

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

**Diplomová práce**

**Vliv praziquantelu na raná vývojová stadia amura bílého**

**Autor:** Bc. Lucie Bártová

**Vedoucí bakalářské práce:** dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Ing. Nikola Mikušková

**Studijní program a obor:** N4106 Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

**Forma studia:** Kombinovaná

**Ročník:** Druhý

**České Budějovice, 2024**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích

Bc. Lucie Bártová

### **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu dr hab. Ing. Josefu Velíškovi, PhD., konzultantce Ing. Nikole Mikuškové a také Ing. Alžbětě Strouhové, za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při psaní této diplomové práce.

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Lucie BÁRTOVÁ  
Osobní číslo: V22N012P  
Studijní program: N4106 Zemědělská specializace  
Studijní obor: Rybnářství a ochrana vod  
Téma práce: Vliv praziquantelu na raná vývojová stádia amura bílého  
Zadávající katedra: Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

### Zásady pro vypracování

Akvakulturní chovy se neobejdou bez preventivních a léčebných opatření, která jsou součástí technologických postupů. Současná paleta v ČR registrovaných přípravků se jen z malé části může opírat o přípravky registrované pro ryby. V současné době jsou registrována pouze dvě léčiva s antimikrobiálním účinkem. S ohledem na limitaci indikační oblasti uvedených léčiv i na možnost omezeného výběru léčivých přípravků se jeví jako velmi žádoucí rozšíření spektra léčiv právě o přípravky k léčbě cestodóz a trematodóz. Pro tuto diplomovou práci byl vybrán praziquantel z indikační skupiny antiparazitika, registrovaný v ČR pro jiný druh potravinových zvířat než ryby.

Cílem diplomové práce je posoudit vliv praziquantelu na raná vývojová stádia amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika/bezpečnosti použití praziquantelu pro ryby.

V rámci diplomové práce bude proveden embryonarvální test toxicity na amuru bílém s praziquantelem. Během testu toxicity bude hodnocen vliv praziquantelu na mortalitu, chování, růst, ontogenetický vývoj, výskyt deformací, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy v tkáních raných vývojových stádií amura. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří vodní toxikologie a ichtyopatologie FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD pro testy toxicity na rybách. Stanovení oxidativního stresu a antioxidantních enzymů v tkáních amura bude prováděno dle jednotlivých metod.

Rozsah pracovní zprávy: 50-90 stran  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

### Seznam doporučené literatury:

- Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 42: 139-53.
- Fu, G.H., Dong, Y.P., Zhang, X.M., Hu, K., 2020. Metabolomic profiles and pathways of praziquantel in crucian carp. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 80: ID 103466.
- Kolářová, J., Zusková, E., Steinbach, Ch., Velíšek, J., 2017. Praktické návody k provádění léčebných postupů u vybraných parazitárních onemocnění ryb. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 166, 53 s.
- Kolářová, J., Svobodová, Z., 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 88, 29 s.
- Maciel, P.O., Affonso, E.G., 2021. Praziquantel against monogeneans of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International* 29: 2369-86.
- Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežiková, I., Kolářová, J., Pojezdal, L., Dyková, I., Scholz, Z., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. *JU v Č. Budějovicích, FROV Vodňany*, 462 s.
- Sudová, E., Piačková, V., Velíšek, J., Pijáček, M., Svobodová, Z., 2010. Efficacy testing of orally administered praziquantel to common carp naturally



infected by caryophyllidean tapeworms (*Platyhelminthes: Eucestoda*). *Acta Veterinaria Brno* 79: S73-S78

Velisek, J., Zuskova, E., Kubic, J., Sandova, M., Stara, A., 2022. Effects of praziquantel on common carp embryos and larvae. *Scientific reports* 12: 17290

Zuskova, E., Piačkova, V., Valentova, O., Zalohova, K., Velisek, J., 2022. Acute toxicity of praziquantel to fish *Danio rerio* and planktonic crustacean *Daphnia magna*. *Vet Med-Czech* 67: 579-584.

Zusková, E., Piačková, V., Máchová, J., Chupani, L., Steinbach, C., Stará, A., Velíšek, J., 2018. Efficacy and toxicity of praziquantel in helminth-infected barbel (*Barbus barbus* L.). *Journal of Fish Diseases* 41: 643-649.

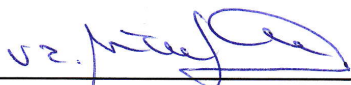
Vedoucí diplomové práce: **dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Ing. Nikola Třešňáková**


Datum zadání diplomové práce: **6. ledna 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2024**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
389 25 Vodňany (2)

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
děkan

L.S.

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 13. února 2023

## OBSAH

1. ÚVOD .....	9
2. OBECNÉ ZÁSADY LÉČBY U RYB .....	11
2. 1. Aplikace léčiv u ryb.....	12
2.1.1. Léčebné koupele ryb.....	12
2.1.2. Perorální aplikace léčiv .....	13
2.1.3. Injekční aplikace léčiv .....	14
2.2. Základy léčby parazitóz .....	15
2.2.1. Přehled nejdůležitějších léčebných látek používaných k léčebným antiparazitárním koupelím ryb v ČR.....	15
2.2.1.1. Kuchyňská sůl (NaCl) .....	15
2.2.1.2. Formaldehyd (HCHO).....	16
2.2.1.3. Kyselina peroctová (KPO, CH <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> H).....	16
2.2.1.4. Peroxid vodíku (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	17
2.2.1.5. Manganistan draselný (KMnO <sub>4</sub> ).....	17
2.2.1.6. Modrá skalice (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O).....	17
2.2.1.7. Akriflavin (C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> ).....	17
2.2.1.8. Azamethiphos (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS).....	18
2.2.1.9. Pyrethroidy .....	18
2.2.1.10. Benzimidazoly .....	18
2.2.1.11. Levamisol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S) .....	18
2.2.1.12. Ivermectin (C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub> ).....	19
2.2.1.13. Praziquantel (C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	19
2.2.1.14. Akvaristické přípravky .....	19
2.2.1.15. Léčba ryb bez léčebných preparátů .....	19
2.2.2. Přehled nejdůležitějších léčebných látek používaných k perorální antiparazitární léčbě ryb v ČR.....	19

2.2.2.1. Léčebné látky využívané k perorální aplikaci i k antiparazitárním koupelím ryb v ČR .....	20
2.2.2.2. Emamectin (C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>13</sub> ) .....	20
2.2.2.3. Diflubenzuron (C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	20
2.2.2.4. Teflubenzuron (C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	20
2.3. Praziquantel .....	21
2.3.1. Toxicita praziquantelu .....	22
2.3.1.1. Toxicita pro savce včetně člověka .....	22
2.3.1.2. Toxicita pro ryby a jiné vodní organismy .....	23
2.4. Motolice <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> .....	24
2.5. Amur bílý ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> ) .....	28
3. MATERIÁL A METODIKA .....	30
3.1. Embryolarvální test toxicity .....	30
3.1.1. Princip a podmínky testu .....	30
3.1.2. Experimentální materiál .....	30
3.1.3. Průběh testu .....	30
3.2. Odběr vzorků .....	35
3.3. Ontogenetický vývoj .....	36
3.4. Růst .....	39
3.5. Analýza antioxidantních biomarkerů a oxidativního stresu .....	40
3.5.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA .....	42
3.5.2. Stanovení stimulované lipidní peroxidace pomocí TBARS testu .....	43
3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT) .....	45
3.5.4. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH) .....	46
3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST) .....	48
3.5.6. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD) .....	48
3.5.7. Stanovení aktivity acetylcholinesterázy (AChE) .....	50

3.6. Statistické vyhodnocení testu .....	51
4. VÝSLEDKY .....	52
4.1. Kulení .....	52
4.2. Kumulativní mortalita.....	52
4.3. Ontogenetický vývoj.....	53
4.4. Růst.....	54
4.5. Oxidativní stres a antioxidační enzymy.....	56
5. DISKUSE .....	60
6. ZÁVĚR.....	63
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	64
8. ABSTRAKT .....	71
9. ABSTRACT .....	72

# 1. ÚVOD

Produkční akvakultura je v poslední době velmi progresivní a tento trend do budoucna poroste. S rostoucí populací lidí je spojen i růst rybní produkce a jelikož jsou dnes volné vody přelovené, světová produkce ryb je z velké části závislá na akvakultuře. Produkce ryb z akvakultury dnes již převládá nad úlovky z volných vod (Chu a kol., 2020). Stejně jako ve volných vodách, i v produkčních chovech se můžeme setkat s parazitárními infekcemi, které představují pro akvakulturu velké problémy (Bader a kol., 2019).

Parazité ryb představují velmi početnou živočišnou skupinu od jednobuněčných organismů až po koryše, kteří nejčastěji napadají kůži, žábry a trávicí trakt. Vlivem parazitárního onemocnění kůže může být narušena její hlenová vrstva s následným vznikem drobných poranění a narušení osmotické rovnováhy. Takto napadené ryby jsou pak také náchylnější ke vzniku onemocnění, způsobených bakteriemi, viry či plísněmi. Pokud parazité napadnou žábry, způsobí hyperplazii či zvýšenou produkci hlenu a dochází k obtížím při výměně plynů a iontů mezi rybou a vodním prostředím. Taktéž může dojít k infekci skrze porušený povrch žaber. V případě osídlení trávicího traktu ryby parazitem, dochází k její podvýživě vlivem odebírání živin parazitem anebo k infekci. Parazité ovšem napadají i jiné orgány ryb, např. metacerkárie motolice oční (*Diplostomum pseudospathaceum*) způsobující tzv. oční motolichnatost (Kolářová a kol., 2017; Bader a kol., 2019).

V produkčních chovech je většinou vysoká hustota ryb, což znamená, že se parazitární infekce může šířit velmi rychle. Proto je nutné infikované ryby co nejrychleji a nejefektivněji léčit a předejít tak významným ekonomickým ztrátám. Cílem léčby je tedy minimalizovat parazitární napadení infikovaného jedince a zabránit šíření infekce mezi ostatní ryby. Navíc, někteří parazité ryb mohou parazitovat i na člověku (např. motolice psí (*Opisthorchis felineus*), motolice žlučová (*Clonorchis sinensis*) a *Nanophyetus salmincola*) (Davydov, 1999; Bader a kol., 2019).

Léčba infikovaných ryb se opírá o léčivé přípravky – antiparazitika. V současné době není v České republice pro ryby registrované žádné antiparazitikum (ÚSKVBL, 2023). V současnosti je žádoucí testovat účinnost a bezpečnost antiparazitik, určených pro jiná potravinová zvířata. Jako účinné antiparazitikum se ukázal být například praziquantel, který je v ČR registrovaný pro jiná potravinová zvířata. Praziquantel účinkuje zejména proti motolicím a tasemnicím. Bezpečnost či riziko použití praziquantelu pro léčbu ryb zůstává ovšem stále otázkou. Proto cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv

praziquantelu na raná vývojová stadia amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) pomocí embryolarválního testu toxicity. Amur bílý byl vybrán z důvodu vysoké náchylnosti k nákaze motolicemi, jelikož se živí makrofyty, na kterých se vyskytují mezihostitelé některých druhů motolic – vodní plži. Během testu toxicity byl hodnocen vliv praziquantelu na mortalitu, růst, ontogenetický vývoj, výskyt deformací, biomarkery oxidativního stresu a antioxidační enzymy v tkáních. Výsledky této diplomové práce jsou podkladem pro hodnocení rizika či bezpečnosti použití praziquantelu pro ryby.

## 2. OBECNÉ ZÁSADY LÉČBY U RYB

Jak již bylo zmíněno výše, parazitární onemocnění představují pro akvakulturu nezanedbatelné problémy. Povinnosti pro chovatele ryb jsou ukotveny v Zákoně č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů. Chovatelům ryb ukládá zákon povinnost sledovat zdravotní stav ryb a pokud zaznamenají jakékoliv zhoršení zdravotního stavu, jsou chovatelé povinni zajistit chovaným rybám veterinární péči. Aplikaci léčivých přípravků upravuje Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech, ve znění pozdějších předpisů a taktéž Zákon č. 166/1999 Sb., ve znění pozdějších předpisů. V případě léčby ryb v chovech je třeba rozlišovat, zda se jedná o chovy potravinových ryb či zájmové chovy. Léčebné postupy se totiž významně liší (Zákon č. 166/1999 Sb.; Zákon č. 378/2007).

V chovech potravinových ryb je třeba se řídit výše zmíněnými zákony. Zákony v Evropské unii (EU) stanovují, že ryby, které jsou určeny ke konzumaci se musí léčit veterinárními přípravky, které mají stanovený a zároveň splňují maximální reziduální limit (MRL). MRL je nejvyšší přípustná koncentrace farmakologicky účinných látek v potravinářském výrobku, který byl získán z potravinových ryb. Na základě MRL se stanovuje i tzv. ochranná lhůta (OL). Po dobu ochranné lhůty nelze ke konzumaci dodávat potravinové ryby, u kterých byla prováděna léčba (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009; Nařízení Komise (EU) č. 37/2010; Bezpečnost potravin, 2023).

Pokud potřebné léčivo není registrované v České republice, ale je registrované v jiných státech EU, lze jej jednorázově dovést a použít. Toto lze ale provést pouze s udělením výjimky od Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL). Pokud je ale léčivo registrované pouze v zemích, které nejsou členy EU, je možné ho dovést a použít až po udělení výjimky Státní veterinární správou (SVS) ČR. Pokud veterinární lékař vyhodnotí, že k léčbě potravinových ryb je třeba zvolit humánní léčivo, může toto léčivo aplikovat na jeho vlastní odpovědnost v souladu s vyhláškou č. 344/2008 Sb. To jistě platí i pro léčiva pro jinou indikaci. V těchto případech se musí dodržet ochranná lhůta minimálně 500 denních stupňů (1 denní stupeň (d°) = 1 den při průměrné teplotě 1°C) před dodáním ryb ke konzumaci (Vyhláška č. 344/2008 Sb.; Kolářová, 2019).

V zájmových chovech ryb se k léčbě mohou použít léčiva, jež nemají stanoven MRL a ochranná lhůta se nemusí dodržovat, protože ryby ze zájmových chovů nejsou určeny k lidské konzumaci a MRL není u používaných léčiv stanoven. Tato léčiva musí být,

ale schválena Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Veterinární lékař, anebo chovatel sám po konzultaci s veterinárním lékařem, může použít také léčiva, která jsou dostupná chovatelské veřejnosti, např. určené pro jiný druh zvířete, humánní léčivo, léčivo pro jinou indikaci či léčivé přípravky připravené v lékárně. Měl by se ovšem měl vždy před aplikací léčiv poradit s veterinárním lékařem (Kolářová, 2019).

## **2. 1. Aplikace léčiv u ryb**

Při léčbě ryb je nejdůležitější správně vypočítat dávku léčiva na objem vody či živou hmotnost ryby, aby nedošlo k předávkování či poddávkování. Předávkování by mohlo způsobit otravu léčených ryb. V případě poddávkování by byla léčba neefektivní, a navíc by mohlo dojít k rezistenci patogenů vůči léčivu (Kolářová, 2019).

Před samotnou aplikací léčiva je vždy nutné provést tzv. test snášenlivosti. Při tomto testu se léčivo nejprve aplikuje pouze několika rybám. Pokud je vše v pořádku, může se následně léčivo aplikovat celé rybí obsádce. Pokud by test snášenlivosti ukázal negativní vliv na testované ryby, bylo by potřeba snížit dávku nebo zvážit jinou možnost aplikace či použít jiné léčivo. U veterinárních léčivých přípravků je třeba znát, kolikrát je vyšší letální koncentrace pro ryby než letální koncentrace pro patogeny. Hodnota rozdílu letálních koncentrací se nazývá terapeutický index (TI) a zjišťuje se pomocí testu toxicity na rybách. TI by měl u léčiv pro ryby být optimálně 10 (min. však 4) (Kolářová a kol., 2017; Kolářová, 2019).

### **2.1.1. Léčebné koupele ryb**

Pokud se léčivo aplikuje rybám do vodního prostředí, hovoříme o tzv. léčebných koupelích. Léčebné koupele jsou schopny efektivně odstranit ektoparazity (parazitující na povrchu těla ryb) i endoparazity (parazitující uvnitř těla ryb). Ektoparazité jsou potlačováni vlivem působení léčebné látky na kůži a povrch žaber ryb. Léčebná látka se zároveň skrze kůži a žábry vstřebává do těla ryb a zde působí i na další orgánové soustavy a potlačuje endoparazity. Výhodou léčebných koupelí je snadné zajištění správné dávky léčiva, které se dostane i k rybám, které již nepřijímají krmivo. Koupele se provádí v nádržích o dostatečném objemu vody a se vzduchováním. Čím delší je trvání koupele, tím nižší se volí hustota ryb. Samozřejmostí pro provádění léčebných koupelí je vždy kvalitní zdroj vody. Taktéž musí být připraven prostor, do kterého se ryby budou moci ihned přesadit v případě, že léčebná koupel vyvolá u ryb negativní reakci. Léčebné



koupele se neprovádí v recirkulačních systémech s biofiltry, jelikož léčebné preparáty mohou poškodit mikroorganismy v biofiltru (Trewes-Brown, 2000; Kolářová a Svobodová, 2009).

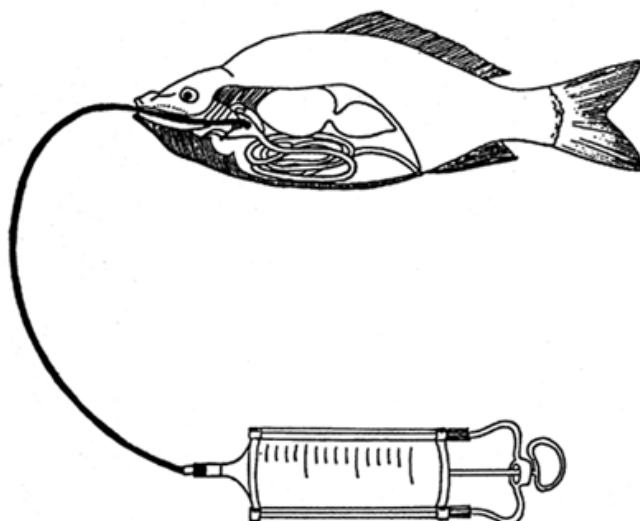
Léčebné koupele dělíme z časového hlediska na koupele (Kolářová a Svobodová, 2009):

- ponořovací, kdy délka koupele nepřesahuje 5 minut,
- krátkodobé, které jsou delší než 5 minut, ale nepřesahují 2 hodiny,
- dlouhodobé, které trvají déle než 2 hodiny.

Léčebné koupele se likvidují nejprve dostatečným naředěním a poté se mohou vypouštět do povrchových vod v souladu se zákonem č. 254/2001 Sb., o vodách a nařízením vlády č. 61/2001 Sb. Léčebné koupele se dají likvidovat také sorpcí na aktivním uhlí, které pak zlikviduje oprávněný subjekt a vyčištěná voda je vypuštěna do kanalizace (Nařízení vlády č. 61/2001 Sb.; Zákon č. 254/2001 Sb.).

### **2.1.2. Perorální aplikace léčiv**

Perorální aplikace léčiv spočívá u ryb v podávání léčiva v krmivu (medikovaná krmiva). Dávka medikovaného krmiva je vztažena na celkovou hmotnost rybí obsádky. Nevýhoda medikovaných krmiv spočívá hlavně v tom, že se léčivo nemusí dostat rovnoměrně ke všem rybám, jelikož oslabení jedinci již krmivo nepřijímají (Kolářová a Svobodová, 2009). Pokud chceme při perorální aplikaci zajistit potřebnou dávku léčiva každé rybě, je na místě využít aplikaci skrze jícnovou sondu (Obr. č. 1). Při této metodě aplikace léčiva se léčivo nejprve musí rozpustit ve škrobovém gelu, který se připravuje povařením 60 g potravinářského škrobu v 1 l vody. Takto připravený medikovaný gel je pak vpraven rybě do jícnu pomocí gumové hadičky a injekční stříkačky v maximální koncentraci 0,5 ml na 100 g živé hmotnosti ryby. Jícnovou sondu by měl vždy zavádět odborný pracovník znající anatomii daného druhu ryby (Kolářová, 2019).

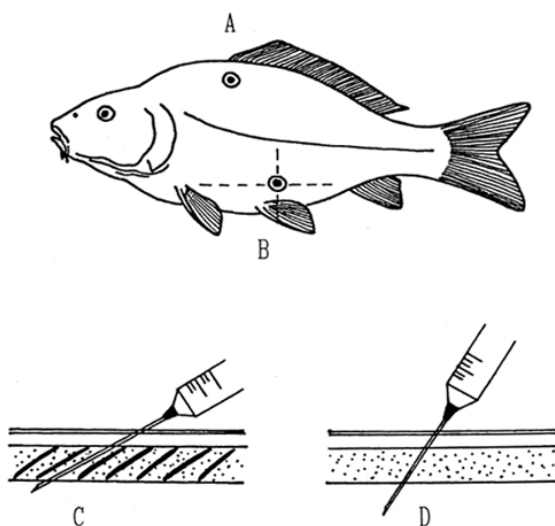


Obr. č. 1: Perorální aplikace léčiva pomocí jícnové sondy  
(převzato z Svobodová a kol., 2007).

### 2.1.3. Injekční aplikace léčiv

Injekční aplikace léčiv (Obr. č. 2) je nejpřesnější metoda, která zajistí přesnou dávku léčiva každé rybě. Nevýhoda této metody spočívá hlavně v nutnosti manipulace s rybami, což jim způsobuje stres. Injekční aplikaci dělíme na (Kolářová a Svobodová, 2009):

- Intraperitoneální – aplikace léčiva do dutiny tělní.
- Intramuskulární – aplikace léčiva do hřbetní svaloviny.



Obr. č. 2: Injekční aplikace léčiva u kapra: A – místo vpichu pro intramuskulární aplikaci; B – místo vpichu pro intraperitoneální aplikaci; C – sklon injekční jehly u šupinaté ryby, D – sklon injekční jehly u bezšupinaté ryby (převzato z Svobodová a kol., 2007).

## **2.2. Základy léčby parazitóz**

V rámci léčby parazitóz existuje tzv. kaskáda volby léčiva. Ta spočívá v tom, že první volíme přípravek registrovaný pro ryby. Pokud není žádný léčivý přípravek v ČR ani EU pro ryby registrovaný, přistupuje se k využití léčiva „off label“ (registrovaného v ČR). Nejprve se uvažuje o léčivu určeném pro jiná potravinová zvířata, poté pro nepotravinová zvířata a pokud není dostupná ani jedna z předešlých možností, aplikovat se může humánní léčivo. V poslední řadě je možné využít také lék připravený v lékárně, předepsaný „magistraliter“. Pokud není využívané léčivo v ČR registrované pro ryby, je nutné dodržet ochrannou lhůtu (500 d°). Z hlediska legislativy ČR je možné taktéž využívat přípravky, které nespádají pod léčiva, mající však prokazatelný antiparazitární účinek (např. chlorid sodný (NaCl) ve formě koupele), a to v souladu s Nařízením Komise EU č. 37/2010 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu (Kolářová a kol., 2017).

### **2.2.1. Přehled nejdůležitějších léčebných látek používaných k léčebným antiparazitárním koupelím ryb v ČR**

V České republice je v dnešní době k antiparazitárním koupelím využívaná řada léčebných preparátů. Použití většiny těchto látek k léčebné koupeli je možné na doporučení veterinárního lékaře, který zároveň stanoví ochrannou lhůtu minimálně 500 d°. Před každou koupelí je nutné provést test snášenlivosti. Některé látky používané k léčebným koupelím jsou pro vodní organismy vysoce toxické. Většina léčebných přípravků není v České republice pro ryby registrována, ale lze je se souhlasem příslušných institucí dovézt a použít (Kolářová a kol., 2017).

#### **2.2.1.1. Kuchyňská sůl (NaCl)**

Kuchyňská sůl se v akvakultuře používá za různými účely. Využívá se zejména při léčbě plísní, bakterií a parazitů, ačkoli nespádá pod léčiva. Využívá se také při přepravě ryb či anestezii, jelikož usnadňuje osmoregulaci a snižuje stres. NaCl je velmi dobře dostupná a disponuje příznivou cenou. Antiparazitární účinky NaCl jsou dobře prokázány a lze jí využívat k léčbě všech potravinových zvířat. NaCl je pro ryby, a následně i lidského konzumenta, relativně neškodná a nemusí se u ní tudíž stanovovat MRL (Tavares-Dias, 2021). V ČR je NaCl využívána k léčebným koupelím raných stadií ryb

až po ryby tržní velikosti. Léčebná koupel s NaCl se za žádnou cenu nesmí provádět v pozinkovaných nádržích, neboť by se vlivem NaCl uvolňoval do vody zinek, který je pro ryby toxický. Dávka NaCl na 1 l vody se pohybuje od 10 g do 30 g. Koupel se provádí 15 až 30 minut a je možné ji opakovat. Teplota by neměla klesat pod 5° C, léčebný účinek se pak značně snižuje. OL se v tomto případě nestanovuje (Kolářová a kol., 2017; PubChem, 2023a).

#### **2.2.1.2. Formaldehyd (HCHO)**

Formaldehyd je v akvakultuře celosvětově využíván k antiparazitárním koupelím. Je velmi účinný, ale na druhou stranu pro ryby nebezpečný. Během léčebné koupele s formaldehydem se u ryb může objevit hyperplazie žaber, nekróza ledvin, porucha jaterní funkce, vakuolizace kůže, změny v chování a dokonce úhyn (Adeyemo a kol., 2012; Mohammed a kol., 2012; Santos a kol., 2012). Je tedy třeba postupovat opatrně a volit bezpečnou koncentraci koupele a dobu jejího trvání. K tomu patří důsledné provedení testu snášenlivosti, který se musí v tomto případě provádět 24 h před samotnou koupelí. K formalinové koupeli se používá pouze čirý 37% vodný roztok formaldehydu. Vždy je třeba odstranit z roztoku bílou usazeninu na dně, jde totiž o paraformaldehyd, který je pro ryby vysoce toxický. Formaldehyd je třeba skladovat v temnu při teplotě nad 4° C (Pahor-Filho a kol., 2014; Kolářová a kol., 2017; Bader a kol., 2019; PubChem, 2023b).

#### **2.2.1.3. Kyselina peroctová (KPO, CH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>H)**

KPO je léčebná látka, která má dezinfekční, baktericidní, fungicidní, sporocidní a antiparazitární účinky. Kromě veterinární medicíny se využívá v mnoha jiných odvětvích (např. humánní medicína, potravinářství, zemědělství). Léčebné koupele s KPO mohou být pro ryby velmi nebezpečné, jelikož KPO je vysoce toxická pro vodní organismy a léčebná koncentrace KPO se blíží letální koncentraci pro ryby. Test snášenlivosti je tudíž nutný před každou léčebnou koupelí. Je taktéž důležité dbát na bezpečnost práce všech pracovníků, kteří provádějí léčebnou koupel, jelikož KPO způsobuje poleptání. V ČR je používán biocidní přípravek Persteril s hlavní účinnou látkou KPO. Dále Persteril obsahuje peroxid vodíku a kyselinu octovou. Persteril je k dostání ve dvou koncentracích, a to 4% a 15% roztok (podle obsahu KPO). Tento léčivý přípravek je snadno biologicky odbouratelný a nezanechává rezidua v tělech ryb ani ve vodním prostředí (Zusková a kol., 2011).

#### **2.2.1.4. Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Peroxid vodíku je dezinfekční přípravek a alternativní antiparazitikum, účinkující proti zástupcům říše protozoa a třídy monogenea. K léčebným koupelím se používá přípravek BioCare SPC ve formě granulí od výrobce BioMar, z něhož se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uvolňuje. V ČR se k léčbě využívá dávka 60 mg·l<sup>-1</sup> při délce koupele 25 minut. Možné je také použít 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peroxid vodíku se ve vodním prostředí poměrně rychle rozkládá na vodu a kyslík, tudíž není chronicky nebezpečný pro vodní organismy a navíc zvyšuje obsah kyslíku ve vodě (Kolářová a kol., 2017; PubChem, 2023c).

#### **2.2.1.5. Manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>)**

Manganistan draselný se v chovech ryb využívá především jako antiseptikum. Využití našla tato látka i jako antiparazitikum. V praxi se koupele v roztoku KMnO<sub>4</sub> používají k léčbě protozoárních infekcí a eudiploozonózy. Koncentrace KMnO<sub>4</sub> je závislá na délce léčebné koupele (čím delší koupel, tím nižší koncentrace). Při ponořovací koupeli se využívá koncentrace 1 g·l<sup>-1</sup>. Do roztoku KMnO<sub>4</sub> se taktéž mohou umisťovat ryby po výtěru, aby se předešlo případné infekci. Toxicita KMnO<sub>4</sub> se musí zohlednit i při likvidaci koupele. MRL není stanoven (Kolářová a kol., 2017; PubChem, 2023d).

#### **2.2.1.6. Modrá skalice (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)**

Modrá skalice je schopna efektivně potlačovat plísňe, řasy a některé parazity ryb. Modrá skalice byla dříve plošně aplikována na rybníky k potlačení sinic, od tohoto se ale kvůli stále přísnější legislativě upouští. Dnes se modrá skalice využívá k léčebným koupelím hlavně v akvaristice k léčbě piscinoodiniózy. Modrá skalice je pro vodní organismy vysoce toxická. K léčbě piscinoodiniózy se osvědčila koncentrace modré skalice 1,5 mg·l<sup>-1</sup> při délce koupele 12 hodin (Kolářová a kol., 2017; PubChem, 2023e).

#### **2.2.1.7. Akriflavin (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>)**

Akriflavin je jedním z prvních uznaných antibakteriálních léčiv. Jako léčivo je hojně využíván v humánní medicíně. Co se týče akvakultury, akriflavin je využíván jako léčivo většinou u akvarijských ryb. Používá se ke koupelím jiker i dospělých ryb proti plísním. Akriflavin je pro léčené ryby bezpečný, jelikož letální koncentrace je oproti koncentraci koupele vysoká. Akriflavinová koupel o koncentraci 5 až 10 mg·l<sup>-1</sup> a délce koupele 10

hodin efektivně potlačuje u akvariálních ryb parazity z říše protozoa (Kolářová a kol., 2017; Piorecka a kol., 2022; PubChem, 2023f).

#### **2.2.1.8. Azamethiphos (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS)**

Azamethiphos patří do skupiny organofosfátů a jedná se o insekticid. Je používán v akvakultuře jako antiparazitikum, ale využívá se taktéž jako insekticid proti mouchám např. v zemědělských objektech. V akvakultuře se používá přípravek Salmosan plv. 50%. Salmosan plv. je registrovaný v některých zemích EU a využívá se k léčbě ektoparazitózy u lososů, způsobené korýšem *Lepeophtheirus salmonis* (Kolářová a kol., 2017; Benchmark Animal Health Limited, 2022).

#### **2.2.1.9. Pyrethroidy**

Pyrethroidy jsou syntetické insekticidy využívané především v zemědělství. Některé pyrethroidy našly uplatnění i v akvakultuře k potlačení ektoparazitóz. V chovech lososů se hojně používají léčiva na bázi cypermethrinu (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) a deltamethrinu (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) k potlačení parazita *Lepeophtheirus salmonis*. V ČR není pro ryby registrován žádný léčivý přípravek na bázi cypermethrinu ani deltamethrinu, tudíž se využívají léčiva určená pro jiná zvířata (Kolářová a kol., 2017; Matsuo, 2019; PubChem, 2023g; PubChem, 2023h).

#### **2.2.1.10. Benzimidazoly**

Benzimidazoly jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, které jsou využívány v medicíně jako léčiva či v zemědělství jako fungicidy. Některé benzimidazoly vykazují antiparazitární účinky a jsou využívány v chovech ryb k potlačení parazitóz. V praxi jsou v léčbě ryb využívány látky fenbendazol (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) a mebendazol (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>). Léčiva na bázi těchto látek jsou v ČR registrována pouze pro jiná potravinová zvířata než ryby.

#### **2.2.1.11. Levamisol (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S)**

V ČR ani v EU není pro ryby registrován žádný přípravek s účinnou látkou levamisol. V ČR jsou ale léčiva s účinnou látkou levamisol registrovaná k léčbě prasat (Levamisole hydrochloride 80 %, Chemisole 300 mg·g<sup>-1</sup>) a brojlerů a krůt (Chemisole 200 mg·ml<sup>-1</sup>). V praxi se účinná látka levamisol osvědčila jako antiparazitikum, fungující při léčbě gyrodaktylózy a anguikolózy u úhořů (Kolářová a kol., 2017).

#### **2.2.1.12. Ivermectin (C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>14</sub>)**

Ivermectin je širokospektrální antiparazitikum, které je využíváno ve veterinární i humánní medicíně. Pro léčbu potravinových ryb může veterinární lékař v ČR použít např. přípravky Biomectin, Noromectin či Cermix, které jsou na bázi ivermectinu a v ČR jsou registrované pro jiná potravinová zvířata (Kolářová a kol., 2017; PubChem, 2023i).

#### **2.2.1.13. Praziquantel (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Praziquantel je derivát cholinu a širokospektrální antiparazitikum. Tato látka je podrobněji popsána v kapitole 2.3. (PubChem, 2023j).

#### **2.2.1.14. Akvaristické přípravky**

V akvaristice jsou velmi oblíbené přípravky s účinnou látkou malachitová zeleň. Ta se v žádném případě nesmí použít pro léčbu potravinových ryb. Při použití v akvaristice je vždy nutné provést test snášenlivosti. Odpadní voda z léčebných koupelí na bázi malachitové zeleně musí před vypuštěním do recipientu projít čištěním (Kolářová a kol., 2017).

#### **2.2.1.15. Léčba ryb bez léčebných preparátů**

Jednou z metod této léčby je přechodné zvýšení teploty vody (na 31 až 32°C). Výsledkem je zbavení se infekce a získání imunity. Tato léčba je účinná hlavně v případě ichtyoftiriózy, což je závažné parazitární onemocnění, jež způsobuje ektoparazit kožovec rybí (*Ichthyophthirius multifiliis*). Další metodou je přelovování. Vlivem přelovování se přerušuje vývojový cyklus parazita a tím se vyléčí i parazitóza. Další možností léčby je přechodné držení ryb v silném průtoku vody (Kolářová a kol., 2017).

### **2.2.2. Přehled nejdůležitějších léčebných látek používaných k perorální antiparazitární léčbě ryb v ČR**

Použití léčebných preparátů k perorální aplikaci potravinovým rybám ve většině případů indikuje veterinární lékař se současným stanovením ochranné lhůty minimálně 500 d°. Léčiva, která nejsou v České republice pro ryby registrována lze po udělení příslušné výjimky dovézt a použít (Kolářová a kol., 2017).

### 2.2.2.1. Léčebné látky využívané k perorální aplikaci i k antiparazitárním koupelím ryb v ČR

Při perorální antiparazitární léčbě ryb se používají některé léčebné látky a přípravky, které jsou využívány i při antiparazitárních koupelích. Těmito látkami jsou (Kolářová a kol., 2017):

- Levamisol – Levamisole hydrochloride v dávce 2,5 až 10 mg na kg živé hmotnosti ryb, který se rybám podává 7 dní (OL 500 d°).
- Fenbendazol – dávka 25 mg na kg živé váhy a krmit 3 dny, nebo dávka 50 mg na kg živé hmotnosti a krmit jednou týdně po dobu 2 týdnů (OL 500 d°).
- Mebendazol – dávka 20 mg na kg živé hmotnosti ryb a krmit jednou týdně po dobu 3 týdnů (OL 500 d°).
- Ivermectin – dávka 50 µg na kg živé hmotnosti ryb a krmit jednou týdně po dobu 2 týdnů (OL 500 d°).
- Praziquantel – dávka 50 mg na kg živé hmotnosti ryb a podávat pouze jednou.

### 2.2.2.2. Emamectin (C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>13</sub>)

Emamectin je insekticid a antiparazitikum, které účinkuje proti ektoparazitům. Ve světě se léčivé přípravky na bázi emamectinu používají k potlačení ektoparazita lososů – *Lepeophtheirus salmonis*. V EU jsou registrovány přípravky SLICE premix pro lososa a SLICE premix pro pstruha duhového (2 mg emamectinu v 1 g premixu). Emamectin je podáván v dávce 50 g na kg živé hmotnosti ryb po dobu 7 dnů (Kolářová a Svobodová, 2009).

### 2.2.2.3. Diflubenzuron (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Diflubenzuron je insekticid a antiparazitikum, které se využívá při nákaze korýšem *L. salmonis*. Diflubenzuron je účinnou látkou přípravku Releeze pelety (0,6 g diflubenzuronu v 1 kg pelet), který je registrovaný v některých zemích EU. Podává se v dávce 5 až 10 g Releeze pelet na 1 kg živé hmotnosti ryb a takto krmit 14 dní (Kolářová a kol., 2017).

### 2.2.2.4. Teflubenzuron (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

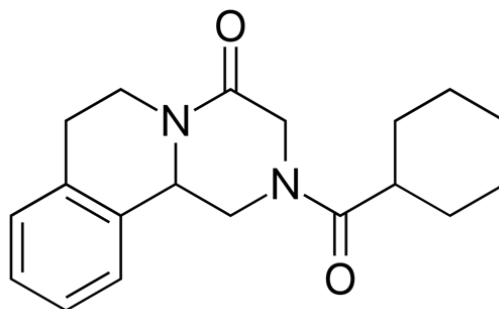
Léčivé přípravky na bázi teflubenzuronu se taktéž osvědčily při léčbě ryb, napadených korýšem *L. salmonis*. V EU je registrováno několik léčivých přípravků na



báti teflubenzuronu. Léčivá dávka teflubenzuronu je 10 mg na kg živé hmotnosti ryb a délka krmení je 7 dní (Kolářová a kol., 2017).

### 2.3. Praziquantel

Praziquantel (2-(cyklohexankarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexanhydro-4H-pyrazino[1,2-a]isochinolin-4-on);  $C_{19}H_{24}N_2O_2$ ) (Obr. č. 3) je širokospektrální anthelmintikum, které působí hlavně proti tasemnicím a motolicím (Sudová a kol., 2010), ale i proti parazitickým žabrohlístům. Toto léčivo ze skupiny cholinových derivátů se ve světě vyrábí pro veterinární a humánní použití (PubChem, 2023j). Mechanismus účinku praziquantelu proti parazitickým helmintům spočívá v narušení neuromuskulárního systému parazita, inhibici přichycení a změně propustnosti kůže (Treves-Brown, 2000).



Obr. č. 3: Strukturální vzorec praziquantelu (převzato a upraveno z Mehlhorn, 2021).

V České republice není pro ryby, ani pro žádná jiná potravinová zvířata, registrován žádný léčivý přípravek na bázi praziquantelu. Stejně tak je tomu i v celé EU. Veterinární lékař může, na vlastní odpovědnost, rozhodnout o aplikaci praziquantelu rybám, a to jak ve formě koupele, tak i formou perorálního podání. Pro praziquantel byl stanoven MRL  $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (EMA, 2022). Léčivé dávky praziquantelu pro ryby jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Léčebné dávky praziquantelu pro antiparazitární koupele a aplikaci v krmivu pro ryby (Kolářová a kol., 2017).

Dávka	Způsob léčby	Délka koupele/počet krmení	Účinek proti	MRL
1 mg·l <sup>-1</sup>	koupele	90 h	metacerkárie motolice <i>Diplostomum pseudosphataceum</i>	20 g·kg <sup>-1</sup>
1 mg·l <sup>-1</sup>	koupele	24 h	tasemnice <i>Bothriocephalus acheilognathi</i>	20 g·kg <sup>-1</sup>
2 mg·l <sup>-1</sup>	koupele	24 h	metacerkárie motolic	20 g·kg <sup>-1</sup>
2 mg·l <sup>-1</sup>	koupele	1-3 h	tasemnice	20 g·kg <sup>-1</sup>
10 mg·l <sup>-1</sup>	koupele	48 h	monogenea	20 g·kg <sup>-1</sup>
50 mg·kg <sup>-1</sup> ž. hm. ryb	perorální podání	krmit 1x	tasemnice, diplostomóza	20 g·kg <sup>-1</sup>

V rámci testů toxicity a efektivity léčby bylo zjištěno, že klíčovou roli při léčebných koupelích nehraje koncentrace praziquantelu, ale délka koupele. Co se týče léčby prostřednictvím perorálního podání praziquantelu, dávka 50 mg na kg živé hmotnosti ryb je dostačující k úplné eliminaci tasemnic (Sudová a kol., 2010; Maciel a Affonso, 2021).

### 2.3.1. Toxicita praziquantelu

#### 2.3.1.1. Toxicita pro savce včetně člověka

Bylo zjištěno, že po perorálním podání je praziquantel rychle absorbován a následně metabolizován a vylučován. Akutní toxicita praziquantelu pro savce byla testována hlavně na hlodavcích a psech. Potkanům byl praziquantel podáván v dávce 1000 mg·kg<sup>-1</sup>, jednou denně po dobu 4 týdnů. Potkani tuto dávku tolerovali bez obtíží. U psů nebyly poškozeny orgány při dávce 180 mg·kg<sup>-1</sup>, podávané jednou denně po dobu 13 týdnů, přičemž léčebná dávka pro psy, proti různým parazitárním helmintům, je nižší (Frohberg, 1984; Vercruyse a Claerebout, 2014). Léčebné dávky praziquantelu, na různé parazitární infekce, jsou pro člověka bezpečné. Bylo například testováno, zda je dávka praziquantelu 60 mg na kg živé hmotnosti člověka, podávaná třikrát, efektivní na potlačení parazita krevničky močové (*Schistosoma haematobium*) a zároveň bezpečná pro člověka (Darko a kol., 2020).

### 2.3.1.2. Toxicita pro ryby a jiné vodní organismy

Akutní toxicita praziquantelu pro ryby je samozřejmě závislá na druhu, věku a zdravotním stavu ryby. Raná vývojová stadia bývají obecně citlivější. Akutní toxicita praziquantelu pro ryby byla již pro některé druhy stanovena – 24hLC50 je pro amura bílého 49,7 mg·l<sup>-1</sup> (Mitchell a Hobbs, 2007), hodnota 96hLC50 pro juvenilní parmy obecné (*Barbus barbus*) byla 28,6 mg·l<sup>-1</sup> (Zusková a kol., 2018) a pro keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) 53,52 mg·l<sup>-1</sup> (Nwani a kol., 2014). Tyto koncentrace jsou násobně vyšší, než je potřeba pro úspěšnou léčbu. Bylo například zjištěno, že letální koncentrace pro 2 měsíce staré ryby dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (24h a 96hLC50 byly 39,9 a 30,4 mg·l<sup>-1</sup>) je násobně vyšší než dávky praziquantelu při léčebných koupelích (viz Tab. č. 1) (Zusková a kol., 2022).

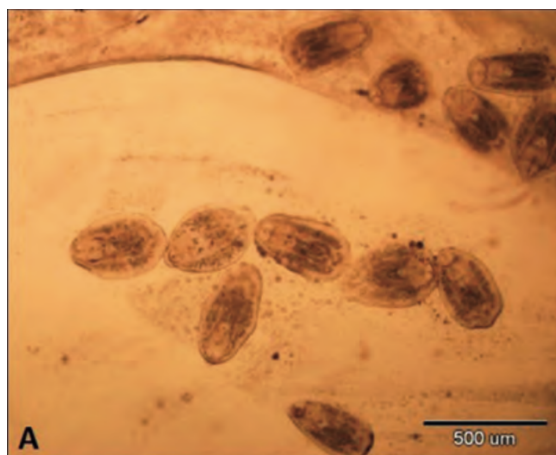
U raných vývojových stadií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) bylo prokázáno snížení růstu a aktivity některých antioxidantních enzymů (katalázy a superoxid dismutázy) po 28 dnech expozice 3 mg·l<sup>-1</sup> praziquantelu (Velíšek a kol., 2022).

Dle dostupných studií by praziquantel, v léčebných dávkách pro ryby, neměl představovat nebezpečí ani pro zooplankton. Vypočítaná hodnota 48hEC50 pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) byla v rámci testu toxicity 42,7 mg·l<sup>-1</sup> (Zusková a kol., 2022).

## 2.4. Motolice *Diplostomum pseudospathaceum*

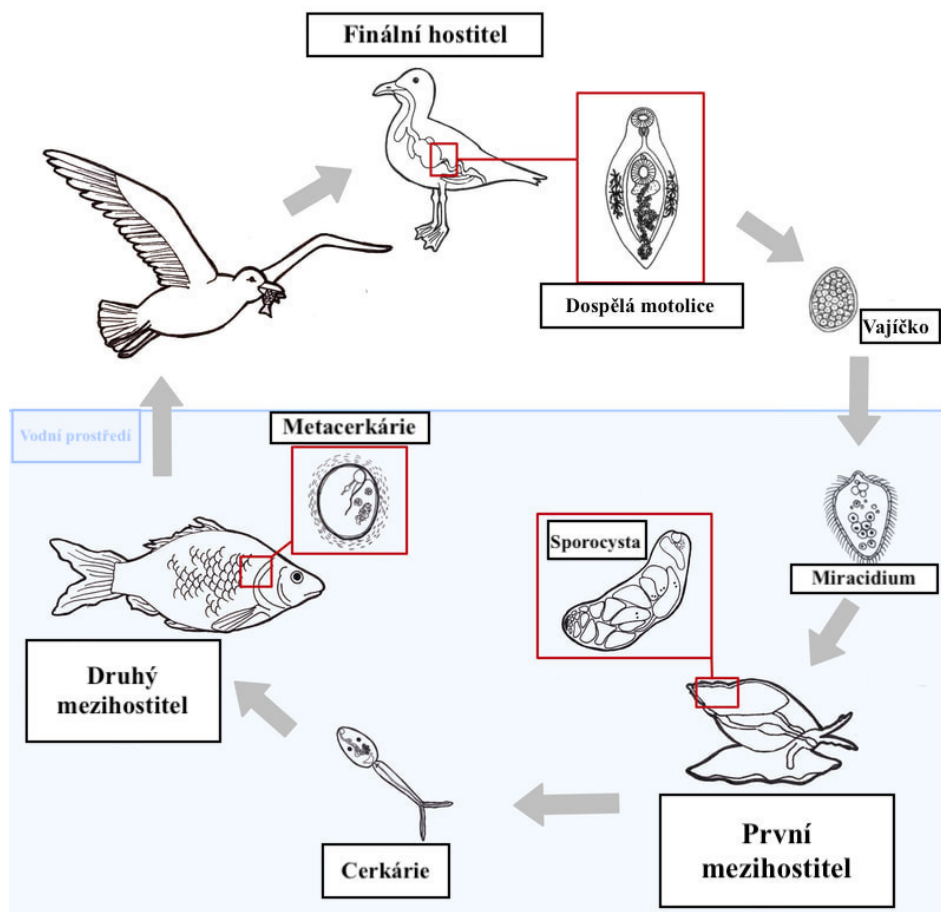
Motolice (Trematoda) jsou parazitičtí ploštěnci, většinou parazitující na sladkovodních a mořských rybách. V dnešní době je popsáno více než 20 tisíc druhů těchto organismů. Motolice jsou malé, dorsoventrálně zploštělí ploštěnci, nepřesahující délku 25 mm. Většina motolic má na těle 2 přísavky, a to ústní a břišní. Motolice jsou ve většině případů hermafrodité a jejich vývojový cyklus probíhá přes mezihostitele (nepřímý vývoj). Počet mezihostitelů motolic je většinou 2, můžeme se ale setkat s druhy motolic, jejichž vývoj probíhá přes 1 nebo i 3 mezihostitele. Ryby mohou působit jako finální hostitelé, kdy parazituje dospělý jedinec motolice nebo mohou působit jako mezihostitelé. V tomto případě na rybě parazituje pouze 1 vývojové stádium motolice, tzv. metacerkárie. Motolice u ryb parazitují v podstatě ve všech orgánových soustavách, nejčastěji však parazitují v trávicím traktu ryb (Volf a kol., 2007; Zusková a Scholz, 2019).

Metacerkárie motolice oční (*Diplostomum pseudospathaceum*) parazitují u ryb v očích a způsobují takzvanou diplostomózu neboli oční motoličnatost (Obr. č. 4). V očích jedné ryby mohou parazitovat i stovky metacerkárií, díky nimž dochází ke zhoršenému vidění a následně se objevují změny v chování ryb. Vývojový cyklus motolice oční probíhá přes 2 mezihostitele – vodního plže a sladkovodní rybu. Finálním hostitelem je pták čeledi Laridae (rackovití). Ve střevech těchto ptáků se dospělí jedinci motolice oční pohlavně rozmnoží a vajíčka se v trusu ptáků dostávají do vodního prostředí. Z těchto vajíček se pak ve vodě líhnou obrvené larvy tzv. miracidia (Voutilainen a kol., 2008).



Obr. č. 4: Metacerkárie motolice oční (*Diplostomum pseudospathaceum*)  
(převzato z Palíková a kol., 2019).

Miracidia nepřijímají potravu, díky brvám jsou schopny aktivního pohybu a vyhledávají svého prvního mezihostitele (vodní plže rodu *Lymnea* či *Radix*). Miracidia musí najít mezihostitele nejpozději do 48 hodin, poté hynou. Jakmile miracidium najde vhodného mezihostitele, přes pokožku se dostane do jeho hepatopankreatu a tam se z něj vytvoří mateřská sporocysta. Ta pak produkuje dceřiné sporocysty, které následně tvoří velké množství cercárií, které opouští tělo plže. Díky rozvětvenému ocásku jsou cercárie schopny aktivního pohybu a vyhledávají druhého mezihostitele, kterého musí nalézt do 48 hodin. Druhým mezihostitelem motolice oční je sladkovodní ryba (Vyhlídalová a Soldánová, 2020). Když cercárie proniknou povrchem těla do těla ryby, ztrácí ocásek a krví jsou zaneseny do očí. Cercárie se poté v očích mění na metacerkárie, které postupně rostou. Ryba má pak vlivem nákazy zhoršené vidění a pohybuje se u hladiny. Je tedy snadnou kořistí pro rybožravé ptáky např. racka, který rybu uloví a po pozření dochází k dokončení vývojového cyklu (Obr. č. 5) (Zusková a Scholz, 2019).



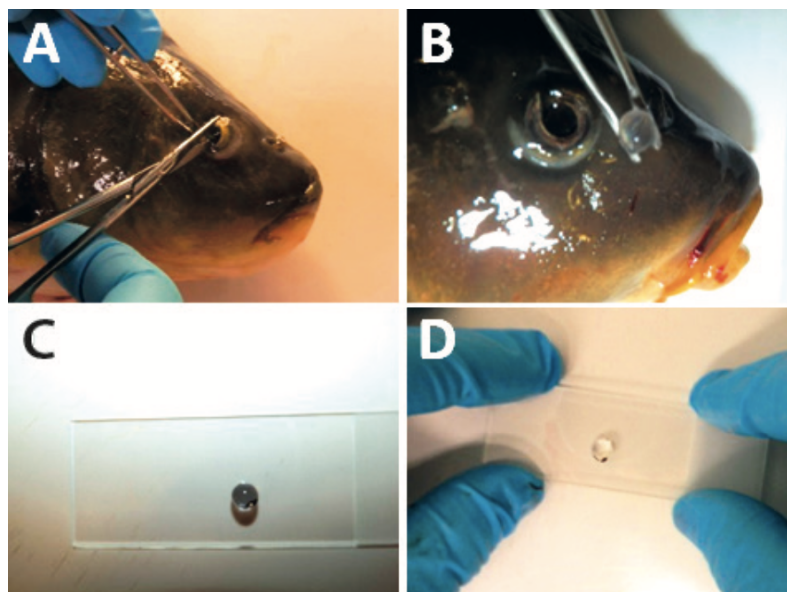
Obr. č. 5: Vývojový cyklus motolice oční (*Diplostomum pseudospathaceum*)  
(převzato a upraveno z Palíková a kol., 2019).

Výskyt onemocnění je tedy podmiňován výskytem mezihostitele – vodního plže rodu *Lymnea* či *Radix* a teplotou vody. Aby cercárie opustily tělo vodního plže, musí být teplota vodního prostředí vyšší než 10°C. Největší množství uvolněných cercárií do vodního prostředí a jejich nejvyšší aktivita byla pozorována při teplotním rozmezí 18 až 22 °C (Lyholt a Buchmann, 1996; Zusková a Scholz, 2019).

Motolice oční jsou tedy parazité, kteří ovlivňují chování svého mezihostitele, aby zvýšily pravděpodobnost, že se dostanou do těla finálního hostitele. Napadená ryba ztrácí únikové reflexy a pohybuje se u hladiny, tudíž je snadnou kořistí. Existují i studie, které objevily, že ryby napadené tímto parazitem mají zvýšenou frekvenci dýchání, čímž se usnadňuje vstup cercárií z vodního prostředí do těla ryby (Mikheev, 2023). Toto chování parazitů se obecně nazývá anglickým výrazem „parasite-increased trophic transmission“ (PITT). Tento parazit ohrožuje ryby v chovech i ve volných vodách. Negativní vliv tohoto onemocnění je v poslední době nejvíce pozorován v chovech amura bílého (Zusková a Scholz, 2019). Diplostomóza mívá většinou chronický průběh, vyznačující se výskytem většího množství metacercárií v oční čočce. K úhynům dochází pouze ojediněle (Karvonen a Seppälä, 2008).

Mezi klinické příznaky patří hlavně změny chování ryb, jako je například zhoršená koordinace v prostoru, snížení příjmu potravy, změny antipredačního chování (plavání u hladiny) a snížení únikové rychlosti (Zusková a Scholz, 2019). Dále se může projevit tzv. Diplostomóza, která u ryb vyvolává patologické změny, jako je zarudnutí kůže a drobné krváceniny okolo míst průniku cercárií do těla ryby ale i změny na oční čočce (Zusková a Scholz, 2019).

Diagnóza se stanovuje po usmrcení ryby na základě vyšetření oční čočky obou očí a zjištění přítomnosti a počtu metacercárií motolice. Oko se nejprve vyšetří pohledem a poté je vyjmuta oční čočka. Ta se následně zkoumá pod mikroskopem a je zaznamenáván počet metacercárií (Obr. č. 6) (Kolářová a kol., 2017).



Obr. č. 6: Vyšetření oční čočky (převzato z Kolářová a kol., 2016).

Jako preventivní opatření proti nákaze diplostomózou, je třeba pravidelně sledovat zdravotní stav ryb a pokud se v rybochovném zařízení motolice oční objeví, je třeba přerušit její vývojový cyklus, to znamená eliminovat vodní plže. Toho lze dosáhnout buďto pravidelným odstraňováním plžů z rybochovných objektů (síta, filtry), nebo vysazením moluskofágních druhů ryb, např. amura černého (*Mylopharyngodon piceus*) ve stáří 3 až 5 let, násady kapra  $K_2$  (nad 500 g) či lína  $L_3$  (500 až 600 ks·ha<sup>-1</sup>) (Zusková a Scholz, 2019).

K léčbě diplostomózy se využívá léčivo praziquantel buďto v krmivu nebo ve formě koupelí (Zusková a Scholz, 2019).

## 2.5. Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*)

Amur bílý (*C. idella*) (Obr. č. 7) je sladkovodní ryba z čeledi kaprovití (Cyprinidae), původně pocházející z řek východní Asie. Odtud se nejprve rozšířil do Ruských vod a poté do celé Evropy. Import do České republiky byl realizován z Ruska v roce 1961 ve formě váčkového plůdku na Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický (VÚRH) ve Vodňanech (Krupauer, 1974). Dnes se amur bílý vyskytuje i v Africe a Spojených Státech Amerických (USA) (Bogudskaya a kol., 2017). Zatímco plůdek amura bílého se po strávení žloutkového váčku živí drobným zooplanktonem, dospělí jedinci se živí převážně makrofyty (Pavlov a kol., 1994).



Obr. č. 7: Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) (převzato z Alamy Stock Photo, 2013).

Samci pohlavně dospívají ve věku 5 let a samice ve věku 7 let, přičemž délka života se u amura bílého pohybuje kolem 15 let. Tyto aspekty ovšem závisí na podmínkách prostředí (Schofield a kol., 2005; Bogudskaya a kol., 2017). Amur bílý je teplomilný druh ryby, to znamená, že k výtěru dochází, když teplota vody dosáhne 23 °C. Amur je pelagofilní druh ryby, k výtěru tudíž dochází ve vodním sloupci. Jikry jsou silně bobtnavé a mohou se zvětšit z 1 mm až na 5 mm. Amur bílý se taktéž vyznačuje tzv. porcovým výtěrem, to znamená, že výtěr probíhá v několika etapách/dávkách (Rykova, 1972; Bogudskaya a kol., 2017). Ke kulení plůdku dochází po 30 d°, kdy amur bílý dosahuje délky 5 mm a ihned plave. Následuje strávení žloutkového váčku, kdy amur přechází na exogenní výživu a měří 7 mm (Koblitskaya, 1981; Chapman, 2006).

Vzhledem k tomu, že je amur bílý původem z Číny, je v této zemi realizován jeho hlavní komerční chov (Chen a kol., 2012). V Evropě je chov amura bílého již dobře



zvládnutý a tento nepůvodní duh zde nepůsobí větší problémy. V USA ovšem panují obavy z nepříznivého účinku nepůvodních amurů bílých na tamější vodní biotu. Naproti tomu se amur bílý osvědčil v likvidaci přemnožené makrovegetace. Z tohoto důvodu jsou do vod USA vysazováni triploidní amuři, kteří jsou neplodní, aby nedošlo k přemnožení amurů, a následnému negativnímu vlivu na vodní ekosystém (Enennaam, 1990).

Nejvýznamnější produkce amura bílého tvoří v Číně až 20 % produkce všech sladkovodních ryb. Amur se obvykle chová v intenzifikačních/polointenzifikačních rybníčcích v obsádce 1000 až 3000 kg·ha<sup>-1</sup>. Osvědčily se ale také klecové chovy (intenzivní způsob chovu), při nichž je možné vyprodukovat 30 až 50 kg·m<sup>-3</sup>. Chov amura bílého má dále také velký význam v Indii a Vietnamu (FAO, 2024). V ČR, je amur bílý chován v polykultuře s kaprem s nižší výslednou produkcí v porovnání s Čínou. V ČR byla produkce amura bílého v roce 2018 515 tun, v roce 2019 536 tun, v roce 2020 611 tun, v roce 2021 695 tun a v roce 2022 548 tun (Mze, 2023).

Migrace amura byla studována v řece Amur (Čína), kde je amur původním druhem. Bylo zjištěno, že amuři migrují za třením do horní části toku, migrace je pomalá a trvá několik let. Během prvních 2 let dokáží jedinci urazit až 500 km (Gorbach a Krykhtin, 1988; Chilton a Muoneke, 1992). Na území USA byla pozorována migrace amurů související s třením, potravou a přezimováním. Amur je schopen migrovat až tisíce kilometrů, to znamená, že potenciál šíření tohoto druhu je vysoký (Moyle, 1986).

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1. Embryolarvální test toxicity**

Embryolarvální test toxicity praziquantelu na amura bílého byl proveden dle metody OECD, konkrétně OECD test č. 210 (OECD, 2013). Při provádění embryolarválního testu toxicity byl dodržován zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a taktéž vyhláška Mze ČR č. 207/2006 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Testování bylo provedeno v laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH) ve Vodňanech.

##### **3.1.1. Princip a podmínky testu**

Embryolarvální testy toxicity slouží k definování letálních a subletálních účinků různých chemických látek na testované organismy, v tomto případě raná vývojová stadia ryb. Princip tohoto druhu testování je založen na vystavení raných stádií ryb různým koncentracím chemických látek, rozpuštěných ve vodě. Podmínky testu by měly být nejlépe průtočné nebo případně semistatické. Embryolarvální test toxicity vždy začíná umístěním oplodněných jiker do testovacích skleněných nádob až do juvenilního stadia ryb. V průběhu testu se u ryb sleduje mortalita, růst, chování a vznik morfologických malformací, a zaznamenávají se fyzikálně-chemické parametry vody (především teplota, pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a koncentrace testované látky). Po ukončení testu mohou být rybí tkáně podrobeny biochemickým a chemickým analýzám. Výsledkem testu je stanovení hodnoty LOEC (z angl. *Lowest Observed Effect Concentration*), což je nejnižší koncentrace testované látky, při níž jsou již pozorovány účinky. A také stanovení hodnoty NOEC (z angl. *No Observed Effect Concentration*), což je nejvyšší koncentrace testované látky, při níž ještě nepozorujeme žádný účinek (OECD, 2013).

##### **3.1.2. Experimentální materiál**

Celkem 1800 kusů jiker amura bílého 10 hodin po oplodnění bylo použito jako experimentální materiál. Jikry byly získané z líhně Jihočeské univerzity, Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV JU) ve Vodňanech.

##### **3.1.3. Průběh testu**

Test byl nasazen 6. 6. 2023 a oplozené jikry byly rozděleny do 6 skupin po 3 opakováních. Do 18 skleněných misek byly umístěny oplodněné jikry amurů bílých 10

hodin po oplodnění. Do každé misky bylo umístěno 100 jiker. Jelikož byla každá skupina nasazena po 3 opakováních, bylo celkem využito 1800 kusů jiker. Celkem byly 4 skupiny s roztokem praziquantelu a 2 kontrolní skupiny, z toho 1 s etanolem (použit jako rozpouštědlo). Testovány byly 4 různé koncentrace praziquantelu, a to konkrétně  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (běžně využívaná léčebná dávka),  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Praziquantel byl získán od firmy Ecological Laboratories Inc., USA.

Praziquantel byl nejprve rozpuštěn v etanolu a poté byl smícháním s destilovanou vodou vytvořen roztok o požadované koncentraci praziquantelu. Schéma přípravy testovacích roztoků je znázorněno v tabulce č. 2. Etanol byl jako rozpouštědlo využit z důvodu nízké rozpustnosti praziquantelu ve vodě. Kontrolní skupina © obsahovala pouze dechlorovanou vodu, jejíž parametry byly následující: teplota  $22,1 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ; nasycení vody kyslíkem nad 95 %; pH v rozmezí 7,82 až 8,01;  $\text{KNK}_{4,5}$   $0,57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$   $0,81 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ; celkový amoniak  $0,011 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kontrolní skupina s etanolem (E-C) obsahovala etanol v koncentraci  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tato koncentrace byla použita pro skupinu P4 ( $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Tabulka č. 2. Příprava testovacích roztoků.

Látka	Skupina		Koncentrace (mg·l <sup>-1</sup> )	Dávka do 1 l roztoku (mg)	Objem příslušných roztoků			Roztok č.
					Do 1 1	Do 2 1	Do 3 1	
Ředící voda	C		0	0	0	0	0	
Etanol	E-C	Kontrola s rozpouštědlem			6 ml	12 ml	18 ml	I
Praziquantel	P1	50 % léčebné dávky	1	1	1 ml	2 ml	3 ml	II
Praziquantel	P2	Léčebná dávka	2	2	2 ml	4 ml	6 ml	II
Praziquantel	P3	2x léčebná dávka	4	4	4 ml	8 ml	12 ml	II
Praziquantel	P4	3x léčebná dávka	6	6	6 ml	12 ml	18 ml	II

Poznámka: Roztok I: 20 ml etanol + 80 ml vody.

Roztok II: 100 mg praziquantelu rozpuštěno ve 20 ml etanolu + 80 ml vody – 1 ml roztoku II obsahuje 1 mg praziquantelu.

Na začátku testu byly misky umístěny do boxu v laboratoři (Obr. č. 8). Vzduchování bylo zajištěno prostřednictvím vzduchovacích kamínků a světelný režim byl přirozený. Test měl semistatický charakter, tudíž byly roztoky ve všech miskách měněny každých 24 hodin (Obr. č. 9, 10, 11). Při výměně roztoků byl kladen důraz na opatrnost, aby se zabránilo případnému poškození či úhynu amurů. Fyzikálně-chemické parametry vody byly denně sledovány. Každý den byla taktéž sledována mortalita a uhynulí jedinci byli pravidelně odstraňováni.



*Obr. č. 8: Uspořádání misek během embryolarválního testu toxicity.*



*Obr. č. 9: Příprava testovacích roztoků před výměnou lázně.*



Obr. č. 10 a 11: Výměna testovací lázně.

Od 4. dne byl plůdek amura krmen nauplii žábřonožky solné (*Artemia salina*) (Obr. č. 12). Krmění probíhalo dvakrát denně *ad libitum*. Žábřonožky se líhly v zázemí laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH. Nejprve byl připraven solný roztok s obsahem soli 90 g na 3 l vody. Solný roztok byl převeden do vhodné nádoby se zajištěním stálého pohybu roztoku vzduchováním. Do solného roztoku bylo následně přidáno 6 g vajíček žábřonožky solné. Při teplotě 25°C se žábřonožky vylíhnou za 48 hodin. Čím je teplota vyšší, tím kratší je doba líhnutí.



Obr. č. 12: Odstředění žábřonožky solné (*Artemia salina*).

### 3.2. Odběr vzorků

Ve dnech 8, 15, 22 a 29 probíhaly odběry vzorků amurů ke stanovení ontogenetického vývoje a růstu (Obr. č. 13, 14, 15). Při odběrech bylo z každé skupiny odebíráno 6 jedinců. 29. den expozice, tedy 4. 7. 2023 byl test ukončen. Amuři byli usmrceni pomocí anestetika MS222 (Tricain methanesulfonát v dávce 250 mg do 1 l vody). Usmrcení amuři byli dále zváženi a poté přemístěni do zkumavek, které byly umístěny do hlubokomrazicího boxu a přechovávány při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  do doby, než byly provedeny biochemické analýzy.



*Obr. č. 13: Odběr amurů 8. den testu.*



*Obr. č. 14: Odběr amurů 29. den testu.*

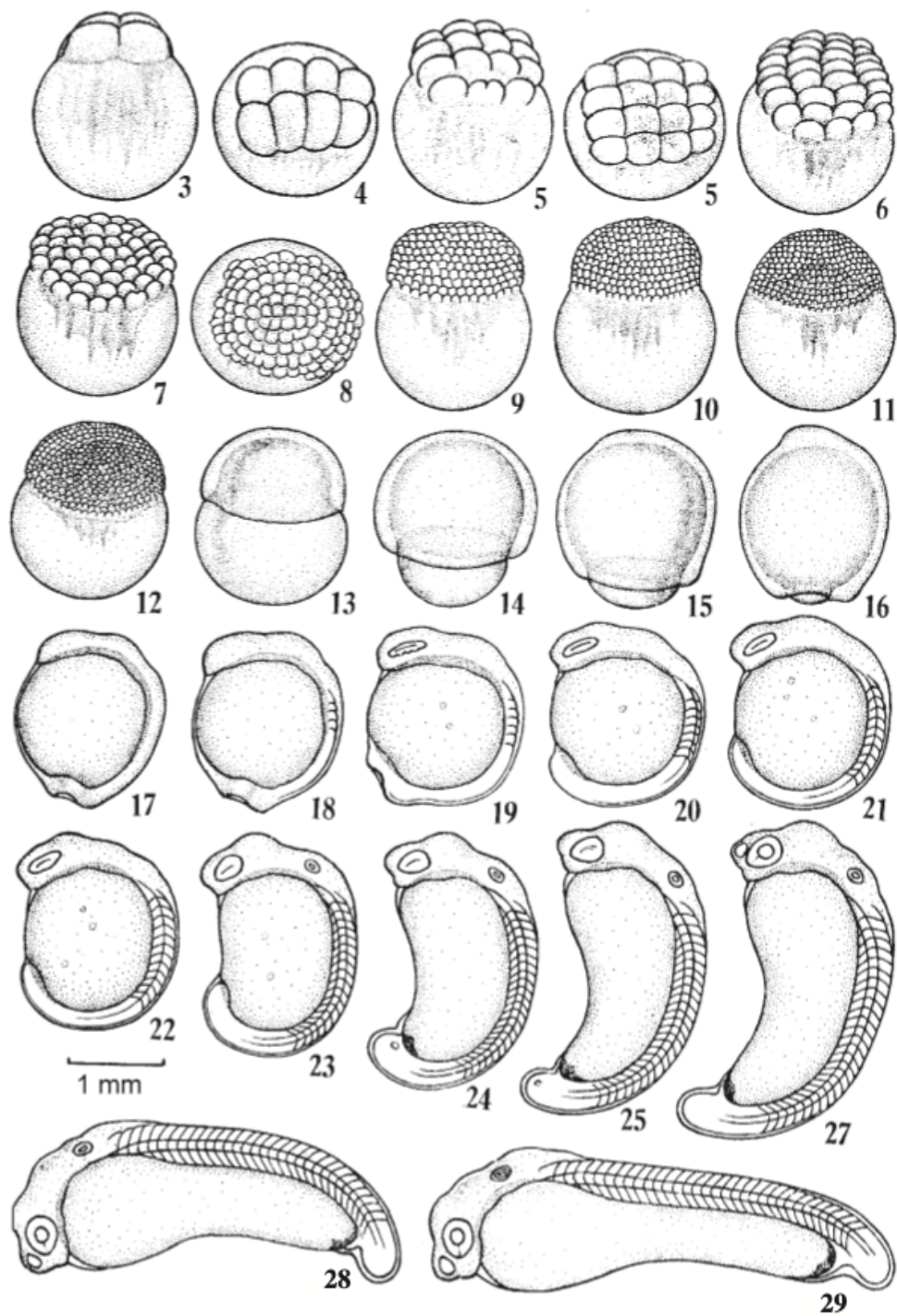


*Obr. č. 15: Odebrané vzorky.*

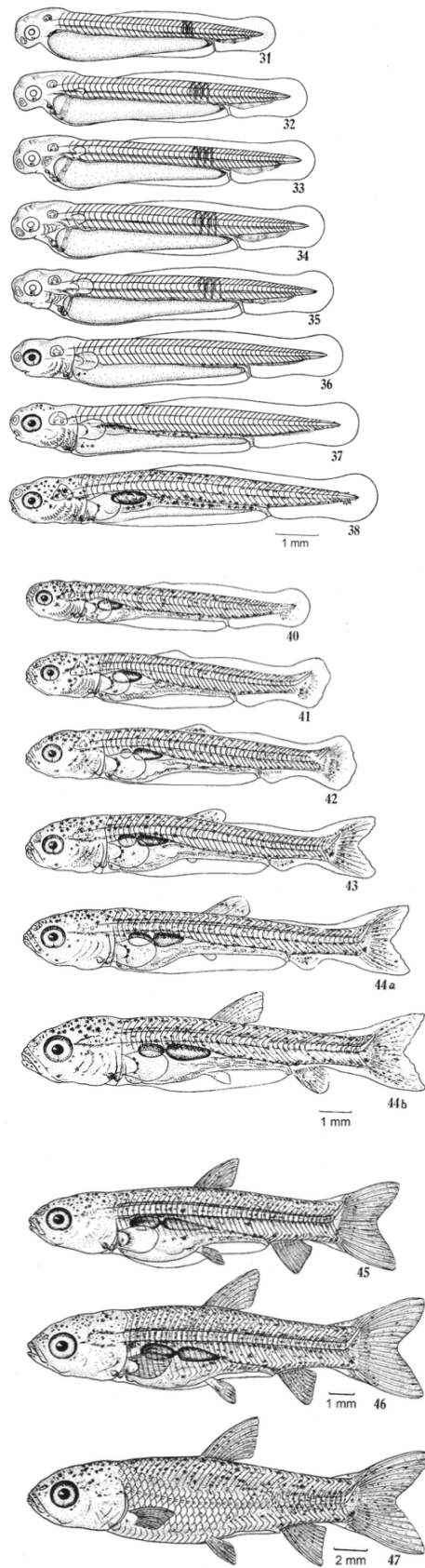
### **3.3. Ontogenetický vývoj**

Ve dnech 8, 15, 22 a 29 bylo odebráno 6 amurů v každé přeživší experimentální skupiny pro vyhodnocení ontogenetického vývoje. U amura je popsáno 30 embryonálních stádií (E1-E30; Obr. č. 6), 18 stádií po vykulení (P1-P18; Obr. č. 17) a 1 juvenilní stádium (J1; Obr. č.18) (Yi a kol., 2006).

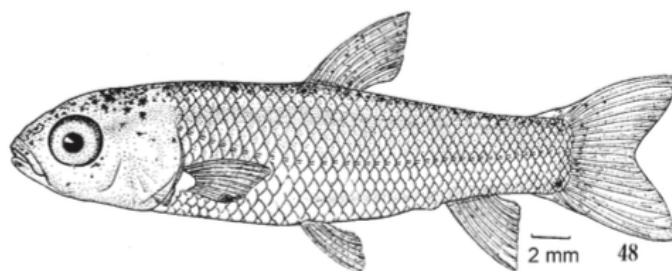




Obr. č. 16: Ontogenetický vývoj amura bílého (embryonální stádia)  
 (převzato a upraveno z Yi a kol., 2006).



Obr. č. 17: Ontogenetický vývoj amura bílého (stádia po vykolení)  
 (převzato a upraveno z Yi a kol., 2006)



Obr. č. 18: Ontogenetický vývoj amura bílého (juvenilní stádium) (převzato a upraveno z Yi a kol., 2006)

### 3.4. Růst

Za účelem zhodnocení růstu bylo 8, 15, 22 a 29 den odebráno 6 amurů z každé přeživší skupiny. Celková délka (TL) byla měřena stereomikroskopem za použití mikrometru. Hmotnost byla měřena pomocí analytických vah Mettler-Toledo (Obr. č. 19).



Obr. č. 19: Vážení odebraných amurů (odběr z 22. dne expozice).

Průměrné specifické rychlosti růstu (SGR) experimentálních skupin byly vypočteny pro období od prvního odběr vzorků (8. den) do konce expozice (29. den). Exponované skupiny byly srovnávány s kontrolou pomocí metody OECD (2000).

Průměrná specifická rychlost růstu byla pro každou skupinu vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\text{SGR} = \frac{\overline{\ln w_2} - \overline{\ln w_1}}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

kde: SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině;  $w_1, w_2$  = hmotnosti jedné ryby v čase  $t_1$  a  $t_2$  [g];  $t_1$  = čas začátku expozice a  $t_2$  = čas konce expozice [dny].

Inhibice specifické rychlosti růstu (I) v každé experimentální skupině byla vypočtena následovně:

$$I_x [\%] = \frac{\text{SGR}_x(\text{kontrola}) - \text{SGR}_x(\text{skupina})}{\text{SGR}_x(\text{kontrola})} \cdot 100$$

kde:  $I_x$  = inhibice specifického růstu ve vybrané experimentální skupině po  $x$  dnech expozice;  $\text{SGR}(\text{kontrola})$  = průměrná specifická rychlost růstu v kontrolní skupině;  $\text{SGR}(\text{skupina})$  = průměrná specifická rychlost růstu ve vybrané experimentální skupině.

Fultonův koeficient hmotnostní kondice (FWC) byl vypočten pomocí následujícího vzorce:

$$\text{FWC} = \frac{W \cdot 10^5}{\text{TL}^3}$$

kde: FWC = Fultonův koeficient hmotnostní kondice;  $W$  = hmotnost ve vybrané experimentální skupině [g];  $\text{TL}$  = celková délka ve vybrané experimentální skupině [mm].

### **3.5. Analýza antioxidantních biomarkerů a oxidativního stresu**

Biomarkery oxidativního stresu a antioxidantů byly po ukončení testu analyzovány pouze u amurů ze skupin C, E-C, P1 a P2, jelikož amuři ze skupin P3 a P4 v průběhu testu uhynuli. Vzorky byly ihned po odebrání zmrazeny v tekutém dusíku a poté přemístěny do hlubokomrazícího boxu s teplotou  $-80$  °C. Před vlastní analýzou byly vzorky zváženy na analytických vahách Mettler-Toledo. K naváženému vzorku byl následně přidán homogenizační PBS pufr v množství 1 ml pufru na 100 mg tkáň. Takto připravené vzorky byly následně zhomogenizovány v homogenizátoru TissueLyser II QIAGEN® (Obr. č. 20). Aby se zabránilo degradaci vzorků, byly stále umístěny na ledu

(Obr. č. 21). Zhomogenizované vzorky byly následně rozpipetovány do eppendorf zkušavek a uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do provedení jednotlivých analýz.



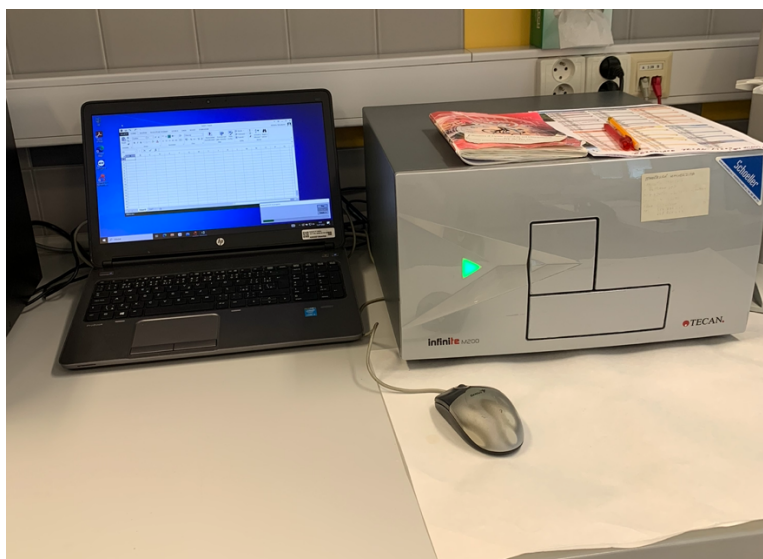
*Obr. č. 20: Homogenizace vzorků pomocí homogenizátoru TissueLyser II QIAGEN®.*



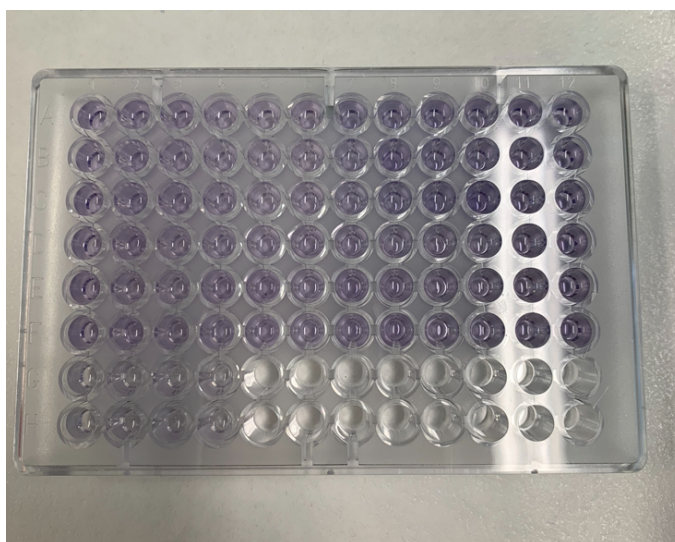
*Obr. č. 21: Umístění vzorků na ledu.*

Veškeré analýzy byly provedeny spektrofotometricky prostřednictvím přístroje TECAN Infinite M200 (TECAN Austria GmbH) v mikrodestičkovém provedení (Obr. č. 22, 23).





*Obr. č. 22: Spektrofotometrická analýza prostřednictvím přístroje TECAN Infinite M200 (TECAN Austria GmbH).*



*Obr. č. 23: Mikrotitrační destička s napipetovanými vzorky, určenými ke spektrofotometrické analýze.*

### **3.5.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA**

#### **Princip metody**

Podle metody Lowryho a kol. (1951) je tato metoda založena na redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ , na níž se podílí hlavně peptidová vazba. Kyselina bichinoninová (BCA) tvoří s redukovánými ionty mědi za alkalických podmínek modrofialový barevný komplex. Pro reakci mezi roztokem BCA a peptidovými vazbami je potřebná teplota  $37^{\circ}\text{C}$ . Analýza probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm.

### Materiál a reagensie

- 0,1 M roztok NaOH,
- BSA standard – Sigma Aldrich (P-0914),
- roztok kyseliny bicinchoninové (BCA) – Sigma Aldrich (B-9643),
- roztok síranu měďnatého (CuSO<sub>4</sub>) – Sigma Aldrich (C-2284).

### Postup stanovení

Den před samotnou analýzou bylo ke 30  $\mu\text{l}$  zhomogenizované tkáně přidáno 570  $\mu\text{l}$  0,1 M roztoku NaOH. Následně byly vzorky ponechány při pokojové teplotě do druhého dne.

Druhý den bylo 10  $\mu\text{l}$  vzorku napipetováno do mikrotitrační destičky. Následně bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého. Tento roztok vznikl smícháním 19,6 ml BCA a 0,4 ml CuSO<sub>4</sub>.

Následně byla mikrotitrační destička překryta fólií a vzorky byly inkubovány v termoboxu při teplotě 37°C. Tato teplota je potřebná pro reakci mezi BCA a peptidovými vazbami. Po inkubaci byla odstraněna fólie a vzorky byly spektrofotometricky změřeny při vlnové délce 562 nm.

### Kalibrační řada

K sestavení kalibrační řady byl použit standard BSA (1 mg BSA na 1 ml + 0,1 M NaOH). Jako blank byl použit 0,1 M roztok NaOH. Kalibrační řada byla stanovena v rozsahu 12,5 až 1000  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### Vyhodnocení

Koncentrace proteinů byla vypočítána podle sestavené kalibrační křivky se standardem BSA. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny v jednotkách  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## **3.5.2. Stanovení stimulované lipidní peroxidace pomocí TBARS testu**

### Princip metody

Princip stanovení stimulované lipidní peroxidace je zhodnocení potenciálu zhomogenizovaného vzorku podstoupit lipidní peroxidaci. Lipidní peroxidace (LPO) se stanovuje pomocí TBARS (z angl. thiobarbituric acid reactive substances – látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou) testu, který je založen na stanovení barevných

aduktů. Tyto barevné adukty vznikají reakcí produktů LPO s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Produktem LPO je malondialdehyd (MDA), který vzniká reakcí reaktivních forem kyslíku s nenasycenými mastnými kyselinami. Reakcí MDA a TBA vzniká barevný komplex, který je spektrofotometricky měřen při vlnové délce 532 nm (Surai a kol., 1996).

#### Materiál a reagensie

- TCA-BHT (20 % kyselina trichloroctová + 2 % butylovaný hydrotoluen v poměru 200:1),
- 0,6M HCl,
- TRIS-TBA (25 mM TRIS + 10 mM TBA),
- standard MDA (22 % 1,1,3,3-tetraethoxypropan v 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),
- PBS homogenizační pufr,
- 2 mM FeSO<sub>4</sub> v PBS pufru.

#### Postup stanovení

Před samotnou analýzou bylo k 250 µl zhomogenizovaného vzorku přidáno 12,5 µl 2 mM FeSO<sub>4</sub> a vzorek byl následně 30 minut inkubován při teplotě 37 °C.

K preinkubovanému vzorku bylo následně přidáno 75 µl roztoku TCA-BHT. Vzorek byl poté zvortexován a následně centrifugován při 4000 rpm a 4 °C.

Do mikrozkuhavky bylo napipetováno 250 µl supernatantu vzorku, 50 µl 0,6 M HCl a 200 µl TRIS-TBA. Takto připravený vzorek byl přemístěn na termoblok, na 45 minut při teplotě 90 °C.

Povařený vzorek byl napipetován v množství 250 µl do mikrotitrační destičky a byl spektrofotometricky změřen při vlnových délkách 550 a 590 nm.

#### Kalibrační řada

Kalibrační řada byla sestavena v rozsahu 0,5 až 8 nmol MDA. Standard MDA – 10 mM zásobní roztok MDA (11,02 mg tetraethoxypropanu v 5 ml 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) naředěný na 100 M roztok MDA. Koncentrační řada je uvedena v tabulce č. 3.



Tab. č. 3. Koncentrační řada pro kalibraci MDA.

nmol · reakce <sup>-1</sup>	100M roztok MDA (μl)	PBS (μl)
0	0	750
0,5	15	735
1	30	720
2	60	690
3	90	660
4	120	630
5	150	600
6	180	570
7	210	540
8	240	510

#### Vyhodnocení

Lipidní peroxidace (LPO) byla vypočítána podle kalibrační křivky. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako nmol TBARS na mg proteinů.

### **3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)**

#### Princip metody

Metoda je založena na schopnosti kataláz rozkládat peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na vodu a kyslík. Rozklad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je sledován měřením poklesu absorbance vzorku s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při 240 nm (Aebi, 1984).

#### Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- TRIS EDTA pufr (50 mM TRIS pufr + 0,1 mM EDTA),
- 0,09 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v TRIS EDTA pufru.

#### Postup stanovení

Zhomogenizovaný vzorek byl nejprve 30 minut centrifugován při 15000 rpm a 4 °C a následně vyředěn. Ředění bylo zvoleno 50:450, tedy 50 μl supernatantu a 450 μl PBS.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  vyředěného vzorku a 250  $\mu\text{l}$  0,09 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  v TRIS EDTA pufru. U vzorků byla pomocí spektrofotometru měřena kinetika reakce po dobu 1 minuty s 5vteřinovými intervaly při vlnové délce 240 nm.

#### Vyhodnocení

Výsledné hodnoty aktivity kataláz byly vypočteny podle následujícího vzorce. Pro výpočet bylo potřeba znát molární extinkční koeficient  $\text{H}_2\text{O}_2$  při 240 nm, což je 39,4  $\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Výsledná hodnota byla vyjádřena v  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteinů}^{-1}$ .

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{směrnice křivky}}{39,4 \cdot 1 \cdot \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}\text{proteinu} \cdot 10^3}$$

### **3.5.4. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)**

#### Princip metody

Metoda je založena na reakci DTNB (2,2,-dinitro-5,5-dithiobenzenová kyselina) s volnými -SH skupinami. Touto reakcí vzniká barevný produkt. Vzorek je podroben spektrofotometrické analýze při vlnové délce 420 nm (Ellman, 1959).

#### Materiál a reagenty

- PBS homogenizační pufr,
- TRIS pufr (0,8 M TRIS a 0,02 M EDTA),
- 0,02M DTNB v metanolu,
- GSH (1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  PBS),
- TCA (25 % kyselina trichloroctová).

#### Postup stanovení

Zhomogenizovaný vzorek byl nejprve 15 minut centrifugován při 10000 rpm a 4 °C. Následně se 180  $\mu\text{l}$  supernatantu vzorku spolu s 18  $\mu\text{l}$  TCA napipetovalo do mikrozkušavek. Poté byly všechny vzorky v mikrozkušavkách promíchány na vortexu a 15 minut se nechaly stát při pokojové teplotě. Následně byly všechny vzorky 10 minut centrifugovány při 8000 rpm a 4 °C. Díky tomuto procesu došlo k odstranění proteinů ze vzorků.

Do mikrotitračních destiček bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  vzorku bez proteinů, 190  $\mu\text{l}$  TRIS pufru a 10  $\mu\text{l}$  0,02 M DTNB. Jako blank byl použit TRIS pufr (240  $\mu\text{l}$ ) a 0,02 M DTNB (10  $\mu\text{l}$ ). Vzorky se ponechaly v destičkách inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky spektrofotometricky měřeny při vlnové délce 420 nm.

#### Kalibrační řada

Kalibrační řada byla sestavena v rozsahu 0,0025 až 0,075  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  GSH. Standard GSH vyředěný v PP pufru – 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  naředěný na 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  roztok v PP pufru. Koncentrační řada je uvedena v tabulce č. 4.

K 500  $\mu\text{l}$  GSH standardu/vzorku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  TCA. Standard/vzorek byl následně promíchán na vortexu a ponechán 15 minut při pokojové teplotě. Následně se 50  $\mu\text{l}$  standardu/vzorku s TCA pipetovalo společně s 190  $\mu\text{l}$  TRIS a 10  $\mu\text{l}$  0,02M DTNB do mikrotitrační destičky. Absorbance vzorků byla spektrofotometricky měřena při vlnové délce 420 nm.

*Tab. č. 4: Koncentrační řada pro kalibraci GSH.*

GSH	GSH ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Objem zásobního roztoku ( $\mu\text{l}$ )	PBS ( $\mu\text{l}$ )
244	0,075	375	125
162,85	0,05	250	250
81,42	0,025	125	375
48,85	0,015	75	425
32,57	0,01	50	450
24,42	0,0075	37,5	462,2
16,28	0,005	25	475
8,14	0,0025	12,5	487,5

#### Vyhodnocení

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

### 3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST)

#### Princip metody

Metoda stanovení je založena na spektrofotometrické detekci konjugátu mezi redukováným glutathionem a CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen). CDNB je běžný substrát pro všechny isoformy GST (Habig a kol., 1974).

#### Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- 10 mM roztok redukováného GSH,
- 50 mM CDNB v etanolu.

#### Postup stanovení

Zhomogenizovaný vzorek byl nejprve 15 minut centrifugován při 10000 rpm a 4 °C. Následně k němu byl přidán PBS pufr v poměru 1:1 (250 µl a 250 µl). Do mikrotitračních destiček bylo napipetováno 20 µl vzorku, 170 µl PBS pufru a 10 µl 50 mM CDNB v etanolu. Měření bylo provedeno ihned po přidání 50 µl 10 mM redukováného GSH. Měření trvalo 5 minut při vlnové délce 340 nm. Měření bylo provedeno ve 3 opakováních.

#### Vyhodnocení

Hodnota aktivity GST byla vypočtena podle následujícího vzorce. Pro výpočet bylo potřeba znát molární extinkční koeficient konjugované CDNB ( $9600 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a výšku hladiny v jamce destičky (0,6791 cm). Výsledná hodnota byla vyjádřena v  $\text{nmol CDNB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteinů}^{-1}$ .

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

### 3.5.6. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

#### Princip metody

Princip metody spočívá ve schopnosti superoxid dismutázy (SOD) inhibovat reakce způsobené superoxidy. Pro produkci superoxidů je využit systém NADH ( $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid) a PMS (phenazin methosulfonát). Superoxidy jsou stanovovány pomocí činidla NBT (nitrotetrazoliová modř). Ten se po reakci se

superoxidy mění na stabilní barevný produkt, který je spektrofotometricky měřen. SOD reaguje se vzniklými superoxidy a tím inhibuje přeměnu NBT, stanovován je tedy pokles přeměny NBT při vlnové délce 560 nm (Ewing a Janero, 1995).

### Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- 50 mM PP pufr s 0,1 mM EDTA (pH 7,4),
- 60  $\mu$ M NBT,
- 100  $\mu$ M NADH v 60  $\mu$ M NBT (přechovávat ve tmě – alobal),
- 35  $\mu$ M PMS (přechovávat ve tmě – alobal).

### Postup stanovení

Zhomogenizovaný vzorek byl nejprve 30 minut centrifugován při 15000 rpm a 4 °C. Do mikrotitračních destiček bylo napipetováno 25  $\mu$ l vzorku či blanku (PBS), k němu bylo přidáno 200  $\mu$ l PP pufru s NADH a NBT. Poté bylo provedeno první spektrofotometrické měření při 560 nm ke stanovení interní přeměny NBT vzorkem. Po prvním měření bylo do vzorku v mikrotitrační destičce přidáno 25  $\mu$ l PMS a odstartovala hlavní reakce. Reakce byla měřena spektrofotometricky po 5sekundovém třepání, taktéž při 560 nm.

### Vyhodnocení

Hodnota aktivity SOD byla vypočtena podle následujícího vzorce. Pro výpočet bylo potřeba znát molární extinkční koeficient NBT ( $15000 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a výšku hladiny v jamce destičky (0,6791 cm). Výsledná hodnota byla vyjádřena v nmol NBT $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mg proteinů $^{-1}$ .

$$\text{SOD aktivita} = \frac{(\text{směrnice křivky blanku} + \text{směrnice křivky vzorku} \cdot \text{min}^{-1}) - \text{směrnice křivky PMS se vzorkem} \cdot \text{min}^{-1}}{0,6791 \cdot 15000 \cdot \text{mg}^{-1}\text{proteinů} \cdot 10^6}$$

### 3.5.7. Stanovení aktivity acetylcholinesterázy (AChE)

#### Princip metody

Metoda je založena na reakci DTNB (2,2,-dinitro-5,5-dithiobenzenová kyselina) s ATC (acetylthiocholin). Při této reakci vzniká barevný produkt, který je spektrofotometricky měřen v časech  $t_0$  a  $t_5$  (5 minut) při vlnové délce 405 nm (Ellman a kol., 1961).

#### Materiál a reagensie

- PBS homogenizační pufr,
- 0,75 mM DTNB v PBS,
- 3 mM ATC.

#### Postup stanovení

Zhomogenizovaný vzorek byl nejprve 30 minut centrifugován při 12000 rpm a 4 °C. 25  $\mu$ l supernatantu bylo napipetováno do mikrodestičky společně se 100  $\mu$ l DTNB a při pokojové teplotě se vzorek inkuboval 5 minut. Následně bylo ke vzorku přidáno 25  $\mu$ l ATC a při pokojové teplotě se inkuboval 10 minut. Takto připravený vzorek po inkubaci byl spektrofotometricky poprvé měřen při 405 nm ( $t_0$ ). Následovala 5minutová inkubace a druhé měření ( $t_5$ ). Blank byl 100  $\mu$ l DTNB, 25  $\mu$ l destilované vody a 25  $\mu$ l ATC.

#### Vyhodnocení

Hodnota aktivity AChE byla vypočtena podle následujícího vzorce. Pro výpočet bylo potřeba znát mikrodoskový faktor ředění (0,49) Výsledná hodnota byla vyjádřena v  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteinů}^{-1}$ .

$$\text{AChE aktivita} = \frac{\left[ \frac{\text{absorbance } t_5 \cdot 1000 - \text{absorbance } t_0 \cdot 1000}{5} \right] \cdot 0,49}{\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \text{proteinů}}$$

### 3.6. Statistické vyhodnocení testu

Rozdíly v kumulativní mortalitě mezi jednotlivými testovanými skupinami byly hodnoceny pomocí kontingenčních tabulek ( $\chi^2$ ). Před analýzou byly všechny měřené proměnné zkontrolovány na normalitu (Kolmogorov-Smirnovův test) a homoskedasticitu rozptylu (Bartlettův test). Poté byla použita jednocestná ANOVA. Tento test určil, zda existují významné rozdíly v měřených proměnných mezi experimentálními skupinami. Když byl zjištěn rozdíl ( $P < 0,05$ ), byl aplikován Tukeyův nerovnoměrný N HSD test. Pokud nebyly splněny podmínky pro ANOVA, byl použit neparametrický test (Kruskal-Wallis).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Kulení

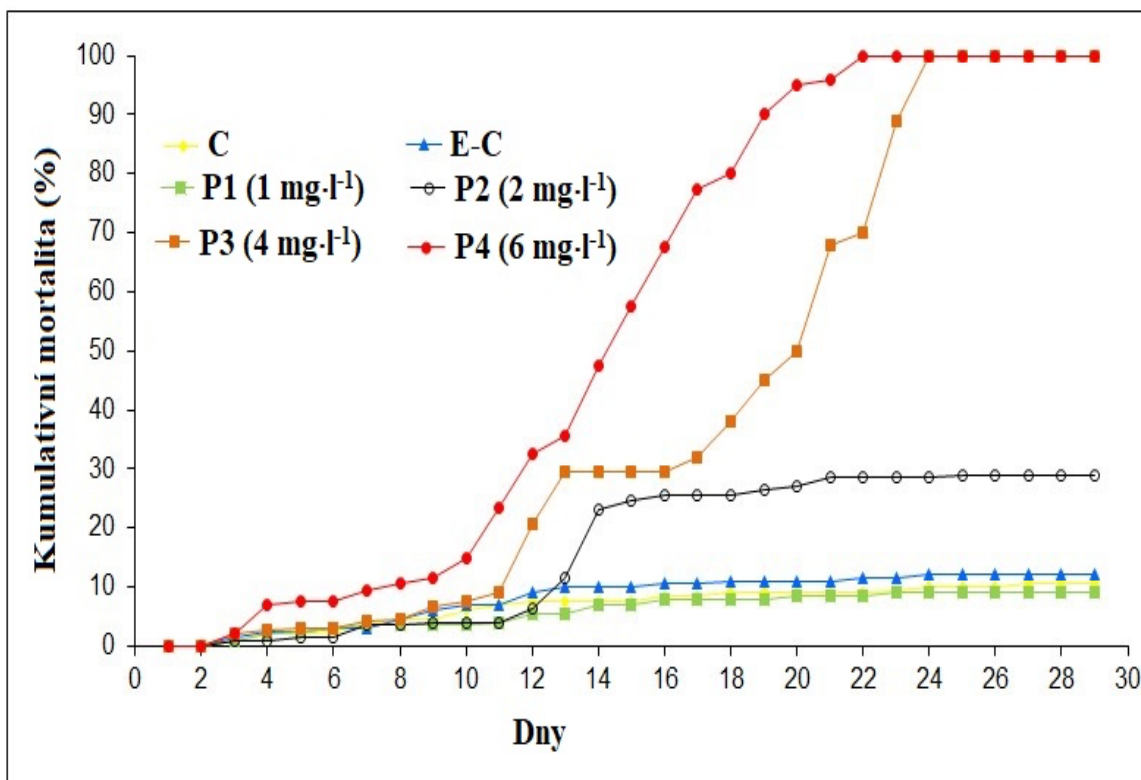
Všechn plůdek se vykuliil do 2. dne expozice a nebyl pozorován žádný statisticky významný vliv praziquantelu na kulení amurů.

### 4.2. Kumulativní mortalita

U skupin vystavených koncentracím  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  praziquantelu byly zjištěny signifikantní ( $P < 0,01$ ) rozdíly v celkové kumulované mortalitě ve srovnání s kontrolami (Graf č. 1). Všichni amuři ze skupiny P4 vystavené koncentraci  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  praziquantelu uhynuli do 21 dnů expozice. Amuři ze skupiny P3 vystavené koncentraci  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  praziquantelu do 24 dnů expozice taktěž všichni uhynuli. Kumulativní mortalita byla na konci testu pro jednotlivé skupiny následující:

- C – 10,5 %,
- E-C – 12 %,
- P1 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) – 9 %,
- P2 ( $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) – 29 %,
- P3 ( $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) – 100 %,
- P4 ( $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) – 100 %.

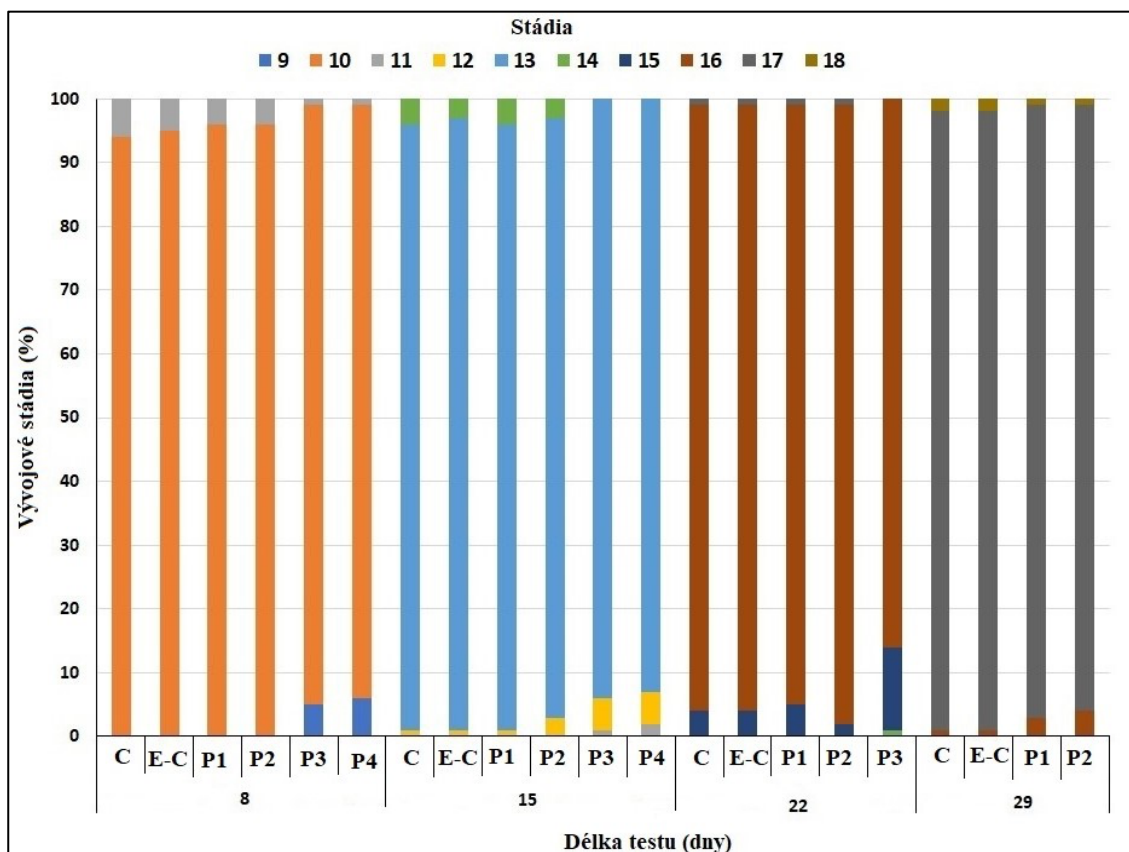




Graf č. 1: Kumulativní mortalita amura bílého během embryolarválního testu toxicity s praziquantelem.

### 4.3. Ontogenetický vývoj

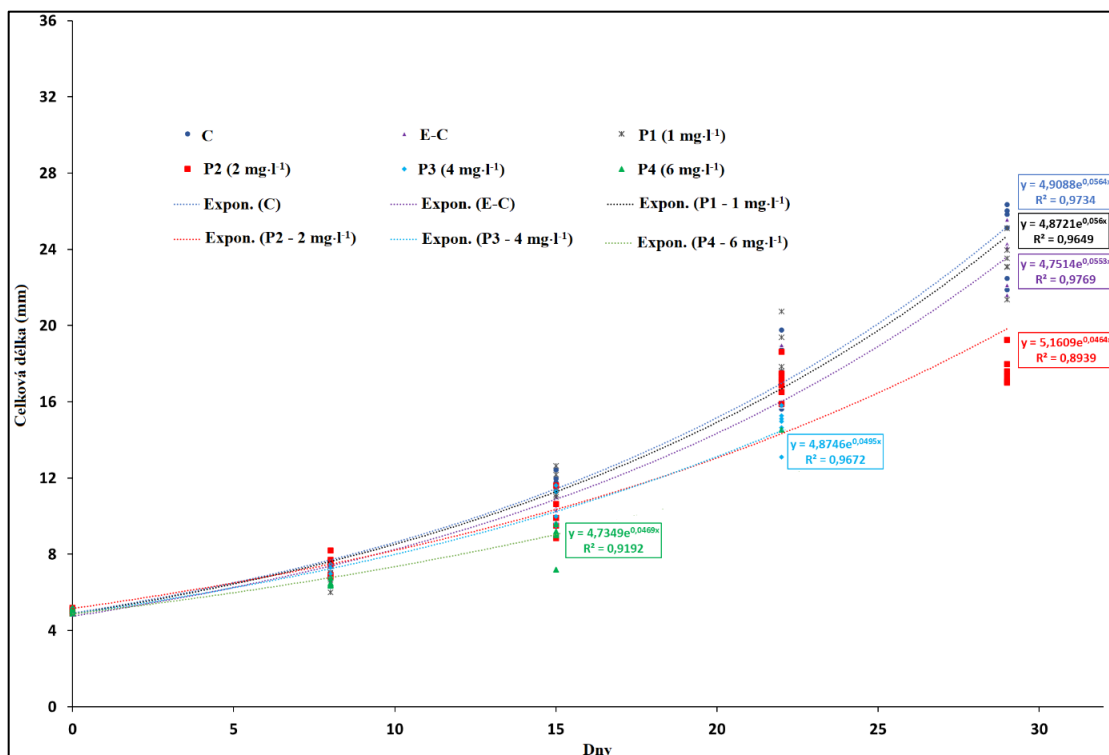
Od 8. dne expozice bylo ve skupinách, vystavených koncentracím praziquantelu 4 mg·l<sup>-1</sup> (P3) a 6 mg·l<sup>-1</sup> (P4), pozorováno signifikantní ( $P < 0,01$ ) opožďení ontogenetického vývoje (Graf č. 2).



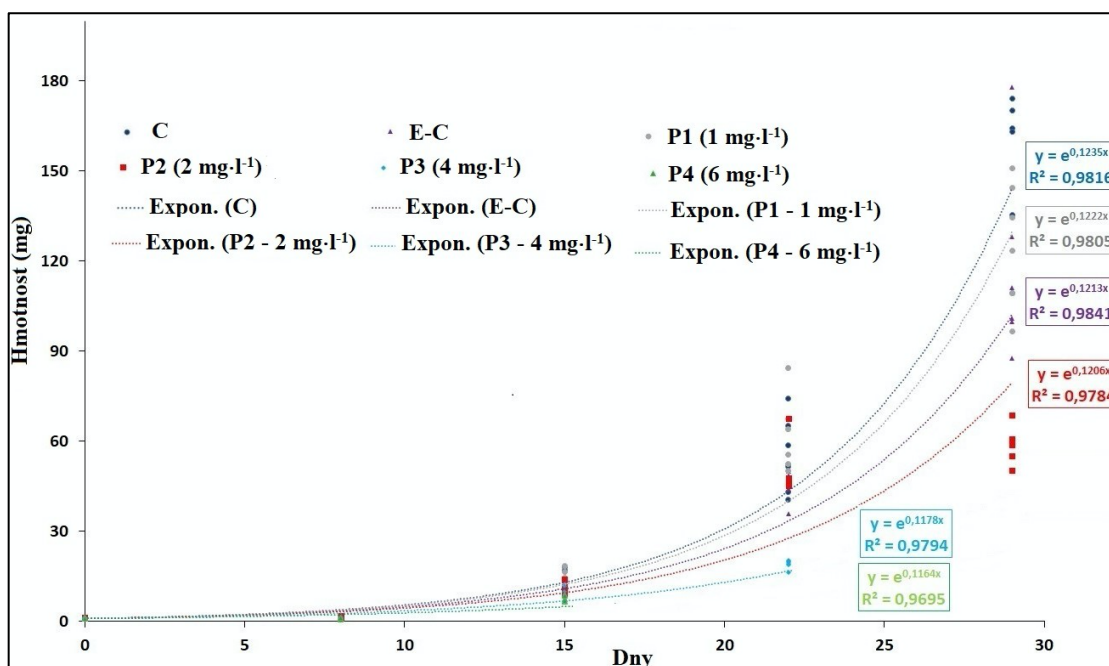
Graf č. 2: Ontogenetický vývoj amura bílého během embryolarválního testu toxicity s praziquantelem.

#### 4.4. Růst

Od 8. dne expozice byla ve skupině amurů, exponovaných koncentrací praziquantelu  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (skupina P4), zaznamenána signifikantně ( $P < 0,01$ ) nižší délka těla a hmotnost. Od 15. dne expozice byla signifikantně ( $P < 0,01$ ) nižší délka těla (Graf č. 3) a hmotnost (Graf č. 4) zaznamenána i u skupiny amurů, exponovaných koncentracím praziquantelu  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (skupiny P3 a P2).



Graf č. 3: Celková délka raných vývojových stádií amura bílého během embryonarválního testu toxicity s praziquantelem.



Graf č. 4: Hmotnost raných vývojových stádií amura bílého během embryonarválního testu toxicity s praziquantelem.

Hodnoty FWC (Fultonův koeficient hmotnostní kondice) byly na konci testu u amurů ze skupiny P2 (2 mg·l<sup>-1</sup>) signifikantně ( $P < 0,01$ ) nižší v porovnání s kontrolami. Inhibice růstu amura bílého byla na konci testu pro skupinu P1 (1 mg·l<sup>-1</sup>) 2,39 % a pro skupinu P2 (2 mg·l<sup>-1</sup>) 22,45 %. Inhibice růstu amura bílého na konci testu ve skupinách P3 a P4 nebyla stanovena z důvodu úhynu obou skupin během testu (Tab. č. 5).

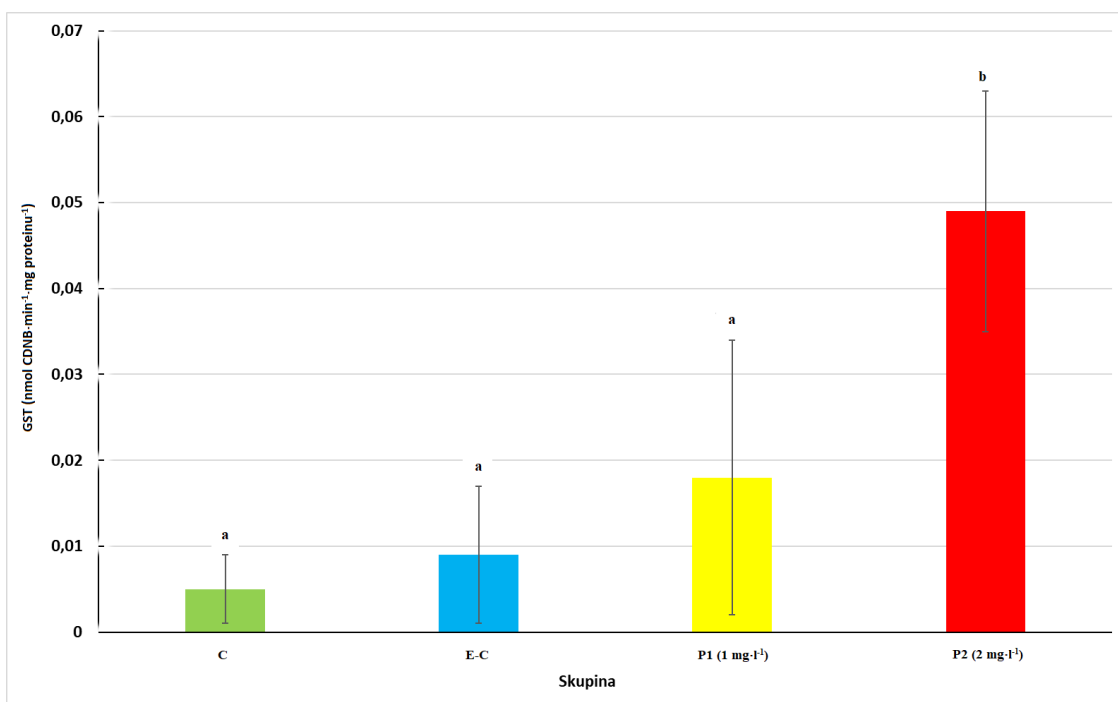
Tab. č. 5: Růstový ukazatele amura bílého během embryolarválního testu toxicity.

Skupina	C	E-C	Praziquantel			
			P1 (1 mg·l <sup>-1</sup> )	P2 (2 mg·l <sup>-1</sup> )	P3 (4 mg·l <sup>-1</sup> )	P4 (6 mg·l <sup>-1</sup> )
m <sub>8</sub>	1,43 ± 0,19	1,28 ± 0,42	1,30 ± 0,21	1,18 ± 0,20	1,13 ± 0,27	1,10 ± 0,15
m <sub>29</sub>	139,60 ± 16,26	101,09 ± 26,11	129,40 ± 20,81	55,55 ± 10,75*	†	†
FWC	1,10 ± 0,09	0,91 ± 0,13	0,97 ± 0,10	0,86 ± 0,08*	†	†
SGR	21,76	19,90	21,24	16,86	†	†
I (%)	-	8,55	2,39	22,45	†	†

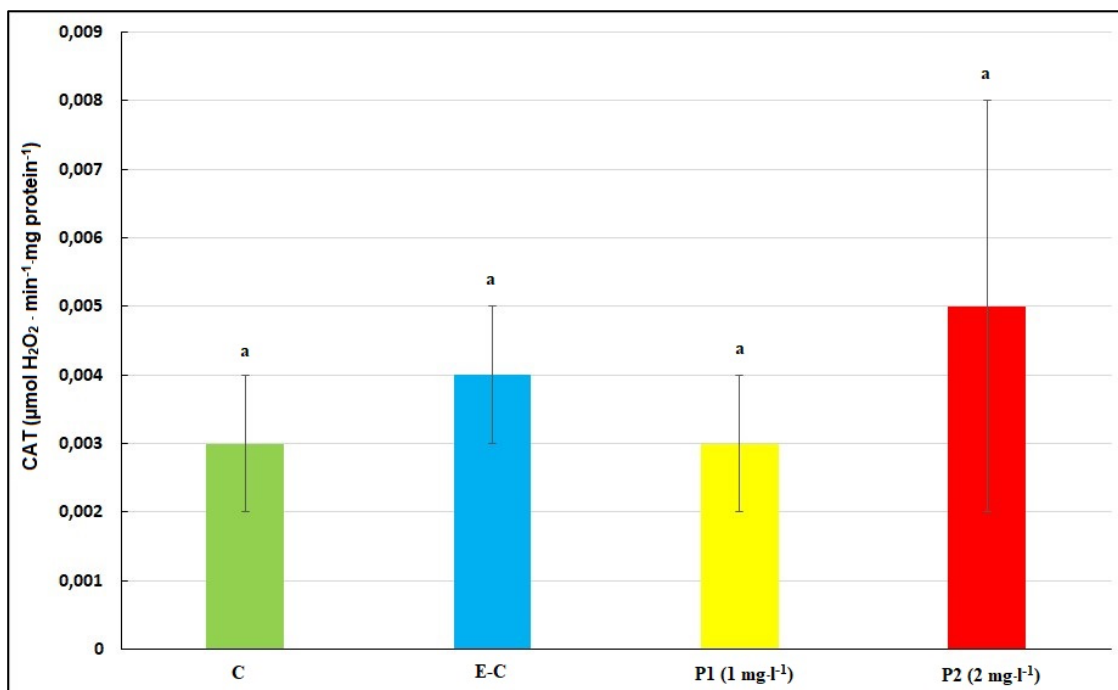
Poznámka: m<sub>8</sub>, m<sub>29</sub> = průměrná hmotnost amura ve skupině po 8 a 29 dnech expozice (průměr ± standardní odchylka, mg); FWC = průměrný Fultonův koeficient hmotnostní kondice po 29 dnech expozice; SGR = specifická rychlost růstu ve skupině po 29 dnech expozice; I = inhibice specifického růstu ve vybrané skupině; \*signifikantní ( $P < 0,01$ ) rozdíl v experimentální skupině oproti kontrolní skupině; †hodnoty nejsou uvedeny z důvodu úhynu všech ryb ve skupině v průběhu testu.

#### 4.5. Oxidativní stres a antioxidační enzymy

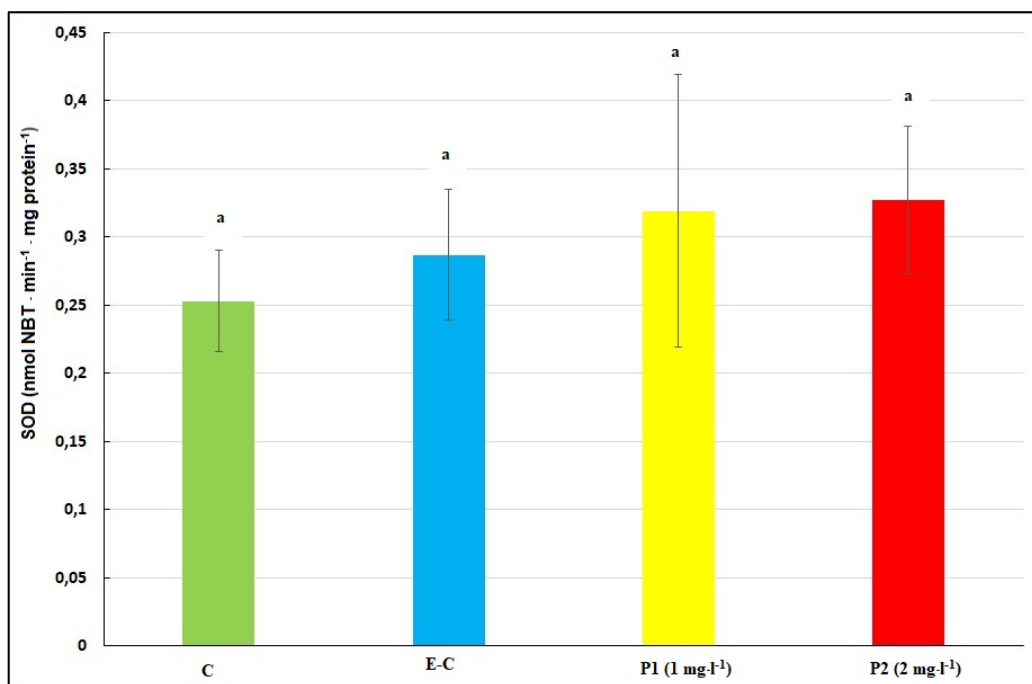
Po 29 dnech expozice praziquantelem byla analyzována hladina oxidativního stresu a aktivita antioxidačních biomarkerů v celotělním homogenátu amurů u skupin P1 (1 mg·l<sup>-1</sup>) a P2 (2 mg·l<sup>-1</sup>). Skupiny P3 a P4 nemohly být podrobeny analýze, jelikož všichni amuři z těchto dvou skupin uhynuli během testu. U amurů ze skupiny P2 (2 mg·l<sup>-1</sup>) byla zjištěna signifikantně ( $P < 0,01$ ) vyšší aktivita GST ve srovnání s kontrolami (Graf č. 5). Po 29denní expozici praziquantelu nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v aktivitách CAT (Graf. č. 6), SOD (Graf. č. 7), TBARS (Graf. č. 8), GSH (Graf. č. 9) a AChE (Graf. č. 10) v celotělním homogenátu amurů bílých v porovnání s kontrolami.



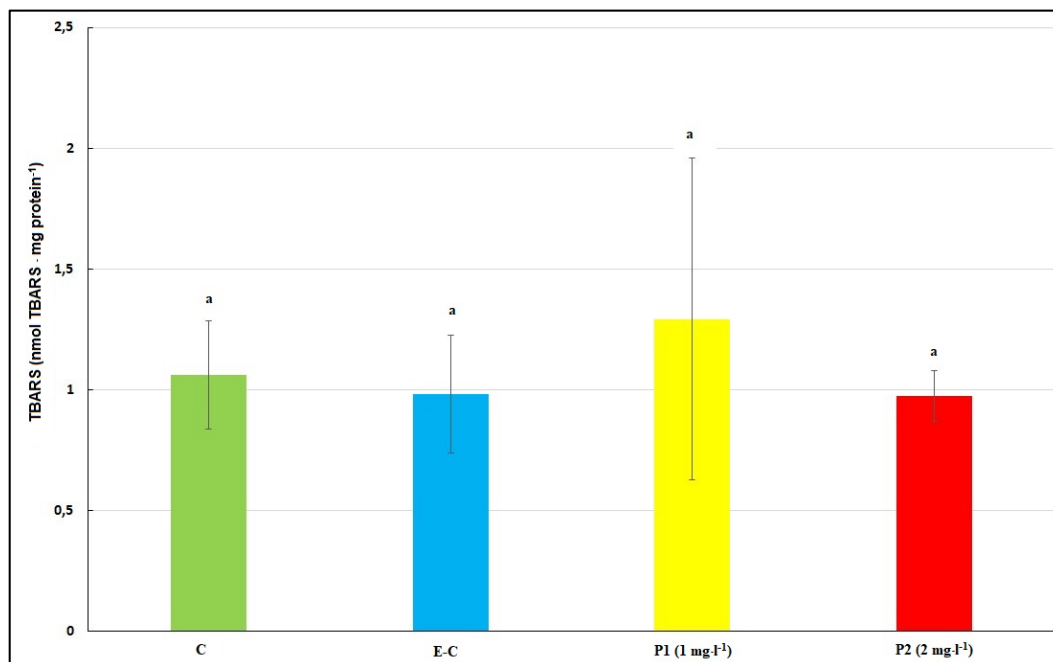
Graf č. 5: Aktivita glutathion-S-transferázy v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D., Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



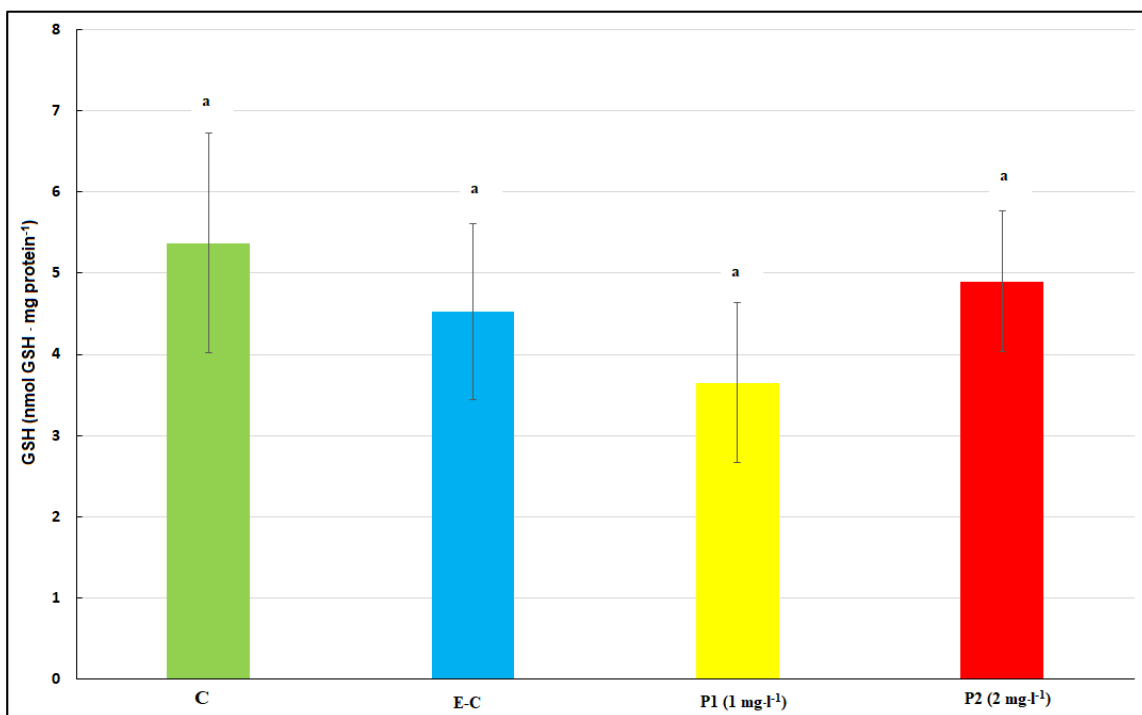
Graf č. 6: Aktivita katalázy v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D. Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



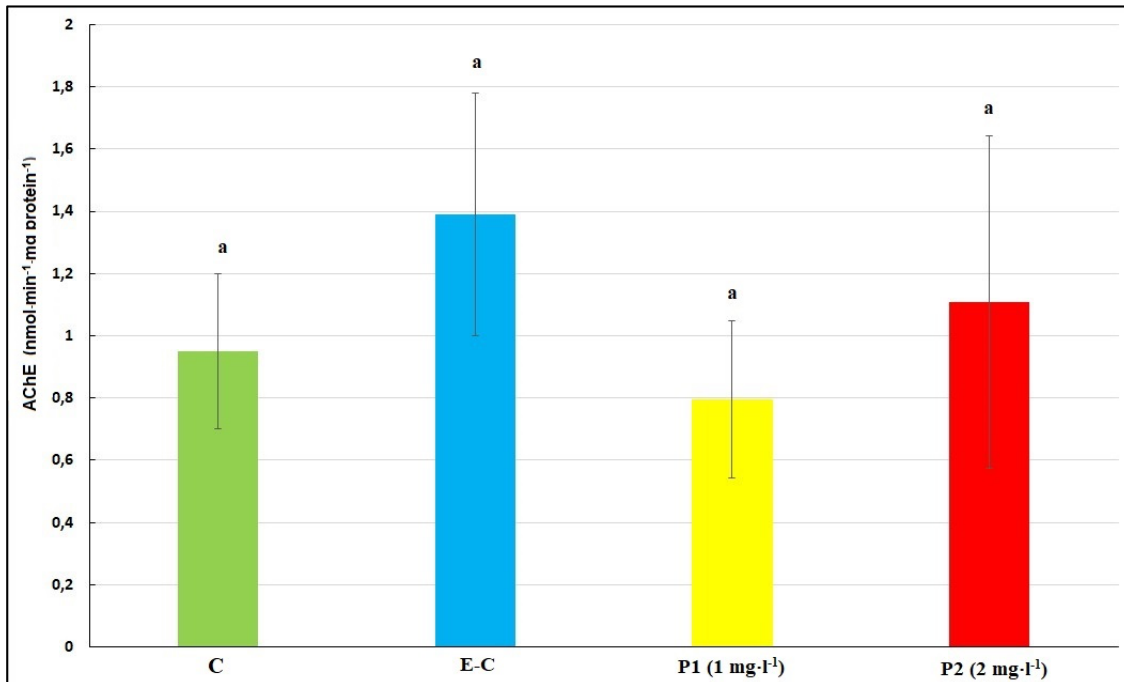
Graf č. 7: Aktivita superoxid dismutázy v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D. Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



Graf č. 8: Lipidní peroxidace v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D. Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



Graf č. 9: Koncentrace glutathionu v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D. Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



Graf č. 10: Aktivita acetylcholinesterázy v celotělním homogenátu amura bílého po 29denní expozici praziquantelu. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± S. D. Indexy a,b charakterizují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).

## 5. DISKUSE

Cílem této studie bylo posouzení vlivu praziquantelu na raná vývojová stádia amura bílého. Posuzovány byl především vliv na přežití, kulení, růst, ontogenetický vývoj a na biomarkery oxidačního stresu a antioxidantní biomarkery. Pro posouzení vlivu praziquantelu na tyto parametry byl použit embryolarváni test toxicity na rybách dle metody OECD (test č. 210). Pro test byly použity 4 různé koncentrace praziquantelu ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Raná vývojová stádia ryb jsou v porovnání s ostatními vývojovými stádii obecně považována za citlivější vůči vnějším negativním vlivům včetně znečištění ekosystému. O negativním vlivu praziquantelu na juvenilní a dospělé ryby již existuje několik studií (Nwani a kol., 2014; Zusková a kol., 2018). Vliv praziquantelu na raná vývojová stádia ryb je ovšem prozkoumán jen málo a u amura bílého v současné době není provedena žádná studie, která by hodnotila jeho vliv na ranná vývojová stádia. Výsledky této studie poskytují cenné údaje o působení praziquantelu na raná vývojová stádia ryb. Pro tuto studii byl jako testovaný organismus vybrán amur bílý, který je díky svým potravním návykům obzvlášť náchylný k nákaze parazitickými trematodami, které je potřeba léčit vhodnými antiparazitiky, jako je například praziquantel.

Kulení je klíčový milník ve vývoji ryb. Tento proces může být narušen negativními změnami prostředí, například znečištěním vodního prostředí xenobiotiky např. léčivy či pesticidy (Velíšek a kol., 2018). Negativní vliv praziquantelu na kulení plůdku amura bílého nebyl v tomto testu pozorován. Všechny plůdky se bez problémů vykulily do 2. dne. Výsledky jsou v souladu se studií Velíšek a kol. (2022), kde také nebyl pozorován vliv praziquantelu na kulení plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Praziquantel je pro ryby toxický. Hodnota 24hLC<sub>50</sub> je pro amura bílého  $49,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a 96hLC<sub>50</sub> pro parru obecnou je  $28,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Mitchell a Hobbs, 2007; Zusková a kol., 2018). Čím delší je doba expozice, tím nižší koncentrace může způsobit úhyn ryb. V této studii byly statisticky signifikantní rozdíly v celkové kumulativní mortalitě oproti kontrolám zaznamenány u skupin amurů vystavených koncentracím praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Všichni amuři ze skupiny vystavené koncentraci  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  praziquantelu uhynuli do 21 dnů expozice. Amuři ze skupiny vystavené koncentraci  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  praziquantelu do 24 dnů expozice taktéž všichni uhynuli. Kumulativní mortalita ve skupině vystavené koncentraci praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla na konci testu 29 %. Při dlouhodobější expozici může být za bezpečnou koncentraci praziquantelu pro raná



vývojová stádia amura bílého považována koncentrace nižší než  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tyto výsledky se liší od výsledků publikovaných ve studii Velíšek a kol. (2022). V této studii nebyly u raných vývojových stádií kapra obecného zjištěny signifikantní rozdíly v celkové kumulované mortalitě v porovnání s kontrolou při koncentracích praziquantelu  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . To může naznačovat vyšší citlivost raných vývojových stádií amura bílého v porovnání s ranými vývojovými stádii kapra obecného.

Raná vývojová stádia ryb jsou velmi citlivá na působení toxických látek a opoždění raného ontogenetického vývoje je běžnou reakcí na chronické působení toxické látky. Opoždění raného ontogenetického vývoje bývá pozorováno zejména po expozici léčivům a pesticidům (Velíšek a kol., 2018). Opoždění ontogenetického vývoje může vést k pozdější pohlavní dospělosti a také k vyšší náchylnosti raných vývojových stádií ryb k predaci (Štěpánová a kol., 2012; Velíšek a Stará, 2018; Islam a kol., 2019; Velíšek a kol., 2022). Signifikantní opoždění ontogenetického vývoje bylo pozorováno od 8. dne testu ve skupinách vystavených koncentracím praziquantelu  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Naopak Velíšek a kol. (2022) ve své studii významné opoždění ontogenetického vývoje kapra obecného po expozici praziquantelem nezaznamenal.

Tato práce se zaměřovala také na růstové schopnosti amurů bílých, vystavených praziquantelu. Rychlost růstu je pro ryby klíčová, neboť se od ní odvíjí kondice a konkurenceschopnost jedince. Jedinci, mající oproti ostatním zpomalený růst jsou znevýhodněni v kompetici o potravu, stanoviště a mohou se hůře uplatňovat při rozmnožování. Taktéž mohou být náchylnější k různým onemocněním a k vyšší predaci (Woltering, 1984). Od 8. dne testu byla ve skupině amurů, exponovaných koncentrací praziquantelu  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , zaznamenána signifikantně nižší délka těla a hmotnost. Od 15. dne expozice byla významně nižší délka a hmotnost zaznamenána i u skupiny amurů, exponovaných koncentracím praziquantelu  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Inhibice růstu amura bílého byla na konci testu pro skupinu, jež byla vystavena koncentrací praziquantelu  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 2,39 % a pro skupinu, jež byla vystavena koncentrací praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 22,45 %. Velíšek a kol. (2022) ve své studii uvádí, že koncentrace praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  významně neovlivnila růst kapra obecného. Ve stejné studii je také uvedeno, že koncentrace praziquantelu  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  zapříčinily signifikantně nižší délku a hmotnost u raných vývojových stádií kapra obecného. Inhibice růstu kaprů byly při koncentracích praziquantelu  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  12,4 % a 16,9 %.

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi reaktivními formami kyslíku (ROS) a antioxidanty, které jsou schopny odbourávat reaktivní meziprodukty (Sies, 2000). Pokud není kyslík v těle během metabolických přeměn zcela redukován, začnou vznikat superoxidový anion ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál (OH) či jiné formy ROS. Tyto radikály mohou poté poškodit tkáň i buňky (Kelly a kol., 1998; Halliwell, 2007). Nejčastěji dochází vlivem oxidačního stresu k peroxidaci lipidů (LPO). Jde o řetězovou reakci, při které dochází k poškození polynenasycených mastných kyselin volnými radikály a následkem toho vznikají pro organismus toxické hydroperoxy. Sekundárními produkty mohou být také pro organismus toxické aldehydy (Lushchak, 2011). Schopnost regulovat hladiny volných radikálů, a tím bojovat proti oxidativnímu stresu, mají antioxidantní enzymy. Základními antioxidantními enzymy jsou superoxid dismutáza, kataláza, glutathion-S-transferáza, glutathion peroxidáza a glutathion reduktáza. Nejdůležitějším neenzymatickým antioxidantem je redukovaný glutathion (de Zwart a kol., 1999). K hodnocení oxidačního stresu se využívají molekulové biomarkery (Valavanidis a kol., 2006). V případě této studie byla sledována aktivita antioxidantních systémů a oxidativní stres. Proto pro účely této studie byla analyzována aktivita katalázy, superoxidodismutázy, glutathion-S-transferázy, redukovaného glutathionu, acetylcholinesterázy a byla stanovena LPO pomocí TBARS testu. Po 29 dnech expozice byly analyzovány pouze skupiny, vystavené koncentracím  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a kontroly, neboť amuři ze skupiny P3 a P4 vystavené nejvyšším koncentracím uhynuly během testu. U amurů ze skupiny P2, která byla vystavena koncentraci praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla zjištěna signifikantně vyšší aktivita GST ve srovnání s kontrolami. GST slouží jako metabolický enzym druhé fáze detoxikace a katalyzuje konjugaci GSH s ROS. Významné rozdíly v aktivitách CAT, SOD, GSH, AChE a hladině LPO oproti kontrolám nebyly napříč skupinami pozorovány. Velíšek a kol. (2022) ve své studii zjistil, že při koncentraci praziquantelu  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo k významnému snížení aktivity SOD a CAT u raných vývojových stádií kapra obecného. Studie Zuskové a kol. (2018) uvádí, že u juvenilů paryby obecné došlo po expozici praziquantelu ke změnám v aktivitě antioxidantních enzymů – CAT, SOD, GR, GST a hladiny GSH v játrech a ve svalu. Známý je i vliv jiných antiparazitik, jako je ivermectin, levamisol a fenbendazol na aktivitu antioxidantních enzymů kapra obecného (Kolářová a kol., 2022).

## 6. ZÁVĚR

V této práci byl posuzován vliv antiparazitálního přípravku praziquantelu na raná vývojová stádia amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Pro testování toxicity této látky byla použita metoda embryolarválního testu toxicity pro ryby dle metody OECD (test č. 210). Experimentální organismy byly rozděleny do 6 skupin, z čehož 2 skupiny byly kontroly. Každá ze zbývajících 4 experimentálních skupin byla vystavena různé koncentraci praziquantelu po dobu 29 dnů. Experimentální skupina P1 byla vystavena koncentraci praziquantelu 1 mg·l<sup>-1</sup>, skupina P2 koncentraci 2 mg·l<sup>-1</sup> (běžně používaná léčebná koncentrace), skupina P3 koncentraci 4 mg·l<sup>-1</sup> a skupina P4 koncentraci 6 mg·l<sup>-1</sup>.

Skupina P1 (1 mg·l<sup>-1</sup>) nevykazovala v průběhu, ani po skončení testu žádné signifikantní rozdíly v kulení, mortalitě, ontogenetickém vývoji, růstu a ani v aktivitě antioxidantních biomarkerů a nezpůsobila oxidativní stres ve srovnání s kontrolami. Je tedy možné říci, že tato koncentrace je pro raná vývojová stádia ryb bezpečná i při dlouhodobější expozici.

Skupina P2 (2 mg·l<sup>-1</sup>) vykazovala v průběhu testu signifikantní rozdíly v mortalitě, růstu, a i v aktivitě glutathion-S-transferázy ve srovnání s kontrolami. Tato koncentrace tudíž nemůže být pro raná vývojová stádia amura bílého považována za bezpečnou.

Amuři ze skupin P3 (4 mg·l<sup>-1</sup>) a P4 (6 mg·l<sup>-1</sup>) uhynuli již v průběhu testu. Před úhynem vykazovali signifikantní rozdíly v mortalitě, ontogenetickém vývoji a růstu ve srovnání s kontrolami. Tyto koncentrace praziquantelu tudíž taktéž nemohou být pro raná vývojová stádia amura bílého považovány za bezpečné.

Tato studie přispěla k rozšíření informací o toxicitě praziquantelu pro raná vývojová stádia ryb.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Adeyemo, O.K., Akano, A.F., Emykpe, B.O., 2012. Effect of formalin on spawning success and organ histology on *Clarias gariepinus*. Research Journal of Environmental Toxicology 2, 42-50.
- Aebi, S.K., 1984. Catalase *In vitro*. Methods in Enzymology 105, 121-126.
- Alamy Stock Photo, 2013. Grass carp *Ctenopharyngodon idella*.
- Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 42, 139-153.
- Benchmark Animal Health Limited, 2022. Summary of product characteristics. Salmosan Vet. Dostupné z: <https://wp-bmkanimalhealth-2022.s3.eu-west-2.amazonaws.com/media/2023/02/01105541/Salmosan-Vet-UK-SPC-Dec-22.pdf>. Navštíveno dne 15. 11. 2023.
- Bezpečnost potravin, 2023. MRL. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/mrl/>. Navštíveno dne 15. 9. 2023.
- Bogudskaya, N., Jones, L.A., Mandrak, M.E., Cudmore, B., 2017. Annotated Bibliography of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) from Russian-language Literature. Fisheries and Oceans Canada. Canadian Science Advisory Secretariat. 44 pp.
- Darko, S.N., Hanson, H., Twumasi-Ankrah, S., Baffour-Awuah, S., Adjei-Kusi, P., Yar, D., Owusu-Dabo, E., 2020. Three monthly doses of 60 mg/kg praziquantel for *Schistosoma haematobium* infection is a safe and effective treatment regimen. BMC Infectious Diseases 20, 323.
- Davydov, O.N., 1999. Ryba i bolezni čelověka, Kiev, 82 s.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology & Medicine 26 (1-2), 202-226.
- Eenennaam, J.P., Stocker, R.K., Thiery, R.G., Hagstrom, N.T., Doroshov, S.I., 1990. Egg Fertility, Early Development and Survival from Crosses of Diploid Female X Triploid Male Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture 86, 111-125.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70-77.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology 7, 88-95.
- EMA (European Medicines Agency), 2022. Praziquantel. All ruminants except bovine, *Equidae*, fin fish. Amsterdam, EMA/CVMP/706481/2022, 1 pp.

- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxid dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* 232, 243-248.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2024. *Ctenopharyngodon idella*. Cultured aquatic species information programme. Dostupné z: [https://firms.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Ctenopharyngodon\\_idella.xml](https://firms.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Ctenopharyngodon_idella.xml). Navštíveno dne 5. března 2024.
- Frohberg, H., 1984. Results of toxicological studies on praziquantel. *Arzneimittel-Forschung* 34 (9B), 1137-1144.
- Gorbach, E.I., Krykhtin, M.L., 1988. Migration of the white amur, *Ctenopharyngodon idella*, and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, in the Amur River Basin. *Journal of Ichthyology* 28, 47-53.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22), 7130-7139.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35 (5), 1147-1150.
- Chapman, D.C., 2006. Early Development of Four Cyprinids Native to the Yangtze River, China. U.S. Geological Survey Data Series 239, 51 pp.
- Chen, Y., Sun, H., Yang, W., Yang, Z., 2012. Incubation and oxidative stress of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) embryos exposed to different un-ionized ammonia levels. *Journal of Freshwater Ecology* 27 (1), 143-150.
- Chilton III, E.W., Muoneke, M.I., 1992. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: a North American perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2, 283-320.
- Chu, Y., Wang, C.M., Park, J.Ch., Lader, P., 2020. Review of cage containment tank designs for offshore fish farming. *Aquaculture* 519 (1-4), 734928.
- Islam, M.A., Hossen, M.S., Sumon, K.A., Rahman, M.M., 2019. Acute toxicity of imidacloprid on the developmental stages of common carp *Cyprinus carpio*. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 11, 244-251.
- Karvonen, A., Seppälä, O., 2008. Eye fluke infection and lens size reduction in fish: a quantitative analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 80, 21-26.
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model system. *Environmental Health Perspectives* 106 (7), 375-384.
- Koblitskaya, A.F., 1981. Key to young of freshwater fishes. Moscow, Liogkaya i pischevaya promyshlennost', 208 pp.
- Kolářová, J., Svobodová, Z., 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 88, 29 s.

- Kolářová, J., Zusková, E., Steinbach, Ch., Velíšek, J., 2017. Praktické návody k provádění vyšetřovacích a léčebných postupů u vybraných parazitárních onemocnění ryb. Edice metodik, FROV JU, Vodňany, č. 166, 53 s.
- Kolářová, J., 2019. Dezinfekční, terapeutické a preventivní možnosti v chovech ryb. In: Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežiková, I., Kolářová, J., Pojezdal, L., Dyková, I., Scholz, T., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. FROV JU, Vodňany, s. 419-446.
- Kolářová, J., Zusková, E., Velíšek, J., 2022. Efficacy of therapeutic bath with selected antiparasitic drugs on a *Dactylogyrus anchoratus* infection in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Veterinární Medicína 67, 620-627.
- Krupauer, V., 1974. Zásady chovu amura bílého v rybnících. ÚVTI Praha. 12 s.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology 101 (1), 13-30.
- Lyholt, H.C.K., Buchmann, K., 1996. *Diplostomum spathaceum*, effects of temperature and light on cercarial shedding and infection of rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms 25, 169-173.
- Maciel, P.O., Affonso, E.G., 2021. Praziquantel against monogeneans of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture International 29, 2369-2386.
- Matsuo, N., 2019. Discovery and development of pyrethroid insecticides. Proceedings of the Japan Academy, Series B 95 (7), 378-400.
- Mehlhorn, H., 2021. Praziquantel: A Broad-Spectrum Drug Acting against Trematodes and Cestodes Parasitizing Humans and Animals. Parasitology Research Monographs 15, 213.
- Mitchell, A.J., Hobbs, M.S., 2007. The acute toxicity of praziquantel to grass carp and golden shiners. North America Journal Aquaculture 69 (3), 203-206.
- Mohammed, S.V.N., Sheriff, M.A., Mohideen, S.A.K., Azmathullah, N.P.G., 2012. Toxicity of formalin on behavioral and respiration in *Danio rerio*. International Journal of Environmental Sciences 2, 1904-1908.
- Moyle, P.B., 1986. Fish introductions into North America: patterns and ecological impact. In: Mooney, H.A., Drake, J.A. (Eds), Ecology of biological invasions of North America and Hawaii. Springer-Verlag, New York. pp. 27-43.
- MZe ČR (Ministerstvo zemědělství České republiky), 2023. Situační a výhledová zpráva ryby. Ministerstvo zemědělství, Praha, 46 s.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu, kterým se zrušuje nařízení Rady (EHS) č. 2377/90 a kterým

- se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004.
- Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu.
- Nařízení vlády č. 61/2001 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.
- Nwani, C.D., Nnaji, M.C., Oluah, S.N., Echi, P.C., Nwamba, H.O., Ikwuagwu, O.E., Ajima, M.N., 2014. Mutagenic and physiological responses in the juveniles of African catfish, *Clarias gariepinus* following short term exposure to praziquantel. *Tissue and Cell* 46 (4), 264-273.
- OECD, (Organization for Economic Cooperation and Development), 2013. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems TG- No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. Paris, France, pp. 24.
- Pahor-Filho, E., Miranda Filho, K.C., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Pereira J.J., 2015. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquaculture Research* 46, 3040-3045.
- Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežiková, I., Kolářová, J., Pojezdal, L., Dyková, I., Scholz, T., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. FROV JU, Vodňany. 462 s.
- Pavlov, D.S., Aliyev, D.S., Shakirova, F.M., Nezdolij, V.K., Ostrovskiy, M.P., Dzhemileva, T.G., Malakhova, T.V., Nikolayev, A.A., Sukhanova, A.I., 1994. Biology of fishes of the Saryyazyn Reservoir. *Gidroproekt, Moscow*, 150 pp.
- Piorecka, K., Kurjata, J., Stanczyk, W.A., 2022. Acriflavine, an Acridine Derivative for Biomedical Application: Current State of the Art. *Journal of Medicinal Chemistry* 65 (17), 11415-11432.
- PubChem, 2023a. Sodium Chloride. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Chloride>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023b. Formaldehyde. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/712>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023c. Hydrogen Peroxide. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/784>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023d. Potassium Permanganate. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/516875>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.

- PubChem, 2023e. Copper sulfate pentahydrate. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24463>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023f. Acriflavine. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acriflavine>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023g. Cypermethrin. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2912>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023h. Deltamethrin. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40585>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023i. Ivermectin. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ivermectin>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- PubChem, 2023j. Praziquantel. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (US). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Praziquantel>. Navštíveno dne 28. 10. 2023.
- Rykova, T.I., 1972. Consumption of water by eggs of Grass Carp, Silver Carp and Bighead Carp during their development. In: Yaroshenko, M.F. (Ed.), Acclimatization of phytophagous fish in waterbodies of the USSR. Book of Abstracts of the 7th All-Union Conference. Shtiintsa, Kishenev, pp. 104-106.
- Santos, R.F.B., Dias, H.D., Fujimoto, R.I., 2012. Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. Anais da Academia Brasileira de Ciências 84, 605-608.
- Schofield, P.J., Williams, J.D., Nico, L.G., Fuller, M.T., 2005. Foreign nonindigenous carps and minnows (Cyprinidae) in the continental United States: a guide to their identification, distribution, and biology. Scientific Investigations Report No. 2005-5041.
- Sies, H., 2000. What is Oxidative Stress? In: Keaney, J.F. (Ed.), Oxidative Stress and Vascular Disease. Developments in Cardiovascular Medicine. Springer New York, NY. pp. 1-8.
- Sudová, E., Piačková, V., Velíšek, J., Pijáček, M., Svobodová, Z., 2010. Efficacy testing of orally administered praziquantel to common carp naturally infected by caryophyllidean tapeworms (*Platyhelminthes: Eucestoda*). Acta Veterinaria Brno 79, S73-S78.
- Surai, P.F., Noble, R.C., Speake, B.K., 1996. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. Biochemica et Biophysica Acta 1304, 1-10.



- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, S., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. Informatorium Praha. 264 s.
- Štěpánová, S., Doležalová, P., Plhalová, L., Prokeš, M., Maršálek, P., Škorič, M., Svobodová, Z., 2012. The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). Pesticide Biochemistry and Physiology 103, 152-158.
- Tavares-Dias, M., 2022. Toxicity, physiological, histopathological, handling, growth and antiparasitic effects of the sodium chloride (salt) in the freshwater fish aquaculture. Aquaculture Research 53, 715-734.
- Treves-Brown, K.M., 2000. Anthelmintics. In: Treves-Brown, K.M. (Ed.), Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, 200-205 pp.
- Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, 2023. Aktuálně registrované VLP. Dostupné z: <https://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>. Navštíveno dne 22. 11. 2023.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64 (2), 178-189.
- Velíšek, J., Stará, A., 2018. Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere 194, 481-487.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šírková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany, 658 s.
- Velíšek, J., Zusková, E., Kubec, J., Šandová, M., Stará, A., 2022. Effects of praziquantel on common carp embryos and larvae. Scientific Reports 12, 17290.
- Vercruyse, J., Claerebout, E., 2014. Praziquantel and Epsiprantel. MSD Veterinary Manual. Dostupné z: <https://www.msddvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/praziquantel-and-epsiprantel>. Navštíveno dne 30. 10. 2023.
- Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J., Votýpka, J., 2007. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton, 318 s.
- Voutilainen, A., Figueiredo, K., Huuskonen, H., 2008. Effects of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* on the energetics and feeding of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Journal of Fish Biology 73 (9), 2228-2237.
- Vyhláška č. 344/2008 Sb., o používání, předepisování a výdeji veterinárních léčivých přípravků.
- Vyhlídalová, T., Soldánová, M., 2020. Species-specific patterns in cercarial emergence of *Diplostomum spp.* from snails *Radix lagotis*. International Journal of Parasitology 50 (14), 1177-1188.

- Woltering D.M., 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a critical review. *Aquatic Toxicology* 5, 1-21.
- Yi, B., Liang, Z., Yu, Z., Lin, R., He, M., 2006. A study of the early development of grass carp, black carp, silver carp, and bighead carp in the Yangtze River, China. In: Chapman, D.C. (Ed.), *Early Development of Four Cyprinids Native to the Yangtze River, China*. U.S. Geological Survey Data Series 239, pp. 11-51.
- Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon č. 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon).
- Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) ve znění pozdějších předpisů.
- Zusková, E., Máchová, J., Velíšek, J., Gela, D., 2011. Možnosti využití kyseliny peroctové v rybářské praxi. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 109, 28 s.
- Zusková, E., Piačková, V., Máchová, J., Chupani, L., Steinbach, C., Stará, A., Velíšek, J., 2018. Efficacy and toxicity of praziquantel in helminth-infected barbel (*Barbus barbus L.*). *Journal of Fish Diseases* 41, 643-649.
- Zusková, E., Scholz, T., 2019. Trematoda. In: Palíková, M. (Ed.), *Nemoci a chorobné stavy ryb*. FROV JU, Vodňany, s. 419-446.
- Zusková, E., Piačková, V., Valentová, O., Záhlová, K., Velíšek, J., 2022. Acute toxicity of praziquantel to fish *Danio rerio* and planctonic crustacean *Daphnia magna*. *Veterinární Medicína* 67, 579-584.

## 8. ABSTRAKT

Praziquantel patří do skupiny léčiv, nazývaných anthelmintika, která se využívají k potlačení parazitárních infekcí. Cílem této studie bylo posoudit vliv praziquantelu na kulení, mortalitu, ontogenetický vývoj, růst, oxidativní stres a aktivitu antioxidačních biomarkerů raných vývojových stádií amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Pro posouzení toxicity praziquantelu pro raná vývojová stádia amura bílého byl použit embryolarvální test toxicity na rybách (OECD test č. 210). Toxické účinky praziquantelu byly zkoumány při expozici 4 koncentracím ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po dobu 29 dnů. Negativní vliv na kulení nebyl pozorován v žádné experimentální skupině. Negativní vliv na mortalitu a růst byl pozorován ve skupinách, vystavených koncentracím praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Skupiny, vystavené koncentracím  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  uhynuly během testu. Negativní vliv na ontogenetický vývoj byl pozorován ve skupinách, vystavených koncentracím praziquantelu  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Negativní vliv praziquantelu na aktivitu glutathion-S-transferázy byl pozorován ve skupině, vystavené koncentraci praziquantelu  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako bezpečná koncentrace pro raná vývojová stádia amura bílého se dá se v případě dlouhodobější expozice považovat koncentrace  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Klíčová slova:** praziquantel, ryby, raná vývojová stádia, embryolarvální test toxicity, amur bílý

## 9. ABSTRACT

Praziquantel belongs to a group of medicines called anthelmintics, which are used to control parasitic infections. The aim of this study was to assess the effect of praziquantel on hatching, mortality, ontogenetic development, growth, oxidative stress and antioxidant enzyme activity in the early life stages of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). To assess the toxicity of praziquantel for the early life stages of grass carp, an embryo-larval fish toxicity test (OECD test no. 210) was used. The toxic effects of praziquantel were investigated when exposed to four concentrations (1 mg·l<sup>-1</sup>, 2 mg·l<sup>-1</sup>, 4 mg·l<sup>-1</sup>, 6 mg·l<sup>-1</sup>) for 29 days. A negative effect on curling was not observed in any group. A negative effect on mortality was observed in fish exposed to the concentrations of praziquantel 2 mg·l<sup>-1</sup>, 4 mg·l<sup>-1</sup> and 6 mg·l<sup>-1</sup>. Groups exposed to praziquantel concentrations of 4 mg·l<sup>-1</sup> and 6 mg·l<sup>-1</sup> died during the test period. A negative effect on ontogenetic development was observed in fish exposed to praziquantel concentrations of 4 mg·l<sup>-1</sup> and 6 mg·l<sup>-1</sup>. A negative effect of praziquantel on the activity of glutathione-S-transpherase was observed in the group exposed to a praziquantel concentration of 2 mg·l<sup>-1</sup>. A concentration of 1 mg·l<sup>-1</sup> praziquantel can be considered as a safe concentration for the early life stages of grass carp in the case of long-term exposure.

**Keywords:** praziquantel, fish, early life stages, embryo-larval toxicity test, grass carp