

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Základní hematologické parametry a jejich
ovlivnění cizorodými látkami u kapra obecného –
přehledová studie**

Autor: Daniela Polanská

Vedoucí bakalářské práce: MVDr. Veronika Piačková, PhD.

Konzultant bakalářské práce: Mehrak Mohammadi, M.Sc.

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: prezenční

Ročník: 3.

Vodňany, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí MVDr. Veronice Piačkové, Ph.D. za cenné rady, které mi poskytovala při psaní bakalářské práce, a za odborné vedení. Děkuji také rodině a příteli, kteří mě při psaní bakalářské práce podporovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela POLANSKÁ**
Osobní číslo: **V14B054P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Název tématu: **Základní hematologické parametry a jejich ovlivnění
cizorodými látkami u kapra obecného - přehledová studie**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je formou rešerše sumarizovat dostupné informace o vlivu různých cizorodých látek (toxických kovů, pesticidů, léčiv,...) na základní hematologické ukazatele.

Metodický postup:


Práce bude spočívat ve studiu vědecké literatury vztahující se k zadanému tématu a v přehledném zpracování doposud publikovaných výsledků výzkumu.

Práce by měla obsahovat metodiku stanovení základních hematologických parametrů u ryb (počty červených a bílých krvinek, koncentrace hemoglobinu, hematokrit, eventuálně diferenciální počet bílých krvinek) a publikované změny jejich hodnot u kapra obecného v důsledku expozice cizorodým látkám.

Rozsah grafických prací: **podle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 50 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **MSc. Mehrak Mohammadi**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **11. prosince 2015**
Termín odevzdání bakalářské práce: **6. května 2016**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 21. března 2016

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, FROV JU, č. 122: 38 s. (certifikovaná metodika) Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. Edice Metodik, FROV JU, č. 160: 56 s. (certifikovaná metodika) Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Furl, M., Knotková, Z., Pejšilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003. Veterinární hematologie. Noviko, Brno, 464pp.(inCzech). Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J., 1975. Veterinary Hematology, 3th edition. Lea & Febiger, Philadelphia: 807 s. Agrawal, S.J., Srivastava, A.K., 1980. Hematological responses in a fresh water fish to experimental manganese poisoning. Toxicology 17: 97-100. Jenkins, F., Smith, J., Rajanna, B., Shameem, U., Umadevi, K., Sandhya, V., Madhavi, R., 2003. Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp *Cyprinus carpio*. Bull Environ Contam Toxicol 70: 993-997. Luskova, V. 1997. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. Acta Sc Nat Brno 31 (5): 70-78. Mikula, P., Modra, H., Nemethova. D., Groch, L., Svobodova, Z., 2008. Effects of subchronic exposure to LASSO MTX_ (Alachlor 42% W/V) on hematological indices and histology of common carp, *Cyprinus carpio* L. Bull Environ Contam Toxicol 81: 475-479. Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J., Zlabek, V., 2001. The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet Brno 70: 457-465. Dörücü, M., Girgin, A., 2001. The effect of cypermethrin on some haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Aquacult. Int. 9: 183-187. Modesto, K.A.,Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb in fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere 81: 781-787. Sopińska, A., 1983. Effect of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. Variability of hematological indices of carp in relation to age and gonad maturity state. Acta Ichthyol. Piscat. 8: 59-81. Sopińska, A., Guzl, L., 1998. Influence of permethrin on phagocytic activity of carp. Med. Wet. 54: 126-128. (In Polish). Svetina, A., Matašin, Z., Tofant, A., Vučemilo, M., Fijan, N., 2002. Hematology and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. Acta Vet. Hung. 50: 459-467. Svobodová, Z., Lusková, V.,Drastichová, J., Svoboda, M., Žlábek, V. 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno 72: 79-85. Velisek, J., Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., 2010. Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicol. Environ. Safety 73: 384-390. Velisek, J., Svobodova, Z., Machova, J., 2009. Effects of bifenthrin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Physiol. Biochem. 35: 583-590. Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Sudova, E., 2009. Effects of acute exposure to metribuzin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of Common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bull. Environ. Cont. Toxicol. 82: 492-495. Luskova, V.: Determination of normal values in fish hematology. Acta Univ. Carol. Biologica, 1996, 39: 191-200. Neskovic, N.K., Elezovic, I., Karan, V., Poleksic, V., Budimir, M., 1993. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 25,173-182. Oropesa, A.L., Garcia-Camberso, J.P., Gomez, L., Roncero, V., Soler, F., 2009. Effect of

long-term exposure to simazine on histopathology, hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol.* 24, 187-199.

Svobodova, Z., Pecena, M., 1988. Changes in the red and white blood picture of carp after acute exposure to toxic substance. *Bull. RIFCH Vodnany*

Obsah

Úvod	11
1 Kapr obecný	12
1.1 Obecná charakteristika	12
1.2 Způsob života	13
1.3 Původ	14
1.4 Rozšíření	15
1.5 Produkční využití	15
1.6 Výzkumné využití	16
2 Rybí krev	17
2.1 Složení.....	18
2.1.1 Krevní plazma	18
2.1.2 Erytrocyty (červené krvinky)	18
2.1.3 Leukocyty (bílé krvinky).....	19
2.1.4 Trombocyty	19
2.2 Tvorba	20
2.3 Funkce jednotlivých složek.....	21
2.3.1 Funkce erytrocytů.....	21
2.3.2 Funkce leukocytů	21
2.3.3 Funkce trombocytů.....	22
2.4 Odběr krve.....	22
3 Metody stanovení hematologických ukazatelů u ryb	24
3.1 Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu	24
3.1.1 Stanovení počtu erytrocytů (Er, RBC)	24
3.1.2 Stanovení hematokritu (Hk, PCV)	26
3.1.3 Stanovení koncentrace hemoglobinu (Hb).....	26
3.1.4 Stanovení methemoglobinu (MetHb).....	27
3.1.5 Stanovení základních hodnot erytrocytu a jejich výpočet.....	28

3.1.6	Stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů.....	29
3.2	Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu	30
3.2.1	Stanovení počtu leukocytů (Leuko, WBC)	30
3.2.2	Stanovení leukokritové hodnoty (Lk, BC)	30
3.2.3	Diferenciální rozpočet leukocytů (leukogram)	31
3.2.4	Stanovení leukogramu.....	34
4	Látky kontaminující vodní prostředí a jejich vliv na hematologické ukazatele kapa obecného	37
4.1	Sloučeniny dusíku	38
4.1.1	Amoniak.....	38
4.1.2	Dusitany	39
4.1.3	Kyanidy.....	41
4.2	Kovy.....	41
4.2.1	Zinek	42
4.2.2	Měď.....	43
4.2.3	Železo.....	43
4.3	Těžké kovy	44
4.3.1	Rtuť	45
4.3.2	Kadmium.....	45
4.3.3	Olovo.....	46
4.3.4	Chrom.....	47
4.4	Ropné látky	47
4.5	Pesticidy.....	48
4.5.1	Organofosfáty.....	48
4.5.2	Triaziny a diaziny.....	49
4.5.3	Pyretriody.....	50
4.6	Léčiva a přírodní doplňky	50
4.7	Perzistentní organické polutanty	51

5	Závěr.....	53
6	Seznam použité literatury	55
7	Seznam zkratek.....	67

Úvod

Ryby žijí v nejtěsnějším možném kontaktu s vodním prostředím, které je zejména v poslední době ve velké míře ovlivňováno různými formami znečištění, ať už přírodního či antropogenního charakteru. Pro studium vlivu cizorodých látek na vodní ekosystémy je využívána řada doprovodných biochemických a hematologických stanovení, která nám mohou pomoci objasnit vliv působení znečišťujících látek na živý organismus.

Výsledky hematologických vyšetření nám mohou o stavu a změnách v organismu ryb mnohé říct, proto jsou tato vyšetření mimo jiné v současné době využívána k posouzení vlivu cizorodých látek znečišťujících vodní prostředí.

Cílem této práce je formou přehledové studie shrnout metody stanovení základních hematologických parametrů a shromáždit co nejvíce informací o cizorodých látkách, které tyto parametry ovlivňují. Pro svou bakalářskou práci jsem z hlediska cizorodých látek vybrala sloučeniny dusíku, které jsou jako jediné z vybraných látek přírodního původu, dále pak kovy, těžké kovy, ropné látky, pesticidy, léčiva a přírodní doplňky a perzistentní organické polutanty. Tato práce se zaměřuje na kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.), naši hospodářsky nejvýznamnější rybu. Nedílnou součástí práce je tedy kapitola o kapru obecném, která se zabývá jeho obecnou charakteristikou, způsobem života, původem apod. Zahrnuta je i kapitola o krvi, jejích složkách a popsány jsou i funkce jednotlivých složek.

1 Kapr obecný

Kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) je sladkovodní paprskoploutvá ryba z čeledi kaprovití (*Cyprinidae*), což je nejpočetnější skupina sladkovodních ryb. Čeleď kaprovití čítá drobné (od 12 mm) až velké ryby (do 1,5 m) různého tvaru těla, které je nejčastěji torpédovité nebo bočně zploštělé (Gaisler a Zima, 2007). Kaprovité ryby mají bezzubé čelisti a požerákové zuby na posledním páru žaberních oblouků. Kromě několika hospodářsky bezvýznamných druhů tato čeleď zahrnuje zejména ryby hospodářsky významné (Mihálik a Reiser, 1986).

1.1 Obecná charakteristika

Kapr obecný je ryba s protáhlým zploštělým tělem, které je celé nebo z části kryto cykloidními šupinami. Podle pokrytí šupinami pak rozlišujeme kapra šupinatého, lysého, řádkového nebo hladkého. Kapr je velmi variabilní druh, u cizokrajných forem se setkáváme jak s různým zbarvením a ošupením, tak i tvarem těla a proporcemi. V našich podmínkách může zbarvení odrážet zejména stáří ryby, genetický základ nebo zásobu tuku, přičemž kapři s vyšším obsahem tuku v těle mají žlutější barvu. Hřbet kapra obecného je ve většině případů tmavší barvy (tmavě zelený, hnědý až hnědočervený), boky jsou nažloutlé a spodní břišní strana je světlá bělavá. Ploutve kapra obecného jsou mohutné a tvrdé paprsky jsou velmi silné. Ploutve jsou v barvě hřbetu, ale mohou mít i načervenalý nádech. Oproti domestikovanému kapru obecnému má původní divoká forma (zvaná sazan) tělo nižší a celé je kryto šupinami (Hanel a Lusk, 2005).

Jak již bylo zmíněno, podle typu pokrytí těla šupinami rozlišujeme kapra šupinatého, lysého, řádkového a hladkého. Kapr šupinatý má celé tělo kryté šupinami. Lysý kapr má šupiny nepravidelného tvaru, které nepokrývají celé tělo. Šupiny jsou navíc rozmístěny nerovnoměrně. Nejčastěji se nachází poblíž hlavy, ocasu, hřbetní ploutve nebo podél postranní čáry. Kapr řádkový má řadu šupin podél postranní čáry a podél hřbetní linie. Jeho šupiny jsou též nepravidelné jak svým tvarem, tak velikostí. Hladká forma kapra má celé tělo bez šupin. Šupiny se mohou vyskytovat ojediněle na hřbetní části těla nebo u ocasní ploutve, popř. i u ostatních ploutví (Mihálik a Reiser, 1986). Nepřítomnost šupin je podle Luska a kol. (1992) znakem nízké životnosti.

Polospodní ústa kapra obecného jsou opatřena dvěma páry vousků, z nichž menší pár je na horní čelisti, je tmavší a u menších ryb hůře rozpoznatelný. Druhý delší pár je v koutcích úst a je světlejší (Baruš a kol., 1995). Ústa kaprovitých ryb jsou vysunovatelná. Velikost a tvar rybích úst je přizpůsoben druhu přijímané potravy a jejímu příjmu (Dvořák a Pyszka, 2014).

Kapr je jednou z největších kaprovitých ryb, dorůstá délky až 120 cm a hmotnosti překračující 30 kg (Čihař a Malý, 1978).

1.2 Způsob života

Kapr obecný obývá pomalu tekoucí a stojaté vody, dobře prosvětlené, nejčastěji s velkou úživností a bahnitým dnem. Za slunného počasí plavou při hladině, naopak v chladnějších dnech se zdržují spíše u dna (Hanel a Lusk, 2005). Kapr je ryba teplomilná a optimální teplota vody je 20-25 °C (Lusk a kol., 1992). Při teplotě vody 5 °C kapři přestávají přijímat potravu a zdržují se v hejnech u dna. Tam kapři setrvávají až do oteplení vody (Reiser, 1996).

Co se týče nároků na kyslíkové poměry, požadovaný obsah rozpuštěného kyslíku je podle Dungela a Řeháka (2005) ve vegetačním období nad 6,5 mg.l⁻¹ a v zimě by neměl klesnout pod 3 mg.l⁻¹. Pokud hodnota rozpuštěného kyslíku klesne pod 0,5 mg.l⁻¹, dochází u kaprů k nouzovému dýchání a kapři tzv. „troubí“ u hladiny (Hanel a Lusk, 2005).

Kapr pohlavně dospívá ve třetím nebo čtvrtém roce života, přičemž samci dospívají obvykle o rok dříve než samice (Čihař, 1993). Vytírá se při teplotě 16-18 °C (v květnu a červnu) v mělkých místech. (Mihálik a Reiser, 1986). Podle Čihaře a Malého (1978) se v době tření, které probíhá většinou v květnu a v červnu, kapři shlukují do hejn a vytírají se na zatopenou vegetaci. Jikry se přilepují na vodní rostlinstvo nebo na zatopené rostliny kolem břehů. Samotné tření probíhá hlavně v ranních hodinách. Jedna samice dokáže vyprodukovat až milion jiker (Hanel a Lusk, 2005). Mihálik a Reiser (1986) ve své knize uvádějí, že na 1 kg hmotnosti ryby připadá 100 000 až 200 000 jiker. Lusk a kol. (1992) uvádějí menší rozpětí; 120 000 až 130 000 jiker na 1 kg hmotnosti ryby.

Rychlost kulení plůdku z jiker závisí na teplotě vody. Při teplotě vody 15 °C kulení plůdku nastává po 5 dnech, při teplotě 20 °C po 3 dnech (Čihař, 1993). Vstřebání žloutkového váčku nastává po 8-10 dnech (Mihálik a Reiser, 1986).

Plůdek kapra obecného se živí planktonem (hrotnatky, buchanky, vířníci), odrostlejší plůdek vyhledává např. larvy pakomárů, později různý hmyz nebo drobné řasy (Mihálik a Reiser, 1986) a dospělci se živí bentosem, což ve své publikaci uvádí i Lusk a kol. (1992). V přírodě kapři přijímají potravu zejména večer a v noci (Čihař, 1993). Jejich poměrně pestrá potravní škála zahrnuje převážně larvy vodního hmyzu, ploštice, červy, měkkýše ale i řasy a části vyšších rostlin (Dungel a Řehák, 2005), což potvrzuje ve své publikaci i Čihař a Malý (1978), a to zejména ve vodách, které jsou silně zarostlé. Baruš a kol. (1995b) ve své publikaci uvádí, že kapra je možné vycvičit na příjem potravy v určitou hodinu nebo na příjem potravy po zvukovém signálu.

Kapr patří mezi středněvěké ryby a podle Luska a kol. (1992) se nejstarší jedinci dožívají i 20-30 let.

1.3 Původ

Divoký předchůdce kapra má původ v oblasti Černého a Kaspického moře a Aralského jezera (Mihálik a Reiser, 1986), odkud byl šířen jak na východ, tak i na západ do řeky Dunaje. Právě tam můžeme najít nyní silně ohroženou původní divokou formu kapra (Balon, 1995).

Podle Mišíka (1958) existují tři odlišné skupiny divokého kapra: (1) evropská forma kapra, která je zastoupena v oblasti Dunaje; (2) východoasijská forma z oblasti Sibiře a Číny; (3) divoká forma kapra z oblasti Aralského jezera a dalších středoasijských regionů, která v určitém ohledu úzce souvisí s evropskou formou, v jiném naopak s formou východoasijskou. Podle Balona (1995) je rozdílnost divoké formy kapra z oblasti západní části centrální Asie dána jejím brzkým geologickým věkem. Pokud je tato západní část střední Asie centrem původu divoké formy kapra, její potomci měli delší dobu vyvinout se v izolaci než kapři, kteří byli rozšířeni na východ a na západ v posledním postglaciálním období.

Nicméně dnes můžeme identifikovat jen dva poddruhy: (1) evropská forma divokého kapra *Cyprinus carpio carpio* a (2) asijská forma *Cyprinus carpio*

haematopterus (Balon, 1995), které se podle Mišika (1958) liší v počtu žaberních tyčinek; *C. c. haematopterus* (27) jich má méně než *C. c. carpio* (32).

Podle Balona (1995) je původní divoká forma kapra ryba se silným protáhlým tělem torpédovitého tvaru s velkými pravidelnými šupinami žlutohnědé barvy, které podle Čihaře (1993) pokrývají vždy celé tělo. Divoký kapr má hnědozelený či šedozelený tmavý hřbet, světlejší boky olivové barvy a žlutobílé břicho. Nepárové ploutve divoké formy kapra jsou šedomodré, někdy s nádechem do červena, a párové načervenalé.

V roce 1983 byl z Ukrajiny do jihočeských Vodňan dovezen amurský sazan, čímž se zkomplikovalo taxonomické zařazení našich kaprů. Posouzení původnosti divokých forem kapra je značně obtížné, protože divoká forma se poměrně snadno kříží s domestikovanou formou (Hanel a Lusk, 2005).

Podle Dungela a Řeháka (2005) vznikly rybniční formy domestikací dunajského sazana a první zmínky o jejich chovu v českých zemích pocházejí již z 11. století. Už Římané si uvědomovali důležitost ryb a přesazovali říční kapry do rybníků ve vojenských táborech a osadách, aby měli ryby kdykoli k dispozici (Vostradovský, 2015).

1.4 Rozšíření

Kapr obecný je druh, který se díky člověku dostal do mnoha evropských zemí (Hanel a Lusk, 2005). Introdukován byl do většiny zemí Evropy a i do některých mimoevropských zemí, např. do Arménie. Dnes je kapr rozšířen celosvětově (Lusk a kol., 1992).

V České republice se domestikovaný kapr objevuje díky vysazování v mnoha lokalitách a je naší nejrozšířenější rybou (Hanel a Lusk, 2005).

1.5 Produkční využití

Systém chovu je výsledkem dlouholetého vývoje a je určován především požadavky spotřebitelů (Lusk a kol., 1992).

Domestikovaná forma je dnes naší hlavní užitkovou rybou, o čemž může vypovídat fakt, že v posledních letech se u nás vyloví až 19 000 tun kaprů za rok (Gaisler a Zima,

2007). Při intenzivním krmení je u nás možné dosáhnout produkce až 2,5-4 tun na hektar. Chov kapra tvoří více než 85% celkové produkce ryb u nás (Lusk a kol., 1992). Mihálik a Reiser (1986) ve své publikaci uvádějí, že kapr je populární zejména díky rychlému růstu a výbornému masu. Růst je podle Baruše a kol. (1995b) určen potravními podmínkami (nabídka, složení, kvalita), dále také teplotou vody, kyslíkovými poměry nebo zdravotním stavem.

Podle Čihaře a Malého (1978) se v rybníkářství využívala divoká forma kapra pro křížení s kulturními rasami. Nově vzniklí jedinci byli pak odolnější vůči infekčním onemocněním a rychleji rostli. Při křížení kapra obecného s karasem, mají jedinci dva páry krátkých vousků, jsou obvykle neplodní a rostou naopak pomaleji.

Kapři se vysazují jednak jako plůdek o hmotnosti 30-50 g nebo jako násada o hmotnosti zhruba 200-500 g (Čihař a Malý, 1978).

1.6 Výzkumné využití

Abychom mohli snižovat rizika působení a dopadu toxických látek na životní prostředí, je důležité znát jejich účinky. Za účelem stanovení vlivů toxických látek na organismy slouží testy toxicity, při kterých se sleduje, v jakých koncentracích či dávkách se účinek projevuje.

Testy toxicity na vodních organismech, tedy i na rybách, patří mezi nejrozšířenější. Jedním z druhů, používaných k testům toxicity je i kapr obecný. Testy toxicity se využívají například při vyhodnocování vlivů nových chemických látek (Štěpánová, 2014). Kapr obecný je také využíván při zkoumání virových, bakteriálních a parazitárních onemocnění ryb (Kašpar a kol., 2014).

Výsledkem chronických testů toxicity na rybách je nejvyšší přípustná koncentrace (NPK) testované chemické látky. K testům bývá mimo jiné používán jednoletý plůdek kapra o hmotnosti 50-70 g. Tyto testy trvají 90 až 100 dnů. Po vypracování testu a vyhodnocení výsledků různých parametrů se vyhodnotí již zmíněná NPK (Svobodová a Vykusová, 1989).

Kapr obecný může být využit i při akutních testech toxicity. Výsledkem těchto testů je hodnota LC50 (Svobodová a kol., 1996). Výsledné hodnoty LC50 pak umožní zařadit testované látky do určitých tříd toxicity (Svobodová a kol., 2000).

2 Rybí krev

Rybí krev je tekutina červené barvy, která se skládá ze dvou složek – ze složky tekuté a z pevných součástí. U ryb představují pevné součásti zhruba 15-40 % objemu krve. Tekutou složku tvoří krevní plazma a pevné součásti jsou tvořeny červenými a bílými krvinkami a krevními destičkami (Novotný a kol., 1966) Krev je uzavřena v cévách a splňuje určité funkce, které budou podrobně popsány v podkapitole „Funkce jednotlivých složek“.

Množství krve v těle tvoří zhruba 1-2 % celkové hmotnosti (Pravda a Svobodová, 2003), což je méně než například u savců (zhruba 8%). Množství krve oproti celkové hmotnosti se může lišit v závislosti na pohybové aktivitě druhu nebo na jiných faktorech (Dubanský a Svobodová, 1995).

Krevní oběh ryb

Krevní oběh ryb je tvořen srdcem a soustavou cév – tepnami, krevními vlásečnicemi a žilami. Srdce ryb je poměrně malé a nachází se v kraniální části tělní dutiny, těsně za kaudálním okrajem žaberních víček. Srdce ryb se skládá ze čtyř oddílů: žilného splavu, předsíně, komory a tepenného násadce (Pravda a Svobodová, 2003). Stěna rybiho srdce se skládá ze 3 vrstev: epikard, myokard a endokard. Epikard je vnější vrstva skládající se ze zploštělých buněk. Myokard není na všech místech stejný, liší se svou tloušťkou, která závisí na pohlaví ryby nebo jejím věku a také na části srdce, které obklopuje. Endokard se skládá z jedné silnější vrstvy buněk (Genten a kol., 2009). Srdce je obaleno osrdečnickovou blanou a chráněno pletencem kostí lopatkového pásma (Baruš a kol., 1995a). Srdce zajišťuje neustálý pohyb krve v cévách. Tepová frekvence je ovlivněna mnohými faktory, kterými mohou být např. druh ryby, její velikost, teplota vody, obsah rozpuštěného kyslíku a jiných látek ve vodě, věk ryby, pohybová aktivita aj. (Bayli, 1994). Konkrétně u kapra je průměrná tepová frekvence 18-30 tepů za minutu. V období zimního spánku se tepová frekvence snižuje; u kapra obecného až na 1-2 tepy za minutu (Lagler, 1977).

Rybím srdcem protéká pouze odkysličená krev, je tzv. žilného typu. Krev je ze srdce přiváděna břišní aortou směrem k žabernímu ústrojí. Aorta se poté větví a do jednotlivých žaberních oblouků vstupují žaberní tepny. Ve vlásečnicovém systému žaber dochází k okysličení krve, která je dále vedena do hlavní tělní tepny hřbetní aorty.

Z té pak vedou dvě krkavice, které zásobují mozek a hlavu. Směrem kaudálním je do těla krev vedena aortou, která se postupně zužuje a přechází v ocasní tepnu. Větvením tepen až na vlasečnice je okysličená krev přiváděna k jednotlivým orgánům. Odkysličená krev je sbírána systémem žil a odváděna do srdce (Pravda a Svobodová, 2003).

2.1 Složení

Jak již bylo uvedeno v úvodu této kapitoly, rybí krev se skládá z krevní plazmy, červených a bílých krvinek (erytrocytů a leukocytů) a krevních destiček (trombocytů).

2.1.1 Krevní plazma

Krevní plazma je nažloutlá tekutina, která má u kapra obecného pH 7,6. Krevní plazma je vodný roztok, který obsahuje bílkoviny, tuky, cukry aj. (Manohey a McNulty, 1992). Dále se v krevní plazmě vyskytují enzymy a další látky nezbytné pro metabolismus buněk (Masopust, 2000).

Součástí krevní plazmy je i fibrinogen, který způsobuje srážení krve. Při otevření oběhové soustavy se mění na nerozpustný fibrin vláknité struktury (Novotný a kol., 1966)

2.1.2 Erytrocyty (červené krvinky)

Erytrocyty ryb jsou oválné plnohodnotné buňky s oválným jádrem, které se nachází ve středu buňky, a dosahují konkrétně u kapra obecného velikosti 12 μm (Svobodová a kol., 2012). Obsahují krevní barvivo hemoglobin, které buňkám dodává červenou barvu a tvoří více než třetinu celkové hmoty erytrocytů. Hemoglobin se skládá z bílkovinné části (globin) a barevné složky, která obsahuje železo (hem). Tyto barevné složky na sebe váží dvojmocné železo a při oxidaci trojmocné (Novotný a kol., 1966).

Počet erytrocytů se druhově liší a u kapra obecného je to zhruba 1,8 milionu v mm^3 krve (Novotný a kol., 1966). Jejich počet je ovlivněn řadou faktorů, mezi něž patří např. věk, pohlaví, roční období (Genten a kol., 2009), kondice, pH krve nebo koncentrace kyslíku v krvi. Počet erytrocytů se snižuje i během tření a v době zvýšené pohlavní aktivity. Během embryonálního a larválního vývoje je výskyt erytrocytů omezen, ale jejich počet se s věkem a růstem zvyšuje. V důsledku intenzivnějšího metabolismu mají samci větší počet červených krvinek než samice (Lusková, 1996).

Nízký počet erytrocytů je podle Luskové (1996) kompenzován relativně velkým povrchem erytrocytů, který můžeme vyjádřit jako střední objem erytrocytu (MCV – Mean Cell Volume). Jeho hodnota je u kapra obecného 200-300 fl (1 fl (femtolitr) = 1 μm^3).

Podle Novotného a kol. (1966) jsou červené krvinky pružné, díky čemuž mohou např. při průchodu jemnými vlasečnicemi dočasně změnit svůj tvar. To je podle Pravdy a Svobodové (2003) dáno zejména jejich eliptickým tvarem.

2.1.3 Leukocyty (bílé krvinky)

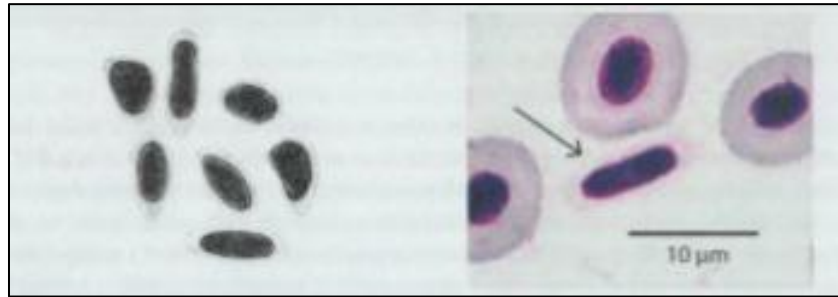
Bílé krvinky jsou bezbarvé a je jich v krvi méně než erytrocytů. Jejich počet kolísá v závislosti na věku, pohlaví, výživě, zdravotním stavu ryby apod. (Novotný a kol., 1966). Leukocyty se rozdělují na základě přítomnosti, resp. nepřítomnosti různě se barvících granul v cytoplazmě stejně jako u savců. Podle této vlastnosti dělíme leukocyty na granulocyty a agranulocyty. Mezi granulocyty, tedy leukocyty obsahující v cytoplazmě většinou značné množství granul, se řadí neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty. Toto rozdělení závisí na afinitě k barvivům. Mezi leukocyty bez granul (agranulocyty) patří lymfocyty a monocyty (Pravda a Svobodová, 2003). Rozlišovacím znakem je i tvar jádra, jeho velikost a vnitřní struktura (Svobodová a kol., 2012). Bližší informace k těmto typům leukocytů jsou popsány v podkapitole 4.2.3 Diferenciální rozpočet leukocytu.

2.1.4 Trombocyty

U savců trombocyty představují pouze útržky cytoplazmy, u ryb jsou to jaderné plnohodnotné buňky, ale jejich funkce je obdobná (Pravda a Svobodová, 2003). Trombocyty u ryb jsou malé oválné buňky s čírou bezbarvou cytoplazmou a centrálním jádrem oválného tvaru. V krevním nátěru je však možné zpozorovat i vřetenovitý (obr. 1) nebo kruhovitý tvar trombocytu. Tento odlišný tvar může odrážet různý stupeň buněčného zrání (Arnold, 2009).

Trombocyty jsou často zaměňovány s lymfocyty, které jsou podobné velikosti. Jedním z rozlišovacích znaků je zbarvení cytoplazmy (Arnold, 2009).

Jejich počet odpovídá zhruba počtu bílých krvinek (Pravda a Svobodová, 2003).



Obr. 1: *Trombocyt kapra obecného (Piačková a kol., 2014).*

2.2 Tvorba

U savců se krev tvoří v kostní dřeni, kterou však ryby nemají. V larválním stádiu slouží ke krvevorbě pronefros (Pravda a Svobodová, 2003). V dospělosti je hlavním orgánem krvevorbby přední část ledviny. Krev se v menší míře tvoří i ve slezině a játrech, které současně slouží jako zásobárna krve (Arnold, 2009).

Důležitá z hlediska tvorby krve je u ryb poikilotermie. Na krvevorbdu ryb působí jak exogenní faktory (teplota vody, koncentrace O_2 , roční období apod.), tak i endogenní faktory (věk, pohlaví, kondice, zdravotní stav aj.). Zvláště důležité je u ryb jako studenokrevných živočichů právě limitace vnějšími podmínkami – teplotou vody a koncentrací O_2 , což jsou podmínky, které ovlivňují i přirozenou potravní nabídku ryb. To ve výsledku spolu s endogenními faktory vytváří sezónní dynamiku změn krve a její tvorby (Pravda a Svobodová, 2003).

Erytropoéza

Erytropoéza je tvorba červených krvinek, které vznikají z prekurzorové buňky proerythroblastu. Tato buňka je kulovitého nebo oválného tvaru a je velká zhruba 15-20 μm . Jejím dělením vznikají erythroblasty. Předposledním stádiem je retikulocyt, což je nezralá forma červených krvinek, která obsahuje zbytky buněčných organel obsahujících RNA, díky čemuž je schopný plnit funkci erytrocytu. Retikulocyt dále zraje a vzniká z něj erytrocyt (Hawkins a Mawdesley-Thomas, 2006)

Leukopoéza

Leukopoéza je tvorba bílých krvinek. V případě leukocytárních řad jde o buňky mezenchymového původu (Pravda a Svobodová, 2003).

Prekurzorem lymfocytární řady je lymfoblast. Jedná se o poměrně velkou buňku okrouhlého tvaru s průměrem 10-15 μm a velkým jádrem. Dalším vývojovým stádiem je prolymfocyt, který má jadérka v mikroskopu neviditelná. Cytoplazma tvoří jen úzký lem okolo jádra (Pravda a Svobodová, 2003).

Kmenovou buňkou monocytové řady je monoblast s velikostí 14-18 μm v průměru, jehož jádro má vláknitou strukturu. Cytoplazma se vyskytuje v poměrně malém množství. Vyvráním monoblastu vzniká promocyt, který dosahuje až 20 μm (Pravda a Svobodová, 2003)

Kmenovou prekurzorovou buňkou granulocytární řady je myeloblast s průměrnou velikostí 8-14 μm . Většinu objemu této buňky je vyplněna kruhovitým jádrem. Cytoplazma zatím neobsahuje žádné granuly a tvoří jen úzký lem obklopující jádro (Svobodová a kol., 2012). Dalšími vývojovými stádii jsou promyelocyt a myelocyt, která se od kmenové buňky liší zejména velikostí (25-28 μm), hrubší strukturou jádra, velkým lemlem cytoplazmy a přítomností granul (Pravda a Svobodová, 2003).

2.3 Funkce jednotlivých složek

2.3.1 Funkce erytrocytů

Jak již bylo zmíněno výše, červené krvinky obsahují červené krevní barvivo hemoglobin, díky němuž mají červené krvinky svou funkci. Jejich hlavní funkcí je transport plynů – kyslíku O_2 a oxidu uhličitý CO_2 . Tato schopnost je dána tím, že v hemové části hemoglobinu je dvojmocný atom železa, na který se váže kyslík, popř. oxid uhličitý (Novotný a kol., 1966). Oproti savčímu hemoglobinu se rybí vyznačuje větší afinitou ke kyslíku. Kromě plynů jsou erytrocyty schopny přenášet i některé látky proteinové povahy (Pravda a Svobodová, 2003).

2.3.2 Funkce leukocytů

Jednotlivé typy leukocytů mají různé funkce, ale tou stěžejní je účast v imunitních procesech. Monocyty jsou schopné trávit hrubší částice cizorodé hmoty a odstraňovat vysokomolekulární koloidní částice z krevního oběhu. Eozinofilní granulocyty mají detoxikační funkci (Pravda a Svobodová, 2003). Funkce jednotlivých typů leukocytů je podrobněji popsána v kapitole 4.3.2 Diferenciální rozpočet leukocytů (leukogram).

2.3.3 Funkce trombocytů

Trombocyty jsou důležitou součástí procesu srážení krve. Při srážení krve dochází k rozkladu cytoplazmy trombocytu na vlákna, která následně vytváří síť a v té se zachycují krvinky (Wardle, 1971). Krevní destičky vykazují vysokou aktivitu, neboť srážlivost krve u ryb je velice rychlá; kolem 1 minuty (Pravda a Svobodová, 2003).

Hemokoagulace (srážení krve)

Proti samovolnému srážení a ke stabilizaci krve se používá heparin, což je přirozené protisrážecí činidlo. Pro stabilizaci 1 ml rybí krve stačí 0,01 ml heparinu (Pravda a Svobodová, 2003, Svobodová a kol., 2012). Tato technika je využívána zejména při hematologických vyšetřeních ryb (Pravda a Svobodová, 2003).

2.4 Odběr krve

Pro odběr krve se používají následující pomůcky: injekční jehla, injekční stříkačka, heparin, hodinové sklíčko, rukavice a papírové utěrky (Piačková a kol., 2014).

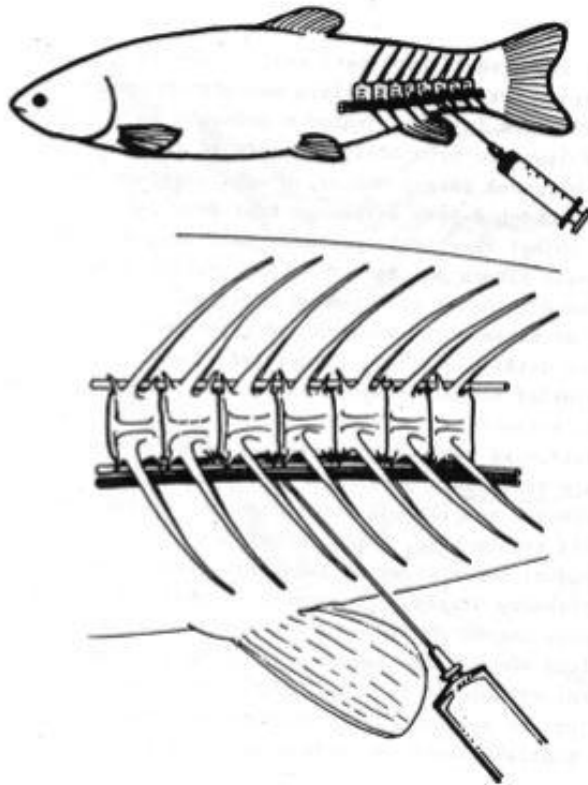
Odběr je prováděn hned po vylovení ryb z vody a podle velikosti ryb, dalšího osudu ryby a množství potřebné krve, se zvolí nejvhodnější metoda odběru (Pravda a Svobodová, 2003). K odběru je potřeba antikoagulační činidlo, kterým je nejčastěji heparin (Hesser, 1960). Množství potřebného heparinu závisí na prováděné laboratorní analýze a také na druhu ryby. U kapra stačí injekční stříkačku heparinem pouze propláchnout, u okounovitých ryb se používá poměr 1 díl heparinu na 8-9 dílů krve (Piačková a kol., 2014). Pokud odebíráme krev citlivým druhům ryb nebo rybám o větší hmotnosti, přichází v úvahu anestezie, která mimo mechanické poškození chrání ryby i před stresem. Mezi nejpoužívanější anestetika patří hřebíčkový olej a fenoxyetanol (Pravda a Svobodová, 2003).

U plůdku s hmotností menší než 8 gramů je možné získat pouze malé množství krve, a to ustrižením ocasního násadce (Piačková a kol., 2014).

Pokud má ryba minimální hmotnost 8 gramů je možné využít metodu odběru krve ze srdce (Piačková a kol., 2014). Ryba se po vylovení fixuje za hřbetní část. Před samotným odběrem se papírovou utěrkou otře krajina srdeční (Pravda a Svobodová, 2003). K odběru se používá skleněná heparinizovaná kapilára nebo u větších ryb

injekční jehla. Tuto metodu je možné použít i u starších ryb, kde se počítá s usmrcením ryb ihned po odběru (Svobodová a kol., 2012).

U ryb s hmotností vyšší než 20 gramů je nejpoužívanější metodou odběr krve z ocasních cév. Ryba se fixuje mokrou utěrkou k podložce tak, aby byl možný přístup k spodní straně ocasního násadce. Jehla je zaváděna pod úhlem 45° od osy páteře asi 1 cm kaudálně za řitní ploutví (obr.2) (Svobodová a kol., 2012). Dotkne-li se jehla při vpichu páteře, jemně se povytáhne a krev se začne vlévat do injekční stříkačky (Campbell, 2006). Po dokončení odběru je nutné místo vpichu řádně desinfikovat (Svobodová a kol., 2012).



Obr. 2: Odběr krve u ryb s hmotností nad 200 gramů metodou odběru z ocasní cévy (Svobodová a kol., 1986).

3 Metody stanovení hematologických ukazatelů u ryb

3.1 Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu

Za prokázané považujeme zjištění, že „mlíčňáci“ mají ve srovnání s jikernačkami po dosažení pohlavní dospělosti vyšší základní hodnoty erytrocytu, kterými jsou střední objem erytrocytu, hemoglobin erytrocytu a střední barevná koncentrace, a hematokrit. Tyto ukazatele budou popsány v následujících podkapitolách. Známý jsou i rozdíly mezi kaprovitými a lososovitými rybami. Lososovité ryby mají větší nároky na čistotu vodního prostředí, ve kterém se nacházejí, a na obsah rozpuštěného kyslíku. Tomu odpovídají vyšší průměrné hodnoty krevních ukazatelů (Pravda a Svobodová, 2003).

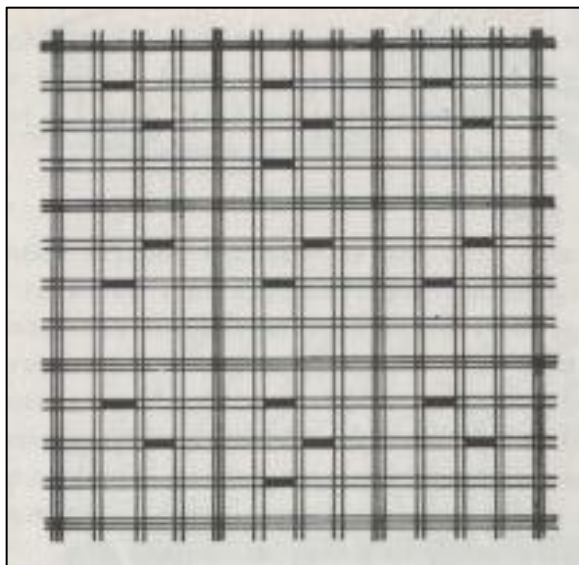
Obdobné rozdíly nalezneme i mezi chovnými liniemi kapra, např. u lysé a šupinaté formy. Šupinatá forma je zpravidla odolnější, čemuž odpovídají vyšší parametry červeného krevního obrazu (Pravda a Svobodová, 2003).

3.1.1 Stanovení počtu erytrocytů (Er, RBC)

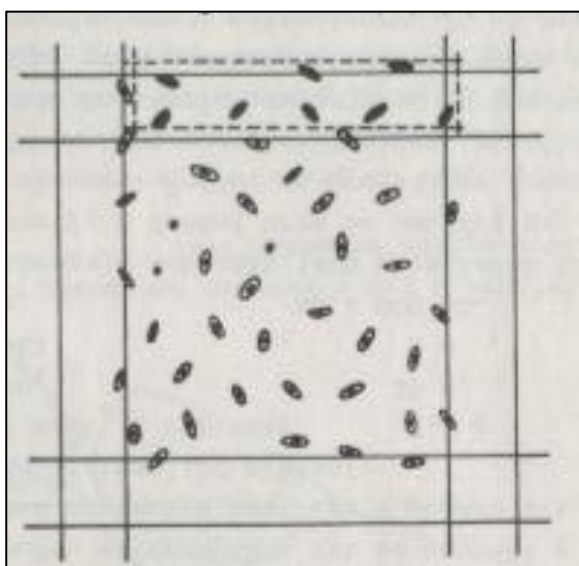
Stanovení počtu erytrocytů se u ryb provádí v heparinizedované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1 : 200 (Svobodová a kol., 2012) nebo roztokem Natt-Herrick v poměru 1 : 200 (Pravda a Svobodová, 2003).

K ředění krve se využívá tzv. baničková metoda podle Bürkera. Ředění se provádí ve speciálních skleněných baničkách nebo v penicilinových lahvičkách, do kterých se nadávkuje 4975 μ l Hayemova nebo Natt-Herrickova roztoku a 25 μ l heparinizedované krve. Špička pipety se pečlivě propláchne, aby došlo k dokonalému vymytí krve. Banička se uzavře a pečlivě se krouživým pohybem promíchá. Pasteurovou pipetou nebo kapátkem či mikropipetou se naplní Bürkerova komůrka (zvaná také hemocytometr) naředěnou krví. Erytrocyty počítají ve 20 obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce počítací komůrky, jak je znázorněno na obr. 3 (Pravda a Svobodová, 2003). Počítá se zpravidla při zvětšení 200x. Při samotném počítání postupujeme tak, že se spočítají všechny erytrocyty, které se nacházejí uvnitř obdélníků a nedotýkají se jejich stran. Z erytrocytů, které se dotýkají, spočteme ty, které se dotýkají pravé a horní strany zevnitř i z venku tak, jak je zobrazeno na obr. 4. Celkový

počet se pak vydělí číslem 100 a výsledkem je počet erytrocytů v $T.l^{-1}$ (T-tera = 10^{12}) (Svobodová a kol., 2012).



Obr. 3: *Nárys mřížky Bürkerovy počítací komůrky. Počet erytrocytů se stanovuje ve 20 stejnoměrně rozmístěných obdélnících po celé mřížce (Svobodová a kol., 1986).*



Obr. 4: *Způsob počítání erytrocytů, které se dotýkají stran. Tmavě vybarvené se počítají (Svobodová a kol., 1986).*

Další metodou pro stanovení počtu erytrocytů je stanovení fotometricky podle Pawinského. Tato metoda je jednodušší, rychlejší a méně pracná než předešlá a navíc není zatížena subjektivní chybou. Má však omezené využití při sledování účinku látek

vyvolávajících zvětšení středního objemu erytrocytů. V přepočtu pak dochází ke stanovení vyššího počtu erytrocytů. Z tohoto důvodu se v ichtyotoxikologii využívá klasická počítací metoda (Svobodová a kol., 1986). Při tomto způsobu stanovení postupujeme tak, že heparinovanou jehlou se odebere krev na hodinové sklíčko a odtud se mikropipetou odebere 20 μ l krve. Krev se smíchá s 10 ml Pawinského roztoku a směs se důkladně promíchá. Extinkce je měřena na fotometru v 1cm kyvetě při vlnové délce 600 nm. Počet erytrocytů se odečítá z kalibrační křivky, která se sestrojí z paralelních měření metodou podle Pawinského a klasickou počítací metodou v Bürkerově komůrce v krvi ryb (Pravda a Svobodová, 2003).

U zdravého kapra je počet erytrocytů zhruba 1,1-1,8 $T.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

3.1.2 Stanovení hematokritu (Hk, PCV)

Hematokritová hodnota vyjadřuje poměr objemu erytrocytů k celkovému objemu krve (Svobodová a kol., 1986).

Stanovení hematokritu se provádí mikrometodou (Pravda a Svobodová, 2003). Postupuje se tak, že se do heparinovaných kapilárek nasaje krev (Blaxhall a Daislay, 1973) do zhruba 2/3 jejich výšky a utěsní se uzávěrem (sklenářský kyt, modelovací hmota, zatavení). Poté se kapiláry vloží do hematokritové odstředivky, kde se nechají po dobu 3 minut odstředovat při 14 000 otáčkách za minutu. Odstředění je důležité z důvodu oddělení erytrocytů od plazmy. Poté se na hematokritovém měřidle odečte hodnota v % a vynásobí se koeficientem 0,01. Výslednou hodnotu udáváme v jednotkách $l.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

Díky jednoduchosti a přesnosti metody se stanovení hematokritu stalo jedním ze základních hematologických vyšetření (Pravda a Svobodová, 2003).

Hodnoty hematokritu u kapra obecného dosahují hodnot 0,28-0,40 $l.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012)

3.1.3 Stanovení koncentrace hemoglobinu (Hb)

Ke stanovení koncentrace hemoglobinu se využívá stejně jako u savců fotometrická kyanohemoglobinová metoda. Stanovení musí být provedeno do 24 hodin po odběru při uchování vzorku v teplotě do 4° C (Pravda a Svobodová, 2003). Princip spočívá

v tom, že se hemoglobin uvolní z erytrocytů pomocí transformačního roztoku a převede se na stálý kyanohemoglobin, který se stanovuje fotometricky (Svobodová a kol., 2012).

Postupuje se tak, že se do zkumavky odměří 7 ml (popř. 5 ml) transformačního roztoku (roztok podle van Kampena a Zijlstra nebo roztok podle Drabkina) a 25 μ l (popř. 20 μ l) čerstvě odebrané nebo heparinizované krve. Obsah zkumavky se důkladně promíchá. Při použití roztoku podle van Kampena a Zijlstra se hemoglobin na kyanohemoglobin přeměňuje rychleji. Odečítání v tomto případě je možné provést již po 3 minutách. V případě použití roztoku podle Drabkina je možné provést odečet až po 15-20 minutách. Měření extinkce vzorku se provádí fotometricky v 1cm kyvetě při vlnové délce 540-546 nm. Množství hemoglobin se určuje z kalibrační křivky (Svobodová a kol., 2012).

Obsah hemoglobinu v krvi u zdravých kaprů se pohybuje v rozmezí 60-100 g.l^{-1} (Svobodová a kol., 2012).

3.1.4 Stanovení methemoglobinu (MetHb)

Methemoglobin vzniká oxidací dvojmocného železa v hemoglobinu na trojmocné. Jeho koncentrace v krvi ryb závisí na koncentraci dusitanů ve vodě. Pokud je koncentrace dusitanů ve vodě vysoká, podíl methemoglobinu v krvi může představovat až 80 % (Svobodová a kol., 2012).

Pro stanovení methemoglobinu v krvi se pracuje s metodou, která využívá absorpčního maxima methemoglobinu při vlnové délce 630 nm. Po přidání kyanidu draselného se methemoglobin mění na kyanmethemoglobin, který v této oblasti nemá charakteristickou absorpci. Pokles absorbance při 630 nm je úměrný koncentraci methemoglobinu (Svobodová a kol., 2012).

Stanovení provádíme tak, že v jedné části vzorku se převede veškerý hemoglobin ferrikyanidem draselným na methemoglobin, který se po přidání kyanidu draselného přemění v kyanmethemoglobin. V druhé části vzorku se na kyanmethemoglobin převede pouze ten hemoglobin, který byl již původně ve vzorku přítomen. Rozdíl absorbancí první části vzorku a druhé části vzorku při 630 nm je přímo úměrný koncentraci methemoglobinu (Svobodová a kol., 2012).

Vzorky krve pro toto stanovení je třeba uchovávat při teplotě 3 °C a zamezit přístupu vzduchu (Svobodová a kol., 2012).

Zjistit zvýšené množství methemoglobinu je možné i podle zbarvení krve kápnuté na filtrační papír, jak je zobrazeno na obr. 5 (Svobodová a kol., 2012).



Obr. 5: Kontrolní kapka krve (vlevo) a červenohnědá kapka krve (vpravo) s obsahem methemoglobinu na filtračním papíře (Svobodová a kol., 2012).

3.1.5 Stanovení základních hodnot erytrocytu a jejich výpočet

Z hodnot hematokritu, hemoglobinu a počtu erytrocytů je možné vypočítat základní hodnoty erytrocytu:

Střední objem erytrocytu (MCV)

Hodnotu středního objemu erytrocytu je možné vypočítat z hematokritové hodnoty udané v jednotkách l.l⁻¹ a počtu erytrocytů v jednotkách T.l⁻¹ podle vzorce:

$$MCV = \frac{PCV \times 1\,000}{Er}$$

U zdravých kaprů se výsledná hodnota pohybuje mezi 200 – 300 fl (fl = femtolitr) (Svobodová a kol., 1986).

Hemoglobin erytrocytu (MCH)

Tato hodnota vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednom erytrocytu a vypočítá se z koncentrace hemoglobinu v krvi v g.l⁻¹ a počtu erytrocytů v T.l⁻¹ podle vzorce:

$$MCH = \frac{Hb}{Er}$$

Výsledná hodnota vychází v pikogramech a u zdravých kaprů bývá zhruba 50-60 pg (Svobodová a kol., 1986).

Střední barevná koncentrace (MCHC)

Střední barevná koncentrace vyjadřuje koncentraci hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů a vypočítá se z hodnoty hemoglobinu v g.l⁻¹ a hodnoty hematokritu v l.l⁻¹ podle vzorce:

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV \times 1\,000}$$

U zdravých kaprů se výsledná hodnota pohybuje v rozpětí 0,20-0,26 l.l⁻¹ (Svobodová a kol., 1986).

3.1.6 Stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů

Rychlost, kterou sedimentují erytrocyty, je u zdravého organismu poměrně stálá, avšak u organismu postiženého nějakou chorobou může být buďto výrazně zpomalena nebo zrychlena (Svobodová a kol., 1986).

Pravděpodobně nejpoužívanější metodou pro měření sedimentace je metoda mikrosedimentace erytrocytů, která využívá heparinizovaných kapilár na kovovém stojanu, jež svírá úhel 45°. Tyto kapilárky se naplní heparinizovanou krví a utěsní se speciální hmotou. Hodnoty poklesu se odečítají po 20 a po 40 minutách, což odpovídá stanovení v kolmé poloze po 2 a 4 hodinách. Hodnota sedimentační rychlosti se určuje pomocí hematokritového měřiče, na kterém je odečítán sloupec erytrocytů v % z celého sloupce krve a hodnota vlastní sedimentační rychlosti erytrocytů v daném časovém limitu je pak rozdílem mezi 100 % a procentem sloupce krvinek (Svobodová a kol., 1986).

Rychlost sedimentace erytrocytů u kapra je po 20 minutách 10-14 % poklesu a po 40 minutách 20-24 % poklesu (Svobodová a kol., 1986).

3.2 Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu

3.2.1 Stanovení počtu leukocytů (Leuko, WBC)

U kaprovitých ryb jsou popisovány lymfocyty, monocyty, neutrofilní granulocyty různých stádií, ojediněle eozinofilní granulocyty a vzácně i bazofilní granulocyty. K výrazným změnám v zastoupení jednotlivých typů leukocytů dochází při vystavení ryb působení anorganických a organických toxických látek (Piačková a kol., 2014).

Stanovení počtu leukocytů se provádí v heparinizované krvi ředěné roztokem Natt-Herrick v poměru 1 : 200 (Svobodová a kol., 2012). Podle Pravdy a Svobodové (2003) je nutné použít odstátý přefiltrovaný roztok.

Při stanovení se postupuje tak, že se do skleněné baničky napipetuje 4 975 μl roztoku Natt-Herrick, ke kterému se následně přidá 25 μl heparinizované krve. Mikropipetu je nutné pro důkladné vymytí krve opakovaným nasátím roztoku několikrát propláchnout. Směs se promíchá krouživým pohybem. Pasteurovou pipetou nebo mikropipetou se naplní Bürkerova komůrka a leukocyty se počítají v 50 velkých čtvercích (Pravda a Svobodová, 2003). Výsledné číslo je rovnou počet leukocytů v G.l^{-1} . Pro větší přesnost je možno počítat leukocyty ve 100 velkých čtvercích a poté výsledek vydělit dvěma (Svobodová a kol., 2012). Počítání se provádí stejně jako u erytrocytů při zvětšení 200x a postupuje se stejným způsobem, a to tak, že se počítají pouze leukocyty, které jsou uvnitř velkých čtverců a z těch, které se dotýkají stran, se počítají pouze ty, které se dotýkají pravé a horní strany uvnitř i vně (Svobodová a kol., 1986, 2012).

Výhodou ředění roztokem Natt-Herrick je to, že po naředění lze počítat jak erytrocyty, tak leukocyty. Je však třeba nejprve počítat erytrocyty, které rychleji hemolyzují (Svobodová a kol., 2012).

Počet leukocytů u kapra se pohybuje v rozmezí 10-80 G.l^{-1} ($\text{G-giga} = 10^9$) a je důležitým diagnostickým znakem při infekčních onemocněních nebo některých akutních otravách (Svobodová a kol., 2012).

3.2.2 Stanovení leukokritové hodnoty (Lk, BC)

Leukokritová hodnota vyjadřuje poměr objemu leukocytů k celkovému objemu krve. Její stanovení se provádí v heparinizovaných mikropilárkách spolu se stanovením

hematokritu. Leukokritová hodnota je stanovována jako podíl šedobílé vrstvy leukocytů z celého krevního sloupce. Výška vrstvy leukocytů se měří pod mikroskopem s použitím okulárového mikrometru při malém zvětšení (Svobodová a kol., 1986).

Tato metoda byla zatím podrobně zpracována pouze u kaprů, u kterých byl zjištěn významný vztah mezi počtem leukocytů a leukokritovou hodnotou. U kaprů se leukokritová hodnota pohybuje mezi 0,002-0,01 l.l⁻¹ (Svobodová a kol., 1986).

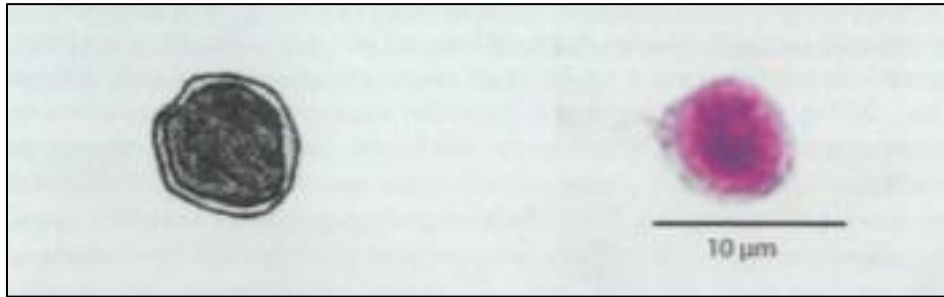
Metoda stanovení leukokritové hodnoty je velice jednoduchá a rychlá. Mezi její výhody patří také vhodnost pro sériová vyšetření a nepodléhá subjektivní chybě. Tato metoda je doplňována o diferenciální rozpočet leukocytů (Svobodová a kol., 1986).

3.2.3 Diferenciální rozpočet leukocytů (leukogram)

Podle velikosti, tvaru a struktury jádra a barvitelnosti cytoplazmy rozlišujeme následující typy bílých krvinek:

Lymfocyty

Lymfocyty jsou buňky, jejichž velikost je mezi 7 a 9 μm (Svobodová a kol., 2012) a jejich podíl v krvi je u ryb minimálně 60% (Campbell, 2006). U kapra se pohybuje v rozmezí 76-97,5 % (Svobodová a kol., 2012). Jádro je poměrně velké, zaujímá téměř celý objem buňky. Cytoplazma je světle modré barvy, bez granulí a kolem jádra tvoří souvislý lem (obr. 6) nebo ho obepíná jen zčásti, jak je znázorněno na obr. 7 (Vázquez a Guerrero, 2007). Cytoplazmatický lem může zcela chybět, jak je znázorněno na obr. 8 (Piačková a kol., 2014). Lymfocyty se dělí na tzv. malé (90 % všech lymfocytů) a velké (Pravda a Svobodová, 2003), které mohou měřit až 12 μm (Ellis, 1977). Jádro velkého lymfocytu zabírá až $\frac{3}{4}$ objemu lymfocytu a má tendenci držet se ve středu buňky. Cytoplazma je bez granulí a má tmavě modrou barvu. Malé lymfocyty jsou kulaté buňky a jejich velké jádro je obklopeno průhlednou cytoplazmou (Blaxhall a Daisley, 1973). Morfologie lymfocytů je velmi podobná napříč všemi obratlovci (Ellis, 1977).



Obr. 6: *Lymfocyt kapra obecného. Velké jádro je obklopeno vrstvou cytoplazmy (Piačková a kol., 2014).*



Obr. 7: *Lymfocyt kapra obecného. Cytoplazma obklopuje jádro jen zčásti (Piačková a kol., 2014).*



Obr. 8: *Nahojaderný lymfocyt kapra obecného. Lem cytoplazmy je velice úzký nebo chybí (Piačková a kol., 2014).*

Funkce lymfocytů pravděpodobně stejně jako u obojživelníků, ptáků a savců spočívá v imunitních mechanismech (Ellis, 1977).

Monocyty

Monocyty dosahují velikosti 15-18 μm, což je řadí mezi největší buněčné struktury krve ryb. Nejčastěji mají kulovitý nebo oválný tvar (obr. 9). Jádro má formu sítě s výraznými uzly (Pravda a Svobodová, 2003) a většinou je kulatého, oválného nebo

laločnatého tvaru (Arnold, 2009). Cytoplazma je šedomodrá (Campbell, 2006). V cytoplazmě se mohou vyskytovat jemná zrna nařialové barvy. Monocyty fungují jako makrofágové (Ellis, 1977). Jejich funkcí je trávit hrubší částice cizorodé hmoty a odstraňovat vysokomolekulární částice z krevního oběhu. Monocyty jsou schopny pohlcovat přestárlé erythrocyty a přeměňovat z nich uvolněný hemoglobin na bilirubin. Také mají podíl na syntéze lipidů, proteinů a tvorbě protilátek (Pravda a Svobodová, 2003). V krvi kapra obecného tvoří asi 3-5% leukocytů (Svobodová a kol., 2012).



Obr. 9: *Monocyt kapra obecného (Piačková a kol., 2014).*

Eozinofilní granulocyty

Velikost eozinofilních granulocytů se pohybuje mezi 8-12 μm . Ve většině případů jsou okrouhlého tvaru, jádro je méně barvitelné a nevýrazně bazofilní (Svobodová a kol., 2012). Jádro je ve většině případů kulovité, ale může být i segmentované (Campbell, 2006). Cytoplazma se barví do světle růžové barvy a je acidofilní (Svobodová a kol., 2012). Cytoplazma bývá obtížně rozpoznatelná pod mikroskopem, neboť je překrývána velkým množstvím granul (Vázquez a Guerrero, 2007), která jsou cihlově červené barvy (Svobodová a kol., 2012). V krvi kostnatých ryb zaujímá tento typ granulocytů pouze 0-1 %. V krvi kostnatých ryb mají významnou detoxikační funkci (Svobodová kol., 2012).

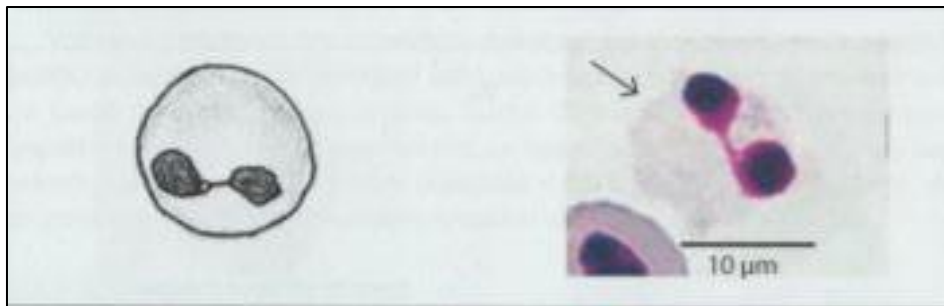
Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty jsou buňky o velikosti 5-10 μm . Obsahují množství granul, které vyplňují prostor kolem jádra (Svobodová a kol., 2012). Cytoplazma je šedavé až světle růžové barvy. Zbarvení granul je různé, závisí na zralosti buňky (Campbell, 2006). Jádro je většinou tyčkovité (obr. 10) nebo segmentované (obr. 11). Na rozdíl od savců se v krevním nátěru ryb vyskytují i nezralé formy granulocytů (Piačková

a kol., 2014). Ke zmnožení neutrofilních granulocytů dochází zejména při napadení organismu patogeny (Pravda a Svobodová, 2003). U kostnatých ryb se procentuální zastoupení těchto granulocytů pohybuje mezi 2-10 % (Svobodová a kol., 2012), čímž jsou nejvíce zastoupeným typem granulocytů v krvi kostnatých ryb (Clauss a kol., 2008).



Obr. 10: Neutrofilní granulocyt kapra obecného s jádrem tyčkovitého tvaru (Piačková a kol., 2014).



Obr. 11: Neutrofilní granulocyt kapra obecného se segmentovaným jádrem (Piačková a kol., 2014).

Bazofilní granulocyty

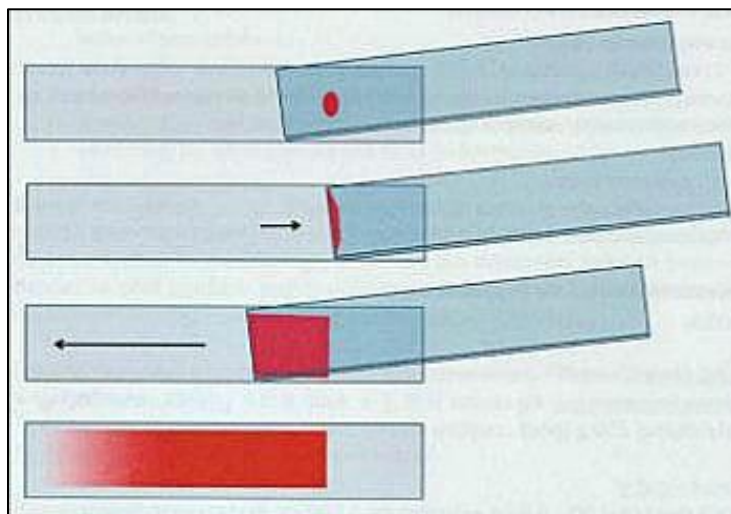
Bazofilní granulocyty mívají okrouhlý tvar a dosahují velikosti 10 μm (Pravda a Svobodová, 2003). Jádro i cytoplazma bývají překryty granuly purpurové až modročerné barvy. V krvi ryb zauímají nejnižší procentuální zastoupení ze všech výše uvedených a to 0-0,5 % (Svobodová a kol., 2012).

3.2.4 Stanovení leukogramu

Při tvorbě leukogramu se nejprve zhotoví krevní nátěr. Nátěr se provádí ihned po odběru krve a to tak, že se kapka krve přenese na okraj suchého a čistého sklíčka. K tomuto sklíčku se přiloží druhé, tzv. roztěrové sklíčko, pod úhlem 45° tak, aby se po

jeho přiložené hraně rozlila kapka krve (Hesser, 1960). Roztěrovým sklíčkem se provede lehkým a rovnoměrným pohybem nátěr až k opačnému konci podložního sklíčka (Svobodová a kol., 2012). Pro účely leukogramu je třeba připravit slabou vrstvu nátěru (Hesser, 1960). Výsledný nátěr musí mít rovné okraje a přecházet pozvolna do ztracena, a to alespoň 1-2 cm před koncem podložního sklíčka (Svobodová a kol., 2012). Postup je zobrazen na obr. 12. Na zábrus sklíčka se napíše identifikační údaje (datum a číslo vzorku). Hotový nátěr je třeba nechat zaschnout a chránit ho před jakýmkoli znečištěním (Piačková a kol., 2014). Podle Piačkové a kol. (2014) jsou nejčastější chyby při zhotovování krevní nátěru: (1) příliš silný nátěr po celé délce podložního sklíčka, (2) špatně odmaštěná sklíčka, (3) nerovnoměrný tah roztěrovým sklíčkem, (4) nátěr nepřechází do ztracena.

Nátěr je nutné barvit do 4 hodin po zaschnutí, jinak je třeba nátěr zafixovat metylalkoholem (Piačková a kol., 2014).



Obr. 12: Zhotovení krevního nátěru (Piačková a kol., 2014).

Pro barvení nátěrů za účelem stanovení leukogramu se používá Pappenheimova metoda. Vlastní postup spočívá v tom, že se suché nebo fixované nátěry rozloží na barvicí mřížku tak, aby se vzájemně nedotýkaly. Pipetou aplikujeme na nátěr barvivo May-Grünwald a necháme 3 minuty působit. Poté se na barvivo nakape zhruba 25 kapek pufrované destilované vody o hodnotě pH 6,8-7,0. Vytvoří se vodný roztok s barvicí schopností. Tento proces trvá 2 minuty. Dále se roztok z nátěrů slijí a nátěry se ihned převrství zředěným roztokem Giemsa-Romanowski. Roztok je ředěn v poměru

1 : 9 – 1 : 40 destilovanou vodou. Tato fáze trvá cca 20 minut. Následně se barviva slijí, nátěry se opláchnou a nechají se uschnout (Svobodová a kol., 2012).

Po zaschnutí nátěrů se provádí mikroskopická analýza (zvětšení 1000-1500x), při které se posuzuje velikost buněk, barvitelnost nebo např. přítomnost parazitů apod. Poté přichází na řadu zhotovení leukogramu. Při prohlížení nátěru se postupuje tak, že se posunuje stolcem u mikroskopu „meandrovitým“ způsobem, to znamená ze shora dolů, do strany, nahoru, do strany, dolů atd. Během prohlížení se do tabulky zapisují a třídí nalezené leukocyty a jiné nálezy. Výsledkem je procentuální zastoupení jednotlivých druhů leukocytů (Svobodová a kol., 2012).

4 Látky kontaminující vodní prostředí a jejich vliv na hematologické ukazatele kapra obecného

V současné době je známo kolem 62 milionů chemických látek. Každým rokem je na trh uvedeno několik tisíc nových a mnoho z nich se následně dostává do životního prostředí (Velíšek a kol., 2014). Vodní ekosystémy jsou nejvíce zatěžovanou složkou životního prostředí, co se týče množství znečišťujících látek. Tyto látky se do povrchových vod dostávají s průmyslovými a komunálními odpadními vodami. Takto znečištěné vody mohou představovat i vážné poškození vodních organismů (Karbassi a kol., 2006). Voda v přírodě není chemicky čistá, ale obsahuje rozpuštěné i nerozpuštěné organické a anorganické látky (Pitter, 2009). Tyto látky se do recipientu dostávají jak spolu s odpadními vodami, tak i z ovzduší při spadu atmosférických srážek nebo při použití těchto látek v lesnictví a zemědělství, kdy se tyto látky do vodního prostředí dostávají prostřednictvím splachů (Velíšek a kol., 2014) nebo při infiltraci půdou či horninami (Pitter, 2009).

Vodní prostředí je zatěžováno cizorodými látkami, které se do vody dostávají zejména v důsledku lidských aktivit a představují riziko pro konzumenty vodních organismů. Ryby jsou konečným článkem potravního řetězce ve vodě, a proto u nich můžeme předpokládat nejvyšší koncentrace cizorodých látek. V současné době jsme schopni pomocí moderních analytických metod zjistit přítomnost polutantů ve tkáni ryb i při nízkých koncentracích, které už ale mohou představovat zdravotní rizika. Všechny látky nacházející se ve vodním prostředí nemusejí podléhat rozkladu a mohou mít schopnost kumulovat se ve tkáních vodních organismů. Koncentrace kumulované látky ve tkáni roste s věkem a trofickou úrovní organismu (Žlábek a kol., 2014).

Toxické látky mohou u ryb způsobovat biochemické, fyziologické, morfologické a genetické změny, které mohou následně ovlivňovat vývoj, růst a rozmnožování (De Boeck a kol., 1995). Vliv toxické látky na organismus je závislý nejen na biologickém stavu zvířete, ale i na toxicitě dané látky, načasování jejího působení a době expozice (Brungs a kol., 1977). Limitní koncentrace různých látek se udávají zvlášť pro kaprovité a pro lososovité ryby, neboť citlivost různých druhů ryb vůči chemickému složení vody a znečišťujícím látkám je velmi rozdílná (Pitter, 2009).

4.1 Sloučeniny dusíku

Dusík se ve vodách vyskytuje v různých oxidačních stupních, v iontové i neiontové formě (Horáková, 2007). Sloučeniny dusíku mohou být organického nebo anorganického původu. Zdrojem organických sloučenin dusíku mohou být např. komunální vody nebo odpady ze zemědělské výroby (močůvka). Anorganickým zdrojem dusíku mohou být průmyslové odpadní vody, atmosférické vody nebo splachy z polí, která jsou hnojena dusíkatými hnojivy (Pitter, 2009).

Tilak a kol. (2007) se zabývali vlivem amoniaku, dusičnanů a dusitanů na hemoglobin v krvi ryb a na spotřebu kyslíku. Výsledky výzkumu ukazují, že se zvyšuje spotřeba kyslíku s dobou expozice. Ryby vystavené zvýšeným koncentracím amoniaku, dusičnanů a dusitanů spotřebovaly v ranních hodinách více kyslíku stejně tak jako kontrolní skupina ryb. Později se však na rozdíl od kontrolní skupiny spotřeba kyslíku snižovala. U kontrolních ryb se vrátila do normálu. Nejvyššího snížení spotřeby kyslíku bylo dosaženo u ryb vystavených koncentraci $\text{NH}_3^+ > \text{NO}_2^- > \text{NO}_3^-$. Zvýšení příjmu kyslíku může být způsobeno stresem, snížení spotřeby kyslíku může být způsobeno poškozením žaber nebo v důsledku poklesu hemoglobinu v krvi. Množství hemoglobinu, které je redukováno, je přeměněno na methemoglobin, který není schopen přenášet kyslík (Cameron, 1971).

4.1.1 Amoniak

Amoniak ve vodě může být organického nebo anorganického původu a nachází se v silně toxické molekulární formě NH_3 nebo jako disociovaná forma NH_4^+ (Hanel, 1995). Z hlediska toxicity je amonný iont NH_4^+ pro ryby méně toxický, protože tento iont není schopen projít stěnou buněk, zatímco molekulární amoniak NH_3 proniká velmi snadno a je tím pádem pro ryby jedovatý (Svobodová a kol., 2008).

Amoniak je konečným produktem dusíkatého metabolismu sladkovodních ryb. Pokud dojde k poruše rovnováhy mezi exkrecí a produkcí amoniaku, může dojít ke zvýšení koncentrace amoniaku v krvi ryb, což má za následek otravu vlastním metabolitem a následně úhyn. K autointoxikaci dochází zejména při náhlém poklesu teploty vody (o 5-8 °C) nebo koncentrace kyslíku, když mají ryby plný trávicí trakt. V takových případech dochází k snížení intenzity metabolismu a zvýšení koncentrace amoniaku v krvi (Svobodová a kol., 2008).

Jak již bylo nastíněno, toxicita amoniaku je dána teplotou vody, hodnotou pH (Pitter, 2009) a současně je ovlivněna i koncentrací rozpuštěného kyslíku (Svobodová a kol., 2008). Platí, že se zvyšující se teplotou a hodnotou pH se zvyšuje koncentrace NH_3 ve vodě (Abbas, 2006) a se snižující se koncentrací kyslíku ve vodě stoupá citlivost ryb na amoniak (Svobodová a kol., 2008).

Maximální přípustná koncentrace amoniaku je pro kaprovité ryby $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ (Svobodová a kol., 2008).

Kůže ryb, které jsou otrávené exogenním amoniakem, je světlé barvy. Povrch těla je pokryt matným hlenem a je možné pozorovat i drobné krváceniny. Žábry jsou silně překrvené a zahleněné. Při velmi vysokých koncentracích dochází až k jejich krvácení. Při autointoxikaci amoniakem je povrch těla tmavé barvy. Žábry jsou překrvené a tmavě červeného zbarvení. Typický je silný edém žaber. Následuje nekróza respiračního epitelu a jeho odlupování ze žaber (Svobodová a kol., 2008).

Podle Spangenberg a kol. (1989) se u kapřího plůdku při akutní intoxikaci NH_3 zvyšuje hodnota PCV a snižuje se MCHC a Lk. Při chronické intoxikaci se hodnota PCV naopak snižuje, stejně tak jako hodnota Lk. Navíc bylo zjištěno snížení Hb. Snížení Hb a PCV potvrzuje i Abbas (2006). Dabrowska a Własow (1986) popisují zejména výrazné snížení WBC.

Vědecké publikace se zabývají spíše vlivem amoniaku na příjem kyslíku, biochemické ukazatele apod.

4.1.2 Dusitany

Dusitany jsou ve vodách přítomny ve formě NO_2^- a zpravidla doprovázejí dusičnany a amoniak. Jsou nestálé, a proto se v povrchových vodách vyskytují jen v nízkých koncentracích (Pitter, 2009). Zvýšené koncentrace se mohou vyskytovat ve vodách při procesu nitrifikace, např. v recirkulačních systémech s nedokonale zapracovanými biologickými filtry. Nitrifikace je využívána ke snížení koncentrace amoniaku, při níž dochází k oxidaci amoniaku na dusitany a dále dusitanů na dusičnany (Eddy a Williams, 1987). Dusičnany jsou pro ryby téměř netoxické, ale pokud nitrifikace neprobíhá dostatečně rychle, dochází v systému k hromadění dusitanů (Svobodová a kol., 2008).

Toxicita dusitanů pro ryby je ovlivněna několika faktory, mezi něž patří např. kvalita vody, délka expozice, druh ryby, velikost a věk ryby a citlivost ryb k dusitanům (Kroupová a kol., 2005a) a vůbec nejdůležitějším faktorem je koncentrace chloridů ve vodě (Kopp a kol., 2009). Dusitany se do těla ryb dostávají přes tzv. chloridové buňky žaber. Chloridové buňky jsou jedním ze čtyř typů žaberních buněk, kterými jsou dlaždicovité, slizové, neuroepitelární a chloridové (Perry, 1997). Pokud jsou ve vodě vyšší koncentrace chloridů, ryba je přijímá místo dusitanů, je tedy před toxicitou dusitanů chráněna. Mezi toxicitou dusitanů a koncentrací chloridů tedy platí vztah, že čím vyšší koncentrace chloridů ve vodě, tím nižší je toxicita dusitanů (Jensen, 2003). Lososovité ryby mají vyšší spotřebu chloridů, jsou tudíž k působení dusitanů citlivější než ryby kaprovité (Eddy a Williams, 1987).

Dusitany pronikají do krve a způsobují oxidaci dvojmocného železa na trojmocné a tím přeměnu hemoglobinu na methemoglobin (Svobodová a kol., 2008). Zvýšené koncentrace methemoglobinu se projevují zbarvením krve a žaber do hněda. Přirozeně se v krvi ryb vyskytuje až 10 % methemoglobinu (Cameron, 1971). K úhynu dochází, pokud množství methemoglobinu přesáhne 70 – 80 % (Svobodová a kol., 2008). Na rozdíl od hemoglobinu, methemoglobin nemá schopnost přenášet kyslík, snižuje se tím tedy kapacita krve pro přenos kyslíku (Cameron, 1971).

Diagnostika otravy se provádí na základě analýzy vody na obsah dusitanů a chloridů a dále se u živých ryb sleduje zvýšená koncentrace methemoglobinu v krvi a zvýšená koncentrace dusitanů v krevní plazmě (Svobodová a kol., 2008).

Po akutní intoxikaci dusitany ($20 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$, $11 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cl}^-$) došlo ke zvýšení koncentrace MetHb, snížení koncentrace Hb a snížení hodnoty RBC a PCV (Kroupová a kol., 2006, Kroupová a kol., 2005b). Po převedení ryb do čisté vody se všechny parametry kromě MetHb vrátily do 24 hodin do normálu. K poklesu koncentrace MetHb došlo až po delším časovém úseku. U ryb, které byly vystaveny stejné koncentraci dusitanů, ale několikanásobně vyšší koncentraci chloridů, nedošlo k žádným významným změnám oproti kontrolní skupině. Zvýšením koncentrace chloridů ve vodě je tedy možné zabránit pronikání dusitanů žábry ryb (Kroupová a kol., 2005b). Stejně výsledky u kapra obecného zaznamenal i Jensen (1990) a Svobodová a kol. (2005).

Poškození ryb v důsledku zvýšené koncentrace dusitanů ve vodě je poměrně častou záležitostí a zabývá se tímto tématem z hlediska vlivu dusitanů na hematologické parametry mnoho publikací, a to u různých sladkovodních i mořských druhů ryb; pstruh duhový (Aggergaard a Jensen, 2001), úhoř říční (Kamstra a kol., 1996) nebo tilapie nilská (Atwood a kol., 2001).

4.1.3 Kyanidy

Kyanidy nacházející se ve vodním prostředí jsou obvykle antropogenního původu a vyskytují se v odpadních vodách z průmyslové výroby (Svobodová a kol., 2007a). Kyanidy se ve vodách mohou vyskytovat jako jednoduché nebo komplexní sloučeniny, přičemž jednoduché kyanidy jsou pro ryby silně toxické. Toxicitu kyanidů ve vodě ovlivňuje pH vody; čím nižší hodnota pH, tím vyšší toxicita. U komplexních kyanidů je toxicita dána schopností odštěpovat skupinu HCN (Svobodová, 1985).

Citlivost ryb vůči kyanidům se zvyšuje s klesající koncentrací rozpuštěného kyslíku ve vodě a se snižující se teplotou vody (Svobodová a kol., 2008).

Charakteristickým znakem u ryb intoxikovaných kyanidy je jasně červené zbarvení žaber. V některých případech je možná i přítomnost transudátu s příměsí krve v tělní dutině (Svobodová a kol., 2007a). V dostupné literatuře však nejsou žádné informace o jejich vlivu na hematologické parametry.

4.2 Kovy

Pokud se kovy nacházejí ve vodách ve stopovém množství, jsou přirozeného původu, díky horninovému podloží, které ji obohacuje. Hlavním antropogenním zdrojem jsou odpadní vody z průmyslu – fotografického, textilního, kožedělného apod. Dalším zdrojem jsou např. anorganické pesticidy nebo atmosférické vody znečištěné exhalacemi, které vznikají při spalování fosilních paliv (Svobodová, 1985).

V povrchových vodách se kovy většinou nevyskytují v koncentracích, které by byly zdravotně závadné, ale jsou i výjimky – například vody z okolí rudných rašelinišť nebo minerální vody, kde jsou koncentrace kovů vyšší. Velká část kovů je v přírodních vodách vázána na nerozpuštěné látky adsorpcí (Pitter, 2009).

Mnohé z kovů jsou sice v malém množství pro organismy nezbytné (mezi takové patří např. Co, Cu, Fe, Mn, Cr, Zn a další), ale ve vyšších koncentracích mohou některé

z nich být i toxické (např. Cu, Zn, Cr). U organismů způsobují inhibici růstu a činnosti enzymů. Některé kovy vyvolávají onemocnění, která mohou být chronického nebo akutního charakteru. Mohou mít i karcinogenní nebo teratogenní účinky, jiné mohou zase ovlivňovat organoleptické vlastnosti vody (Pitter, 2009).

Významnou negativní vlastností kovů je jejich kumulativní charakter, díky němuž se kumulují ve vodních organismech a rostlinách nebo v sedimentu. Tuto vlastnost mají zejména těžké kovy a je určována kumulačním koeficientem, který udává, kolikrát je obsah kovu v organismu větší než v okolní vodě (Pitter, 2009). Koncentrace kovů v potravním řetězci stoupá a nejvyšší koncentrace se nacházejí u dravých ryb, které jsou konečným článkem potravního řetězce (Modrá, 2014).

Toxicita kovů závisí především na teplotě, která ovlivňuje rychlost metabolismu a vyšší teplota pak může způsobovat i rychlejší vstřebávání látky do organismu a celkově zvyšuje rychlost chemických reakcí (Svobodová a kol., 1993). Dalším faktorem je hodnota pH a celkové složení vody. Zpravidla větší toxicitu vykazují jednoduché ionty než komplexní sloučeniny. Toxicita kovu se může měnit s oxidačním stupněm (Pitter, 2009).

4.2.1 Zinek

Zinek se ve vodním prostředí vyskytuje v oxidačním stupni II nebo může být součástí komplexů. Zinek se do vody dostává např. s průmyslovými odpadními vodami, které vznikají při zpracování rud, povrchových úpravách kovů apod. (Pitter, 2009).

Pro lidskou populaci je poměrně nezávadný, ale pro vodní organismy může být toxický (Strnadová, 2007), zejména lososovité ryby jsou na koncentrace zinku velmi citlivé (Pitter, 2009).

Witeska a Kościuk (2003) zkoumali akutní toxicitu zinku po 3h vystavení ryb koncentraci 20 mg.l^{-1} . Hodnota PCV byla nejvyšší ihned po expozici, hodnota RBC se postupně zvyšovala a hodnota WBC byla nejnižší po 48 hodinách. Zastoupení neutrofilů vzrostlo bezprostředně po vystavení ryb uvedené koncentraci a s postupem času klesalo. Svobodová a kol. (1994) při akutní intoxikaci zaznamenali snížení Hb a PCV, zatímco při chronické expozici koncentrace 30 mg.l^{-1} zinku nevyvolala významné změny.

4.2.2 Měď

Nejběžněji se měď ve vodě vyskytuje ve formě iontu Cu^{2+} nebo ve formě komplexních sloučenin. V závislosti na pH se pak může vyskytovat i v nerozpustné formě a v uhličitanových komplexech a hydroxokomplexech (Strnadová, 2007). U mědi se oxidační stupeň II projevuje nejvyšší komplexotvornou schopností. Zdrojem mědi ve vodách mohou být opět odpadní vody z průmyslu (Pitter, 2009).

Vystavení ryb koncentracím mědi může mít různé účinky, které se mohou lišit v závislosti na kvalitě vody a velikosti ryby (De Boeck a kol., 1995). Měď je pro ryby silně toxická, přesto je v praxi často využívána její sloučenina $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ jako léčebná koupel při infekci protozoárními parazity (Kolářová a Svobodová, 2007), např. při piscinodinióze, což je časté onemocnění zejména u akvarijních druhů ryb (Svobodová, 2007b).

Po vystavení kapra obecného koncentraci mědi 5 mg.l^{-1} ve vodním prostředí, došlo ke změnám bílého krevního obrazu. Snížila se hodnota WBC a došlo ke snížení procenta lymfocytů (Witeska, 2005). Snížení WBC potvrzuje i Svobodová a kol. (1994). V jiném pokusu došlo ke zvýšení RBC, Hb a PCV (Svobodová a kol., 1994). Witeska a kol. (2010b) zkoumali vliv koncentrace mědi 2 mg.l^{-1} na červený krevní obraz. Ryby byly této koncentraci vystaveny po dobu 3 hodin a dále byly zkoumány po dobu 16 dní. Došlo ke snížení RBC, zvýšení MCH, hodnota Hb byla nejvyšší ihned po expozici. Navíc byly pozorovány změny v morfologii buněk (např. změna tvaru jádra apod.).

4.2.3 Železo

Formy výskytu železa ve vodě jsou závislé na hodnotě pH, oxidačně redukčním potenciálu a na přítomnosti komplexotvorných látek. Podle přítomnosti kyslíku se ve vodě železo vyskytuje buď v oxidačním stupni II, to v bezkyslíkatém prostředí, naopak v prostředí obsahujícím kyslík se vyskytuje v oxidačním stupni III (Strnadová, 2007). Sloučeniny železa v oxidačním stupni III pokrývají žaberní listky ryb a zamezují tak dýchání (Hanel, 1995).

Železo je v malých koncentracích běžnou součástí vod, avšak může ovlivňovat jeho organoleptické vlastnosti nebo způsobovat závady technického rázu a nežádoucí reakce

(Strnadová, 2007). V chovu kaprovitých ryb by koncentrace železa ve vodě neměla překročit $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Pitter, 2009).

O vlivu železa na hematologické ukazatele kapra obecného nejsou v dostupné literatuře žádné poznatky.

4.3 Těžké kovy

Většina těžkých kovů je toxická nebo karcinogenní a tím nebezpečná pro životní prostředí (Damien a kol., 2004). Důležitou vlastností těžkých kovů je jejich kumulativní charakter, díky kterému se hromadí v sedimentu a biomase vodních organismů (Strnadová, 2007). Vyšší koncentrace v tkáni ryb mohou mít negativní vliv na jejich metabolismus (Canli a kol., 1997).

Zdrojem těžkých kovů v povrchových vodách jsou především průmyslová odvětví, např. zpracování železa, těžba rud, metalurgie, povrchová úprava kovů fotografický průmysl a další (Strnadová, 2007).

Vinodhini a Narayanan (2009) na základě svého výzkumu uvádějí, že přítomnost těžkých kovů ve vodním prostředí má velký vliv na hematologické parametry kapra obecného. Po vystavení testovaných skupin kapra obecného koncentraci 5 mg.l^{-1} směsi těžkých kovů (kadmium, chrom, nikl a olovo) byla zvýšena hodnota RBC. Během doby expozice (32 dnů) se snižovala hodnota PCV a koncentrace Hb. Některé těžké kovy mohou měnit vlastnosti hemoglobinu tak, že se sníží jeho afinita ke kyslíku (Witeska a Kościuk, 2003). Podle Abedi a kol. (2012b) je kapr odolný vůči toxicitě těžkých kovů díky velkým šupinám.

Vystavení ryb zvýšeným koncentracím těžkých kovů způsobuje rybám stres, jehož důsledkem je snížení imunitního potenciálu ryb. Změny se tedy projevují zejména v bílém krevním obrazu (Witeska, 2005). Stres může způsobit osmotickou nerovnováhu a změny v systému iontové výměny, která může snížit hodnotu pH krve, a to může ovlivnit některé hematologické parametry. Dlouhodobější vystavení ryb těžkým kovům většinou snižuje hematologické parametry, např. WBC (Vosyliené, 1999), což potvrzuje i Witeska (2005). Velmi citlivá vůči těžkým kovům ve vodě jsou embryonální a juvenilní stádia (Alam a Maughan, 1995).

4.3.1 Rtut'

Rtut' se ve vodě vyskytuje nejčastěji v elementární formě, ve formě jednoduchého kationtu nebo ve formě komplexů (Strnadová, 2007). Do vodního prostředí se rtuť dostává spolu s průmyslovými odpadními vodami nebo atmosférickými srážkami (Hanel, 1995). Rtut' je jedním z prvků, který má nejvyšší akumulací koeficient (Pitter, 2009).

Rtut' a její sloučeniny podléhají methyloaci. Vlivem tohoto procesu vzniká methylrtuť, která vstupuje do potravního řetězce a kumuluje se v organismech (Hanel, 1995); u ryb se kumuluje ve svalové tkáni, která tvoří nejčastěji konzumovanou část (Žlábek a kol., 2014). Methylrtuť CH_3Hg^+ je považována za nejtoxičtější formu rtuti (Špička a kol., 2000).

Literatura se zabývá spíše kumulací rtuti v organismu. O jejím vlivu na hematologické parametry ryb nejsou v dostupných publikacích žádné informace.

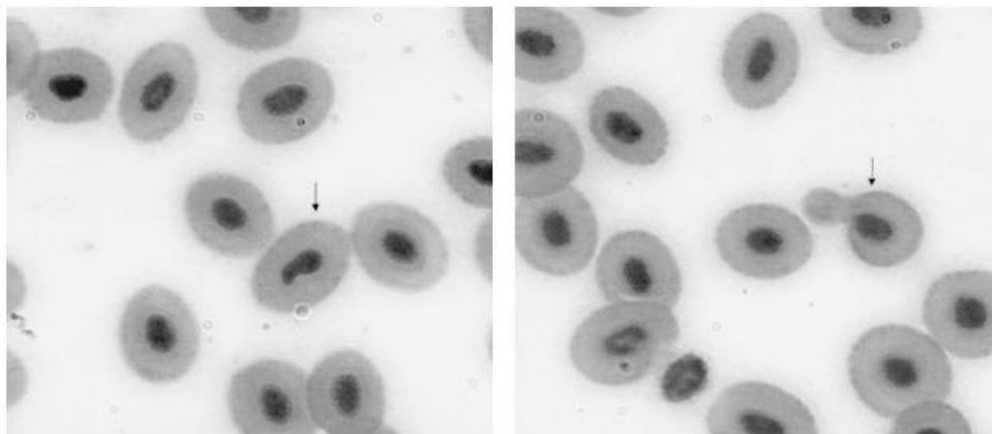
4.3.2 Kadmium

Kadmium se do vodního prostředí dostává např. s fosforečnanovými hnojivy, která mohou obsahovat až 170 mg.l^{-1} kadmia, nebo s odpadními vodami z průmyslu. Ve vodě je kadmium doprovázeno zinkem díky jeho chemické podobnosti (Pitter, 2009). Kadmium je považováno za jeden z nejvíce toxických kovů, který může způsobit toxicitu na téměř každé úrovni organismů (Rashed, 2001). Nejvyšší přípustná koncentrace kadmia ve vodě pro chov kaprovitých ryb je $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$ (Hanel, 1995).

Podle Witeska (1998) může mít kadmium vliv na krevní buňky, zejména na bílé krvinky. Co se týče červeného krevního obrazu, hodnoty PCV a RBC byly v pokusu zvýšeny, ale tyto změny jsou přičítány spíše manipulačnímu stresu. Zvýšení RBC, Hb a PCV popisuje i Drastichová a kol. (2004) a Witeska a kol. (2010b).

V pokusu Pravdy a kol. (1989) byl vystaven kapří plůdek koncentraci kadmia $20 \mu\text{g.l}^{-1}$. Při tomto pokusu došlo k extrémnímu snížení počtu leukocytů: $13,00 \pm 1,49 \text{ G.l}^{-1}$ oproti kontrolním rybám, u nichž bylo naměřeno $77,16 \pm 32,14 \text{ G.l}^{-1}$. Je však důležité podotknout, že mírný leukopenický trend byl pozorován už u kontrolní skupiny ryb. Ke snížení WBC došlo i v pokusu Witeska (2005) při 3hodinové expozici 10 mg.l^{-1} kadmia, při které navíc došlo ke snížení zastoupení lymfocytů a naopak zvýšení

neutrofilů. Snížení WBC popisuje i Drastichová a kol. (2004). Snížení WBC popisuje i Witeska a kol. (2006) u pokusu s línem obecným (*Tinca tinca*), který byl vystaven koncentraci $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ po dobu 3 hodin. Navíc bylo zjištěno, že kadmium mělo vliv na erythrocyty a vyvolalo buněčné anomálie (změna tvaru, otok, členění jádra apod.), což potvrzuje i Witeska (2001) a Witeska a kol. (2010b), viz obr. 12.



Obr. 12: Obrázek vlevo – Změna tvaru jádra erythrocytu po působení kadmia. Obrázek vpravo – Změna tvaru erythrocytu po působení kadmia (Witeska, 2001).

4.3.3 Olovo

Zdroji olova ve vodě mohou být odpadní vody ze zpracování rud, metalurgie, sklářského průmyslu apod. (Pitter, 2009). Díky svému vysokému akumulacnímu koeficientu se olovo hromadí v sedimentech i ve tkáni organismů. Jeho toxicita závisí na jeho rozpustnosti nebo přítomnosti vápníku a hořčíku ve vodě; se zvyšující se alkalitou a hodnotou pH rozpustnost klesá, stejný trend platí pro koncentrace Ca a Mg ve vodě (Hanel, 1995). Minimální rozpustnost je zaznamenána při pH 9 až 10 (Pitter, 2009). Nejvyšší přípustná koncentrace pro kaprovité ryby je $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ (Pitter, 2009).

Olovo je nebezpečné mimo jiné zejména z důvodu inhibice tvorby hemoglobinu a negativního vlivu na erythrocyty (Pitter, 2009). Při akutní intoxikaci dochází k poškození epitelu žaber (Hanel, 1995).

Vystavení kapra obecného olovu v koncentraci 10 mg.l^{-1} po dobu 3 hodin způsobilo zvýšení hodnoty PCV. Z hlediska RBC nedošlo ke statisticky významným změnám. Naopak tomu bylo u WBC. Při měření hodnot hned po vystavení ryb koncentraci olova výrazně vzrostla hodnota WBC, následně po 24 a 48 hodinách však došlo k výraznému

poklesu hodnot. Ten samý trend bylo možné pozorovat i u zastoupení lymfocytů (Witeska, 2005). Witeska a kol. (2010a) se zabývali i výsledky hematologických parametrů po 2 až 16 dnech po expozici. Dva dny po expozici statisticky významně vzrostla hodnota RBC, Hb, MCHC a klesla hodnota MCV. Čtvrtý den hodnoty RBC, Hb a PCV klesly. Osmý den bylo dosaženo nejnižšího počtu leukocytů, který se během dalších dní vrátil na počet srovnatelný s kontrolou.

4.3.4 Chrom

Chrom se do vody může dostat spolu s odpadními vodami z metalurgického, textilního a kožedělného průmyslu. Ve vodách se chrom vyskytuje v oxidačním stupni III nebo VI. Pro živočichy, rostliny a bakterie jsou toxické především sloučeniny obsahující Cr^{VI} . U ryb je ale pozorována opačná závislost; jako silně jedovatý se projevuje Cr^{III} (Pitter, 2009).

Abedi a kol. (2012a) zkoumali vliv trojmocného chromu ve formě $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ na hematologii kapra obecného. Ryby byly vystaveny subletální koncentraci 2 mg.l^{-1} . Po 28 dnech naměřili snížené hodnoty PCV, Hb, RBC, MCH, MCHC a WBC. Ke snížení hodnoty WBC došli i Al-Akel a Shamsi (1996). Naopak bylo zaznamenáno zvýšení Hb, PCV a RBC. Snížení těchto hodnot dosáhli i Shaheen a Akhtar (2012), když vystavili kapra obecného šestimocnému chromu o koncentracích 25-150 mg.l^{-1} .

4.4 Ropné látky

Znečišťující látky ropného charakteru (benzin, petrolej, motorová nafta apod.) se do vody dostávají zejména díky petrochemickému průmyslu, dále pak strojírenskému nebo hutnímu a častou příčinou znečištění mohou být i havarijní úniky těchto látek (Svobodová., 1985).

Toxicita ropných látek pro ryby je rozdílná, hodnoty LC50 se většinou pohybují od 0,5 do 200 mg.l^{-1} . Lehčí frakce, jako je petrolej nebo benzin, jsou toxičtější než např. oleje. Ropné produkty navíc obsahují i složky (např. kyseliny nafténové), které na ryby působí silně toxicky (Svobodová, 1985).

Samotná surová ropa je pro vodní organismy velmi nebezpečná a jejím vlivem na hematologii kapra obecného se zabýval Jahanbakhshi a kol. (2013). Ve svém výzkumu zjišťovali účinky LC50 po 24, 48 a 96 hodinách na hematologické parametry

kapra. Výsledky ukázaly nárůst jak bílých tak i červených krvinek. Při 96hodinové expozici došlo až ke zdvojnásobení hodnot RBC a WBC. Dále bylo zaznamenáno i zvýšení hodnot Hb a PCV. Nárůst může být způsoben dehydratací (Gad, 2007) a navíc může intoxikace ropnými látkami způsobit i uvolnění krvinek z ledvin (Haschek a kol., 2010). Ze základních hodnot erytrocytu stojí za zmínku pokles MCV a MCH. MCHC se v průběhu testu prokazatelně nezměnil.

4.5 Pesticidy

Pesticidy se do vody dostávají zejména nesprávnou aplikací nebo splachem ze zemědělských ploch (Svobodová a kol., 2008).

Organismy tvořící potravní základnu ryb jsou na působení pesticidů citlivější než ryby samotné a tím může docházet k likvidaci potravní základny ryb (Svobodová a kol., 2008). Znečištění vody pesticidy se odráží na kvalitě rybího masa a může ovlivňovat raná vývojová stádia, která jsou náchylnější než dospělí jedinci (Svobodová, 1985).

Nejzávažnější poškození způsobují pesticidy na bázi organofosfátů, triazinů a diazinů a pyretroidů (Svobodová a kol., 2008).

4.5.1 Organofosfáty

Hossain a kol. (2014) zkoumali účinky pesticidu Sumithionu, jehož účinnou látkou je fenitrothion. S rostoucí koncentrací Sumithionu byl zjištěn výrazný pokles RBC, Hb a PCV. Naopak počet bílých krvinek se výrazně zvyšoval. Do svého pokusu zařadili i výpočet hodnot MCV, MCH a MCHC; došlo ke zvětšení MCV a MCH. Hodnota MCHC se významně nezměnila. Ke snížení hodnot v rámci červeného krevního obrazu došlo pravděpodobně z důvodu selhání krvetvorby.

Svoboda a kol. (2001) zkoumali vliv pesticidu Basudin 600 EW s účinnou látkou diazinon. V jejich pokusu byli vystaveni jedno- až dvouletí kapři po dobu 96 hodin koncentraci 32,5 mg.l⁻¹. Hodnota 96hLC50 je druhově velmi rozdílná, konkrétně pro kapra 26,7 mg.l⁻¹. U intoxikovaných ryb bylo zjištěno snížení u hodnot RBC, Hb a PCV ve srovnání s kontrolní skupinou ryb. Snížení bylo zaznamenáno i u WBC, absolutního i relativního počtu lymfocytů a zvýšení zastoupení vývojových forem neutrofilních granulocytů. Výsledky týkající se bílého krevního obrazu potvrzuje i Drastichová a kol. (2000). V pokusu použili stejný pesticid o koncentraci 30 a 35 mg.l⁻¹. Snížení RBC, Hb

a PCV a zvýšení WBC potvrzuje i Adedeji a kol. (2009) v pokusu s keříčkovcem červenolekým (*Clarias gariepinus*). Podle Svobodové a kol. (1996) je snížení počtu leukocytů (leukopenie) charakteristickým znakem při akutní intoxikaci ryb. Leukopenii zaznamenal i Siwicki a kol. (1990) při působení pesticidu trichlorfonu.

Koncentrace 2,7 a 27 $\mu\text{g.l}^{-1}$ fungicidu isoprothiolan způsobila signifikantní nárůst WBC a pokles RBC, PCV a Hb (Saravanan a kol., 2015).

4.5.2 Triaziny a diaziny

Pečená a Svobodová (1989) zkoumaly vliv pesticidů na bázi triazinů a diazinů na plůdek kapra obecného. Z pesticidů na bázi triazinů byly využity přípravky Zeazin Mix Extra (60 mg.l^{-1}) a Zeaprim DKV 30 (24 mg.l^{-1}). Po intoxikaci Zeazinem Mix Extra došlo ke snížení PCV až téměř na polovinu. Z hlediska zastoupení jednotlivých druhů leukocytů bylo zjištěno: výrazné snížení procenta malých lymfocytů a navýšení procenta neutrofilních granulocytů se segmentovaným a tyčkovitým jádrem. Po intoxikaci Zeaprimem DKV 30 byla zaznamenána zvýšená leukokritová hodnota a co se týká změn v diferenciálním rozpočtu leukocytů, došlo opět k výraznému snížení procenta malých lymfocytů a zvýšení procenta neutrofilních granulocytů s tyčkovitým jádrem. U tohoto přípravku bylo navíc zaznamenáno zvýšené procento eozinofilních granulocytů. Po intoxikaci pesticidy na bázi triazinů dochází ke zvýšení počtu těch leukocytů, které jsou schopny fagocytózy a mají vlastnosti makrofágů. Malé lymfocyty pomáhají vzniku protilátek, jejich snížení má tedy negativní vliv na odolnost ryb.

Velíšek a kol. (2009a) zkoumali vliv Simazinu, což je herbicid na bázi triazinů, na biochemický, hematologický a histopatologický profil zkoumaných ryb. Kapři byli vystaveni koncentracím 0,06, 4, 20 a 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Nejnižší koncentrace nevykazovala žádný vliv na sledované hematologické parametry. Po působení ostatních koncentrací došlo ke zvýšení hodnoty PCV a zastoupení lymfocytů a ke snížení MCHC a zastoupení neutrofilních granulocytů. V jiném pokusu Velíška a kol. (2012) byly použity nižší koncentrace (0,06, 1, 2 a 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a byl zjištěn pokles v hodnotě WBC. Velíšek a kol. (2011) zkoumali účinky i dalších pesticidů, např. terbutrynu. Po jeho dlouhodobém působení došlo ke zvýšení RBC, Hb a MCHC a ke snížení MCV a WBC. Testovány byly koncentrace 0,02, 0,2 a 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Ve vyšších koncentracích (4, 20, 40 $\mu\text{g.l}^{-1}$) došlo rovněž ke zvýšení RBC a ke snížení hodnot MCV, MCH a WBC (Velíšek a kol., 2010).

Pečená a Svobodová (1989) se ve svém výzkumu zabývaly i pesticidy na bázi diazinů – Betoxonem F 430 (229 mg.l⁻¹) a Rubiganem 12 EC (13 mg.l⁻¹). Po působení Betoxonu F 430 došlo ke snížení PCV, u přípravku Rubigan 12 EC nebyly zaznamenány statisticky významné změny. Z hlediska zastoupení jednotlivých typů leukocytů je výsledek obdobný jako u použití pesticidů na bázi triazinů, které jsou zmíněny výše.

4.5.3 Pyretriody

Velíšek a kol. (2009b) zkoumali vliv látky bifenthrin na hematologické parametry kapra. Použit byl přípravek Talstar EC 10 obsahující 100 g.l⁻¹ bifenthrinu. Z hematologických parametrů došlo až ke zdvojnásobení zastoupení monocytů. Ostatní významné změny se týkaly spíše biochemických parametrů.

Přípravek Alimetricin 10 EM s účinnou látkou cypermethrin vyvolal zvýšení RBC a počtu segmentovaných neutrofilních granulocytů a eozinofilních granulocytů, a snížení hodnot MCV, MCH a počtu lymfocytů (Dobšíková a kol., 2006). Při vystavení pstruhů duhových stejné látce došlo u segmentovaných neutrofilních granulocytů naopak ke snížení, stejně tak u lymfocytů. Navíc bylo zjištěno výrazné zvýšení hodnoty MCV (Velíšek a kol., 2006).

Působení deltamethrinu na kapra obecného zapříčinilo nižší hodnoty RBC, Hb a PCV. Jednotlivé typy leukocytů se na rozdíl od předchozích přípravků od kontrolních ryb příliš nelišily (Svobodová a kol., 2003).

Koncentrace 10 µg.l⁻¹ přípravku cyfluthrinu nevyvolala žádné významné změny v hematologických parametrech kapra obecného. Změny nebyly zaznamenány po 48 hodinách ani po týdnu expozice (Sepici-Dinçel a kol., 2009).

4.6 Léčiva a přírodní doplňky

Svobodová a kol. (2006) zkoumali vliv medikovaného krmiva Rupin Special s účinnou látkou oxytetracyclinum (5 g.kg⁻¹). Krmivo bylo podáváno v 8 dávkách (15 g.kg⁻¹ živé hmotnosti). Od třetí dávky bylo u kaprů K₂₋₃ pozorováno snížení RBC, PCV a Hb. Hodnoty RBC a Hb se po 15 dnech po skončení testu vrátily zpět k normálu. U kaprů K₁₋₂ k tak významným změnám nedošlo; hodnota RBC se téměř nezměnila, zato bylo zaznamenáno snížení hodnoty PCV, které přetrvávalo i po 15 dnech po ukončení

testu, hodnota Hb vzrostla až po osmé dávce. Z hlediska bílého krevního obrazu byl u obou věkových skupin zaznamenán pokles WBC, u skupiny K_{2,3} se však po 15 dnech hodnota vrátila k normálu. Rozdíl mezi věkovými skupinami byl vysvětlen tak, že mladší věkové skupiny preferují přirozenou potravu rybníka a byly méně ochotny přijímat předkládané krmivo.

Han a kol. (2014) se zabývali vlivem antibiotika metronidazolu v koncentracích 0,1, 0,5 a 2,5 mg.l⁻¹, kterým byl kapr obecný vystaven po dobu 30 dnů. Poté byly ryby přemístěny do čisté vody. U ryb vystavených koncentracím 0,5 a 2,5 mg.l⁻¹ došlo ke snížení hodnoty WBC.

Přípravek Astaxanthin je karotenoid syntetizovaný některými rostlinami nebo řasami a je přidáván do potravy jako doplněk stravy. Byl přidán do potravy kapra obecného jako podpůrný prostředek při léčbě infekce způsobené bakterií *A. hydrophila* vyvolal změny v následujících hematologických parametrech: hodnoty RBC, WBC, Hb a PCV se zvýšily po vystavení ryb koncentraci 50 a 100 mg.kg⁻¹ (Jagruthi a kol., 2014). Stejný přípravek byl využit i na pstruha duhového (Řehulka, 2000), kde došlo k naprosto opačnému výsledku. Hodnoty RBC, PCV a Hb se oproti kontrolním rybám signifikantně snížily. Použita byla koncentrace 49,8 mg.l⁻¹.

Propolis je látka produkovaná včelami, která disponuje různými účinky, např. protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální a jiné (Mani a kol., 2006). Podle Talas a kol. (2012) má pozitivní účinky na hematologické parametry kapra obecného, který byl vystaven koncentraci arzenu. Po působení arzenu se hodnoty hematologických ukazatelů odchýlily od kontrolní skupiny, avšak po aplikaci propolisu se hodnoty přiblížily zpět k původnímu stavu. Talas a Gulhan (2009) zkoumali také vliv různých koncentrací (0,01, 0,02 a 0,03 mg.l⁻¹) tohoto přírodního produktu na pstruha duhového. S rostoucí koncentrací byly zjištěny větší odchylky od kontrolní skupiny; nárůst WBC, pokles RBC, Hb a PCV a nárůst MCV, MCH a MCHC.

4.7 Perzistentní organické polutanty

Perzistentní organické polutanty (POPs) jsou organické látky, které jsou v přírodě obtížně rozložitelné a díky své kumulativní schopnosti se ukládají v organismu. U některých POPs byl prokázán i vliv na endokrinní systém; takové látky pak označujeme jako endokrinní disruptory (Yang a kol., 2005).

Mezi hlavní zástupce vyskytující se ve vodním prostředí patří např. polychlorované bifenyly, dioxiny a organochlorované pesticidy (Žlábek a kol., 2014).

V pokusu Pravdy a kol. (1989) byl vystaven kapří plůdek krmné směsi s příměsí PCB. Z hlediska hematologických údajů je zapotřebí brát v potaz, že již na začátku pokusu neodpovídal kapří plůdek hematologickým nálezem potřebám dlouhodobého testu. Co se týká změny červeného krevního obrazu, nebyly prokázány výrazné změny, avšak v bílém krevním obrazu došlo k výrazným změnám hemogramu. Již po 20ti denní expozici bylo sledováno výrazné snížení počtu bílých krvinek ($15,8 \pm 7,2 \text{ G.l}^{-1}$ oproti kontrole s hodnotou $77,16 \pm 32,14 \text{ G.l}^{-1}$).

Mnoho vědeckých publikací se zabývá vlivem perzistentních organických polutantů, ale zabývají se spíše jejich akumulací ve tkáních a orgánech ryb nebo ovlivněním imunitních reakcí.

5 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala vlivem cizorodých látek na hematologické parametry kapra obecného. Shrnula jsem základní informace o metodách stanovení jednotlivých hematologických ukazatelů, jak pro červený tak pro bílý krevní obraz.

Nejdůležitější částí této práce je ovlivnění těchto parametrů cizorodými látkami, které se mohou vyskytnout ve vodním prostředí.

Většina cizorodých látek, u nichž byl zaznamenán a publikován vliv na hematologické ukazatele kapra, je ve vodě přítomna v důsledku znečištění povrchových vod průmyslovými či komunálními odpadními vodami. Některé substance jsou používány záměrně jako léčiva nebo prostředky zlepšující odolnost ryb vůči onemocnění. Sloučeniny dusíku představují skupinu látek, které se ve vodě mohou vyskytovat přirozeně a z tohoto důvodu je dle mého názoru důležité znát, jak mohou ovlivnit hematologické parametry kapra. Z publikací, které jsem vyhledala, je zřejmé, že toxicitu těchto látek ovlivňuje mimo vodní prostředí a jeho chemického složení zejména doba trvání expozice. Při působení dusitanů je velmi významný nárůst koncentrace methemoglobinu a pokles koncentrace hemoglobinu, což způsobuje zabarvení krve do hněda a sníženou schopnost hemoglobinu přenášet kyslík. Po přemístění ryb do čisté vody jsou ryby schopné zotavení.

Těžké kovy způsobují velké změny v hematologických parametrech, avšak jsou u jednotlivých prvků tak rozdílné, že je složité je jednotně sumarizovat. Ryby vystavené koncentracím těžkých kovů vykazují známky stresu, což má za následek snížení imunitních reakcí, osmotickou nerovnováhu a změny v iontové výměně. Tyto změny pak způsobují změnu pH krve a tím se mění i hematologické parametry. Zejména u působení kadmia dochází k morfologickým anomáliím tvaru buňky nebo jádra erytrocytů.

Za zmínku stojí také působení pesticidů. Zejména u přípravků na bázi organofosfátů se různé publikace shodují na následujících změnách v hematologických parametrech: zvýšení počtu leukocytů a snížení počtu erytrocytů, koncentrace hemoglobinu a hodnoty hematokritu, což je pravděpodobně důsledek selhání krvetvorby. U pesticidů na bázi triazinů a diazinů je významné zejména snížení počtu

leukocytů a změny v procentuálním zastoupení jejich různých forem. Vzrůstá převážně zastoupení těch forem leukocytů, které jsou schopny fagocytózy.

Zajímavé by byly dle mého názoru i výsledky působení léčiv, ale vědecké publikace se jejich vlivům na hematologické parametry příliš nevěnují. Léčiv registrovaných pro ryby je velmi málo, ale v chovech ryb mohou být používána na základě doporučení veterinárního lékaře i léčiva registrovaná pro jiná potravinová zvířata. U těchto látek by bylo také dobré vědět, které dávky už hematologické parametry ohrožují, protože léčiva jsou jediná skupina cizorodých látek, u kterých můžeme správným dávkováním změnám v hematologických parametrech předejít.

Práce by se v budoucnu dala rozšířit o vlastní výzkumný experiment. O mnohých cizorodých látkách je v literatuře dostatek informací o jejich vlivu na organismus, na imunitní reakce, jejich působení na tkáň a orgány ryb, ale vliv na hematologii není ve výzkumech příliš často zahrnut, např. u působení kyanidů, léčiv nebo perzistentních organických polutantů.

6 Seznam použité literatury

ABBAS, H. H., 2001. *Acute toxicity of ammonia to common carp fingerlings (Cyprinus carpio) at different PH levels*. Pakitan Journal of Biological Sciences, 9(12), 2215-2221.

ABEDI, Z., KHALESİ, M.K., KOHESTAN ESKANDARI, S., 2012a. *Biochemical and Hematological Profiles of Common Carp (Cyprinus Carpio) under Sublethal Effects of Trivalent Chromium*. Iranian Journal of Toxicology: 7(20): 282 - 792.

ABEDI, Z., KHALESİ, M.K., KOHESTAN ESKANDARI, S., RAHMANI H., 2012b. *Comparison of Lethal Concentrations (LC50-96 H) of CdCl₂, CrCl₃, and Pb(NO₃)₂ in Common Carp (Cyprinus carpio) and Sutchi Catfish (Pangasius Hypophthalmus)*. Iranian Journal of Toxicology: 6(18): 672-80.

ADEDEJI, O. B., ADEYEMO, O. K., AGBEDE, S. A., 2009. *Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (Clarias gariepinus)*. African Journal of Biotechnology, 8(16), 3940.

AGGERGAARD, S., JENSEN, F.B., 2001. *Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout*. Journal of Fish Biology, 59(1), 13-27.

AL-AKEL, A. S., SHAMSI, M. J. K., 1996. *Hexavalent chromium: toxicity and impact on carbohydrate metabolism and haematological parameters of carp (Cyprinus carpio L.) from Saudi Arabia*. Aquatic sciences, 58(1), 24-30.

ALAM, M. K., MAUGHAN, O. E., 1995. *Acute toxicity of heavy metals to common carp (Cyprinus carpio)*. Journal of Environmental Science & Health Part A, 30(8), 1807-1816.

ARNOLD, J.E., 2009. *Hematology of Fish: WBC and RBC Cell Morphology*. Proceeding of the ACVP/ASVCP, Monterey, December 5-9, 2009.

BALON, E., MIŠÍK, V., 1958. *Vývoj dunajského kapra (Cyprinus carpio carpio L.) v priebehu predlarválnej fázy a larválnej periódy*. Biometrika dunajského kapra (Cyprinus carpio carpio L.) z dunajského systému na Slovensku. Bratislava: Slovenská akadémia vied, 125 s.

BALON, E., 1995. *Origin and domestication of the wild carp, Cyprinus Carpio: from Roman gourments to the swimming flowers*. Aquaculture 129: 3-48.

BARUŠ, V., OLIVA, O., ČERNÝ, K., GAJDŮŠEK, J., HENSEL, K., HOLČÍK, J., KÁLAL, L., KRUPAUER, V., KUX, Z., LIBOSVÁRSKÝ, J., LOM, J., LUSK, S., MORAVEC, F., PEŇÁZ, M., PIVNIČKA, K., PROKEŠ, M., RÁB, P., ŠPINAR, Z.,

ŠVÁTORA, M., VOSTRADOVSKÝ, J., 1995a. *Mihulovci - Petromyzontes a ryby - Osteichthyes (1)*. Vyd. 1. Praha: Academia. Fauna ČR a SR, svazek 28/1. 623 s. (178-183).

BARUŠ, V., OLIVA, O., ČERNÝ, K., GAJDŮŠEK, J., HENSEL, K., HOLČÍK, J., KÁLAL, L., KRUPAUER, V., KUX, Z., LIBOSVÁRSKÝ, J., LOM, J., LUSK, S., MORAVEC, F., PEŇÁZ, M., PIVNIČKA, K., PROKEŠ, M., RÁB, P., ŠPINAR, Z., ŠVÁTORA, M., VOSTRADOVSKÝ, J., 1995b. *Mihulovci - Petromyzontes a ryby - Osteichthyes (2)*. Vyd. 1. Praha: Academia. Fauna ČR a SR, svazek 28/2. 698 s. (9-17)

BAYLI, W.H., 1994. *A review of the biology and fisheries for northern bluefin tuna, Thunnus thynnus L., in the Pacific Ocean*. FAO Fisheries Technical Report No. 336: 244-296.

BLAXHALL, P.C., DAISLEY, K.W., 1973. *Routine haematological methods for use with fish blood*. Journal of fish biology, 5(6), 771-781.

BRUNGS, W.A., MCCORMICK, J.H., NEIHEISEL, T.W., SPEHAR, C.E., STOKES, G.N., 1977. *Effects of pollution on freshwater fishes*. J. W.P.C.F, Washington DC, 49:1425-1493.

CAMERON, J.N., 1971. *Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout*. Comparative Biochemistry and Physiology A 40: 734-749.

CAMPBELL, T.W.: Hematology of Fish. In: THRALL, M.A. et al., 2006. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, pp. 277–289.

CANLI, M., AY, O., KALAY, M. 1998. *Levels of Heavy Metals (Cd, Pb, Cu, Cr and Ni) in tissue of Cyprinus carpio, Barbus capito and Chondrostoma regium from the Seyhan River, Turkey*. Turkish Journal of Zoology 22: 149-158.

CLAUSS, T. M., DOVE, A. D., ARNOLD, J. E., 2008. *Hematologic disorders of fish*. Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice, 11(3), 445-462.

ČIHAŘ, J., 1993. *Ryby sladkých vod*. 1. vyd. Praha: Aventinum, Průvodce přírodou. 184 s. (128-131)

ČIHAŘ, J., MALÝ, J., 1978. *Sladkovodní ryby*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 189 s. (132-138)

DABROWSKA, H., WŁASOW, T., 1986. *Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indicators in common carp (Cyprinus carpio L.)*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 83(1), 179-184.

DAMIEN, C., CHANTAL, V.H., PIROUZ, S., ZERIMECH, F.H., LAURENCE, J., JEAN, M.H., 2004. *Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen Diploschistes muscorum (Scop.)R. Sant. –identification of oxidative stress biomarkers*. Water Air Soil Pollut, 152: 55– 69.

DE BOECK, G., DE SMET, H., BLUST, R., 1995. *The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, Cyprinus Carpio*. Aquatic Toxicology 32: 127-144.

DOBŠÍKOVÁ, R., VELÍŠEK, J., WLASOW, T., GOMULKA, P., SVOBODOVÁ, Z., NOVOTNÝ, L., 2006. *Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Neuroendocrinology Letters, 27(2), 101-105.

DUBANSKÝ, V., SVOBODOVÁ, Z., 1995. *Krev ryb*. Veterinářství 52: 69-71.

DUNGEL, J., ŘEHÁK, Z., 2005. *Atlas ryb, obojživelníků a plazů České a Slovenské republiky*. 1. vyd. Praha: Academia. 181 s. (28-30)

DRASTICHOVÁ, J., SVOBODA, M., KOLÁŘOVÁ, J.: *Vliv organofosforečných pesticidů na bílý krevní obraz kapra*. In: MIKEŠOVÁ, J. (red.), 2000. *Sborník referátů ze IV. české ichtyologické konference*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, VÚRH ve Vodňanech. 281 s. (144-147)

DRASTICHOVA, J., SVOBODOVA, Z., LUSKOVA, V., MACHOVA, J., 2004. *Effect of cadmium on hematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 72(4), 725-732.

DVOŘÁK, P., PYSZKO, M.: *Zevní popis, části a tvar rybího těla*, Odd. 2. In: DVOŘÁK, P., a kol., 2014. *Anatomie a fyziologie ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 189 s. (15-25)

EDDY, F.B., WILLIAMS, E.M., 1987. *Nitrite and freshwater fish*. Chemistry and Ecology, 3(1), 1-38.

ELLIS, A., 1977. *The leucocytes of fish: a review*. Journal of fish biology, 11(5), 453-491.

- GAD, S.C., 2007. *Animal models in toxicology*. CRC, New York, p 950.
- GAISLER, J., ZIMA, J., 2007. *Zoologie obratlovců*. 2. vyd. přeprac. Praha: Academia. 692 s. (306-307)
- GENTEN, F., TERWINGHE, E., DANGUY, A., 2009. *Atlas of Fish Histology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 47-56.
- HAN, J., ZHANG, L., YANG, S., WANG, J., TAN, D., 2014. *Detrimental effects of metronidazole on selected innate immunological indicators in common carp (Cyprinus carpio L.)*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 92(2), 196-201.
- HANEL, L., 1995. *Ochrana ryb a mihulí*. Vlašim: Český svaz ochránců přírody. 139 s. (36-47)
- HANEL, L., LUSK, S., 2005. *Ryby a mihule České republiky: rozšíření a ochrana = Fishes and lampreys of the Czech Republic: distribution and conservation*. 1. vyd. Vlašim: Český svaz ochránců přírody Vlašim. 448 s. (268-271)
- HASCHEK, W.M., WALLING, M.A., Rousseaux C., 2010. *Fundamental of toxicologic pathology*. Academic, New York, p 686.
- HAWKINS, R.I., MAWDESLEY-THOMAS, L., 2006. *Fish Haematology – A bibliography*. Journal of Fish Biology 4: 193-232.
- HESSER, E. F., 1960. *Methods for routine fish hematology*. The Progressive Fish-Culturist, 22(4), 164-171.
- HORÁKOVÁ, M.: Dusík. Odd. 4.1. In: HORÁKOVÁ, M., a kol., 2003. *Analytika vody*. Vyd. 2., opr. a rozš. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 335 s. (153)
- HOSSAIN, S., SHARMIN, S., HAQUE, A.M.D., SHAHJAHAN, M.D., 2014. *Hematological changes in common carp exposed to sub-lethal concentrations of sumithion*. Proceedings of 5th International Conference on Environmental Aspects of Bangladesh. 104-106.
- JAGRUTHI, C., YOGESHWARI, G., ANBAZAHAN, S.M., MARI, L.S.S., AROCKIARAJ, J., MARIAPPAN, P., SUDHAKAR, G.R.L., BALASUNDARAM, CH., HARIKRISHNAN, R., 2014. *Effect of dietary astaxanthin against Aeromonas hydrophila infection in common carp, Cyprinus carpio*. Fish & shellfish immunology, 41(2), 674-680.

JAHANBAKHSHI, A., HEDAYATI, A., HARSIJ, M., BARKHODAR, M., 2013. *Hematological and biochemical responses of common carp Cyprinus carpio to direct infusion of crude oil*. Comparative Clinical Pathology, 23(3), 799-803.

JENSEN, F.B., 1990. *Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation*. Journal of Experimental Biology, 152(1), 149-166.

KAMSTRA, A., SPAN, J.A., VAN WEERD, J.H., 1996. *The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, Anguilla anguilla (L.)*. Aquaculture Research, 27(12), 903-911.

KARBASSI, R., BAYATI, I., MOATTAR, F., 2006. *Origin and chemical partitioning of heavy metals in riverbed sediments*. Int. J. Environ. Sci. Tech, 3(1): 35 – 42.

KAŠPAR, V., RODINA, M., FLAJŠHANS, M., 2014. *Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (Cyprinus carpio)*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 29 s.

KOLÁŘOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z.: *Aplikace léčebně působících látek a přípravků do vodního prostředí (léčebné koupele ryb a jiker)*. Odd. 6.1. In: SVOBODOVÁ, Z., a kol. 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4. vyd., přeprac. Praha: Informatorium. 264 s. (47-59)

KOPP, R., ZIKOVÁ, A., BRABEC, T., LANG, Š., VÍTEK, T., MAREŠ, J.: *Dusitany v recirkulačním systému rybí farmy Pravíkov*. In: KOPP, R. (red.), 2009. *“60 let výuky rybářské specializace na MZLU v Brně” Sborník referátů z konference s mezinárodní účastí konané ve dnech 2. a 3. prosince 2009 v Brně*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 186 s. (105-110)

KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., 2005a. *Nitrite influence on fish: a review*. VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-, 50(11), 461.

KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., PIAČKOVÁ, V., SVOBODOVÁ, Z.: *Schopnost regenerace kapra obecného (Cyprinus carpio L.) po otravě dusitany*. In: VYKUSOVÁ, B. (red.), 2005b. *Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, VÚRH ve Vodňanech. 164 s. (43-50)

KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., PIAČKOVÁ, V., SMUTNÁ, M., 2006. *The ability of recovery in common carp after nitrite poisoning*. Veterinarni Medicina, 51(8), 423-431.

- LAGLER, K.F., 1977. *Ichthyology*. John Wiley and Sons, New York, USA. 506 s.
- LUSK, S., BARUŠ, V., VOSTRADOVSKÝ, J., 1992. *Ryby v našich vodách*. Vyd. 2. dopl. Praha: Academia. Živou přírodou. 248 s. (175-178)
- LUSKOVÁ, V., 1996. *Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes*. Acta Sc. Nat. Brno 31: 1-70.
- MAHONEY, J.B., MCNULTY, J.K., 1992. *Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary*. Transactions of the American Fisheries Society 12: 261-268.
- MANI, F., DAMASCENO, H. C. R., NOVELLI, E. L. B., MARTINS, E. A. M., SFORCIN, J. M., 2006. *Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables*. Journal of ethnopharmacology, 105(1), 95-98.
- MASOPUST, J., 2000. *Klinická biochemie. Část I*. Karolinum, Praha. 429 s.
- MIHÁLIK, J., REISER, F., 1986. *Naše ryby*. Vyd. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 144 s. (100-107)
- MODRÁ, H.: Faktory a látky způsobující akutní otravy vodních organismů. Odd. 7. In: VELÍŠEK, J., a kol., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 600 s. (245-268)
- NOVOTNÝ, E., BÖHM, R., GEISSEL, V., HOLMAN, J., 1966. *Veterinární histologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 637 s.
- PEČENÁ, M., SVOBODOVÁ, Z.: Změny v diferenciálním rozpočtu leukocytů u kapra po akutní intoxikaci pesticidy na bázi triazinů a diazinů. Odd. 46. In: PRAVDA, D. (red.), 1989. *Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny, Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989*. Praha: ČSVTS. 350 s. (čísla stran neuváděny)
- PERRY, S.F., 1997. *The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes*. Annual Review of Physiology, 59(1), 325-347.
- PIAČKOVÁ, V., PALÍKOVÁ, M., ZUSKOVÁ, E., FLAJŠHANS, M., 2014. *Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 64 s.

PITTER, P., 2009. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha. 592 s.

PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J., ZIMA, S., VÁVROVÁ, M., JIRÁSEK, J.: Dynamika časných změn hemogramu a biochemie krve a tkání v pokusu s experimentálními dietami s obsahem pcb a s příměsemi Hg a Cd ve vodním prostředí kapřího plůdku. Odd. 24. In: PRAVDA, D. (red.), 1989. *Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a докладů s anglicko-českými souhrny*, Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989. Praha: ČSVTS. 350 s. (čísla stran neuváděny)

PRAVDA, D., SVOBODOVÁ, Z.: Hematologie ryb. Odd. 10. In. DOUBEK, J., a kol., 2003. *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 2003. 464 s. (381-405)

RASHED, M.N., 2001. *Cadmium and lead levels fish (tilapia nilotica) tissues as biological indicator for lake water pollution*. Environ. Monit. Assess, 68: 75–89.

ŘEHULKA, J., 2000. *Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. Aquaculture 2000;190: 27-47.

REISER, F., 1996. *Ryby našich vod*. 1. vyd. Praha: Brázda. 144 s. (94-100)

REY VÁZQUEZ, G., GUERRERO, G.A., 2007. *Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)*. Tissue and Cell 39: 151–160.

SAGLAM, N., YONAR, M. E., 2009. *Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)*. Aquaculture Research, 40(4), 395-404.

SARAVANAN, M., KIM, J. Y., KIM, H. N., KIM, S. B., KO, D. H., HUR, J. H., 2015. *Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 58(4), 491-499.

SEPICI-DINÇEL, A., BENLİ, A. Ç. K., SELVI, M., SARIKAYA, R., ŞAHİN, D., ÖZKUL, I. A., ERKOÇ, F., 2009. *Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(5), 1433-1439.

SHAHEEN, T., AKHTAR, T., 2012. *Assessment of chromium toxicity in Cyprinus carpio through hematological and biochemical blood markers*. Turkish Journal of Zoology, 36(5), 682-690.

SIWICKI, A. K., COSSARINI-DUNIER, M., STUDNICKA, M., DEMAEL, A., 1990. *In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (Cyprinus carpio): II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response*. Ecotoxicology and environmental safety, 19(1), 99-105.

SPANGENBERG, R., SCHRECKENBACH, K., MEESE, J.: Main values for defining the state of health and productiveness of carp fingerlings (C1-2). Odd. 2. In: PRAVDA, D. (red.), 1989. *Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny, Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989*. Praha: ČSVTS. 350 s. (čísla stran neuváděny)

STRNADOVÁ, N.: Stanovení kovů ve vodách. Odd. 3.1. In: HORÁKOVÁ, M., a kol., 2003. *Analytika vody*. Vyd. 2., opr. a rozš. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 335 s. (101-103)

SVOBODA, M., LUSKOVÁ, V., DRASTICHOVÁ, J., ŽLÁBEK, V., 2001. *The Effect of Diazinon on Haematological Indices of Common Carp (Cyprinus carpio L)*. Acta Vet. Brno 2001, 70: 457-465.

SVOBODOVÁ, Z.: Otravy ryb a jejich etiologie. In: PISKAČ, A., KAČMÁR, P., BARTÍK, M., PROCHÁZKA, Z., SVOBODOVÁ, Z., ŠIKULA, J., 1985. *Veterinární toxikologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 254 s. (206-223)

SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J., 1986. *Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb*. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. 36 s.

SVOBODOVÁ, Z., VYKUSOVÁ, B.: Využití hematologických ukazatelů k vyhodnocení testů chronické toxicity. Odd. 22. In: PRAVDA, D. (red.), 1989. *Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny, Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989*. Praha: ČSVTS. 350 s. (čísla stran neuváděny)

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., LLOYD, R., VYKUSOVÁ, B., 1993. *Water quality and fish health*. EIFAC Technical Paper 54, FAO, Rome. 59 p.

SVOBODOVÁ, Z., VYKUSOVÁ, B., MÁCHOVÁ, J., MÜLLER, R., LLOYD, R., 1994. *Sublethal chronic effects of pollutants on freshwater fish*. R. Muller ir R. Lloyd. Lugano, 39-52.

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., KOLÁŘOVÁ, J., VYKUSOVÁ, B., PIAČKA, V.: Vliv vybraných negativních faktorů na hematologické ukazatele kapra obecného, *Cyprinus carpio* L., a lína obecného, *Tinca tinca* L. In: FLAJŠHANS, M. (red.), 1996. *Sborník vědeckých prací k 75. výročí založení VÚRH Vodňany*. VÚRH Jihočeské univerzity se sídlem ve Vodňanech: 93-103.

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J., 2000. *Ekotoxikologie: praktická cvičení část I*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. 69 s. (62)

SVOBODOVÁ, Z., LUSKOVÁ, V., DRASTICHOVÁ, J., SVOBODA, M., ŽLÁBEK, V., 2003. *Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Acta Vet Brno, 72(1):79–85.

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., DRASTICHOVÁ, J., GROCH, L., LUSKOVÁ, V., POLESZCZUK, VELÍŠEK, J., G., KROUPOVÁ, H., 2005. *Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride*. Aquaculture Research, 36(12), 1177-1184.

SVOBODOVÁ, Z., SUDOVA, E., NEPEJCHALOVÁ, L., ČERVINKA, S., VYKUSOVÁ, B., MODRA, H., KOLÁŘOVÁ, J., 2006. *Effects of oxytetracycline containing feed on pond ecosystem and health of carp (Cyprinus carpio L.)*. Acta Veterinaria Brno, 75(4), 571-577.

SVOBODOVÁ, Z.: Neinfekční nemoci. Odd. 7. In: SVOBODOVÁ, Z., a kol. 2007a. *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb*. 4. vyd., přeprac. Praha: Informatorium. 264 s. (72-114)

SVOBODOVÁ, Z.: Parazitární nemoci. Odd. 9.4. In: SVOBODOVÁ, Z., a kol. 2007b. *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb*. 4. vyd., přeprac. Praha: Informatorium. 264 s. (168-239)

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., KROUPOVÁ, H.: Otravy ryb. Odd. 14. In: SVOBODOVÁ, Z., a kol., 2008. *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Profi Press. 253 s. (201-217)

SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., MODRÁ, H., 2012. *Metody hematologického vyšetřování ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 38 s.

ŠPIČKA, J., SVOBODA, L., JANOUŠKOVÁ, D.: Stanovení obsahu methylrtuti v rybí tkáni. In: MIKEŠOVÁ, J. (red.), 2000. *Sborník referátů ze IV. české ichtyologické konference*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, VÚRH ve Vodňanech. 281 s. (54-57)

ŠTĚPÁNOVÁ, S.: Hodnocení toxicity látek a přípravků pro organismy vodního prostředí. Odd. 5. In: VELÍŠEK, J., a kol., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 600 s. (95-129)

TALAS, Z. S., GULHAN, M. F., 2009. *Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1994-1998.

TALAS, Z. S., DUNDAR, S. P., GULHAN, M. F., ORUN, I., KAKOOLAKI, S., 2012. *Effects of propolis on some blood parameters and enzymes in carp exposed to arsenic*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(2), 405-414.

TILAK, K. S., VEERAIHAH, K., RAJU, J. M. P., 2007. *Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, Cyprinus carpio (Linnaeus)*. *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 45-47.

VELÍŠEK, J., WLASOW, T., GOMULKA, P., SVOBODOVÁ, Z., DOBŠÍKOVÁ, R., NOVOTNÝ, L., DUDZIK, M., 2006. *Effects of cypermethrin on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Vet Med - Czech.*; 51(10):469–76.

VELÍŠEK, J., ŠTASTNÁ, K., SUDOVÁ, E., TUREK, J., SVOBODOVÁ, Z., 2009a. *Effects of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Neuroendocrinol Lett*; 30(Suppl 1): 236–241.

VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., 2009b. *Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Fish physiology and biochemistry*, 35(4), 583-590.

VELÍŠEK, J., SUDOVÁ, E., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., 2010. *Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 384-390.

VELÍŠEK, J., STARÁ, A., KOLÁŘOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., 2011. *Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (Cyprinus carpio L.) after long-term*

exposure to terbutryn in real environmental concentration. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100(3), 305-313.

VELÍŠEK, J., STARÁ, A., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., 2012. *Effects of long-term exposure to simazine in real concentrations on common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 79-86.

VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ, Z., BLAHOVÁ, J., MÁCHOVÁ, J., STARÁ, A., DOBŠÍKOVÁ, R., ŠIROKÁ, Z., MODRÁ, H., VALENTOVÁ, O., RANDÁK, T., ŠTĚPÁNOVÁ, S., KOCOUR KROUPOVÁ, H., MARŠÁLEK, P., GRABIC, R., ZUSKOVÁ, E., BARTOŠKOVÁ, E., STANCOVÁ, E., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 600 s. (13)

VINODHINI, R., NARAYANAN, M., 2009. *The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 6: 23-28.

VOSYLIENĚ, M. Z., 1999. *The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey)*. *Acta Zoologica Lituonica*, 9(2), 76-82.

VOSTRADOVSKÝ, J.: Počátky domestikace volně žijících ryb. Odd. 2.2. In: RANDÁK, T a kol., 2015. *Rybářství ve volných vodách*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 463 s. (14)

WARDLE, C. S., 1971. *New observations on the lymph system of the plaice Pleuronectes platessa and other teleosts*. *J. Mar. Bid. Ass. U.K.* 51, 977-990.

WILLIAMS, E.M., EDDY, F.B., 1988. *Anion transport, chloride cell number and nitrite-induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (Salmo gairdneri) and carp (Cyprinus carpio)*. *Aquatic Toxicology* 13. 29-42.

WITESKA, M., 1998. *Changes in selected blood indices of common carp after acute exposure to cadmium*. *Acta. Vet. Brno*, 67: 289 – 293.

WITESKA, M., 2001. *Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium*. *Acta Zoologica Lituonica*, 11(4), 366-371.

WITESKA, M., KOŚCIUK, B., 2003. *Changes in common carp blood after short-term zinc exposure*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 3: 15 – 24.

WITESKA, M., JEZIERSKA, B., WOLNICKI, J., 2006. *Respiratory and hematological response of tench, Tinca tinca (L.) to a short-term cadmium exposure*. Aquaculture International, 14(1-2), 141-152.

WITESKA, M., KONDERA, E., SZYMAŃSKA, M., OSTRYSZ, M., 2010a. *Hematological changes in common carp (Cyprinus carpio L.) after short-term lead (Pb) exposure*. Polish Journal of Environmental Studies, 19(4), 825-831.

WITESKA, M., KONDERA, E., LIPIONOGA, J., JASTRZEBSKA, A., 2010b. *Changes in oxygen consumption rate and red blood parameters in common carp Cyprinus carpio L. after acute copper and cadmium exposures*. Fresenius Environ Bull, 19, 115-122.

YANG, F.X., XU, Y., 2005. *Hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls and their endocrine disrupting mechanism*. Progress in Chemistry 17: 740-748.

ŽLÁBEK, V., ČERVENÝ, D., GRABIC, R., TUREK, J., RANDÁK, T., 2014. *Metodika hodnocení hygienické kvality masa ryb z hlediska obsahu cizorodých látek*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 30 s.

7 Seznam zkratek

LC50 = koncentrace testovaného vzorku, který vyvolá úhyn 50% testovaných organismů

48hLC50 = koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovaných ryb v úseku 48±2 hodin

96hLC50 = koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovaných ryb v úseku 96 hodin

BC = leukokrit

Er = počet erytrocytů

Hb = koncentrace hemoglobinu

Hk = hematokritová hodnota

Leuko = počet leukocytů

Lk = leukokritová hodnota

MetHb = koncentrace methemoglobinu

MCH = hemoglobin erytrocytu

MCHC = střední barevná koncentrace

MCV = střední objem erytrocytu

NPK = nejvyšší přípustná koncentrace

RBC = počet červených krvinek

WBC = počet bílých krvinek

Abstrakt

Cílem této přehledové studie bylo popsat metody stanovení základních hematologických parametrů a získat co nejvíce informací o cizorodých látkách, které je mohou svým působením ovlivnit. Předmětem této práce je kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.). Z hlediska cizorodých látek jsem se zaměřila na sloučeniny dusíku (amoniak, dusitany a kyanidy), kovy (Zn, Cu, Fe), těžké kovy (Hg, Cd, Pb, Cr), ropné látky, pesticidy (organofosfáty, triaziny a diaziny, pyretroidy), léčiva a přírodní doplňky a perzistentní organické polutanty. Ze shromážděných informací vyplývá, že největší vliv na hematologické parametry kapra obecného mají z uvedených látek zejména těžké kovy, které způsobují jak změny v hematologických parametrech, tak i buněčné anomálie, a pesticidy, u nichž se v důsledku selhání krvetvorby jedná zejména o snížení počtu červených krvinek, koncentrace hemoglobinu a hodnoty hematokritu a o změny v zastoupení různých forem leukocytů. Tato studie shrnuje poznatky o vlivech uvedených cizorodých látek a upozorňuje na nebezpečnost jejich působení a možné ohrožení zdraví ryb, nejen kapra obecného. Informace o působení mnohých cizorodých látek na krevní parametry ryb v dostupné vědecké literatuře schází.

Klíčová slova

Kapr obecný, *Cyprinus carpio* L., hematologie, rybí krev, znečišťující látky, pesticidy, těžké kovy

Abstract

The objective of this study was to describe the methods of determining the main haematological parameters and obtain as much information as possible about pollutants that may influence them. The subject of this thesis is the common carp (*Cyprinus carpio* L.). As far as pollutants are concerned, I focused on nitrogen compounds (ammonia, nitrite and cyanide), metals (Zn, Cu, Fe), heavy metals (Hg, Cd, Pb, Cr), petroleum substances, pesticides (organophosphates, triazines and diazines, pyrethroids), pharmaceuticals and natural supplements and persistent organic pollutants. Collected information imply that heavy metals and pesticides have the most important effect on haematological parameters of the common carp. Heavy metals cause changes in haematological parameters and cell anomalies and pesticides may cause haematopoietic failure, which especially means a decrease of number of red blood cells, the concentration of haemoglobin, the haematocrit value and the changes in the presence of different leukocyte forms. This study summarizes the knowledge of the effects of the aforementioned pollutants and highlights the danger of their effect as well as the possible threat to fish health, not just of the common carp. The information dealing with the effects of many pollutants on the blood parameters of fish is missing in available scientific literature.

Key words

Common carp, *Cyprinus carpio* L., haematology, fish blood, pollutants, pesticides, heavy metals