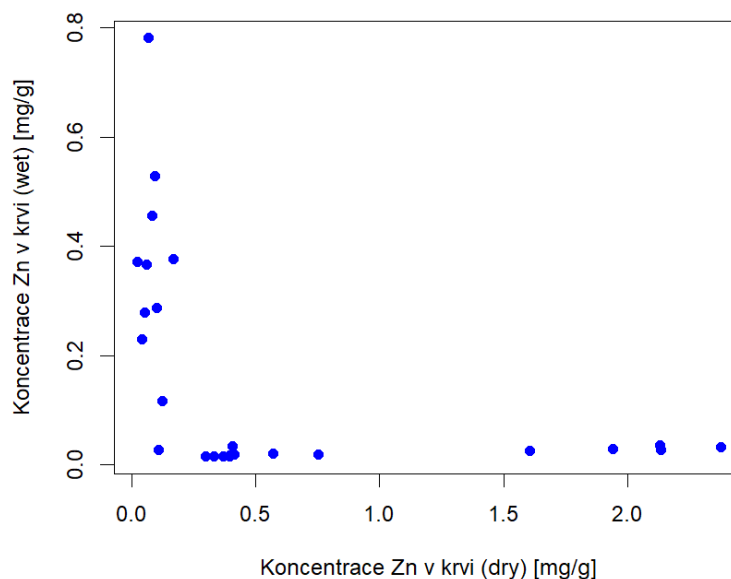


Obrázek 24: Korelace mezi koncentracemi Cd (kadmium) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mláďat sýkor koňader ($r_s = -0.833$, $p = 0.008$).



Obrázek 25: Korelace mezi koncentracemi Pb (olovo) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mláďat sýkor koňader ($r_s = -0.609$, $p = 0.002$).





Obrázek 28: Korelace mezi koncentracemi Zn (zinek) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mláďat sýkor koňader ($r_s = -0.561$, $p = 0.004$).

5.3 Vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry

Na základě korelací mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi i trusu (Obr. 13-16) byly pro další analýzu vybrány pouze kovy Fe, Ni, Pb a Ca. Analýza neukázala žádné statisticky významné vztahy ($p \leq 0.05$) mezi koncentracemi těchto prvků a kondičními či hematologickými parametry. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 4-7) a znázorněny regresními grafy (Obr. 29-30).

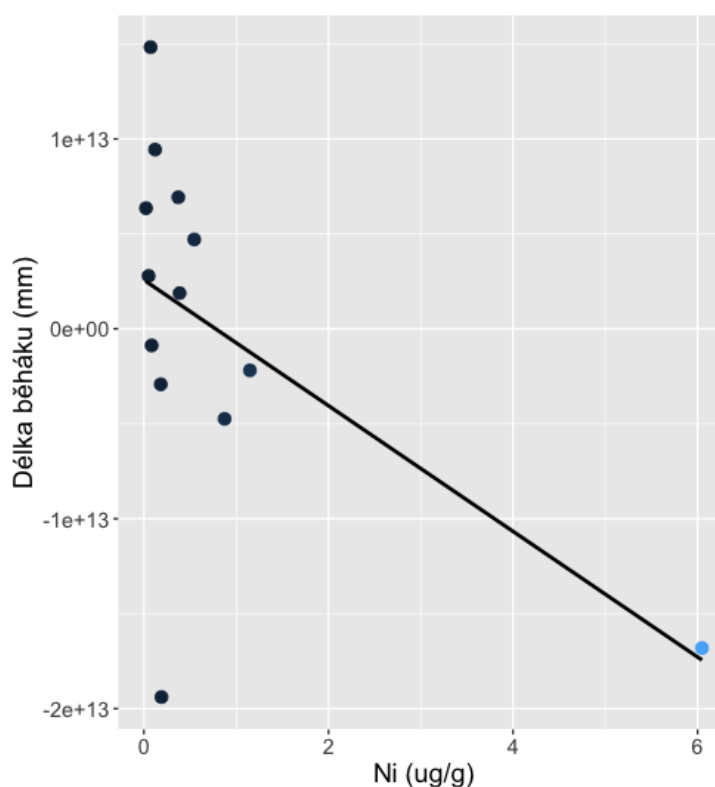
Tabulka 4: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a tělesnou hmotností mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.

Vysvětlovaná	Model / Vysvětlující proměnná	F / t	df	p-hodnota
hmotnost	H/L + Fe + Ni + Pb + Ca + Lokalita	1.386	6/6	0.351
	H/L	0.157		0.881
	Fe	1.004		0.354
	Ni	-1.286		0.246
	Pb	-0.203		0.846
	Ca	-0.753		0.480
	Lokalita	-1.229		0.265

Tabulka 5: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a délkou běháku mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.

Vysvětlovaná	Model / Vysvětlující proměnná	F / t	df	p-hodnota
Délka běháku	H/L + Fe + Ni + Pb + Ca + Lokalita	3.886	6/6	0.06157
	H/L	0.782		0.464
	Fe	1.432		0.202
	Ni	-1.939		0.101
	Pb	1.029		0.343
	Ca	-1.283		0.247
	Lokalita	-1.375		0.218

Obrázek 29: Regresní vizualizace vztahu mezi koncentrací niklu (Ni, $\mu\text{g/g}$) v krvi a délkou běháku (mm) mláďat sýkor koňader. Regresní přímka představuje trend vztahu.

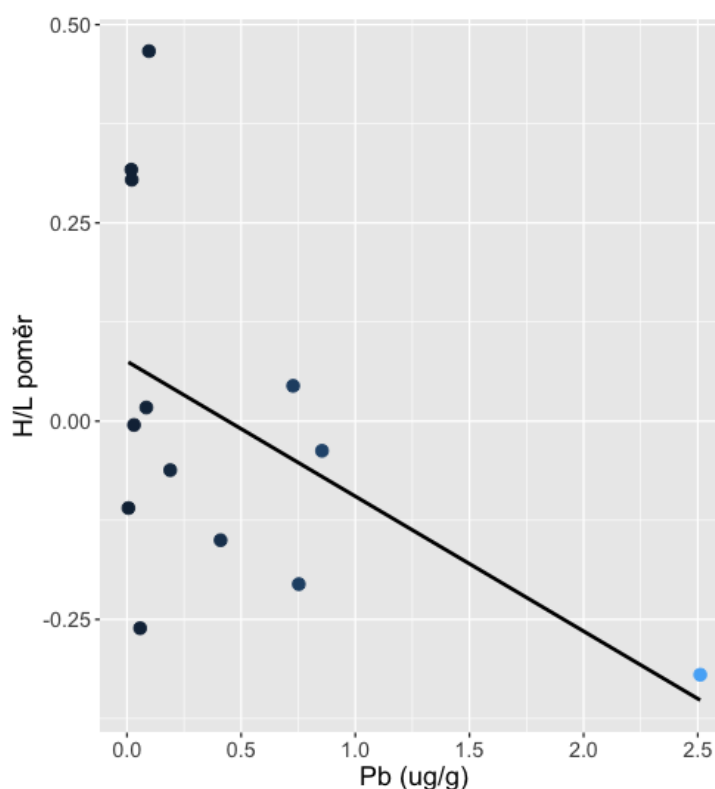


Tabulka 6: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a délkou křídel mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.

Vysvětlovaná	Model / Vysvětlující proměnná	F / t	df	p-hodnota
Délka křídla	H/L + Fe + Ni + Pb + Ca + Lokalita	1.9	6/6	0.227
	H/L	0.553		0.600
	Fe	0.826		0.441
	Ni	-1.771		0.127
	Pb	-0.107		0.918
	Ca	-0.732		0.492
	Lokalita	-1.055		0.332

Tabulka 7: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a H/L poměrem mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.

Vysvětlovaná	Model / Vysvětlující proměnná	F / t	df	p-hodnota
H/L poměr	Fe + Ni + Pb + Ca + Lokalita	2.094	5/7	0.181
	Fe	0.638		0.544
	Ni	0.758		0.473
	Pb	-1.845		0.108
	Ca	-0.424		0.684
	Lokalita	-1.771		0.120



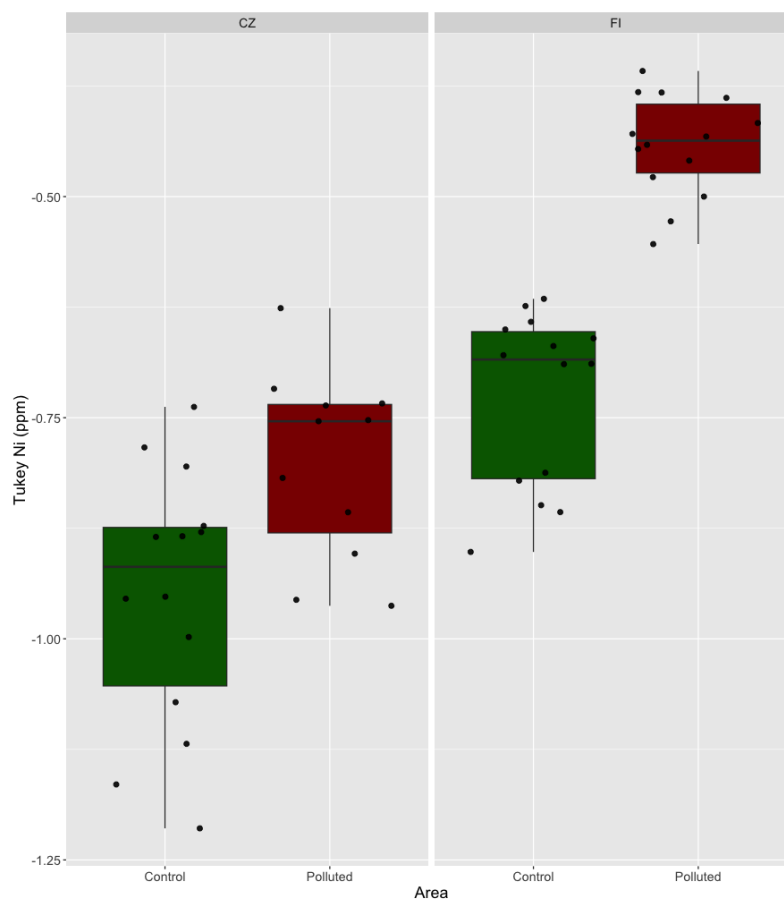
Obrázek 30: Regresní vizualizace vztahu mezi koncentrací olova (Pb, $\mu\text{g/g}$) v krvi a H/L poměrem mláďat sýkor koňader. Regresní přímka představuje trend vztahu.

5.4 Porovnání míry kontaminace mezi lokalitami

Analýza ukázala, že koncentrace všech sledovaných kovů se mezi lokalitami významně lišily ($p \leq 0.05$). Nejvyšší rozdíly byly zaznamenány u niklu ($F = 55.41$, $p < 0.001$) a olova ($F = 17.34$, $p < 0.001$). Významné rozdíly byly rovněž nalezeny pro železo ($F = 6.913$, $p = 0.002$) a vápník ($F = 4.063$, $p = 0.012$). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 8–11 a vizualizovány pomocí boxplotů (Obr. 31–34).

Tabulka 8: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích niklu (Ni) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.

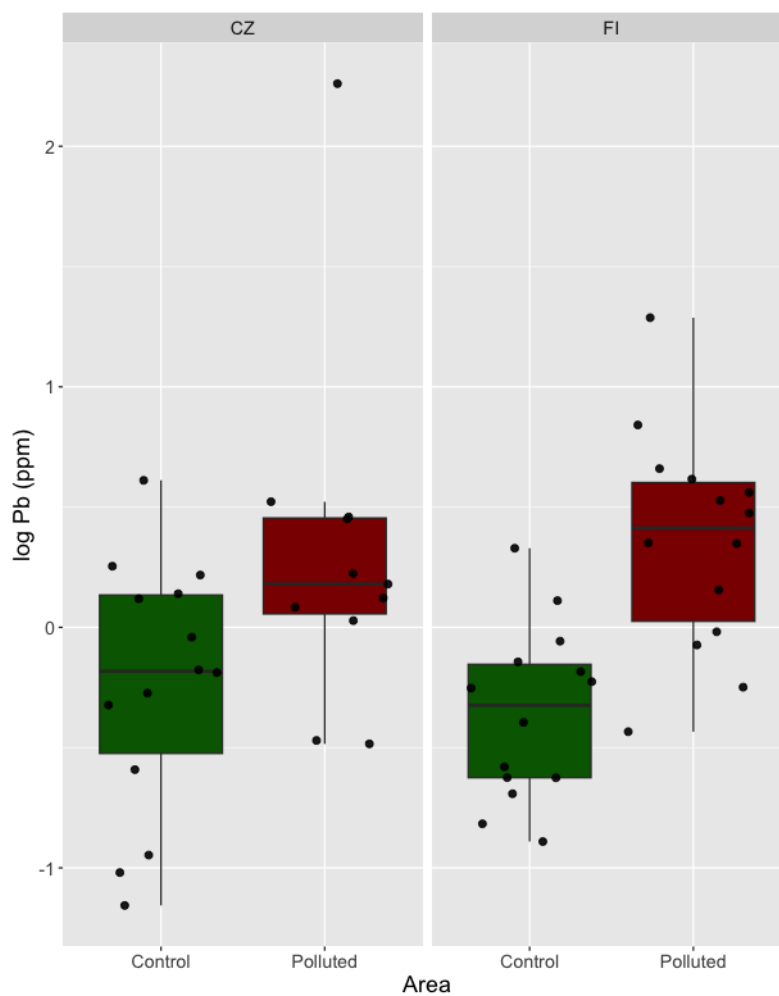
Vysvětlovaná	Model / vysvětlující proměnná	F/t	df	p-hodnota
Ni	Země + lokalita	55.41	3/49	<0.001 **
	Země	5.590		<0.001 ***
	Lokalita	3.481		<0.001 **
	Země:lokalita	5.091		0.029 *



Obrázek 31: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích niklu (Ni) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted).

Tabulka 9: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích olova (Pb) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.

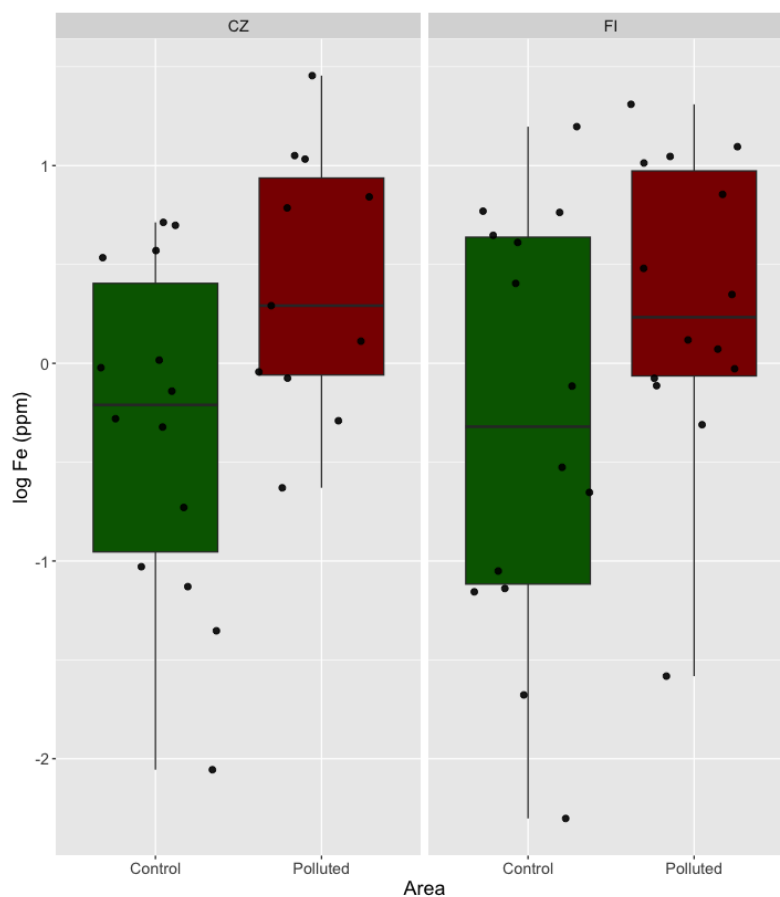
Vysvětlovaná	Model / vysvětlující proměnná	F/t	df	p-hodnota
Pb	země + lokalita	17.34	2/50	<<0.001 ***
	Země	3.538		<0.001 ***
	Lokalita	4.488		<<0.001 ***



Obrázek 32: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích olova (Pb) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted).

Tabulka 10: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích železa (Fe) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.

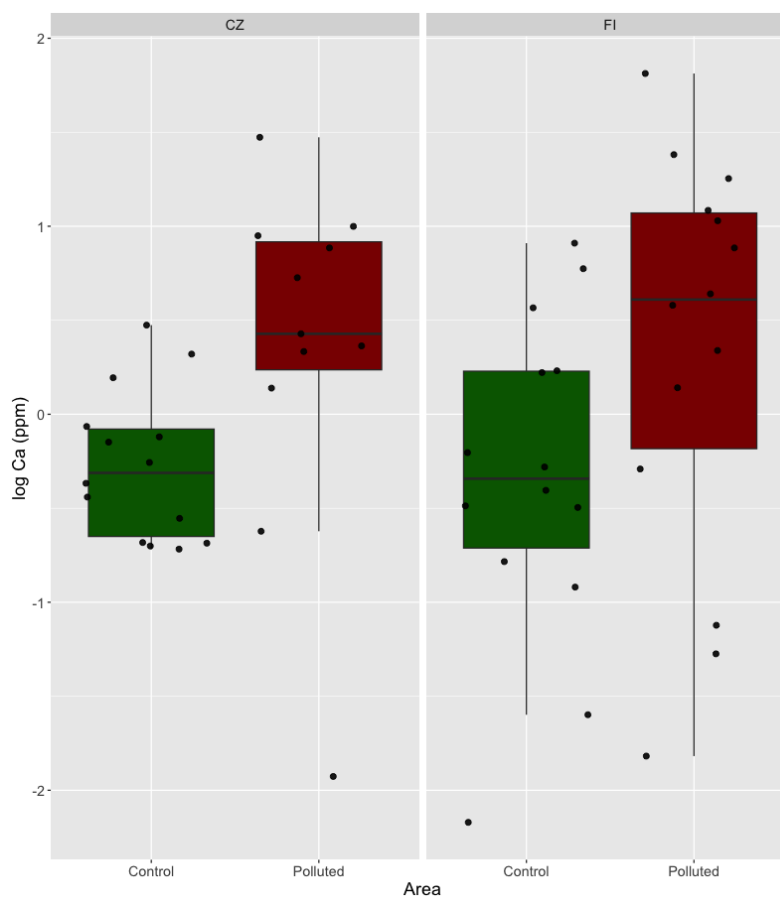
Vysvětlovaná	Model / vysvětlující proměnná	F/t	df	p-hodnota
Fe	země + lokalita	6.913	2/50	0.002 **
	Země	1.218		0.031 *
	Znečištění			0.006 **



Obrázek 33: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích železa (Fe) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted).

Tabulka 11: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích vápníku (Ca) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.

Vysvětlovaná	Model / vysvětlující proměnná	F/t	df	p-hodnota
Ca	Věk + země + lokalita	4.063	2/49	0.012
	Země	2.298		0.026 *
	Lokalita	2.903		0.006 **
	Věk	2.407		0.020*



Obrázek 34: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích vápníku (Ca) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted).

6 DISKUZE

V této práci byly analyzovány koncentrace těžkých kovů ve vzorcích odebraných z mládřat sýkor koňader s cílem zjistit vztah mezi zdravotním stavem mládřat sýkor koňader a kontaminací těžkými kovy v antropogenních ekosystémech. Testovány byly korelace mezi koncentracemi vybraných kovů ve dvou biologických matricích (krev vs. trus), porovnány dva metodické postupy stanovení koncentrace těžkých kovů v krevních vzorcích a vyhodnocen vliv kontaminace na hematologické a kondiční parametry. Dále byla vyhodnocena prostorová variabilita kontaminace mezi znečištěnými a kontrolními lokalitami v České republice a Finsku. Výsledky potvrdily významné rozdíly v míře kontaminace mezi těmito lokalitami, s nejvýraznějšími rozdíly zaznamenanými u niklu a olova. Korelační analýza ukázala, že mezi vzorky krve a trusu je významný vztah u chromu, železa a vápníku. Naopak například u kadmia a olova nebyla zjištěna signifikantní korelace, což může souviset s odlišnými metabolickými drahami a detoxikačními mechanismy. Přestože nebyl prokázán jednoznačný vliv kontaminace na hematologické a kondiční parametry mládřat, některé trendy, například potenciální vliv olova na poměr heterofilů a lymfocytů, naznačují možné slabé subletální efekty těžkých kovů na fyziologii ptáků.

6.1 Vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu

Pro analyzované biologické matrice (krev a trus) výsledky ukázaly statisticky signifikantní korelace mezi koncentracemi Cr, Fe a Ca, zatímco u ostatních prvků (Ni, Cd, Pb, As, Cu, Zn) nebyl nalezen významný vztah.

Nejvyšší korelace mezi koncentracemi v krvi a trusu vykazoval Cr. Studie Rogival a kol. (2006) na myších (*Apodemus sylvaticus*) ukázala, že krevní hladiny Cr částečně odrážely jeho přítomnost v prostředí, avšak nebyl nalezen přímý vztah mezi koncentracemi Cr v půdě a krvi. To naznačuje, že distribuce Cr v těle není dána pouze mírou expozice, ale také fyziologickými procesy, které ovlivňují jeho ukládání v tkáních a vylučování. Podobný trend může hrát roli i u ptáků, což by mohlo vysvětlovat silnou korelaci mezi hladinami v krvi a trusu.

Středně silná korelace mezi koncentracemi Fe v krvi a trusu, podobně jako u Cr, naznačuje, že jeho metabolismus a přítomnost v těchto biologických matricích souvisejí se složením potravy a následnou mírou absorpce v organismu. Jako esenciální prvek hraje významnou roli v řadě fyziologických procesů organismů, včetně transportu kyslíku a enzymatických reakcí, avšak při nadměrné akumulaci může mít toxické účinky (Järup 2003; Tchounwou a kol. 2012).

U Ca byl zjištěn podobný trend mezi trusem a krví, avšak vykazoval slabší pozitivní korelaci, což může být způsobeno odlišnou metabolickou regulací v těle, včetně ukládání v kostech.

Rozdíly v korelaci Ni mezi krevními vzorky a vzorky trusu mohou souviset s jeho metabolickou cestou, protože se nikl primárně ukládá v ledvinách a játrech, kde je metabolizován a následně vylučován močí, zatímco jeho přímé vylučování trusem je méně efektivní (ATSDR 2024).

Cd vykazovalo středně silnou pozitivní korelaci mezi krevními a trusovými vzorky, avšak tato souvislost nebyla statisticky signifikantní. Cd je známé svou schopností rychle vstupovat do jater, kde se váže na metallothionein (nahrazuje esenciální Zn), což omezuje jeho přímé vylučování a může vést k hepatotoxicitě (Järup 2003; Jaishankar a kol. 2014).

Pb, As, Cu a Zn nevykazovaly téměř žádnou nebo jen velmi slabou korelaci mezi krevními vzorky a vzorky trusu. Pb se ukládá převážně v kostech, zatímco v krvi a měkkých tkání se vyskytuje spíše přechodně, což vysvětluje jeho nízkou přítomnost v trusu (WHO 1995; Järup 2003; Tchounwou a kol. 2012).

V předchozích studiích bylo pozorováno, že se Cd a Pb hromadí spíše v játrech, ledvinách a svalech, což může vysvětlit absence korelace mezi krví a trusem ve výsledcích této práce. (WHO 1995; Järup 2003; Tchounwou a kol. 2012).

Tyto rozdíly v akumulaci těžkých kovů do různých tkání mohou být dále ovlivněny délkou expozice a biologickou matricí. Některé kovy mohou být lépe detekovatelné při krátkodobé expozici v krvi, zatímco jiné se ukládají dlouhodobě v tělesných tkáních a jejich přítomnost se odráží spíše v perí či kostech (Bauerová 2020).

Zn je esenciální pro mnoho metaloproteinů a jeho přebytek bývá běžně vylučován trusem, což by mohlo vysvětlovat jeho téměř nulovou korelaci s krevními vzorky (WHO 2001; Zargar 2015).

Neesenciální těžké kovy jako As, Cd a Pb jsou vysoce toxické, se škodlivými účinky pozorovanými i ve velmi nízkých dávkách a mohou navíc po vstupu do organismu nahrazovat původní esenciální kovy a tím způsobit metabolické poruchy (Järup 2003; Tchounwou a kol. 2012). Další výzkum by mohl zahrnout detailnější analýzy rozdílných vlivů jednotlivých těžkých kovů na metabolismus.

6.2 Srovnání koncentrací těžkých kovů mezi „wet“ a „dry“ metodou

Srovnání dvou metodických postupů (wet vs. dry krev) ukázalo, že koncentrace většiny těžkých kovů byly mezi oběma metodami relativně konzistentní, avšak u některých prvků byly nalezeny rozdíly. Nejvyšší shodu vykazovaly Ni, Ca a Cr, což naznačuje, že naměřené koncentrace těchto prvků nebyly výrazně ovlivněny při manipulaci se vzorky, včetně procesu sušení, a jejich měření bylo konzistentní mezi oběma metodami.

Naopak Cd, Pb a Zn měly silně negativní korelace mezi metodami, což poukazuje na možné ztráty při vysušení. Podle Bauerové a kol. (2017) rozdíl v koncentracích kovů mezi „wet“ a „dry“ vzorky lze vysvětlit změnami v rozpustnosti a stabilitě kovů v biologických tkáních. Studie uvádí, že Pb má tendenci vázat se na proteiny nebo buněčné struktury, což vede k potenciální ztrátě nebo redistribuci při sušení vzorků. Podobně se Cd může při vysušení chovat odlišně kvůli své tendenci vázat se na metalothioneiny, což by mohlo vysvětlit negativní korelaci.

Z výsledků vyplývá, že při analýze těžkých kovů v krevních vzorcích je nutné zohlednit metodické postupy, protože některé prvky mohou být ovlivněny sušením více než jiné. Budoucí výzkum by se mohl zaměřit na vliv metody sušení na stabilitu různých prvků a v různých biologických materiálech.

6.3 Potenciální vliv těžkých kovů na hematologické a kondiční parametry mlád'at

Analýza neodhalila žádný jednoznačný vliv kontaminace těžkými kovy na hematologické a kondiční parametry, i když u některých proměnných byly pozorovány trendy blízké hranici statistické významnosti.

U tělesné hmotnosti a délky křídla nebyly nalezeny významné vztahy s koncentracemi těžkých kovů, což ukazuje, že expozice těmto prvkům neměla přímý dopad na růstové parametry mlád'at. To může souviset s nižší citlivostí těchto znaků ve srovnání s jinými fyziologickými parametry. Tento výsledek je v souladu se zjištěními (Bauerová a kol. 2017), která předpokládají, že absence jasného vlivu expozice kovům na tělesnou hmotnost, délku běháku nebo délku křídel může naznačovat, že fyziologické kompenzační nebo detoxikační mechanismy mlád'at mohou bránit klinickým efektům subletálních koncentrací kovů.

Ačkoli nebyl prokázán významný vztah mezi expozicí těžkým kovům a poměrem heterofilů a lymfocytů (H/L, ratio) marginálně nesignifikantní vztah k Pb naznačuje možnost jeho potenciálního vlivu na imunitní odpověď. Heterofily jsou hlavní složkou vrozené imunity ptáků a analogií neutrofilů u savců, jsou nezbytné pro produkci antimikrobiálních látek a schopnost fagocytózy (Krajzingrová 2019).

Relativní množství heterofilů v krvi citlivě reaguje na environmentální stresory, a proto jsou běžně používaným ukazatelem stresové odpovědi u ptáků (Krajzingrová 2019). Biologický trend byl zaznamenán i v předchozí studii (Bauerová a kol. (2020), kde byly vyšší koncentrace Pb, Cd a Zn spojeny se zvýšením celkového počtu leukocytů a změnami v H/L poměru. Navíc bylo prokázáno, že Pb spolu s Cd a Cu mohou přímo narušovat antioxidační kapacitu, imunitní odpověď a celkové zdraví volně žijících ptáků (Geens a kol. 2010; Blanco a kol. 2004; Fair a Myers 2002; Snoeijs a kol. 2004). Výsledky mohou tedy naznačit, že i subletální koncentrace těžkých kovů mohou ovlivňovat imunitní parametry mlád'at. Kontaminace Pb je přímo spojená s inhibicí enzymu δ -aminolevulinát dehydratázy (ALAD), který ovlivňuje tvorbu hemoglobinu (Papanikolaou a kol. 2005). Inhibice ALAD olovem vede ke snížení dostupnosti hemoglobinu, což může způsobit pokles hematokritu a středního objemu erytrocytů (Vanparys a kol. 2008). I když naše výsledky neprokázaly statisticky významný vztah mezi Pb a kondičními parametry mlád'at, negativní vliv Pb na organismus se může projevit v jiných fyziologických aspektech, jako je imunitní systém nebo hormonální regulace. To je v souladu s předchozími studiemi, které uvádějí, že Pb a Cd mohou mít toxické účinky na endokrinní systém, proces pelichání, reprodukci, rychlost růstu a enzymy zapojené do tvorby hemoglobinu (Eisler 1988).

Marginálně nesignifikantní vztah byl pozorován také mezi Ni a délkou běháku. Ze všech analyzovaných kovů měl Ni nejtěsnější vztah k tělesné hmotnosti a délce křídel, i když

pozorovaný trend nedosáhl statistické významnosti. I tak ale tento trend reflektuje možný vliv na morfologické parametry. Nicméně je nutné vzít v úvahu, že jedním z limitů této práce je přítomnost odlehlých bodů (outliers), které mohly ovlivnit marginálně nesignifikantní výsledky. Podle studie Macomber a Hausinger (2014) lze toxicitu Ni vysvětlit několika mechanismy, včetně nahrazení esenciálního kovu v metaloproteinech, vazby na katalytická místa ne-metalických enzymů a inhibice enzymů prostřednictvím alosterické interakce, což nepřímo způsobuje oxidační stres. Vzhledem k tomu, že se Ni primárně ukládá v játrech a ledvinách, může jeho akumulace ovlivnit metabolické procesy a fyziologický stav organismu (ATSDR 2024), což by se mohlo nepřímo projevit na růstových a hematologických parametrech i u ptáků. I když ve výsledcích nebyl prokázán jednoznačný vztah mezi koncentrací Ni a hematologickými parametry, nelze vyloučit jeho nepřímý vliv na imunitu. Studie na zvířatech pozorovaly, že Ni může ovlivnit jak nespecifickou imunitu (aktivitu makrofágů), tak i specifickou, včetně rezistence vůči bakteriálním infekcím a reakce na cizorodé látky (ATSDR 2024).

Potenciální toxicita Ni pro lidské zdraví a domácí zvířata je dobře zdokumentována, avšak ve srovnání s Pb a Cd zůstává jeho vliv na volně žijící ptáky málo prozkoumaný. Další výzkum by se měl podrobněji zkoumat jeho možné toxické účinky na růst a vývoj ptáků, zejména v souvislosti s jeho ukládáním v organismu a dlouhodobou expozicí.

6.4 Faktory ovlivňující rozdíly v kontaminaci těžkými kovy mezi lokalitami

Pro zjištění rozdílů v míře kontaminace těžkými kovy mezi lokalitami byly potvrzeny statisticky signifikantní rozdíly v koncentraci všech analyzovaných kovů (Pb, Fe, Ca, Ni). Získané výsledky podporují hypotézu, že koncentrace jednotlivých zkoumaných kovů se liší mezi kontrolními a znečištěnými lokalitami, což odráží vliv urbanizace a průmyslové činnosti na jejich zvýšenou přítomnost v prostředí a následnou akumulaci v mláďatech ptáků. Celkově byly vyšší koncentrace těžkých kovů zaznamenány ve Finsku než v České republice. To může být dáno výběrem lokalit pro výzkum, neboť ve Finsku se výzkum zaměřil na okolí metalurgického komplexu, zatímco v České republice byly srovnávány městské a rurální lokality. U všech analyzovaných prvků byly vyšší hodnoty naměřeny v kontaminovaných lokalitách oproti kontrolním. Nejvýraznější rozdíly mezi lokalitami byly pozorovány u Ni a Pb, zatímco železo vykazovalo větší variabilitu mezi státy.

V porovnání se všemi analyzovanými prvky se Ni ukázal jako vysoce signifikantní. Tento výsledek naznačuje, že distribuce niklu v prostředí je silně ovlivněna geografickou lokalitou a mírou znečištění. Podle předchozí studií (WHO 1995; WHO 2001; Van Wyk a kol. 2001) je zvýšená koncentrace niklu pravděpodobně důsledkem současných průmyslových emisí, zatímco jiné kovy, jako Pb, odráží spíše historickou depozici z dopravy a spalováním fosilních paliv. To je možným vysvětlením, proč nikl vykazoval nejvýraznější rozdíly mezi lokalitami a jeho koncentrace v kontaminovaných oblastech převyšovaly hodnoty Pb. Koncentrace Ni se v různých oblastech životního prostředí značně liší, pohybují se od nízkých nanomolárních úrovní v mnoha vodních systémech, 10–40 ppm ve většině půd a až po stovky ppm v serpentinových půdách. (Macomber a Hausinger 2014). Zatímco údaje o bioakumulaci niklu ve vodních organismech, jako jsou ryby, jsou dobře zdokumentované (Birge a Black 1980;

McGeer a kol. 2003; Suedel a kol. 1994; Zaroogian a Johnson 1984), data u volně žijících ptáků a savců jsou omezené (Alberici a kol. 1989; Dressler a kol. 1986). I přes kumulativní povahu Ni se nezdá, že by docházelo k jeho biomagnifikaci v potravních řetězcích, což naznačuje, že hlavním zdrojem expozice pro ptáky nemusí být bioakumulace v potravě, ale spíše přímý kontakt s kontaminovaným prostředím (ATSDR 2024).

Hodnocení rizik sekundární otravy Ni neprokázalo významné ohrožení v mořských a sladkovodních ekosystémech, přičemž v suchozemských ekosystémech bylo identifikováno pouze v prostředích s přirozeně vysokými koncentracemi tohoto kovu v půdě (Nickel Institute 2015). Vzhledem k tomu, že nebylo jednoznačně prokázáno, že by se nikl ve vyšších trofických úrovních potravních řetězců hromadil v rostoucích koncentracích (biomagnifikoval), lze předpokládat, že jeho přenos v potravní síti je omezený. Přesto výrazné rozdíly v koncentracích niklu mezi lokalitami naznačují, že ptáci mohou být vystaveni lokálním zdrojům kontaminace.

Statistická analýza prokázala výrazné rozdíly také v koncentracích Pb mezi lokalitami. Zatímco kontaminované lokality v obou zemích vykazovaly očekávaně vyšší hladiny Pb než kontrolní, překvapivým zjištěním bylo, že kontrolní lokalita v Česku měla vyšší koncentrace Pb než kontrolní lokalita ve Finsku. To naznačuje vyšší úroveň Pb v českém prostředí, pravděpodobně v důsledku historické depozice z dopravy a spalování fosilních paliv (WHO 1995; WHO 2001; Van Wyk a kol. 2001). Naopak ve finské kontaminované lokalitě byly zaznamenány nejvyšší hodnoty Pb s vyšší variabilitou naměřených hodnot ve srovnání s českou kontaminovanou oblastí. Je však důležité poznamenat, že samotná přítomnost Pb v prostředí nemusí spolehlivě odpovídat jeho biologické dostupnosti a míře absorpce v těl organismů, a právě proto jsou bioindikátory nezbytné pro monitorování kvality životního prostředí (Bauerová a kol. 2017). U pěvců, včetně sýkor koňader, může být míra akumulace těžkých kovů ovlivněna nejen expozicí v prostředí, ale také stravou, věkem a sezónními podmínkami (Fritsch a kol. 2012; Bauerová a kol. 2020; Furness a kol. 1986). Zatímco složení potravy ovlivňuje biomagnifikace kovů v potravních řetězcích (Fritsch a kol. 2012), věkové rozdíly mohou ovlivnit koncentrace Pb a dalších kovů v krvi (Bauerová a kol. 2020), a sezónní faktory, jako změny ve stravě a metabolické procesy, mohou vést k výrazným výkyvům v akumulaci kovů během roku (Furness a kol. 1986). Výsledky Bauerové a kol. (2020) ukázaly, že nejvyšší koncentrace Pb byly naměřeny u mláďat a ve malé skupině nejstarších jedinců (starších 7 let), zatímco u většiny věkových stádií dospělých nebyl pozorován žádný jasný trend. To naznačuje, že mláďata mohou být vůči Pb obzvláště citlivá. Nicméně, studie také poukazuje na to, že přesné stáří jedince nemusí být zásadní při monitorování těžkých kovů, protože krevní analýzy poskytují spolehlivá data o kondice ptáků i v případech, kdy tento údaj není známo (Bauerové a kol. 2020).

Výsledky statistické analýzy u Fe a Ca ukázaly, že jejich koncentrace v trusu sýkor koňader se také významně lišily mezi lokalitami a zeměmi. Finské kontrolní lokality měly vyšší koncentrace obou prvků než česká, což může souviset s přirozenými geografickými rozdíly a jejich dostupností v půdě a potravě. Kontaminované lokality měly v obou zemích vyšší koncentrace než kontrolní, ale nejvyšší hodnoty železa byly zaznamenány v Česku, zatímco nejvyšší koncentrace Ca ve Finsku. Oba prvky jsou esenciální pro biologické funkce ptáků.

Železo je nezbytné pro krvetvorbu a přenos kyslíku, zatímco Ca je zásadní pro mineralizaci kostí a tvorbě skořápek vajec. Nedostatek Ca vede k ztenčení skořápek vajec, nižší reprodukční úspěšnost a vyšší úmrtnost mláďat (Graveland a Van Gijzen 1994). Ačkoliv jejich nadbytek může narušit rovnováhu minerálů, přispívat k oxidačnímu stresu nebo vést k poškození ledvin u ptáků v důsledku potenciálního znečištění (Koivula a Eeva 2010; Wideman a Cowen 1987).

7 ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl objasnit vztah mezi kontaminací těžkými kovy a zdravotním stavem mláďat sýkor koňader v antropogenních ekosystémech a zároveň zdůraznit potenciál tohoto druhu jako bioindikátoru kvality životního prostředí.

Jako první dílčí cíl práce jsem si vytkla zjistit, zda spolu korelují koncentrace různých těžkých kovů v krvi a trusu mláďat sýkor. Výsledky ukázaly, že mezi krevními vzorky a vzorky trusu není výrazná korelace v koncentracích těžkých kovů kvůli rozdílné době expozice a odlišným detoxikačním mechanismům v těchto biologických matricích, což platí u Ni, Cd, Pb, As, Cu a Zn. Zároveň byla ale zaznamenána statisticky významné korelace u Cr, Fe a Ca, což odpovídá předpokladu, že některé prvky mohou mít podobný vliv na mláďata sýkor bez ohledu na délku expozice. Dále jsem srovnávala dva metodické postupy měření koncentrací těžkých kovů v krevních vzorcích (wet vs. dry). Výsledky ukázaly, že koncentrace většiny analyzovaných kovů byly mezi metodami relativně konzistentní, což odpovídá původnímu očekávání. Překvapivým zjištěním však byla silně negativní korelace u Cd, Pb a Zn, což naznačuje, že tyto prvky mohou být ovlivněny procesem sušení. Budoucí výzkum by se proto mohl zaměřit na detailnější hodnocení vlivu sušení na detekovatelnost jednotlivých kovů a jejich možnou redistribuci v biologických vzorcích. Dalším cílem práce bylo zjistit vliv kontaminace těžkými kovy na kondiční a hematologické parametry sýkor koňader. Výsledky však neprokázaly jednoznačný vliv těžkých kovů na tělesnou hmotnost, délku křídel, délku běháku nebo poměr heterofilů a lymfocytů, což bylo v rozporu s očekáváním. Přesto byly u délky běháku v případě Ni a H/L poměru v případě Pb zaznamenány trendy blízké hranici statistické významnosti, které naznačují potenciální vliv těžkých kovů na růst a imunitu mláďat. Vzhledem k přítomnosti odlehklých bodů v datech by bylo vhodné v budoucích výzkumech analyzovat větší počet jedinců. Posledním cílem práce bylo porovnat míru kontaminace těžkými kovy v trusu mláďat mezi znečištěnými a kontrolními lokalitami v České republice a Finsku. Výsledky potvrdily očekávání, že koncentrace těžkých kovů jsou vyšší ve městech a průmyslových oblastech blíže ke zdrojům znečištění, přičemž nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u Ni a Pb.

Výsledky této práce přispívají k ekotoxikologickému výzkumu a zdůrazňují význam synantropních druhů ptáků, jako jsou sýkory koňadry, pro monitorování dopadů kontaminace těžkými kovy. Bioindikátory mohou lépe než samotná analýza vzorků odebraných z prostředí odrážet skutečný vliv znečištění na fyziologii živých organismů. Lepší pochopení těchto vztahů může nejen přispět k ochraně ptáků a ekosystémů citlivých na těžké kovy, ale také rozšířit naše poznání jejich potenciálních dopadů na lidské zdraví a otevřít nové a doposud neprobávané možnosti jejich ochrany.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ABBASI, N.A., JASPERS, V.L.B., CHAUDHRY, M.J.I., ALI, S. a MALIK, R.N. Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan. *Chemosphere* [online]. 2015, 120, s. 527–537. ISSN 0045-6535. Dostupné z:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.054>.

ALBERICI, T. M., SOPPER, W. E., STORM, G. L. a kol. Trace metals in soil, vegetation, and voles from mine land treated with sewage sludge. *Journal of Environmental Quality* [online]. 1989, 18(1), s. 115–120. ISSN 0047-2425. Dostupné z:

<https://doi.org/10.2134/jeq1989.00472425001800010021x>.

ALI, H., KHAN, E. a ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry* [online]. 2019, č. 6730305, s. 1–14. ISSN 2090-9063. Dostupné z:

<https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.

ATSDR. Toxicological Profile for Nickel. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services* [online]. 2024. Dostupné z:

<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>.

BAUEROVÁ, P. Zdravotní a kondiční znaky volně žijících ptáků jako indikátory stresu a kvality prostředí. *Disertační práce*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Fakulta životního prostředí, Katedra ekologie, 2020. Dostupné z:

https://theses.cz/id/fn7jwx/zaverecna_prace.pdf?lang=cs.

BAUEROVÁ, P., VINKLER, M. a kol. Longitudinally monitored lifetime changes in blood heavy metal concentrations and their health effects in urban birds. *Science of the Total Environment* [online]. 2020, 723, s. 138002. ISSN 0048-9697. Dostupné z:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138002>.

BELSKII, E. a GREBENNIKOV, M. Snail consumption and breeding performance of pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) along a pollution gradient in the Middle Urals, Russia. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, 490, s. 114–120. ISSN 0048-9697.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.116>.

BIRGE, W. J. a BLACK, J. A. Aquatic toxicology of nickel. In: NRIAGU, J. O., ed. *Nickel in the environment*. New York: John Wiley & Sons, 1980, s. 354–355.

BLANCO, G., JIMENEZ, B., FRIAS, O., MILLAN, J. a DAVILA, J. A. Contamination with nonessential metals from a solid-waste incinerator correlates with nutritional and immunological stress in prefledgling black kites (*Milvus migrans*). *Environmental Research* [online]. 2004, 94, s. 94–101. ISSN 0013-9351. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00120-8](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00120-8).

BOHÁČ, J. Organismy jako bioindikátory měnícího se prostředí. *Životné prostredie* [online]. 1999, 33(3), s. 126–129. ISSN 0044-4863. Dostupné z:

https://publikacie.uk.sav.sk/sites/default/files/1999_3_126_129_bohac.pdf.

- BURGER, J. Effects of lead on sibling recognition in young herring gulls. *Toxicological Sciences* [online]. 1998, 43(2), s. 155–160. ISSN 1096-6080. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/toxsci/43.2.155>.
- BURGER, J. Food chain differences affect heavy metals in bird eggs in Barnegat Bay, New Jersey. *Environmental Research Section A* [online]. 2002, 90, s. 33–39. ISSN 0013-9351. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/enrs.2002.4381>.
- BURGER, J. a GOCHFELD, M. Behavioral impairments of lead-injected young herring gulls in nature. *Fundamental and Applied Toxicology* [online]. 1994, 23(4), s. 553–561. ISSN 0272-0590. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/faat.1994.1140>.
- ČERNÁ, K. Vliv složení střevní mikrobioty na kondici u ptáků. *Diplomová práce*. Praha: Univerzita Karlova, 2019. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/126348>.
- CRAMP, S., PERRINS, C. M. a BROOKS, D. J. The birds of western Palearctic - volume VII: flycatchers to shrikes. In: CRAMP, S. a BROOKS, D. J., eds. *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa*. Oxford: Oxford University Press, 1993, s. 577.
- DAVIS, A. K., MANEY, D. L. a MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* [online]. 2008, 22, s. 760–772. ISSN 0269-8463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>.
- DAUWE, T., BERVOTES, L., PINXTEN, R., BLUST, R. a EENS, M. Variation of heavy metals within and among feathers of birds of prey: effects of molt and external contamination. *Environmental Pollution* [online]. 2003, 124(3), s. 429–436. ISSN 0269-7491. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00044-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00044-7).
- DOLENSKÝ, M. Imobilizace vybraných těžkých kovů v kompozitu na bázi hořečnatofosfátového cementu. *Diplomová práce*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, Fakulta stavební, Katedra materiálového inženýrství a chemie, 2023. Dostupné z: <https://dspace.cvut.cz/bitstream/handle/10467/110554/F1-BP-2023-Dolensky-Matej-BP-MD-final-BEZ%20podpisu.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>.
- DONALDSON, G. a BRAUNE, B. Sex-related levels of selenium, heavy metals, and organochlorine compounds in American white pelicans (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 1999, 37, 110–114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002449900495>.
- DRESSLER, R. L., STORM, G. L., TZILKOWSKI, W. M. a kol. Heavy metals in cottontail rabbits on mined lands treated with sewage sludge. *Journal of Environmental Quality* [online]. 1986, 15(3), s. 278–281. ISSN 0047-2425. Dostupné z: <https://doi.org/10.2134/jeq1986.00472425001500030015x>.
- DUFFUS, J. H. "Heavy metals"—A meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2002, 74(5), s. 793–807. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>.
- EENS, M., PINXTEN, R., VERHEYEN, R. F., BLUST, R. a BERVOETS, L. Great and blue tits as indicators of heavy metal contamination in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety [online]. 1999, 44, s. 81–85. ISSN 0147-6513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1828>.

EEVA, T., BELSKII, E., GILYAZOV, A. S. a KOZLOV, M. V. Pollution impacts on bird population density and species diversity at four non-ferrous smelter sites. *Biological Conservation* [online]. 2012, 142(5), s. 1125–1132. ISSN 0006-3207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.004>.

EEVA, T., LEHIKOINEN, E. a NIKINMAA, M. Pollution-induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecological Applications* [online]. 2003, 13(5), s. 1242–1249. ISSN 1051-0761. Dostupné z: <https://doi.org/10.1890/01-5375>.

EISLER, R. Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report* [online]. 1988, 85(1.14), s. 1–134. Dostupné z: <https://semspub.epa.gov/work/03/137426.pdf>.

ESPÍN, S., MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., LEÓN-ORTEGA, M., MARTÍNEZ, J. E. a GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environmental Research* [online]. 2014, 131, s. 134–144. ISSN 0013-9351. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.015>.

FAIR, J. M. a MYERS, O. B. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* [online]. 2002, 11, s. 199–208. ISSN 0963-9292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/a:1015474832239>.

FIGURA, R. Hnízdní ztráty dutinových pěvců: sezonní vlivy a reprodukční odpovědi. *Diplomová práce*. Olomouc: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. Dostupné z: http://theses.cz/id/j9a6kw/Hnizdni_ztraty_dutinovych_pevcu.pdf.

FLORA, S. J., MITTAL, M. a MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2008, 128, s. 501–523. ISSN 0971-5916.

FRITSCH, C., COEURDASSIER, M., FAIVRE, B., BAURAND, P., GIRAUDOUX, P., BRINK, N. W. VAN DEN a SCHEIFLER, R. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: a case study of trace metal transfer to European blackbirds (*Turdus merula*). *Science of the Total Environment* [online]. 2012, 432, s. 275–287. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004>.

FURNESS, R. W., MUIRHEAD, S. J. a WOODBURN, M. Using bird feathers to measure mercury in the environment: Relationships between mercury content and moult. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 1986, 17(1), s. 27–30. ISSN 0025-326X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(86\)90801-5](https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90801-5).

GEENS, A. et al. Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment* [online]. 2010, 408, s. 1174–1179. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.029>.

GEENS, A., DAUWE, T. a EENS, M. Does anthropogenic metal pollution affect carotenoid colouration, antioxidative capacity and physiological condition of great tits (*Parus major*)?

- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2009, 150(2), s. 155–163. ISSN 1532-0456. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.007>.
- GERHARDT, A. Review of Impact of Heavy Metals on Stream Invertebrates with Special Emphasis on Acid Conditions. *Water, Air, and Soil Pollution* [online]. 1993, 66(3), s. 289–314. ISSN 0049-6979. Dostupné z: https://www.limco-int.com/wp-content/uploads/2019/04/Research_9095_1.pdf.
- GOCHFELD, M. a BURGER, J. Heavy metal concentrations in the liver of three duck species: Influence of species and sex. *Environmental Pollution* [online]. 1987, 45(1), s. 1–15. ISSN 0269-7491. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90012-1).
- GRAVELAND, J. a VAN GIJZEN, T. Arthropods and seeds are not sufficient as calcium sources for shell formation and skeletal growth in passerines. *Ardea* [online]. 1994, 82(1), s. 299–314. ISSN 0373-2266. Dostupné z: <https://doi.org/10.5253/arde.v82.p299>.
- HEIKENS, A., PEIJNENBURG, W. J. G. M. a HENDRIKS, A. J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* [online]. 2001, 113, s. 385–393. ISSN 0269-7491. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00179-2).
- HUDEC, K. a kol. Fauna ČR. Ptáci 3. Praha: Academia, 2005. ISBN 80-200-1113-7.
- JAISHANKAR, M., TSETEN, T., ANBALAGAN, N., MATHEW, B. B. a BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2014, 7(2), s. 60–72. ISSN 1337-6853. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- JANSSENS, E., DAUWE, T., BERVOETS, L. a kol. Inter- and intraclutch variability in heavy metals in feathers of great tit nestlings (*Parus major*) along a pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2002, 43, s. 323–329. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0138-2>.
- JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* [online]. 2003, 68, s. 167–182. ISSN 0007-1420. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>.
- KABATA-PENDIAS, A. Trace Elements in Soils and Plants. 4. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2010. 548 s. ISBN 978-1420093681.
- KOIVULA, M. J. a EEVA, T. Metal-related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution* [online]. 2010, 158(7), s. 2359–2370. ISSN 0269-7491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.013>.
- KRAJZINGROVÁ, T. Vliv stárnutí na hematologické parametry a reprodukční úspěšnost u sýkory koňadry (*Parus major*). *Diplomová práce*. Praha: Univerzita Karlova, 2019. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/110256>.
- LUCAS, A. M. a JAMROZ, C. Atlas of avian hematology. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1961. Dostupné z: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6392>.

- MACOMBER, L. a HAUSINGER, R. P. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* [online]. 2011, 3(11), s. 1153–1162. ISSN 1756-5901. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c1mt00063b>.
- MCGEER, J. C., BRIX, K. V., SKEAFF, J. M. a kol. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003, 22(5), s. 1017–1037. ISSN 0730-7268.
- MĚSTEK, O., ČURDOVÁ, E., KOPLÍK, R. a ZIMA, T. Přímé stanovení mědi a zinku v plné lidské krvi metodou ICP-MS. *Chemické listy* [online]. 1997, 91(12), s. 1059–1062. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_12_1059-1062.pdf.
- MIHALJEVIČ, M., STRNAD, L. a ŠEBEK, O. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* [online]. 2004, 98(3), s. 123–130. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_02.pdf.
- O'HALLORAN, J., IRWIN, S., HARRISON, S., SMIDDY, P. a O'MAHONY, B. Mercury and organochlorine content of Dipper (*Cinclus cinclus*) eggs in south-west Ireland: trends during 1990–1999. *Environmental Pollution* [online]. 2003, 123(1), s. 85–93. ISSN 0269-7491. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00336-6).
- OTS, I., MURUMÄGI, A. a HÖRAK, P. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* [online]. 1998, 12, s. 700–707. ISSN 0269-8463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x>.
- PAPANIKOLAOU, N. C., HATZIDAKI, E. G., BELIVANIS, S., TZANAKAKIS, G. N. a TSATSAKIS, A. M. Lead toxicity update. A brief review. *Medical Science Monitor*. 2005, 11(10), s. RA329–336. Epub 26. září 2005. PMID: 16192916.
- PATOČKA, J. Toxikologie I. Obecná toxikologie. *Doplňkové texty pro posluchače kombinované formy studia studijního programu „Ochrana obyvatelstva“*. České Budějovice, 2007. Dostupné z: https://www.ssps.cz/wp-content/uploads/2021/04/5_jedy_web-1.pdf.
- PEREIRA, M. G., WALKER, L. A., BEST, J. a SHORE, F. R. Long-term trends in mercury and PCB congener concentrations in gannet (*Morus bassanus*) eggs in Britain. *Environmental Pollution* [online]. 2009, 157, s. 155–163. ISSN 0269-7491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.019>.
- RAYCHAUDHURI, S. Chapter 6 - Polyamines, metallothioneins, and phytochelatins—Natural defense of plants to mitigate heavy metals. In: LUCH, A., ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 2021, s. 1–11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819487-4.00006-9>.
- RICHTER, R. Živinný režim půd: Těžké kovy v půdě. *Ústav agrochemie a výživy rostlin, MZLU v Brně* [online]. 2004. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_tk.htm.

- ROGIVAL, D., SCHEIRS, J., DE COEN, W., VERHAGEN, R. a BLUST, R. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2006, 25(1), s. 149–157. ISSN 0730-7268. Dostupné z: <https://doi.org/10.1897/04-659r1.1>.
- RUIZ, S., ESPÍN, S., RAINIO, M., RUUSKANEN, S., SALMINEN, J. P., LILLEY, T. M. a EEVA, T. Effects of dietary lead exposure on vitamin levels in great tit nestlings – An experimental manipulation. *Environmental Pollution* [online]. 2016, 213, s. 688–697. ISSN 0269-7491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.017>.
- RUIZ, S. R., ESPÍN, S., SÁNCHEZ-VIROSTA, P., SALMINEN, J. P., LILLEY, T. M. a EEVA, T. Vitamin profiles in two free-living passerine birds under a metal pollution gradient – A calcium supplementation experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2017, 138, s. 242–252. ISSN 0147-6513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.037>.
- SÁNCHEZ-VIROSTA, P., ESPÍN, S., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. a EEVA, T. A review on exposure and effects of arsenic in passerine birds. *Science of the Total Environment* [online]. 2015, 512–513, s. 506–525. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.069>.
- SCHEIFLER, R., CŒURDASSIER, M., MORILHAT, C., BERNARD, N., FAIVRE, B., FLICOTEAUX, P., GIRAUDOUX, P., NOËL, M., PIOTTE, P., RIEFFEL, D., DE VAUFLEURY, A. a BADOT, P. M. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Science of the Total Environment* [online]. 2006, 371(1–3), s. 197–205. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.011>.
- SCHUBERT, R. Bioindikation in Terrestrischen Ökosystemen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1985. ISBN 3437304755. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02853260>
- SNOEIJIS, T., DAUWE, T., PINXTEN, R., VANDESANDE, F. a EENS, M. Heavy metal exposure affects the humoral immune response in a free-living small songbird, the great tit (*Parus major*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2004, 46, s. 399–404. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00244-003-2195-6>.
- STOHS, S. J. a BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1995, 18(2), s. 321–336. ISSN 0891-5849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- SUEDEL, B. C., BORACZEK, J. A., PEDDICORD, R. K. a kol. Tropic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 1994, 136, s. 21–89. ISSN 0179-5953. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2656-7_2
- TCHOUNWOU, P. B., YEDJOU, C. G., PATLOLLA, A. K. a SUTTON, D. J. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: LUCH, A., ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*, vol. 101. Basel: Springer, 2012, s. 133–164. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.

TINBERGEN, J. M. a BOERLIJST, M. C. Nestling weight and survival in individual Great Tits (*Parus major*). *Journal of Animal Ecology* [online]. 1990, 59(3), s. 1113–1127. ISSN 0021-8790. Dostupné z: <https://doi.org/10.2307/5035>.

VAN WYK, E., VAN DER BANK, F. H., VERDOORN, G. H. a HOFMANN, D. Selected mineral and heavy metal concentrations in blood and tissues of vultures in different regions of South Africa. *South African Journal of Animal Sciences* [online]. 2001, 31(2), s. 57–63. ISSN 0375-1589. Dostupné z: <https://doi.org/10.4314/sajas.v31i2.3831>.

VANPARYS, C., DAUWE, T., VAN CAMPENHOUT, K., BERVOETS, L., DE COEN, W., BLUST, R. a EENS, M. Metallothioneins (MTs) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of The Total Environment* [online]. 2008, 401(1–3), s. 184–193. ISSN 0048-9697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.009>.

STOHS, S. J. a BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1995, 18(2), s. 321–336. ISSN 0891-5849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).

WIDEMAN, R. F. Jr. a COWEN, B. S. Effect of dietary acidification on kidney damage induced in immature chickens by excess calcium and infectious bronchitis virus. *Poultry Science* [online]. 1987, 66(4), s. 626–633. ISSN 0032-5791. Dostupné z: <https://doi.org/10.3382/ps.0660626>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Inorganic lead. *World Health Organization* [online]. 1995. Dostupné z: <https://iris.who.int/handle/10665/37241>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 221: Zinc. *World Health Organization* [online]. 2001. Dostupné z: <https://iris.who.int/handle/10665/42337>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, REGIONAL OFFICE FOR EUROPE a JOINT WHO/CONVENTION TASK FORCE ON THE HEALTH ASPECTS OF AIR POLLUTION. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. *World Health Organization, Regional Office for Europe* [online]. 2007. Dostupné z: <https://iris.who.int/handle/10665/107872>.

ZARGAR, S. M., MAHAJAN, R., FARHAT, S., NAZIR, M., AHMAD, R. M., SALGOTRA, R. K. a MALLICK, S. A. Understanding the role of iron and zinc in animals and crop plants from genomics perspective. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* [online]. 2015, 9(2), s. 182–196. ISSN 0973-8916. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Understanding-the-Role-of-Iron-and-Zinc-in-Animals-Zargar-Mahajan/0622381859c4ef60811003cc12bdbb5bb5027dce>.

ZAROOGIAN, G. E. a JOHNSON, M. Nickel uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 1984, 13, s. 411–418. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01056256>.

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

8.1 Obrázky

Obrázek 1: Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>). Foto: Natalie Salem.....	13
Obrázek 2: Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>) během kroužkování. Foto: Natalie Salem	16
Obrázek 3: Vlevo ptačí budka určená k monitorování hnízdění dutinových pěvců, včetně sýkory koňadry. Vpravo kontrola snůšky sýkory koňadry v terénu. Foto: Natalie Salem.	17
Obrázek 4: Měření hmotnosti mláděte sýkory koňadry pomocí digitální váhy v terénu. Foto: Natalie Salem.	18
Obrázek 5: Příprava krevních nátěrů v terénu během sběru dat. Foto: Natalie Salem.	19
Obrázek 6: Barvení krevních nátěrů panoptickou metodou podle Pappenheima. Foto: Natalie Salem.	20
Obrázek 7: Vlevo tlakové mikrovlnné rozkladné zařízení Speedwave Xpert použité pro digesti vzorků. Vpravo ředění vzorků po digesti pro následnou analýzu metodou ICP-MS. Foto: Natalie Salem.	21
Obrázek 8: Přístroj Agilent 7900 ICP-MS použitý pro analýzu koncentrace těžkých kovů metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS). Foto: Natalie Salem.	23
Obrázek 9: Korelační matice znázorňující vztahy mezi kondičními parametry mláďat sýkor koňader z pražských lokalit. Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).	26
Obrázek 10: Závislost tělesné hmotnosti (g) mláďat sýkor koňader na jejich věku.....	27
Obrázek 11: Závislost délky běháku (mm) mláďat sýkor koňader na jejich věku.	27
Obrázek 12: Závislost délky křídel (mm) mláďat sýkor koňader na jejich věku.	28
Obrázek 13: Korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty a jejich statistickou významnost (p-hodnoty) pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích krve (wet). Statisticky významné hodnoty jsou podbarveny zeleně (tmavší odstíny značí nižší p-hodnoty), zatímco síla korelace je vyjádřena odstíny oranžové (tmavší barvy značí silnější vztah).	28
Obrázek 14: Grafická korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích krve (wet). Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).	29
Obrázek 15: Korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty a jejich statistickou významnost (p-hodnoty) pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích trusu. Statisticky významné hodnoty jsou podbarveny zeleně (tmavší odstíny = nižší p-hodnoty), zatímco síla korelace je vyjádřena odstíny oranžové (tmavší odstíny = silnější vztah).	29
Obrázek 16: Grafická korelační matice znázorňující Spearmanovy korelační koeficienty pro koncentrace těžkých kovů ve vzorcích trusu (fecal). Barva bodů vyjadřuje směr korelace (modrá = pozitivní, červená = negativní) a jejich velikost odpovídá síle vztahu (větší kruhy = silnější korelace).	30
Obrázek 17: Spearmanova korelace mezi koncentrací Cr (chrom) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mláďat sýkor koňader ($r_s = 0.604$, $p = 0.002$).	31

Obrázek 18: Spearmanova korelace mezi koncentrací Fe (železa) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.536$, $p = 0.006$).	31
Obrázek 19: Spearmanova korelace mezi koncentrací Ca (vápník) v krvi [mg/g] a trusu [ppm] mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.426$, $p = 0.049$).	32
Obrázek 20: Korelace mezi koncentracemi Cr (chrom) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.631$, $p < 0.001$ ***).	33
Obrázek 21: Korelace mezi koncentracemi Fe (železo) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.392$, $p = 0.054$).	33
Obrázek 22: Korelace mezi koncentracemi Ca (vápník) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.710$, $p < 0.001$ ***).	34
Obrázek 23: Korelace mezi koncentracemi Ni (nikl) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.861$, $p < 0.001$ ***).	34
Obrázek 24: Korelace mezi koncentracemi Cd (kadmium) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = -0.833$, $p = 0.008$).	35
Obrázek 25: Korelace mezi koncentracemi Pb (olovo) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = -0.609$, $p = 0.002$).	35
Obrázek 26: Korelace mezi koncentracemi As (arsen) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.441$, $p = 0.053$).	36
Obrázek 27: Korelace mezi koncentracemi Cu (měď) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = 0.615$, $p = 0.003$).	36
Obrázek 28: Korelace mezi koncentracemi Zn (zinek) ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry) mlád'at sýkor koňader ($r_s = -0.561$, $p = 0.004$).	37
Obrázek 29: Regresní vizualizace vztahu mezi koncentrací niklu (Ni, $\mu\text{g/g}$) v krvi a délkou běháku (mm) mlád'at sýkor koňader. Regresní přímka představuje trend vztahu.	38
Obrázek 30: Regresní vizualizace vztahu mezi koncentrací olova (Pb, $\mu\text{g/g}$) v krvi a H/L poměrem mlád'at sýkor koňader. Regresní přímka představuje trend vztahu.	39
Obrázek 31: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích niklu (Ni) v trusu mlád'at sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted). Příloha 9: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích olova (Pb) v trusu mlád'at sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	40
Obrázek 32: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích olova (Pb) v trusu mlád'at sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted). Příloha 10: Výsledky lineárního modelu	

testujícího rozdíly v koncentracích železa (Fe) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	41
Obrázek 33: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích železa (Fe) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted). Příloha 11: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích vápníku (Ca) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	42
Obrázek 34: Boxplot znázorňující rozdíly v koncentracích vápníku (Ca) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami v České republice (CZ) a Finsku (FI). Zelená barva označuje kontrolní oblasti (Control), červená znečištěné oblasti (Polluted).	43

8.2 Tabulky

Tabulka 1: Výsledky lineárních modelů testujících vztah věku mláďat sýkor koňader na jejich kondiční parametry. Uvedeny jsou hodnoty F-statistiky, stupně volnosti (df) a p-hodnoty pro jednotlivé modely. Statisticky významné výsledky ($p < 0.05$) jsou označeny hvězdičkou.	26
Tabulka 2: Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a trusu. Hodnoty představují Spearmanův korelační koeficient (r_s) a odpovídající p-hodnotu testu statistické významnosti.	30
Tabulka 3: Korelace mezi koncentracemi těžkých kovů ve vzorcích krve odebrané na standardní objem (wet) a krve odebrané do ethanolu a následně vysušené (dry). Hodnoty představují Spearmanův korelační koeficient (r_s) a odpovídající p-hodnotu testu statistické významnosti.	32
Tabulka 4: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a tělesnou hmotností mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.	37
Tabulka 5: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a délkou běháků mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.	38
Tabulka 6: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a délkou křídel mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.	38
Tabulka 7: Výsledky lineárního modelu testujícího vztah mezi koncentracemi těžkých kovů v krvi a H/L poměrem mláďat sýkor koňader. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty jednotlivých vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.	39
Tabulka 8: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích niklu (Ni) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a odpovídající p-hodnoty.	40

Tabulka 9: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích olova (Pb) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	41
Tabulka 10: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích železa (Fe) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	42
Tabulka 11: Výsledky lineárního modelu testujícího rozdíly v koncentracích vápníku (Ca) v trusu mláďat sýkor koňader mezi lokalitami. Uvedeny jsou F-statistika pro celý model, t-hodnoty vysvětlujících proměnných, stupně volnosti (df) a p-hodnoty.	43

9 PŘÍLOHY

9.1 Úvodní ilustrace sýkory koňadry



Příloha 1: Originální ilustrace vytvořená jako úvodní vizuální prvek k tématu práce. Znárodníje sýkoru koňadru při krmení mláďat hmyzem v hnízdní dutině. Autor: Natalie Salem

9.2 Přehled repeatability pro jednotlivé parametry v rámci stejného hnízda

Nejdříve byla testována repeatabilita (opakovatelnost) hematologických a kondičních parametrů v rámci stejného hnízda. Hodnoty repeatability se pohybovaly od 0 do 0.939, přičemž nejvyšší byla u délky křídla ($R = 0.939$) a nejnižší u eosinofilů ($R = 0$).

R	Lymfocyty	Heterofily	Basofily	Eosinofily	Monocyty	H/L	Tělesná hmotnost	Délka křídla	Délka běháku
	0.476	0.606	0.254	0	0.323	0.57	0.869	0.939	0.82

Příloha 2: Repeatabilita hematologických a kondičních parametrů v rámci stejného hnízda.

9.3 Korelační matice vztahů mezi kondičními parametry

	délka křídel	hmotnost	délka běháku
délka křídel		0.77	0.79
hmotnost	0		0.79
délka běháku	0	0	

Příloha 3: Korelační matice vztahů mezi tělesnou hmotností, délkou běháku a délkou křídel mláďat sýkor koňader na pražských lokalitách. Statisticky významné hodnoty jsou podbarveny zeleně (tmavší odstíny značí nižší p-hodnoty), zatímco síla korelace je vyjádřena odstíny oranžové (tmavší barvy značí silnější vztah).

9.4 Terénní dokumentace sýkory koňadry



Příloha 4: Manipulace s mládětem sýkory koňadry při terénní části výzkumu. Foto: Natalie Salem



Příloha 5: Manipulace s mládětem sýkory koňadry při terénní části výzkumu. Foto: Natalie Salem