

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Vliv anestetik na parmu obecnou

Autor: Bc. Josef Řežábek

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

Konzultant diplomové práce: Ing. Josef Příborský

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2017

Prohlášení autora diplomové práce

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis.....

Bc. Josef Řežábek

Poděkování

Rád bych poděkoval svému vedoucímu dr hab. Ing. Josefu Velíškovi, Ph.D. za vedení celé diplomové práce a za věnování cenných rad a materiálů. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Josefu Příborskému a Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. za pomoc při praktické části pokusu. Závěrem chci poděkovat své rodině za podporu při studiu.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Josef ŘEŽÁBEK**
Osobní číslo: **V14N006P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv anestetik na parmu obecnou**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

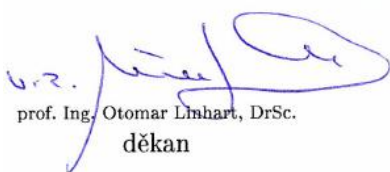
Anestézie u ryb je fyziologický stav, který se vyznačuje reverzibilním znecitlivěním buněk. Působení anestetik na centrální nervovou soustavu vyvolává u ryb změny, které vedou ke zklidnění a také až k celkové narkóze. Anestézie ryb je prevencí manipulačního stresu a mechanického poškození. Zákon na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.) požaduje postupovat tak, aby bylo zabráněno nešetrné manipulaci a následnému poškození ryb. Použití anestetik v rybářské a ichtyologické praxi všeobecně usnadňuje manipulaci s rybami během umělého výtěru ryb, odběrech krve, intramuskulární aplikaci léčiv a hormonálních preparátů, chirurgických úkonů, biometrie, značení, třídění ryb, přepravě ryb, apod.

Cílem práce bude vybrat vhodné anestetikum a posoudit jeho vliv na parmu obecnou *Barbus barbus*. Vliv anestetik bude posuzován pomocí oxidativního stresu a antioxidantních enzymů. Práce bude zaměřena hlavně na čtyři nejpoužívanější anestetika v evropské akvakultuře, a to MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin.

V rámci diplomové práce budou provedeny testy s vybranými anestetiky na parmě obecné. Během testu se bude sledovat vliv na biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy v tkáních parmy obecné. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří FROV JU. Oxidativní stres a antioxidantní enzymy v tkáních parmy obecné budou prováděny dle jednotlivých metod.

Rozsah grafických prací: **3 grafy**
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran textu**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: **Ing. Josef Příborský**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání diplomové práce: **12. prosince 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2016**


prof. Ing. Otomar Lihart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší, 389 01
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

dne

Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné literatury:

- Coyle, S. D., Durborow, R. M., Tidwell, H. J., 2004. Anaesthetic in aquaculture, SRAC Publication No. 3900, 6s.
- Gomulka, P., Wlasow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., Chmielinska, E., 2008. Effects of Eugenol and MS-222 Anaesthesia on Siberian Sturgeon *Acipenser baeri* Brandt, *Acta Veterinaria Brno* (77), 447-453 s.
- Kazuń, K., Siwicki, A. K., 2001. Propiscin - a safe new anaesthetic for fish, *Archives of Polish Fisheries* (9), 183-190 s.
- Kolářová, J. a kol., 2012. Anestetika pro ryby (aktualizované vydání z roku 2007), Edice Metodik, FROV JU, vodňany (77), 25 s.
- Kříšťan, J., Stará, A., Turek, J., Policar, T., Velíšek, J., 2012. Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.), *Neuro Endocrinol Letter* (33), 66-71 s.
- Lepič, P., Stará, A., Turek, J., Kozák, P., Velíšek, J., 2014. The effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in vimba bream, *Vimba vimba*, *Veterinární Medicína* (59), 81-87 s.
- Rodrigo, R., 2009. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease, Nova Science Publishers, 358 s.
- Ross, L. G., Ross, B., 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, Oxford, Blackwell Science Ltd., 228 s.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, J., 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis*L.), *Veterinární Medicína* (52), 103-110 s.
- Velíšek, J., Stejskal, V., Kouřil, J., Svobodová, Z., 2009. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch, *Aquaculture research* (40), 354-361 s.,
- Velíšek, J., Stará, A., Li Z. H., Silovská, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profile and oxidative stress biomarkers of rainbow trout, *Aquaculture* 310, 369-375 s.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled.....	12
2.1	Parma obecná (<i>Barbus barbus</i> Linnaeus, 1758).....	12
2.1.1	Systematické zařazení parmy obecné.....	12
2.1.2	Poznávací znaky.....	13
2.1.3	Rozšíření a výskyt.....	14
2.1.4	Habitat a bionomie.....	15
2.1.5	Potrava.....	16
2.1.6	Pohlavní dimorfismus a rozmnožování.....	17
2.1.7	Růst a věk.....	19
2.1.8	Význam.....	20
2.1.9	Výskyt parmy obecné ve vodních tocích z hlediska sportovního rybolovu.....	21
2.1.10	Ohrožení a ochrana parmy obecné.....	23
2.2	Anestésie a anestetika.....	23
2.2.1	Anestésie.....	23
2.2.2	Vstup a vyloučení anestetik.....	24
2.2.3	Fáze anestésie.....	25
2.2.4	Vliv stresu na organismus.....	27
2.2.5	Anestetika.....	28
2.2.6	Ideální anestetikum.....	28
2.2.7	MS 222 (tricain methanosulfonat).....	29
2.2.8	2-phenoxyethanol (ethylen glycol monophenyl ether).....	31
2.2.9	Hřebíčkový olej.....	33
2.2.10	Propiscin.....	35
2.3	Oxidativní stres.....	37
2.3.1	Volné radikály.....	38
2.3.1.1	Zdroj volných radikálů.....	38
2.3.1.2	Volné radikály kyslíku a dusíku a rovnováha mezi nimi a antioxidanty.....	38
2.3.1.3	Poškození volnými radikály.....	40

2.3.1.4	Negativní a pozitivní účinky volných radikálů	41
2.3.1.5	Ochrana před volnými radikály	42
2.3.2	Antioxidanty a jejich vliv na ochranu organismu	42
2.3.3	Celková antioxidační kapacita	44
2.3.4	Enzymatické antioxidační systémy	44
2.3.4.1	Superoxiddismutáza.....	45
2.3.4.2	Glutathionperoxidáza a glutathionreduktáza.....	46
2.3.4.3	Kataláza.....	46
2.3.5	Biomarkery	48
3	Materiál a metodika	50
3.1	Experimentální materiál a pracovní postup	50
3.2	Odběr vzorků	52
3.3	Hematologický profil krve.....	55
3.3.1	Stanovení počtu erytrocytů (RBC).....	55
3.3.2	Stanovení množství hemoglobinu (Hb).....	57
3.3.3	Stanovení hematokritové hodnoty (PCV)	60
3.3.4	Střední objem erytrocytu (MCV).....	62
3.3.5	Hemoglobin erytrocytu (MCH)	62
3.3.6	Střední barevná koncentrace (MCHC).....	62
3.3.7	Stanovení počtu bílých krvinek (WBC)	63
3.4	Stanovení biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních enzymů	63
3.4.1	Stanovení lipidní peroxidace	65
3.4.2	Měření enzymatické aktivity superoxiddismutázy	68
3.4.3	Měření enzymatické aktivity katalázy.....	69
3.4.4	Měření enzymatické aktivity glutathionreduktázy.....	70
3.4.5	Stanovení koncentrace proteinů	72
3.5	Statistické vyhodnocení.....	74
4	Výsledky	75
4.1	Výsledky vlivu anestetik na hematologický profil krve parmy obecné	75
4.2	Biomarker oxidativního stresu	77
4.2.1	Lipidní peroxidace	77
4.3	Antioxidační enzymy	79
4.3.1	Superoxiddismutáza	79

4.3.2	Kataláza	81
4.3.3	Glutathionreduktáza	83
5	Diskuze.....	85
5.1	Vliv anestetik na hematologický profil krve ryb	85
5.2	Vliv anestetik na oxidativní stres a aktivitu antioxidantních enzymů	86
5.2.1	Oxidativní stres	86
5.2.2	Aktivita antioxidantních enzymů	87
6	Závěr.....	89
7	Přehled použité literatury	90
8	Abstrakt.....	100
9	Abstract	101

1 Úvod

Současným trendem v oblasti veterinární medicíny je dbát na ochranu zdraví ryb. Proto je nutné postupovat při manipulaci s rybami podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů a zabránit tak mechanickému poškození a stresu ryb. S postupem času se stále více setkáváme s pojmem anestezie ryb, který označuje buď celkové (úplná anestezie) nebo částečné (lokální anestezie) znecitlivění (uspání). Anestezie u ryb je fyziologický stav, který se vyznačuje reverzibilním znecitlivěním buněk (Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012).

Použití anestetik v rybářské a ichtyologické praxi všeobecně usnadňuje manipulaci s rybami a má uplatnění při mnoha úkonech, například při umělém výtěru, převozu, chirurgických úkonech, třídění, značkování, odběrech krve, aplikaci léků a hormonálních preparátů, focení, vážení a měření ryb apod. (Soto a Burhanuddin, 1995; Munday a Wilson, 1997; Pokorný a kol., 2004; Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012).

V současné době existuje mnoho nevyřešených dotazů týkajících se bezpečnosti anestetik a jejich vlivu na ryby. Druhy ryb se mohou značně lišit ve své odpovědi na anestetikum a testování optimálních dávek a bezpečnost anestetik pro ryby je v současné době pro moderní akvakulturu často nezbytná.

Parma obecná (*Barbus barbus*) je velice oblíbeným a ceněným rybím druhem mezi sportovními rybáři z hlediska její bojovnosti a vytrvalosti (Adámek a kol., 2015). Početnost parmy ve volných vodách v posledních letech výrazně klesá a to hlavně z důvodu zhoršení kvality vodního prostředí xenobiotiky, kdy jsou do tekoucích vod často svedeny odpadní vody z domácností, továren apod. (Velíšek a kol., 2014). Dalším důvodem snížení početnosti populace parmy je zvýšená aktivita sportovních rybářů. Rybáři se výrazně podílejí na stavu početnosti tohoto rybího druhu (RybSvaz, 2017a, b). Z těchto důvodů se v současné době stále více uplatňuje umělý odchov násad parmy pro volné vody. Při umělém odchovu parmy se využívají anestetika pro usnadnění manipulace a snížení stresu ryb během umělého výtěru.

Cílem diplomové práce bylo vybrat vhodné anestetikum a posoudit jeho vliv na tento druh. Práce byla zaměřena na čtyři nejpoužívanější anestetika v evropské akvakultuře a to MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin. Vliv anestetik

byl posuzován pomocí hematologického profilu, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidantních enzymů. Cílem této práce bylo přispět k rozšíření poznatků o bezpečnosti čtyř nejpoužívanějších anestetik v evropské akvakultuře, tak jak požaduje zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Výsledky práce mohou být uplatněny pro výběr vhodného anestetika pro parmu obecnou při umělém výtěru a tím mohou napomoci ke zvýšení početních stavů tohoto druhu ve volných vodách.

2 Literární přehled

2.1 Parma obecná (*Barbus barbuis* Linnaeus, 1758)

2.1.1 Systematické zařazení parmy obecné

Dřívější systematické zařazení parmy obecné se v současné době liší v některých údajích. Starší literatura, například Baruš a kol. (1995a), uvádí zařazení parmy obecné do třídy *Osteichthyes* – ryby a latinský rodový název *Barbus* – parma přidělují pouze Cuvierovi, 1817.

Dnešní vyspělejší a prozkoumanější systém obsahuje v některých bodech systematického zařazení drobné změny, například zařazuje parmu do třídy *Actinopterygii* – paprskoploutví a rod *Barbus* je přidělován Cuvierovi a Cloquetovi, 1816 (BioLib, 2017). Podle Berrebiho a kol. (1996) patří do rodu *Barbus* 50 druhů, naopak Kottelat a Freyhof (2007) uvádí 25 druhů.

Systematické zařazení parmy obecné (BioLib, 2017):

Říše: Animalia (Linnaeus, 1758) – živočichové

Kmen: Chordata (Bateson, 1885) – strunatci

Podkmen: Vertebrata (Cuvier, 1812) – obratlovci

Infrakmen: Gnathostomata (Zittel, 1879) – čelistnatí

Nadtřída: Osteichthyes (Huxley, 1880) – ryby kostnaté

Třída: Actinopterygii (Klein, 1885) – paprskoploutví

Nadřád: Teleostei (Müller, 1846) – kostnatí

Řád: Cypriniformes (Bleeker, 1859) – máloostní

Čeleď: Cyprinidae – kaprovití

Rod: *Barbus* (Cuvier a Cloquet, 1816) – parma

Druh: *Barbus barbuis* (Linnaeus, 1758) – parma obecná



Obr. č. 1. Parma obecná (Barbus barbus).

2.1.2 Poznávací znaky

Parma obecná (obr. č. 1) se vyznačuje protáhlým mohutným tělem dobře přizpůsobenému k vysoké rychlosti proudění vody a k životu na dně vodních toků. Tělo je pokryto drobnými, tuhými, pevně uloženými, cykloidními šupinami v kůži (Holčík a Mihálik, 1971; Baruš a kol., 1995b; Reiser, 1996; Hanel, 2001; Běňárescu a kol., 2003; Adámek a kol., 2012). Nápadnou částí hlavy je silný a mohutný rypec, vyznačující se spodním postavením úst, která jsou ohraničena silnými a tvrdými rty. U parmy lze nalézt dva páry vousků. První, resp. přední pár vousků na konci rypece na horní čelisti je kratší v porovnání s druhým párem vousků nacházející se v koutcích masitých úst. Druhý pár vousků dosahuje k oku parmy (Baruš a kol., 1995b; Běňárescu a kol., 2003; Dubský a kol., 2003; Pokorný a kol., 2004).

Laloky ocasní ploutve jsou u mnoha palem nestejně dlouhé (asymetrické), kdy spodní lalok ocasní ploutve bývá delší v porovnání s horním lalokem. Nepárová hřbetní ploutev je poměrně vysoká v poměru k výšce těla, na okrajích je tmavá. Nejvýraznější silný paprsek hřbetní ploutve má na zadní části vroubkovaný okraj. Párové ploutve se vyznačují načervenalou barvou. Oči menší velikosti se nacházejí u temena hlavy (Baruš a kol., 1995b; Hanel, 2001; Dubský a kol., 2003).

Barva těla parmy je olivově-zelená (Baruš a kol., 1995b; Běňárescu a kol., 2003). Podle Reiser (1996) je barva těla hnědomodrá až zlatavá. Zbarvení těla mladých ryb je mramorované s viditelnými skvrnami, přesto tyto skvrny mohou být někdy viditelné i u dospělých ryb ve velikosti 300 až 400 mm (Baruš a kol., 1995b; Hanel, 2001).

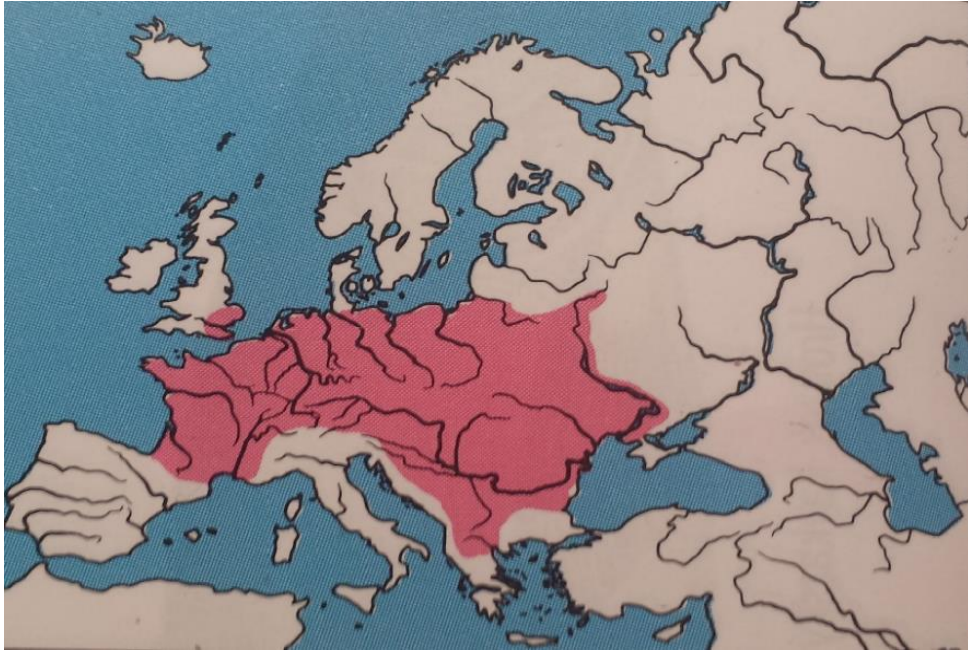
2.1.3 Rozšíření a výskyt

Kotlík a kol. (2004) a Flajšhans a kol. (2008) uvádějí rozšíření pouze jedné ze čtyř linií parmy na konci doby ledové do celé Evropy. Toto rozšíření bylo pravděpodobně možné z hlediska odolnosti palem vůči okolnímu prostředí. Tudíž je možné charakterizovat parmu obecnou jako relativně mladý druh ryby ve střední a západní Evropě, ale také jako geneticky málo odlišný druh v rámci jednotlivých povodí.

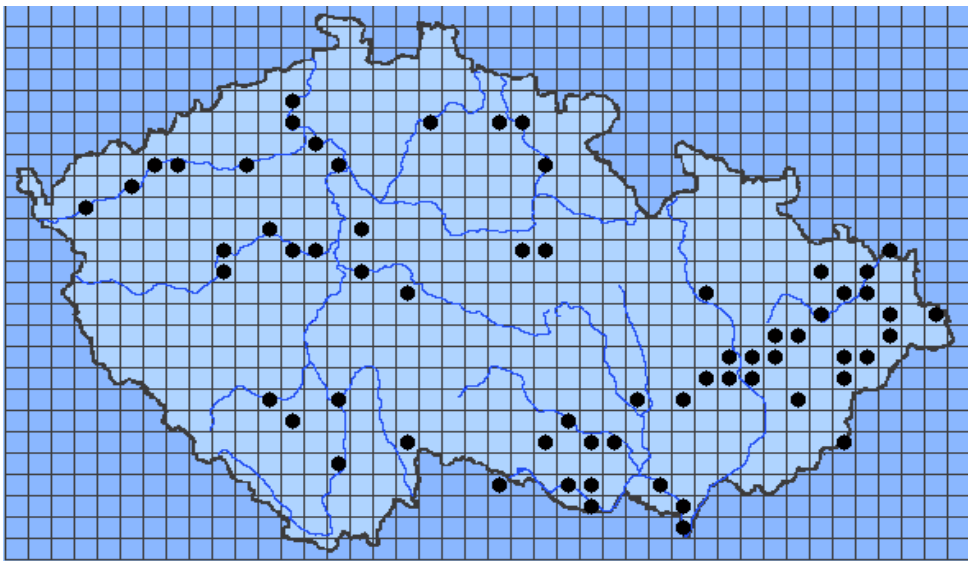
Baruš a kol. (1995b) popisují areál rozšíření parmy obecné ve střední a západní Evropě a na jihu Anglie. Naopak se tato ryba nevyskytuje ve Skandinávii, Skotsku a Irsku. Podle Terofala (2006) je areál rozšíření parmy obecné od jihozápadu Anglie, včetně jižní Francie v oblasti severně od Alpského pohoří až k oblasti Černého moře a zároveň se podle téhož autora parma obecná nevyskytuje v oblastech výše zmíněných Barušem a kol. (1995b), přičemž Terofal (2006) doplňuje ještě Dánsko.

Na území České republiky se vyskytuje pouze parma obecná, avšak na východě Slovenska v povodí řeky Tisy se vyskytuje parma karpatská (*Barbus carpathicus*), která byla považována za parmu středomořskou (*Barbus meridionalis*) a parmu východní (*Barbus petenyi*) (BioLib, 2017). Mapu výskytu parmy obecné ve světě znázorňuje obr. č. 2 a mapu výskytu parmy obecné v České republice znázorňuje obr. č. 3.

Populace parmy obecné ve vodních tocích České republiky v posledních letech výrazně klesají. Na tomto poklesu má velký vliv nízká ochrana tohoto druhu v České republice (Lusk, 1996; Peňáz a kol., 2002, 2003; Pivnička a kol., 2005) (více o ochraně tohoto druhu pojednává kapitola 2.1.10).



Obr. č. 2. Mapa výskytu parmy obecné ve světě (převzato a upraveno z Terofal (2006)).



Obr. č. 3. Mapa výskytu parmy obecné v České republice (převzato a upraveno z BioLib (2017)).

2.1.4 Habitat a bionomie

Parma je typickým zástupcem reofilních (proudomilných) druhů ryb. Při klasifikaci rybích pásem pojmenoval v roce 1871 prof. Antonín Frič podle tohoto druhu ryby rybí pásmo parmové, avšak parma se může vyskytovat také ve zbylých rybích pásmech

(pstruhových, lipanových a cejnových) (Holčík a Mihálik, 1971; Pivnička, 1994; Pokorný a kol., 2004; Hartman a kol., 2005; Lusk a kol., 2014). Parma je díky stavbě svého těla velice úspěšná při zdolávání překážek v tocích, ale i při zdolávání silného proudu vody (Baruš a kol., 1995b; Reiser, 1996; Bănărescu a kol., 2003; Kottelat a Freyhof, 2007).

Nachází se v tekoucích vodách na celém území České republiky, především v proudivých středních úsecích větších řek. Vyskytuje se v různě dlouhých podhorských až nížinných tocích s kamenitým, písčitým či štěrkovitým dnem a s poměrně vysokou rychlostí proudění vody (1 až 1,5 m·s⁻¹). Preferuje čisté a na kyslík bohaté úseky řek a naopak se straní oblastem s bahnitým dnem (Dubský a kol., 2003; Hartman a kol., 2005; Adámek a kol., 2012). Parma je velice náchylná na znečištění vody, to je také jeden z důvodů vymizení tohoto druhu v určitých oblastech (Svobodová a kol., 1987, 1993; Reiser, 1996; Dubský a kol., 2003).

Parma disponuje především noční pohybovou a potravní aktivitou (Holčík a Mihálik, 1971; Dubský a kol., 2003; Pokorný a kol., 2004; Adámek a kol., 2012). Juvenilní stádia parmy vytvářejí hejna, která se později spojují s jinými hejny, např. hrouzky. Starší jedinci žijí spíše osamoceně, avšak v době rozmnožování (tření) vytvářejí pohlavně dospělé parmy početná hejna a migrují na trdliště (místo přirozeného rozmnožování) (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003). Výskyt parmy ve stojatých vodách je závislý na jejím přirozeném výtěru v přítokových oblastech (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003; Kottelat a Freyhof, 2007).

2.1.5 Potrava

Reiser (1996) uvádí, že počáteční potrava parmy je tvořena zooplanktonem, později se parma živí larvami hmyzu, např. pošvatek, chrostíků, jepic, vodních larev pakomárů apod. Podle Pospíšila (2008) je parma hlavně bentofágem, který se živí veškerou přirozenou potravou v tekoucích vodách. Hanel (2001) a Adámek a kol. (2012) uvádí potravu parmy v podobě bentosu (larvy hmyzu a měkkýšů). Terofal (2006) uvádí ještě jako složky potravy parmy rybí potěr a méně zelené řasy, přičemž zelené řasy zmiňuje také Adámek a kol. (2015). Baruš a kol. (1995b) uvádí, že v trávicí soustavě parmy obecné byly během larvální periody determinovány různé druhy vířníků a jednobuněčných řas. Juvenilní stádium parmy obecné chované v rybníční akvakultuře

využívá ze začátku chovu jako potravu pouze zooplankton - hlavně korýše, tedy hrotnatky (rod *Daphnia*) a buchanky (rod *Cyclops*), aj. Později konzumují kukly pakomárů (čeleď *Chironomidae*), dále také larvy jepic (řád *Ephemeroptera*), a také máloštětinatce (řád *Oligochaeta*) (Hochman, 1955; Adámek a Obrdlík, 1977).

Potrava starších vývojových stádií je určena velikostí a stářím ryby, lokalitou výskytu, ale také ročním obdobím a dostupností potravy (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003).

Dospělé parmy využívají především bentickou složku potravy (Adámek a kol., 2012), vodní měkkýše, např. hrachovky (rod *Pissidium*) a bahňivky (rod *Bithinia*), dále vodní brouky (např. řád *Coleoptera*), larvy vážek (např. řád *Odonata*), chrostíky (např. řád *Trichoptera*), larvy dvoukřídlého hmyzu (např. řád *Diptera*), pošvatky (např. řád *Plecoptera*) a blešivce (např. čeleď *Gammaridae*) (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003). Parma může být tedy zařazena mezi zoobentofágní organismy (Fiala a Spurný, 2001; Terofal, 2006).

2.1.6 Pohlavní dimorfismus a rozmnožování

U parmy obecné je poměrně obtížné rozlišit samčí pohlaví od samičího, jelikož nejsou viditelné žádné stoprocentní morfologicko – anatomické znaky pro jednotlivá pohlaví (Dubský a kol., 2003; Policar a kol., 2009). Přesto Krupka (1987) popisuje pohlavní dimorfismus v době tření podle většího viditelného objemu břišní partie u jikernaček a nápadně zbarvené pohlavní papily. Podle Krupky (1987) je dalším rozlišovacím znakem pohlaví v době rozmnožování přítomnost vylučovaného mlíčí tlakem na břišní dutinu. Dubský a kol. (2003) považují za přesný znak determinace pohlaví třetí vyrážku na hlavě a na bocích těla u samčího pohlaví v době výtěru. Rozeznání pohlaví může být také posouzeno z hlediska rychlosti růstu, jelikož samičí pohlaví roste oproti samčímu pohlaví rychleji a samičí pohlaví se dožívá vyššího věku. Na základě vyšší růstové rychlosti samic dosahují tedy samci kratší délky těla a to v poměru 1:1,5 až 1:3 (Peňáz, 1977; Peňáz a kol., 2002; Pokorný a kol., 2004).

U parmy obecné byla také prokázána tzv. protandrie, neboli přeměna samčího pohlaví na samičí v průběhu života. Tato situace ovšem nastává velice vzácně. Dalším prokázaným faktem je tzv. intersexualismus (hermafroditismus), tedy souběžný výskyt

samčí i samičí pohlavní tkáně v gonádách jednotlivců divokých populací (Peňáz a kol., 2002; Pokorný a kol., 2004).

Někteří samci pohlavně dospívají již na konci 2. roku života (ojediněle), avšak většina ve věku tří let, samice pohlavně dozrávají o 2 až 3 roky později, resp. ve věku 4 až 5 let (Peňáz, 1977). Pohlavní dospělost samic je v 5. až 6. roce života při celkové délce 300 až 350 mm (Krupka, 1987). Pohlavní dospělost samců nastává v době od 2 do 4 let při celkové délce těla okolo 150 mm a průměrné hmotnosti 60 g. U samic nastává pohlavní dospělost o 1 až 2 roky později než u samců při celkové délce těla okolo 210 mm a hmotnosti v rozmezí 120 až 140 g (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003; Kottelat a Freyhof, 2007). Dubský a kol. (2003) uvádějí pohlavní dospívání ve věku 3 až 6 let, u samců o 2 až 3 roky dříve než u samic.

Vlastní výtěr nastává v rozmezí od května do června (výjimečně až do září) při teplotě vody 14 (16) až 23 (25) °C. Přirozený výtěr parmy probíhá v mělkých částech vodního toku se středním prouděním (Krupka, 1987; Baruš a kol., 1995b). Parma je druhem litofilním, neukrývajícím jikry (Baruš a kol., 1995b; Dubský a kol., 2003; Pokorný a kol., 2004). Pohlavně dospělé ryby, které mimo reprodukční období neuskutečňují téměř žádné migrační tahy, se shromažďují kvůli třecím migracím do reprodukčně optimálních částí vodních toků, kde probíhá výtěr (Reiser, 1996; Pivnička a kol., 2005). Tyto třecí migrace proti proudu trvají různou dobu a jsou různě dlouhé (max. v řádech desítek kilometrů) (Dubský a kol., 2003; Pivnička a kol., 2005; De Leeuw a Winter, 2008). Také parmy vyskytující se ve stojatých vodách podnikají krátké třecí migrace do přítoků (Bănărescu a kol., 2003; De Leeuw a Winter, 2008).

Trdliště se nacházejí nejčastěji v peřejnatých úsecích vodních toků s kamenitým, písčitém či štěrkovitým dnem (Pokorný a kol., 2004; Hanel a Lusk, 2005). Rychlost proudění vody na trdlištích je udávána jako mírná až středně silná (Hanel a Lusk, 2005). Migrační tahy na trdliště vykonávají nejdříve samci vyčkávající na druhé pohlaví (Pokorný a kol., 2004). Výtěr probíhá většinou v noci. Samice kladou jikry do předem vytvořených děr v kamenitém, písčitém či štěrkovitém substrátu (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003; Kottelat a Freyhof, 2007; Lefler a kol., 2008).

Parma se vytírá v jedné či více dávkách. Obecně parma patří do skupiny ryb s vícedávkovým (porcovým) výtěrem a s asynchronním dozráváním pohlavních produktů, což znamená, že pohlavní produkty nedozrávají ve stejný časový okamžik (Hochman, 1965; Dubský a kol., 2003). Krupka (1987) konstatuje, že v pohlavních

orgánech samic je v období před výtěrem obsaženo 4 až 5 skupin pohlavních produktů různé velikosti. Počet jiker těchto skupin zůstává po celou dobu třetího období přibližně stejný a ani jikry největší velikosti v dutině břišní nejsou vyprodukovány samicí v jednom časovém okamžiku. Při reprodukci se uvolňují z těla pouze fyziologicky zralé jikry. Dále Krupka (1987) udává, že po provedení umělého výtěru zůstává ještě v břišní dutině přibližně 50 % největších jiker.

První vytřená dávka jiker se pohybuje v rozmezí 37,6 až 54,4 % z celkové absolutní plodnosti, která je charakterizována jako celkový počet dozrálých jiker od jedné jikernačky ve výtěrovém období (Hochman, 1965; Pokorný a kol., 2004). Parametry absolutní pracovní plodnosti a relativní plodnosti jsou závislé na stáří, velikosti a hmotnosti jedinců (Baruš a kol., 1995b; Bănărescu a kol., 2003; Kottelat a Freyhof, 2007). Podle Hochmana (1963, 1965) je absolutní plodnost v rozmezí 6 081 až 71 671 jiker a relativní plodnost je v rozmezí 23 831 až 48 706 kusů jiker na kilogram samice. Baruš a kol. (1995b), Bănărescu a kol. (2003), Kottelat a Freyhof (2007) udávají absolutní pracovní plodnost samic v rozmezí 8 000 až 155 000 jiker, relativní plodnost vyjadřují v rozmezí 10 až 58 % celkové hmotnosti živé jikernačky.

Podle Dubského a kol. (2003) mají jikry před nabobtnáním velikost 1,9 mm, podle Krupky (1987) je velikost nenabobtnalých jiker v rozmezí 1,8 až 2,1 mm, průměr je tedy 1,9 mm (Peňáz, 1973) a po nabobtnání se zvětšují na velikost 2,9 mm (Dubský a kol., 2003).

Délka inkubace jiker je závislá na teplotě vody, ale udávají se hodnoty okolo 130 °d, což odpovídá asi sedmi až deseti dnům (Dubský a kol., 2003), Adámek a kol. (2015) charakterizuje délku inkubace 7 až 10 dní, resp. 120 °d.

Dubský a kol. (2003) popisuje vykulený plůdek jako světloplachý a ležící na dně vodního toku až do doby rozplavání. Podle Peňáze (1973) dosahují vylíhlá (vykulená) eleuteroembrya velikosti 8,1 až 8,7 mm, je u nich patrná absence pigmentace a jsou světloplachá. Po vykulení se ukrývají v substrátu dna po dobu 11 až 19 dnů do začátku exogenní výživy.

2.1.7 Růst a věk

Podle Kottelata a Freyhofa (2007) může parma maximálně dorůst 900 mm. Pokorný a kol. (2004) popisují parmu jako středněvěkou kaprovitou rybu pomalého

růstu. Hochman (1955) zastává názor, že parma náleží do skupiny dlouhověkových ryb. Adámek a kol. (2015) charakterizují parmu jako pomalu rostoucí druh s maximální velikostí těla 500 mm a hmotností 1 až 2 kg, výjimečně až 800 mm a 5 kg, maximálně se dožívající 15 let.

Podle Holčíka a Mihálíka (1971) měří parma v prvním roce života 60 až 100 mm, ve druhém roce života 100 až 140 mm a ve třetím roce života 150 až 190 mm. Maximální celková délka těla je 1000 mm a maximální hmotnost je v rozmezí 8 až 12 kg. Prokeš a kol. (2006) uvádí, že parma nabývá minimální zákonnou lovnou délku, která je stanovena na 400 mm, mezi 10. až 13. rokem svého života. Podle Pokorného a kol. (2004) je v pátém roce svého života celková délka těla parmy v rozmezí 350 až 400 mm při hmotnosti 1 kilogramu. Existují však také ojedinělé případy, kdy je celková délka těla v rozmezí 700 až 900 mm a hmotnost v rozmezí 5 až 7 kilogramů.

Hanel (2001), Hanel a Lusk (2005) a Adámek a kol. (2012) udávají, že věk parmy může dosahovat až na hranici 18 let. Hanel (2001) a Hanel a Lusk (2005) uvádí příklad, kdy měla chycená parma obecná na řece Moravici celkovou délku těla 630 mm a váhu 2,15 kilogramů. Hochman (1955) podává informace o parmách z řeky Svratky o maximálním stáří 17 let a Peňáz a kol. (2003) popisuje parmy z řeky Jihlavy také ve stáří 17 let.

2.1.8 Význam

Z pohledu produkčního rybářství není parma obecná hospodářsky významným druhem (Polícar a kol., 2009). Chuťově průměrná kvalita jejího masa s velkým zastoupením mezisvalových kůstek nedělá z této ryby vyhlášenou kulinářskou pochoutku (Baruš a kol., 1995b; Reiser, 1996; Hanel, 2001; Pokorný a kol., 2004; Polícar a kol., 2009). Další negativní vlastností parmy je jedovatost jejich reprodukčních orgánů (gonád), hlavně ovárií a jejich produktů - jiker, především v době reprodukce. Jedovatost je dána přítomností toxinu cyprinidinu, což je termostabilní lipoprotein. V případě pozření gonád parmy dochází k tělesným nevolnostem známým jako parmová cholera (Reiser, 1996; Hanel, 2001; Hanel a Lusk, 2005; Adámek a kol., 2012).

Vlivem znečištění vodních toků lidskou činností populace parem v posledních desítkách let klesají (Pokorný a kol., 2004). Proto je také uvedena v Červeném seznamu

v kategorii téměř ohrožených druhů (Adámek a kol., 2012). Její doba hájení je na rybářských revírech od 16. března do 15. června a nejmenší zákonná lovná délka je stanovena na hodnotu 400 mm. V Jihočeském kraji je parma hájena celoročně (Vyhláška č. 197/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů).

Parmu můžeme také posuzovat z hlediska bioindikátoru znečištění vodních toků (Baruš a kol., 1995b; Dubský a kol., 2003), respektive z hlediska obsahu polutantů nacházejících se v povrchových vodách a obsažených v tkáních jejího těla (zvláště měď a rtuť dle Svobodové a Hejtmánka (1985), Hugla a Thomé (1999) uvádí polychlorované bifenyly). Lusk (1996) uvádí další význam parmy obecné z pohledu posouzení ekologického stavu (biodiverzity) vodního toku jako celku.

V dnešní době je parma chovaná v umělých podmínkách a také vysazována do volných vod (Adámek a kol., 2015).

2.1.9 Výskyt parmy obecné ve vodních tocích z hlediska sportovního rybolovu

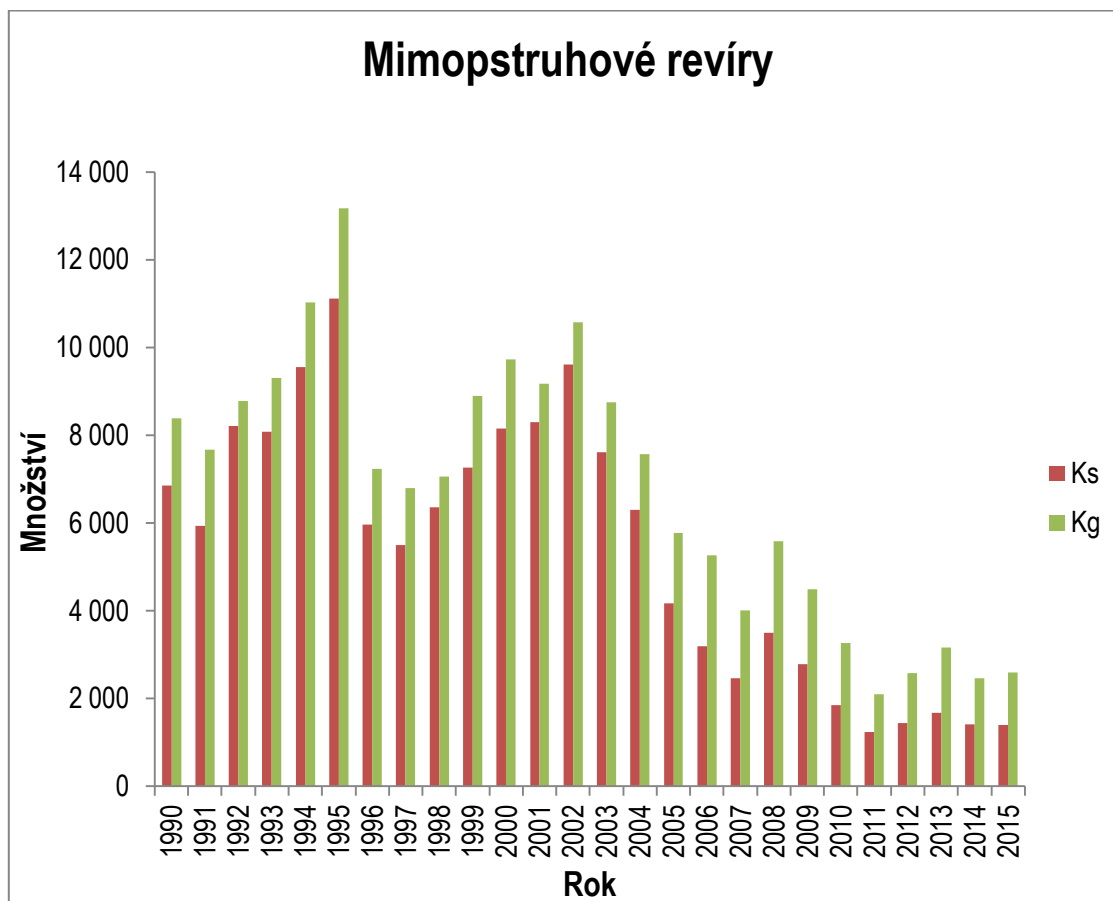
Výskyt, respektive početní stavy parmy obecné, ale i jiných druhů ryb, jsou ovlivněny jak kvalitou vodního prostředí (Dubský a kol., 2003; Velíšek a kol., 2014), tak tlakem sportovních rybářů (Pivnička a kol., 2005). Na základě každoročně vedené statistiky úlovků lze stanovit procentuální zastoupení tohoto původního druhu v porovnání s úlovkou jiných druhů ryb. Takto vedené statistiky mají tedy zásadní význam pro stanovení početnosti parem v časovém měřítku v konkrétních úsecích vodních toků (Cowx a Broughton, 1986).

Podle rybářských statistik nastal v několika minulých desetiletích (od roku 1950 až do současnosti) výrazný úbytek stavu ulovených parem v České republice na revírech Českého a Moravského rybářského svazu. Například v roce 1950 se v ČR ulovilo 38 000 kusů parem, naopak v roce 2007 to bylo 3,6 tisíc kusů a v roce 2015 se ulovilo necelých 1 462 kusů parem (Lusk, 1996; Pivnička a kol., 2005; RybSvaz, 2017a, b). Grafický pohled na celkové množství a celkovou hmotnost ulovených ryb (od roku 1990 do roku 2015) pouze v rámci ČRS představuje graf č. 1 (mimopstruhové revíry) a graf č. 2 (pstruhové revíry).

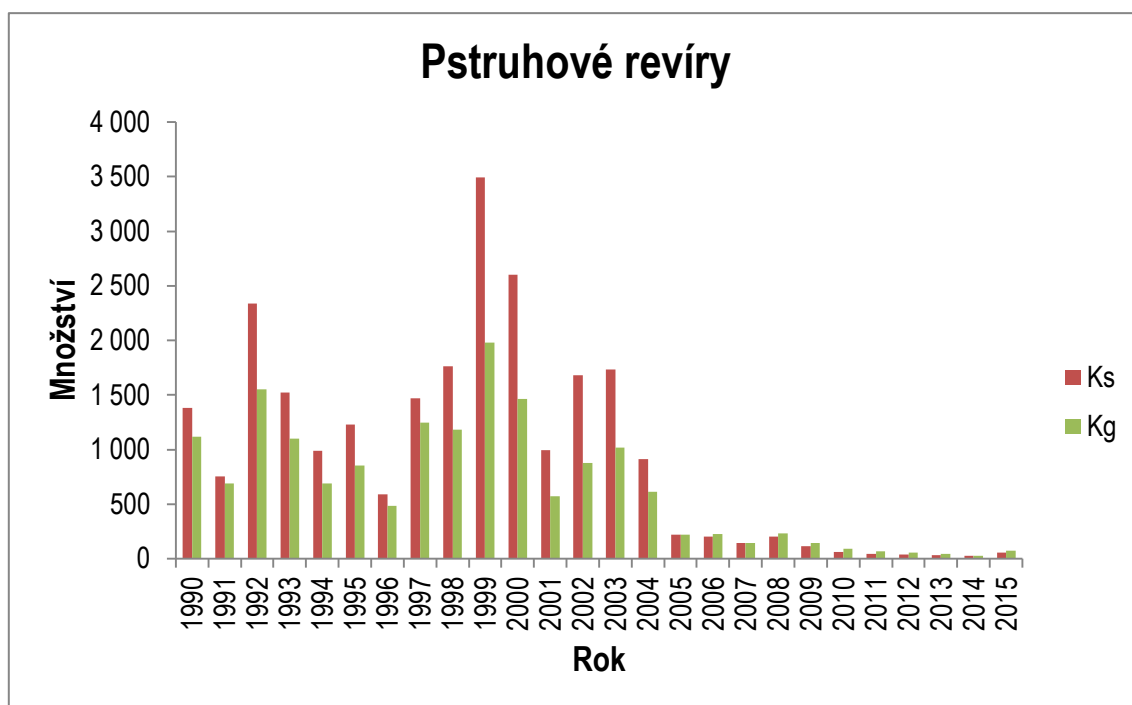
Pivnička a kol. (2005) udává, že úlovky parmy obecné jsou v rozmezí několika let, popřípadě desetiletí, rozdílné např. z důvodu chemického a biologického složení

vodního prostředí. Dále dodává nutnost uvědomit si, že aktivita (docházka) a způsoby lovu sportovních rybářů hrají velice důležitou roli, stejně tak jako zákonná lovná míra pro přivlastnění ryby. Nově stanovená míra parmy obecné v roce 1975, kdy byla zvýšena z 350 mm na 400 mm, měla velice významný vliv na pokles rybářských úlovků tohoto druhu v tomtéž roce (okolo 13 tisíc kusů), přestože v roce 1974 bylo množství ulovených ryb necelých 24 tisíc kusů (Pivnička a kol., 2005).

Minimální zákonná lovná délka je stanovena na hodnotu 400 mm celkové délky těla. Při této a větší velikosti jsou ryby ve věku 10 – 13 let a jsou tedy pohlavně dospělé. Proto lov a ponechání si těchto generačních ryb negativně ovlivňuje početnost ryb pro přirozený výtěr ve volných vodách (Pivnička a kol., 2005).



Graf č. 1. Grafické znázornění množství ulovených parem a celkové hmotnosti ulovených parem na mimopstruhových revírech ČRS (převzato a upraveno z RybSvaz (2017a)).



Graf č. 2. Grafické znázornění množství ulovených palem a celkové hmotnosti ulovených palem na pstruhových revírech ČRS (převzato a upraveno z RybSvaz (2017b)).

2.1.10 Ohrožení a ochrana parmy obecné

Parma obecná v minulosti patřila v Evropě k druhům zranitelným (Lelek, 1987), později byla parma obecná řazena k druhům málo dotčeným (Kottelat a Freyhof, 2007). Lusk a kol. (2006) uvádějí, že je parma v Červeném seznamu ryb a mihulí České republiky v kategorii téměř ohrožený druh. Zařazení parmy obecné do Červeného seznamu ryb a mihulí ČR uvádí také Adámek a kol. (2012). BioLib (2017) udává statut parmy podle IUCN jako málo dotčený druh.

2.2 Anestésie a anestetika

2.2.1 Anestésie

V dnešní moderní humánní (lidské) medicíně je často zmiňováno odborné lékařské slovo anestésie, které charakterizuje necitlivost, ztrátu citu, resp. lokální znecitlivění organismu pomocí anestetik, toto slovo však neznamená „umrtvení“ organismu. Dalším odborným pojmem je narkóza, kterou vyvolávají narkotika (omamující a tlumící

prostředky), která zamezují citění bolesti pacienta v bezvědomí prostřednictvím útlumu mozkových nervů (Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012; Zahl a kol., 2012).

V oblasti veterinární medicíny je používán pojem anestezie ryb, který vyjadřuje celkové znecitlivění ryb za účelem různé manipulace a snížení stresu (Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012; Gressler a kol., 2015). Pokorný a kol. (2004) charakterizuje narkózu ryb jako uspání ryb, neboli jako částečnou či úplnou ztrátu citlivosti. Podle Keenea a kol. (1998), Svobody a Kolářové (1999), Iversena a kol. (2003), Svobodové a kol. (2007) a Kolářové a kol. (2012) je účelem anestezie zabránit stresu a mechanickému poškození ryb při manipulaci jak v přirozeném prostředí, tak i mimo něj. Svoboda a Kolářová (1999) udává, že při nešetrné manipulaci může dojít k různému poškození rybiho organismu počínaje od narušení slizové vrstvy těla až po hluboké poškození rybí svaloviny a žaberního aparátu. Čítek a kol. (1997) uvádí, že ryby mají poměrně rychlou regeneraci různých tkání, přesto upozorňuje na šetrné mechanické zacházení s rybami. Kolářová a kol. (2012) uvádí, že ve veterinární medicíně je potřeba řídit se podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, který stanovuje jak postupovat a zabránit tak nešetrné manipulaci se zvířaty.

Anestezie je využívána například při umělém výtěru ryb, při odstraňování parazitů (ektoparazitů) z povrchu těla, při focení ryb, při převozu ryb, při odběrech krve, při aplikaci léků a různých přípravků, při vážení a měření ryb. Dále se anestetika používají při přepravě ryb (zvláště akvariijních), kdy anestetikum snižuje metabolickou aktivitu organismu, což má za následek menší hromadění odpadních produktů metabolismu organismu (CO_2 a NH_3) a také menší spotřebu kyslíku, který je využíván při metabolismu. Anestetikum snižuje také reakce organismu na vnější podněty a s tím souvisí menší agresivita ryb, např. při společném převážení (Soto a Burhanuddin, 1995; Munday a Wilson, 1997; Pokorný a kol., 2004; Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012; Gomulka a kol., 2015; Gressler a kol., 2015; Silva a kol., 2015).

2.2.2 Vstup a vyloučení anestetik

Hunn a Allen (1974) a Houston a Woods (1976) uvádí, že hlavní vstupní brána anestetika do těla ryby a zpět je žaberní aparát. Hunn a Allen (1974) poukazuje ještě na možnost absorpce anestetika přes kůži, ačkoliv hlavní vstupní bránou zůstává žaberní

aparát. Brown a kol. (1972) zkoumal absorpci anestetika u paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) a zjistil, že anestetikum pronikalo do těla ryby ve velké míře žaberním aparátem, přesto vyšší absorpce byla přes kůži.

Nejčastější způsob aplikace anestezie je přimíchání anestetika do vody. Takto vzniklý roztok je vdechován žaberním aparátem a je obsažen v okysličené krvi. S krví je transportován do centrální nervové soustavy (Hunn a Allen, 1974). Ferreira a kol. (1984) uvádí, že po navrácení ryby do čisté vody je anestetikum (či jeho metabolity) odbouráváno z těla přes žábry a v menší míře přes kůži. Dále Ross a Ross (1999) uvádí, že odstranění anestetika či jeho metabolitu může být uskutečněno ledvinami. Při tomto odstraňování má zásadní vliv teplota vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku, množství amoniaku, množství exkrementů a dalších látek v nádobě, která slouží pro anestezii.

V České republice se anestezie provádí pomocí anestetické koupele, avšak v zahraničí se používají pro anestezii větších ryb (býložravé ryby) speciální spreje, které obsahují přesně naředěný roztok anestetika, který se aplikuje (sprejuje) na žaberní aparát ryb (Kolářová a kol., 2012). Pokorný a kol. (2004) doplňuje, že anestezie může být také vyvolána el. proudem, pomocí injekce nebo dodáním anestetika do potravy. Pro krátkodobou anestezii lze použít vat, která je vložena do 40% etylalkoholu a poté je vsunuta pod skřelové víčko na žaberní aparát ryby.

Ross a Ross (1999) uvádí, že některé druhy ryb dokážou dýchat vzdušný kyslík, a proto mají redukovaný žaberní aparát využívaný k vyměšování a osmoregulaci. Proto je anestezie u těchto ryb časově náročná, nejistá, ale možná. Příkladem mohou být úhoř říční (*Anguilla anguilla*) nebo keříčkovec červenolemý (*Clarias gariepinus*).

2.2.3 Fáze anestezie

Anestezie probíhá ve čtyřech po sobě jdoucích fázích (Theinpoint a Niemegeers, 1965):

1. **Fáze - běžné (normální) chování** - ryba se chová klidně a má běžnou pohybovou aktivitu, bez problémů překonává překážky, nachází se ve fyziologické poloze a pravidelně dýchá,
2. **Fáze – podrážděné a vzrušené chování (excitační)** - ryba je v přirozené poloze, její aktivita stoupá, začíná se projevovat neklid, projevují se zrychlené pohyby charakteristické s překonáváním překážek, jsou patrné silné obranné reflexy

a projevuje se nepravidelné dýchání (mělké dýchací pohyby nebo naopak rozevřené skřele),

3a. Fáze – uklidnění (sedace) a znehybnění (imobilizace) - celkové znecitlivění povrchu těla, ryba je málo aktivní, přepadává na bok, ztrácí obranný reflex, přičemž akustický reflex zůstává aktivní a vykazuje již pravidelné klidné a hluboké dýchání, které se postupně zpomaluje,

3b. Fáze – celkové úplné znecitlivění těla - tato fáze se v případě ryb nazývá anestesií a u savců znamená narkózu - bezvědomí - dochází k útlumu nervových funkcí mozku a z tohoto důvodu není vnímána bolest; ryba má tzv. boční polohu, úplná absence pohybové aktivity a s tím související nemožnost obranných reflexů kromě akustického reflexu; pravidelné klidné hluboké dýchací pohyby, které jsou částečně zpomalené,

4. Fáze – zástava dýchání (fáze označována jako hraniční bod hluboké anestezie - tedy narkózy) - ryba leží na boku, dýchání je pouze lehké a povrchní, naprostá absence obranných reflexů včetně akustického.

Výše zmíněné fáze anestezie nastávají v konkrétním pořadí. Má-li se nacházet ryba opět v přirozeném stavu, ve kterém byla před aplikací anestetika, musí být ryba přemístěna do čisté vody a fáze zotavení probíhá v opačném pořadí než fáze anestezie. Při zotavení ryby jsou jednotlivé stupně anestezie méně výrazné a dochází k jejich prolínání (Theinpoint a Niemegeers, 1965; Kouřil a kol., 2001; Kolářová a kol., 2012).

V případě potřeby hluboké nebo povrchové anestezie ryb je anestezie závislá na dávce anestetika a na expoziční době ryby v roztoku vody s anestetikem podle potřeby fáze, kterou je nutné docílit pro další manipulaci. Anestetika způsobují ze začátku uklidnění ryby a v případě zvýšené dávky anestetika či zvýšené expoziční doby způsobují ztrátu reflexů, rovnováhy apod. Je potřeba myslet i na druh, věk ryb a na citlivost jejich organismu na konkrétní anestetikum. Proto je nutné před začátkem anestezie provést zkoušku snášenlivosti (otestovat citlivost ryb na používané anestetikum, otestovat koncentraci a teplotu roztoku s anestetikem). Teplota má výrazný vliv, neboť se zvyšující se teplotou roste účinek anestetika. Je nutné mít při provádění anestezie nádoby s čistou a dobře prokysličenou vodou stejné teploty jaká byla použita pro roztok s anestetikem (Ross a Ross, 1999; Kouřil a kol., 2001; Kolářová a kol., 2012).

Při anestezii je potřeba dodržovat určitá kritéria (Brown, 1988):

1. Kontrola a měření parametrů vody před použitím anestetika.
2. Kontrola a měření parametrů vody, které mohou být ovlivněny anestetikem, jedná se především o pH a alkalitu. V případě potřeby změny parametrů vody se použijí předem stanovené pufrы.
3. Pro aplikaci anestetika do vody použít stejnou vodu, ve které byly ryby chovány.
4. Při anestezii je nutné mít nádoby (vaničky) s čistou vodou pro zotavení ryb.
5. Aplikace jednoho či dvou ověřených anestetik, přičemž budou známy jejich účinky na ryby.
6. Nepodávat rybám 24 hodin před začátkem pokusu potravu.
7. Anestezii provádět nejdříve na malé skupině ryb, poté počkat 12 až 24 hodin zda se neobjeví uhynulé ryby a poté bude provedena anestezie u všech cílových organismů.
8. Při pokusu je nutné vzduchování vodního prostředí.

Po provedení anestezie je vhodné provést ponořovací nebo krátkodobou léčebnou koupel s dezinfekční látkou. Jako dezinfekční látka pro ponořovací koupel může posloužit manganistan draselný (hypermangan, KMnO_4) v množství $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 30 až 45 sekund. V případě krátkodobé koupele poslouží opět manganistan draselný v množství $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 5 až 10 minut (Kolářová a kol., 2012; Mitjana a kol., 2014).

2.2.4 Vliv stresu na organismus

Při manipulačním stresu ryb dochází k endokrinním změnám organismu, nazývaným jako primární reakce. Tyto reakce mají negativní vliv na řízení organismu a vyvolávají změny metabolických aktivit. Tyto aktivity způsobují změny spojené s hematologickým a biochemickým profilem a i s acidobazickou rovnováhou. Tento projev je označován jako sekundární reakce, které způsobují snížení zdraví ryb (Brožová a Svobodová, 1986).

Small (2003) uvádí, že při použití anestetika dochází k blokaci nebo částečnému negativnímu omezení funkce osy hypotalamus (*hypothalamus*) - hypofýza (podvěšek

mozkový, glandula pituitaria) - nadledviny (glandulae suprarenales), neboť tato osa je ovlivňována manipulačním stresem. Zvýšená funkce této osy a zvýšená vnímavost stresu způsobí uvolnění kortizolu, který má vliv na fyziologický stav ryby a s tím související obranu proti stresu.

2.2.5 Anestetika

Anestetika jsou léčiva používána k anestezii. Pro použití u ryb je ověřeno několik druhů anestetik. Problém v jejich použití u potravinových ryb spočívá v jejich registraci. Pro potravinové druhy ryb jsou využívána anestetika, která jsou registrována a je u nich testována účinnost, bezpečnost a zdravotní nezávadnost (Kolářová a kol., 2012; Zahl a kol., 2012; Gressler a kol., 2015). V případě registrovaného anestetika, které může být potencionálně použito pro potravinové druhy ryb, byly uskutečněny testy, kde bylo stanoveno (Kolářová a Nepejchalová, 2006):

- chemické složení a stabilita látky,
- účinnost anestetika na ryby,
- vliv anestetika na ryby,
- vliv na životní prostředí,
- stanovení reziduí.

Při zacházení s každým anestetikem je nutné postupovat podle jeho návodu stanoveného výrobcem (Velíšek a kol., 2005a; Kolářová a kol., 2012).

2.2.6 Ideální anestetikum

Podle Brožové a Svobodové (1986) a Velíška a kol. (2005a) musí moderní anestetikum splňovat určitá kritéria ohledně dobré rozpustnosti ve vodě, délce indukčního času, celkové toxicity a bezpečnosti. Dále by moderní anestetikum mělo umožnit vyšší intenzitu (zesílení) anestezie, nemělo by tvořit rezidua (metabolické zbytky) v cílovém organismu a mělo by umožnit „samovolné zotavení“ organismu, resp. rychlé vyloučení anestetika a jeho metabolitů. Hseu a kol. (1998) uvádí, že ideální anestetikum by mělo být cenově přijatelné a bezpečné pro ryby a obsluhující personál. Dále připomíná, že by mělo moderní anestetikum navodit anestezii do fáze 3b

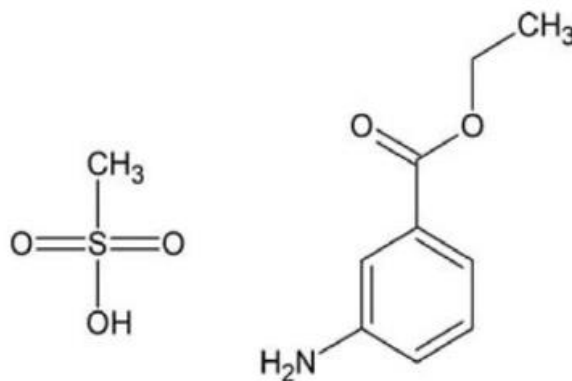
do 3 minut a doba vlastního zotavení by měla být do 5 minut v čisté vodě. Marking a Meyer (1985) dodává, že ideální anestetikum by mělo mít indukční čas do 15 minut (lepší by byl indukční čas do 3 minut). Dále by mělo trvat samovolné zotavení po aplikaci anestetika max. do 5 minut a mělo by být cenově přijatelné. Anestetikum by nemělo mít vliv na trvalou změnu chování a fyziologický stav ryby. Munday a Wilson (1997) popisuje, že je velmi důležitý rychlý nástup anestezie do fáze narkózy v časovém rozmezí od 3 do 15 minut. Avšak Marking a Meyer (1985) dodávají, že nebude existovat anestetikum, které by splňovalo výše zmíněné požadavky.

Gilderhus a Marking (1987) stanovili 3 kritéria pro ideální anestetikum. První kritérium se týká tzv. sedace (zncitlivění), která by měla nastat do 3 minut (lépe dříve). Druhé kritérium se týká opět zotavení, které by mělo nastat od 10 až 15 minut. Třetím kritériem byla mortalita, která nesmí nastat po 15 minutové expozici v roztoku anestetika.

V akvakultuře jsou nejčastěji používány čtyři anestetika a to hřebíčkový olej, MS 222, 2-phenoxyethanol a Propiscin. Dále v literárním přehledu budou tato anestetika stručně popsána.

2.2.7 MS 222 (tricain methanosulfonat)

MS 222 (obr. č. 4) ($C_9H_{11}NO_2 + C_{10}H_{15}NO_5S$) je registrované anestetikum pro potravinové druhy ryb v Evropské unii (Ross a Ross, 2008). Pro jeho dovoz musí být podána žádost veterinárním lékařem, kterou následně schvaluje Státní veterinární správa ČR (Kolářová a kol., 2012).



Obr. č. 4. Chemická struktura MS 222 (převzato a upraveno z Ross a Ross (2008)).

Jedná se o bílý prášek, jehož rozpustnost je ve vodním prostředí vysoká, jeho aktivace je rychlá, není nebezpečný pro cílový organismus a obsluhu, lze ho postupně přidávat do koupele a je bezproblémový v případě „samozotavení“ ryby (Keene a kol., 1998; Svoboda a Kolářová, 1999; Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012). Woody a kol. (2002) uvádí MS 222 jako anestetikum pro konzumní ryby, přesto Pirhonen a Schreck (2003) charakterizují tento přípravek jako karcinogenní a doporučují ochrannou lhůtu před zpracováním pro potravinářský průmysl v minimální délce 3 týdnů.

Kolářová a kol. (2012) uvádí, že při aplikaci se používá obvykle v koncentraci 30 až 350 mg·l⁻¹, avšak Svobodová a kol. (2007) udává koncentraci v rozmezí 50 až 250 mg·l⁻¹. Pokorný a kol. (2004) doporučuje koncentraci MS 222 v rozmezí 70 až 302 mg·l⁻¹. V tab. č. 1 jsou uvedeny doporučené dávky MS 222 pro anestezii vybraných druhů ryb při teplotě vody 7 až 17 °C. Podle Kolářové a kol. (2012) je nutné při dávkování anestetika brát ohled na druh a věk ryby, teplotu vodního prostředí apod. Při použití zvýšené dávky tohoto přípravku může nastat sedace v časovém úseku od 1 do 30 minut a v případě nižší dávky trvá sedace až 48 hodin (Kolářová a kol., 2012). Podle Svobodové a kol. (2007) začíná anestezie okolo 3. minuty a doba „samozotavení“ v čisté vodě nastane do 5 minut. Pokorný a kol. (2004) uvádí, že k nástupu účinku dochází v rozmezí 2 až 4 minut. Podle Kolářové a kol. (2012) se základní reflexy snižují v rozmezí 1. až 15. minuty (fáze 3a až 3b). Autorka dále uvádí, že pro navrácení ryby do stavu, v jakém se nacházela před anestezíí, dochází v čisté vodě v časovém úseku od 1 do 30 minut.

Tab. č. 1. Doporučené dávky MS 222 při teplotě vody 7 až 17 °C (převzato a upraveno z Kolářová a kol.(2012)).

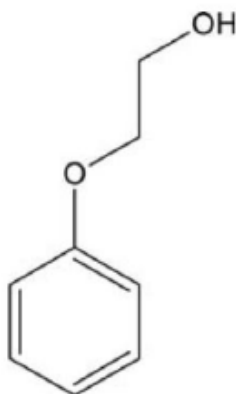
Druh	Účinek	Koncentrace MS 222 (mg·l ⁻¹)	Délka účinku (min.)
Pstruh (<i>Oncorhynchus sp.</i>)	sedace	10 - 30	do 480
	anestezie lehká	30 – 80	do 30
	anestezie hluboká	80 – 180	do 10
Losos (<i>Salmon sp.</i>)	sedace	7 – 30	do 240
	anestezie lehká	30 – 80	do 10
	anestezie hluboká	80 – 100	do 5
Okounovité (<i>Percidae</i>)	sedace	8 – 30	do 480
	anestezie lehká	30 – 70	do 20
	anestezie hluboká	70 – 100	do 4
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	sedace	20 – 30	do 1 440
	anestezie	30 – 200	do 8
Tropické ryby	sedace	30 – 50	do 1 440

Přibližně 12 až 24 hodin před anestesií by neměla být rybám podávána žádná potrava. Namíchaný roztok anestetik je nutné použít tentýž den. Vstupní bránou pro roztok je žaberní aparát, kterým se aktivní látka dostává do krevního oběhu, krev je rozváděna do celého těla. Dochází ke zpomalení krevního oběhu a poklesu potřeby kyslíku pro organismus. Vylučování anestetika probíhá nejvíce přes žaberní aparát, méně ledvinami. OL (ochranná lhůta) po aplikaci tohoto přípravku je 70 stupňodnů (Kolářová a kol., 2012).

Tento přípravek není vhodný pro některé druhy ryb, příkladem jsou tropické akvarijní ryby jako *Apistogramma ramirezi* apod. Tento přípravek musí být uskladněn v suchém prostředí při teplotě nižší než 25 °C bez přítomnosti slunečního záření. Při dodržování těchto podmínek je doba skladovatelnosti až 5 let (Kolářová a kol., 2012).

2.2.8 2-phenoxyethanol (ethylen glycol monophenyl ether)

2-phenoxyethanol (obr. č. 5) (ethylen glycol monophenyl ether pod chemickým označením $C_8H_{10}O_2$) je bezbarvý roztok, dobře rozpustný ve vodním prostředí a má přesně určené chemické složení. Jedná se o látku, která se používá hojně ve světě při anestezii ryb (Sehdev a kol., 1963; Bell, 1964; Santos a kol., 2015). Toto anestetikum není registrované v České republice z důvodu nestanoveného MRL (maximální reziduální limit, který vyjadřuje maximální množství testované látky, která může být v požitelné tkáni obsažena). Přesto tato látka může být předepsána veterinárním lékařem jako „magistraliter“. Za použití nese plně zodpovědnost veterinární lékař s chovatelem. Maximální ochranná lhůta stanovená veterinárním lékařem činí 500 stupňodnů (Kolářová a kol., 2012).



Obr. č. 5. Chemická struktura 2-phenoxyethanolu (převzato a upraveno z Ross a Ross (2008)).

Při aplikaci této látky do vodního prostředí vzniká roztok, který se dostává do těla ryby žaberním aparátem. Jeho přítomnost v krvi je krátkodobá a způsobuje vratné změny v krevním obraze (Kolářová a kol., 2012). Hseu a kol. (1997) uvádí, že toto anestetikum působí rychleji u ryb s vyššími nároky na množství kyslíku než u ryb s nižší spotřebou kyslíku.

V tab. č. 2 jsou uvedeny dávky 2-phenoxyethanolu pro anestezii vybraných druhů ryb. Barton a Helfrich (1981) a Svobodová a kol. (2007) a Kolářová a kol. (2012) uvádí doporučenou dávku 0,3 až 0,4 ml·l⁻¹ 2-phenoxyethanolu pro anestezii ryb. Pokorný a kol. (2004) doporučuje pro anestezii ryb koncentraci 0,25 až 0,5 ml·l⁻¹ v závislosti na teplotě vody a druhu ryby, přičemž oblužení nastává v rozmezí 2 až 3 minut. Podle Kolářové a kol. (2012) je vhodné přidat toto anestetikum do vaničky s menším množstvím čisté vody. Takto vzniklý roztok je potřeba dostatečně promíchat a poté nalít do jiné větší nádoby, do které budou vloženy testované ryby. Autorka doporučuje, aby byla do vaniček přidávána voda, ve které jsou ryby chovány. Ryby přemísťujeme do roztoku postupně. Od 5 do 10 minut dochází k anestezii a „samozotavení“ probíhá po přemístění do čisté vody přibližně 10 minut (Svobodová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2012). Podle Bartona a Helfricha (1981) je tento přípravek vhodný pro juvenilní stádia lososovitých ryb, avšak s ohledem na dobu expozice. Tito autoři publikují, že při koncentraci 0,50 ml·l⁻¹ anestetika je nevhodné vystavovat ryby v roztoku déle než 15 minut (téměř polovina LC50). Podle autorů je tedy vhodnější použít koncentraci 0,25 ml·l⁻¹.

Tab. č. 2. Doporučené dávky 2-phenoxyethanolu pro anestezii vybraných druhů ryb (převzato a upraveno z Kolářová a kol. (2012)).

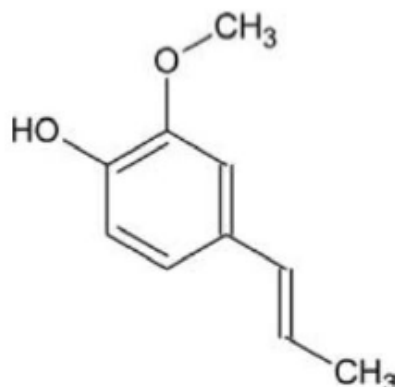
Druh	Věk	Hmotnost (g)	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml·l ⁻¹)
Lín obecný (<i>Tinca tinca</i>)	L ₁ - L _t	5 – 500	20	0,6
Jeseteři (<i>Acipenser baeri</i> , <i>A. ruthenus</i> , <i>A. stellatus</i>)	4 měsíce až generačky	9	4 – 22	0,6 – 0,7
Sih peled' (<i>Coregonus peled</i>)	Pe ₃	800 – 1 000	1	0,4
Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)		32 – 40	12,5 – 20,0	0,4
Lipan podhorní (<i>Thymallus thymallus</i>)	generačky		11,5 – 12,0	0,4
Pstruh obecný (<i>Salmo trutta</i>)		100	10,5	0,4
Živorodka ostrotlamá (<i>Poecilia sphenops</i>)			25	0,4
Parmička čtyřpruhá (<i>Puntius tetrazona</i>)			25	0,3
Parmička nádherná (<i>Puntius conchonijs</i>)			25	0,3
Karas zlatý (<i>Carassius auratus</i>)			15 - 20	0,35

2-phenoxyethanol musí být skladován v uzavřené lahvi při teplotě vzduchu do 25° C. Nutné je zamezit přístupu ohně a mrazu. Při používání látky je potřeba dbát vysoké opatrnosti, neboť látka je toxická a nebezpečná. Při neodborné manipulaci způsobuje podráždění očí a kůže (Morton, 1990; Svoboda a Kolářová, 1999; Kolářová a kol., 2012).

2.2.9 Hřebíčkový olej

Jedná se o žlutou až hnědou, méně rozpustnou látku přírodního charakteru, jejíž aktivní látkou je eugenol (C₁₀H₁₂O₂). Hřebíčkový olej (obr. č. 6) vzniká destilací květů, stonků a listů rostliny hřebíčkovce *Eugenia aromatica* (Isaacs, 1983; Keene a kol., 1998). Briozzo a kol. (1989) doplňuje, že hřebíčkový olej může být získán také ze stromu *Eugenia caryophyllata*. Negativní stránkou tohoto anestetika je jeho přírodní původ - nelze totiž přesně určit, z jakých látek se skládá a z tohoto důvodu není možná jeho registrace (nemá stanoven MRL) (Soto a Burhanuddin, 1995; Ross a Ross, 1999; Woody a kol., 2002; Pirhonen a Schreck, 2003; Kolářová a kol., 2012). Soto a

Burhanuddin (1995) popisují tuto látku jako výborné anestetikum využívané obyvateli Indonésie např. při bolesti zubů.



Obr. č. 6. Chemická struktura hřebíčkového oleje (převzato a upraveno z Ross a Ross (2008)).

Stejně tak jako 2-phenoxyethanol, tak musí být předepsán hřebíčkový olej veterinárním lékařem jako „magistraliter“. Proto lékař i chovatel nesou za tuto látku plnou odpovědnost. Maximální ochranná lhůta je 500 stupňodnů (Kolářová a kol., 2012). Přesto tato látka patří ve světě mezi nejvíce používaná anestetika (Pokorný a kol., 2004). Vstupní bránou hřebíčkového oleje do těla ryby je žaberní aparát a částečně kůže. Tato látka vyvolává stejně jako 2-phenoxyethanol vratné změny krevního obrazu (Kolářová a kol., 2012).

Podle Svobody a Kolářové (1999) je vhodná anestetická dávka hřebíčkového oleje $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a podle Kolářové a kol. (2012) je v rozmezí 30 až $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (v přepočtu 0,03 až $0,04 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$), přičemž anestezie nastává v rozmezí 5 až 10 minut. V tab. č. 3 jsou uvedeny doporučené dávky hřebíčkového oleje pro anestezii vybraných druhů ryb.

Kolářová a kol. (2012) doporučuje aplikovat hřebíčkový olej do menší nádoby s malým množstvím vody a pečlivě olej rozmíchat. Poté celou směs přelít do pracovní vaničky, do které jsou přemísťovány postupně ryby. V porovnání s ostatními anestetiky je doba „samozotavení“ ryb poněkud delší. Pokorný a kol. (2004) uvádí množství hřebíčkového oleje v koncentraci $0,03 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ a k nástupu účinku dochází do 5 minut. Kolářová a kol. (2012) doporučuje nekrmit ryby v rozmezí 12 až 24 hodin před začátkem pokusu. Dále autorka poukazuje na vhodný způsob skladování – pevně uzavřená lahev v prostoru, kde teplota nepřekročí $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a prostor musí být chráněn před mrazem. Také poukazuje na nebezpečí této látky ohledně dráždivosti očí a kůže.

Po skončení anestezie je nutné lázeň několikanásobně zředit a lázeň se nesmí vypouštět do odpadních vod.

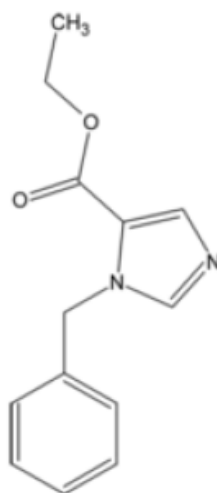
Tab. č. 3. Doporučené dávky hřebíčkového oleje pro anestezii vybraných druhů ryb (převzato a upraveno z Kolářová a kol. (2012)).

Druh	Kategorie	Hmotnost (g)	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml·l ⁻¹)
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	K ₁ – K ₃	50 – 3 000	5 – 25	0,04 – 0,06
Mník jednovousý (<i>Lota lota</i>)	Mn ₂₋₃	80 – 100	5	0,02 – 0,07
Jeseter malý (<i>Acipenser ruthenus</i>)	0+ až generační	9 – 10 000	4 – 20	0,07
Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	0+ 2-3	32 – 40	12,5 – 20,0	0,033
Siven americký (<i>Salvenius fontinalis</i>)	Si ₁	20 – 50	5	0,033
Síh peled' (<i>Coregonus peled</i>)	Pe ₃	800 – 1 000	1	0,033
Parmička čtyřpruhá (<i>Puntius tetrazona</i>)			25	0,025
Parmička nádherná (<i>Puntius conchoniuis</i>)			25	0,025
Živorodka ostrotlamá (<i>Poecilia sphenops</i>)			25	0,025
Karas zlatý (<i>Carassius auratus</i>)			15	0,033
			20	0,033

2.2.10 Propiscin

Propiscin (obr. č. 7) je relativně novou v Polsku (Zabieniec) objevenou látkou, jejíž aktivní složkou je etomidat používaný k anestezii ryb (Amend a kol., 1982; Plumb a kol., 1983, Siwicki, 1984; Hamáčková a kol., 2004) nebo malých domácích savců (Plumb a kol., 1983). Zakes a Demska-Zakes (2005) a Kazuń a Siwicki (2012) uvádějí, že se jedná o vhodný přípravek, který navozuje anestezii ryb. Propiscin je hlavně využíván pro navození tzv. krátkodobé celkové anestezie u malých savců, jejíž délka trvání dosahuje i půl hodiny. Kazuń a Siwicki (2012) poukazují na schopnost Propiscinu způsobit celkovou anestezii ryb. Amend a kol. (1982) uvádí, že čím je použita nižší dávka anestetika, tím je delší doba pro navození anestezie, ale dochází k rychlejšímu

zotavení. Amend a kol. (1982) uvádí, že účinná látka etomidat je efektivnější v alkalické vodě o vyšší teplotě.



Obr. č. 7. Chemická struktura Propiscinu (převzato a upraveno z Ross a Ross (2008)).

Kazuň a Siwicki (2012) doporučují aplikovat pro přípravu anestetické lázně (za účelem rozmnožování apod.) Propiscin o koncentraci 1,0 až 3,0 ml·l⁻¹ (tab. č. 4). Pokorný a kol. (2004) doporučuje k anestezii ryb koncentraci 0,75 ml·l⁻¹, přičemž k navození anestezie dochází do 10 minut.

Tab. č. 4. Doporučené dávky Propiscinu pro vybrané druhy ryb (převzato a upraveno z Kazuň a Siwicki (2012)).

Druhy ryb	Kategorie	Teplota vody (°C)	Koncentrace (ml·l ⁻¹)	Čas navození (min.)	Čas anestezie (min.)	Max. čas působení (min.)
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Tržní	4,5	1,0	0,5 – 1,0	10	30
	Tržní	4,5	0,5	0,75 – 1,5	10	30
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	Násada	17,0	1,0	3,0	15	30
	Plůdek	17,0	1,0	3,0	15	20 – 30
	Plůdek	19,0	1,0	1,0 – 1,5	15	20 – 25
Pstruh obecný (<i>Salmo trutta</i>)	Tržní	7,0	0,5	2,5	15	60
	Tržní	7,0	1,0	1,0	15	90

Maršić-Lučić a kol. (2005) a Kazuň a Siwicki (2012) také poukazují na bezpečnost této látky pro organismus při standardním a předepsaném používání, resp. tato látka

je bezpečná (vykazuje nízký stupeň toxicity) a nevykazuje karcinogenní (rakovinotvorné) a teratogenní (způsobující vadu vývoje plodu) účinky. Kazuň a Siwicki (2012) ještě uvádí, že při použití tohoto anestetika dochází ke snížení krevního tlaku, k malému ovlivnění fyziologických pochodů ryby a k bezvýznamným vedlejším účinkům. Amend a kol. (1982) uvádí, že při aplikaci Propiscinu je nutné dbát na bezpečnostní opatření, protože při neúmyslném požití a vdechnutí tohoto anestetika může dojít k vážným zdravotním problémům. Proto je vhodné při anestezii používat osobní ochranné pomůcky a dodržovat stanovený postup při manipulaci s touto látkou. V minulosti nebyly na Propiscin zjištěny žádné informace ohledně alergických reakcí.

2.3 Oxidativní stres

Jak v minulosti, tak i v dnešní době se setkáváme s případy poškození životního prostředí různými xenobiotiky, které způsobují negativní změny organismů (včetně člověka). Následkem používání cizorodých látek může docházet ke změně ekologické skladby organismů, potravní nabídky, hodnoty přirozeného prostředí, reprodukce a vývoje, růstu a zdravotního stavu apod. Je proto nesmírně důležité věnovat se této problematice, při které se uplatňuje metoda oxidativního stresu a s ním související pojmy (volné radikály, biomarkery, antioxidantní enzymy apod.) (Livingstone, 2001; Racek, 2003). Hofmanová a kol. (2000) a Racek (2003) poukazuje na negativní okolní vlivy vnějšího prostředí jakožto na zdroj oxidativního stresu. Vliv látek na organismus se posuzuje podle vzniku **reaktivních forem kyslíku** (zkratka ROS, z angl. *Reactive Oxygen Species*) při oxidativním stresu a jejich reakcí s biomolekulami. Lushchak (2011) uvádí, že při tvorbě adenosintrifosfátu (zkratka ATP, z angl. *Adenosine Triphosphate*) na základě kyslíkového systému vznikají reaktivní formy kyslíku jako vedlejší produkt.

Oxidativní stres je chápán jako nebezpečné působení ROS na zdravotní stav organismu (van der Oost a kol., 2003). Oxidativní stres nastává v případě, kdy v buňce převládají volné radikály (Racek, 2003). Tento stres je vyvolán látkami, které mohou redukovat počet elektronů a tím dávají vznik volnému radikálu. Mezi tyto látky patří například perzistentní organické polutanty (zkratka POPs, z angl. *Persistent Organic Pollutants*), těžké kovy, vodní květ apod. (van der Oost a kol., 2003).

2.3.1 Volné radikály

Pod tzv. pojmem volný radikál jsou myšleny látky (např. atomy), které jsou schopny samostatné existence a které obsahují v jednom popř. více orbitalech tzv. nepárový elektron nebo několik těchto elektronů. Tyto látky vznikají z běžných částic buď přijetím elektronu, odevzdáním elektronu nebo tzv. homologickým štěpením (málo časté). Volné radikály jsou velmi reaktivní a málo stabilní, protože se neustále snaží doplnit chybějící elektron od jiného volného radikálu či molekuly za účelem své větší stability (dosáhnout párového počtu elektronů). Reakce dvou radikálů dává vzniku molekuly, kterou již nelze nazvat volný radikál (již nemá nepárový elektron). V případě, že elektron byl dotován molekulou, stane se z ní volný radikál (má nepárový elektron), který bude opět hledat nepárový elektron. Na tomto principu vzniká řetězová reakce, která je ukončena v případě setkání dvou radikálů nebo radikálu s jinou látkou, jejíž radikál vykazuje větší stabilitu. Jelikož je odebrání elektronu z určitého pohledu oxidace, vykazují volné radikály oxidační aktivitu (Halliwell a Gutteridge, 2000; Racek, 2003). Snahou volného radikálu je přijmout další elektron procesem oxidace z důvodu jeho větší stability, přičemž existují látky, které mu v jeho činnosti a působení zabraňují. Tyto látky se nazývají antioxidanty (Racek, 2003).

2.3.1.1 Zdroj volných radikálů

Racek (2003) uvádí, že se volné radikály do organismu transportují z okolního prostředí, ale také se vytvářejí přímo v organismu při metabolických procesech. Dle zdroje lze rozdělit vznik volných radikálů (Racek, 2003):

- Exogenní (zevní, mající vnější příčinu): např. UV – světlo, kouření, intoxikace, potrava, průmysl atd.
- Endogenní (vnitřní, mající vnitřní příčinu): např. produkce methemoglobinu, rozpad fagocytů, syntéza prostaglandinů atd.

2.3.1.2 Volné radikály kyslíku a dusíku a rovnováha mezi nimi a antioxidanty

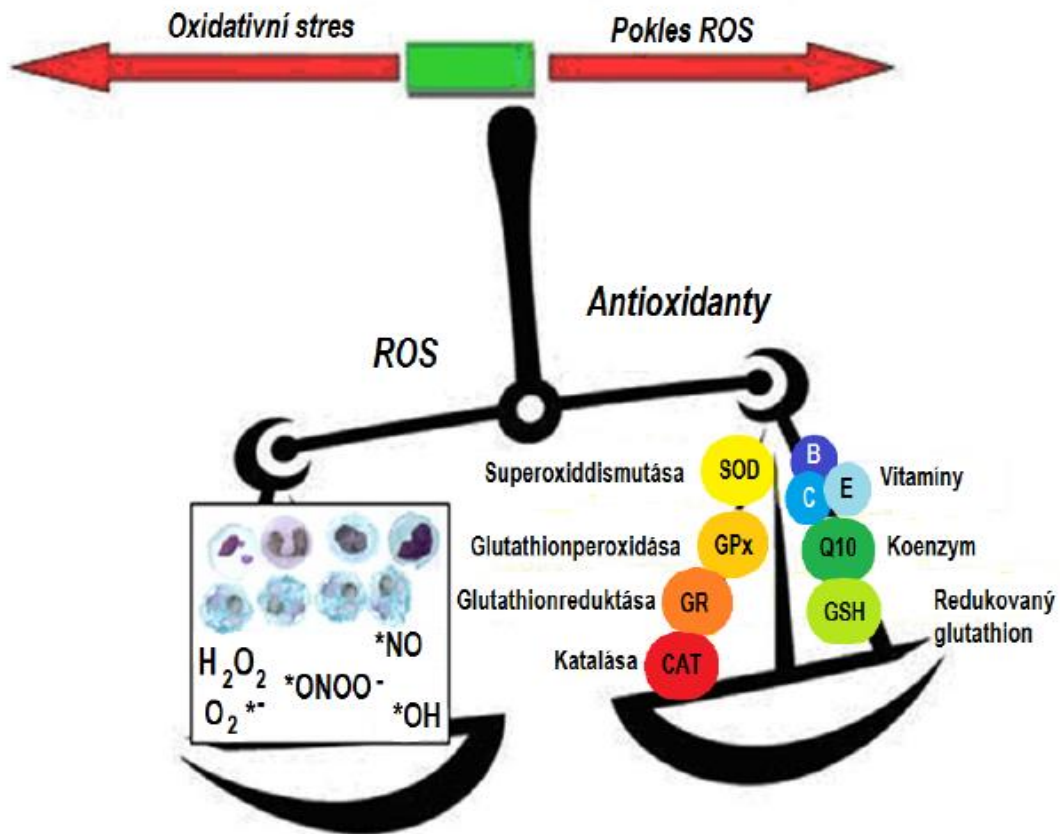
Za běžné situace jsou vzniklé volné radikály a antioxidanty v rovnováze (obr. č. 8). V případě, že je jedna z obou stran v převaze, může dojít k velkým zdravotním

komplikacím organismu. K těmto komplikacím dochází spíše v případě, kdy je převaha volných radikálů nad antioxidanty nebo mají antioxidanty sníženou aktivitu nebo buňka není schopna bojovat s oxidativním stresem nebo platí více možností. Také převaha antioxidantů nad volnými radikály může mít zdraví škodlivé účinky z hlediska blokace potřebných volných radikálů, což může mít za následek růst oxidativního stresu (např. redukce kyseliny askorbové a souvislost s Downovým syndromem) (Ďuračková, 1977; Fiers a kol., 1999; Hofmanová a kol., 2000; Racek, 2003).

Nejběžněji se vyskytují volné radikály kyslíku, převážně tzv. superoxidový aniont (O_2^-), který se vytváří redukcí molekuly kyslíku a dále může být přeměňován na velmi reaktivní sloučeniny, resp. na jiné radikály (velmi zdraví škodlivý ($\cdot OH$)) (Babior, 1997).

Při oxidativním stresu vznikají také reaktivní formy kyslíku produkované metabolismem kyslíkových radikálů, které ale neobsahují nepárový elektron. Do této skupiny patří hydroxylové radikály ($\cdot OH$), superoxidové anionty (O_2^-), alkoxy ($RO\cdot$), hydroperoxy ($HO_2\cdot$), peroxy ($ROO\cdot$), které mají charakter radikálu a singletový kyslík (1O_2), kyselina chlorná ($HClO$), peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3), které nemají charakter radikálu. Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány přirozenou cestou v každé buňce (Racek a Holeček, 1999a; Štípek a kol., 2000; Racek, 2003; van der Oost a kol., 2003; Zhang a kol., 2003).

Dále se také v organismu nacházejí radikály dusíku, převážně tzv. oxid dusnatý (NO). Tento oxid je schopen produkovat volné radikály na dusíkaté bázi, ale také sloučeniny, které neobsahují nepárový elektron, tzv. **reaktivní formy dusíku** (zkratka RNS, z angl. *Reactive Nitrogen Species*), z nichž je nejvýznamnější peroxinitrit ($OONO^-$) (Racek, 2003).



Obr. č. 8. Vztah mezi volnými radikály a antioxidanty (převzato a upraveno podle Amira a Adly (2010)).

2.3.1.3 Poškození volnými radikály

Van der Oost a kol. (2003) uvádí, že volné radikály mají snahu reagovat s makromolekulami a tím může dojít k poškození organismu. Racek (2003) popisuje, že prakticky každá buňka organismu může být napadena volnými radikály, které zapříčiní oxidační poruchu. Mezi velice nebezpečné poruchy organismu patří narušení buněčných membrán tvořených fosfolipidy, kdy tyto membrány ztrácejí funkčnost a může dojít přímo k apoptóze (zániku buňky). Dále mezi vážné poruchy patří porucha nukleových kyselin (porucha chromozomů, mutagenita a karcinogenita) a porucha bílkovin (Racek, 2003).

Dalším problémem v působení volných radikálů je tzv. lipoperoxidace. Ta značí poruchu lipidů, resp. mastných kyselin s obvykle dlouhým řetězcem, kdy dochází k poruše dvojných vazeb a vznikají toxické aldehydy a hydroperoxydy (Racek, 2003; Kovacic a kol., 2005; Lushchak, 2011). Mastné kyseliny bez dvojných vazeb jsou

k volným radikálům celkem odolné. Mezi nejčastěji sledované ukazatele lipoperoxidace patří malondialdehyd (MDA) – výsledný produkt lipidní peroxidace nebo také látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou stanovené pomocí metody TBARS (z angl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Lipoperoxidace je ukončena antioxidanty, hlavně vitamínem E (tokoferol) a koenzymem Q10, které narušují probíhající řetězovou reakci (Racek, 2003). Racek a Holeček (1999b) uvádí jako vhodné ukazatele lipoperoxidace izoprostany, které se vytvářejí reakcí volných radikálů s kyselinou arachidonovou. Kovacic a kol. (2005) a Lushchak (2011) uvádějí také negativní vliv volných radikálů v oblasti syntézy a struktury proteinů, v oblasti mitochondriální aktivity apod. Finkel a Holbrook (2000) uvádí, že právě poškozené mitochondrie mají za následek neustálou produkci ROS, což vede k neustálému narušování deoxyribonukleové kyseliny a Lushchak (2011) dodává, že v tomto případě nastává riziko snížené či úplné zástavy činnosti jednotlivých orgánů, případně orgánových soustav.

2.3.1.4 Negativní a pozitivní účinky volných radikálů

Racek (2003) uvádí, že volné radikály mají vliv na vznik a průběh různých typů nemocí. Mezi tyto nemoci patří např. ateroskleróza (kornatění tepen), *Diabetes mellitus* (cukrovka), syndrom ischemie – reperfuze (infarkt myokardu), vznik zhoubných novotvarů, zánětlivé stavy, selhání ledvin, intoxikace, neurologická a trávicí onemocnění, poruchy zraku apod.

Co se týče pozitivních účinků volných radikálů, tak DeLeo a kol. (1998) a Racek (2003) poukazují na vliv kyseliny chlorné (HClO). Ta vzniká podle reakce $H_2O_2 + H^+ + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$ a ničí fagocytované mikroorganismy. Volné radikály mají i svůj význam v dýchacím řetězci, při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin nebo při odbourávání cizorodých látek, například léků z organismu. Dalším příkladem je H_2O_2 , který se účastní přeměny jódu (důležitý pro štítnou žlázu) z jodidu procesem oxidace. Aitken a Clarkson (1987) a Heinecke a Shapiro (1989) uvádí důležitost volných radikálů také v oblasti reprodukce, kdy je superoxid v kontaktu s vaječnou membránou a H_2O_2 produkovaný vajíčkem po oplodnění zamezí průniku ostatních spermií do vajíčka.

2.3.1.5 Ochrana před volnými radikály

Při aerobním metabolismu vzniká více energie než při anaerobním metabolismu, avšak přístup vzduchu s sebou nese větší nebezpečí přítomnosti volných radikálů, na které si organismus postupně získával obranné postavení. Tuto ochranu před volnými radikály rozděluje Štípek a kol. (2000) a Racek (2003) do tří skupin:

- **1. skupina:** Mechanické systémy, které brání vzniku volných radikálů – příklad: inhibice enzymů (proces, kdy vazba určité látky způsobí snížení aktivity enzymu a tím dochází k zamezení či omezení správného průběhu enzymatické reakce),
- **2. skupina:** Mechanické systémy přímo zaměřené na již existující volné radikály – příklad: superoxiddismutáza – umožňuje dismutaci superoxidových aniontů za vzniku H₂O₂ a kyslíku; látky s redukčním účinkem – vitamíny C, E – tyto látky dotují radikál svým elektronem, přičemž se z nich stávají radikály, ale jsou mnohem stabilnější a méně nebezpečnější pro organismus,
- **3. skupina:** Nápravné mechanické systémy, které likvidují již narušené molekuly volnými radikály – příklad: činnost endonukleáz při opravě molekuly deoxyribonukleové kyseliny.

Některé druhy látek, například kyselina močová (C₅H₄N₄O₃), působí zmíněnými mechanismy současně (Racek, 2003).

2.3.2 Antioxidanty a jejich vliv na ochranu organismu

Jak je již zmíněno, jedná se o látky, které zabraňují vzniku a existenci volných radikálů neboli to jsou látky se snahou likvidovat volné radikály. Jedná se o redukující látky, výjimkou je superoxiddismutáza (Racek, 2003). Lushchak (2011) charakterizuje antioxidanty jako látky, které chrání organismus před reaktivními formami kyslíku a jejich toxickým účinkem. Dále je charakterizuje jako látky redukující činnost volných radikálů např. převáděním do méně účinných forem. A také udává, že se jedná o látky, které mají mezi sebou určitou vazbu a vytvářejí tak ochranné systémy.

Podle Racka (2003) a Lushchaka (2011) je důležitá spolupráce mechanismů pro ochranu organismu pomocí antioxidantů, ale také rovnováha mezi těmito mechanismy a prooxidačními látkami, tedy volnými radikály.

Antioxidanty jsou velmi rozmanitou skupinou látek, takže existuje několik způsobů jejich dělení. Mezi nejčastější kritéria patří: původ (exogenní, endogenní), umístění (v buňce či mimo buňku), velikost (vysoko či nízkomolekulární), rozpustnost (hydrofilní – rozpustnost ve vodně, lipofilní – rozpustnost v tucích, amfofilní – rozpustné ve vodě i v tucích), vliv na vznik volných radikálů apod. (Racek, 2003). Některé antioxidanty nelze však přesně zařadit do konkrétní skupiny z důvodu jejich kategorizace ve více kritériích. Proto další způsob dělení je následující (Racek, 2003):

1. skupina – přirozené antioxidanty – organismus je schopen jejich produkce nebo jsou přijímány v potravě – vitamíny,

➤ **Hydrofilní antioxidanty:**

intracelulární: - enzymové – superoxiddismutáza, kataláza, aj.,

- neenzymové – glutathion,

extracelulární: - vysokomolekulární - bílkoviny, které jsou tvořeny SH skupinami, patří sem enzymy s malým antioxidačním účinkem,

- nízkomolekulární - kyselina askorbová,

➤ **Lipofilní antioxidanty:** vitamín E, méně vitamín A, karotenoidy, steroidy,

➤ **Amfofilní antioxidanty:** melatonin, některé tzv. umělé antioxidanty,

2. skupina – umělé antioxidanty – léky; látky chemicky upravené za účelem zvýšení vlastnosti – nahrazování strukturních řetězců – vitamín C, E.

Lushchak (2011) uvádí kategorizaci antioxidačních systémů na systémy:

- **Enzymatické:** superoxiddismutázy, katalázy, glutathion-S-transferázy – tyto enzymy se přímo účastní boje s volnými radikály a chrání tak buňku před jejím poškozením; do této kategorie spadají také glutathionreduktázy a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy, jejichž činností jsou opravy systémů buňky (Fiers a kol., 1999; Lushchak, 2011).
- **Neenzymatické** – Tato skupina se dále dělí na antioxidanty přímé a nepřímé. Přímé antioxidanty, kam patří například kyselina askorbová, jsou využívány hlavně při prvotní obraně vůči oxidativnímu stresu. Kyselina askorbová je důležitá

pro vychytávání a detoxikaci volných radikálů. Tohoto procesu se zúčastňuje také glutathion, který je také důležitý pro ochranu tzv. thilových skupin buněk (Lushchak, 2011).

Do této kategorie také spadají karotenoidy (vitamín A – retinol) detoxikující volné hydroxo a peroxo radikály. Přímé antioxidanty jsou dodávány do organismu především potravou, menší množství si je buňka schopna vytvořit sama. Do skupiny nepřímé antioxidanty patří látky, které umožňují navázání kovů (Halliwell a Gutteridge, 2000; Lushchak, 2011).

2.3.3 Celková antioxidační kapacita

Při oxidativním stresu se také někdy používá pojem tzv. **celková antioxidační kapacita** (zkratka AOC – z angl. *Antioxidant Capacity*), která vypovídá o všech antioxidačních látkách přítomných v extracelulární tekutině. Existuje několik způsobů, jak se tato kapacita stanovuje, avšak jednotlivé metody vykazují rozdílné výsledky (Racek, 2003).

U organismů trpících nějakou nemocí a tím pádem zvýšeným množstvím volných radikálů se předpokládalo, že bude celková antioxidační kapacita na nízké úrovni z důvodu potřeby antioxidantů v boji s volnými radikály. Avšak tato myšlenka byla chybná. Ukázalo se, že u nemocných organismů byla celková antioxidační kapacita vyšší v porovnání se zdravými jedinci. Jedním důvodem byl názor, že organismus produkoval velké množství antioxidantů kvůli zvýšené přítomnosti volných radikálů nebo organismus produkoval velké množství antioxidantů, které však nebyly v boji s radikály účinné (nedokázaly zneškodnit konkrétní druh volných radikálů). Dalším vysvětlením této situace byl názor, že zvýšené množství antioxidantů je způsobeno jejich vyplavováním z jater a tukových zásob. Celková antioxidační kapacita plazmy se tedy navyšovala, avšak v buňkách nikoliv (Racek a kol., 2000).

2.3.4 Enzymatické antioxidační systémy

Tato skupina je zastoupena superoxiddismutázami (zkratka SOD, z angl. *Superoxide dismutase*), katalázami (zkratka CAT, z angl. *Catalase*), glutathionperoxidázami (zkratka GPx, z angl. *Glutathione peroxidase*) a glutathion-S-transferázami (zkratka

GST, z angl. *Glutathione-S-transferase*). Tyto zmíněné enzymy jsou významné hlavně při prvotní fázi boje s volnými radikály a chrání tak buňku (organismus) před vlivem cizorodých látek. Další dva antioxidantní systémy jsou glutathionreduktázy (zkratka GR, z angl. *Glutathione reductase*) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (zkratka G6PDH, z angl. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*), jejichž činnosti spočívají v opravě buněčných systémů (Fiers a kol., 1999; Racek, 2003; Lushchak, 2011).

2.3.4.1 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza se nachází téměř ve všech aerobních (kyslík využívajících) organismech a je hlavní antioxidantní enzym patřící do skupiny metaloenzymů. Účelem tohoto enzymu je katalyzovat reakci superoxidových aniontů za vzniku H₂O₂ a kyslíku. Umožňuje tedy tzv. dismutaci superoxidových aniontů za produkce H₂O₂ a kyslíku (Štípek a kol., 2000; Racek, 2003; van der Oost a kol., 2003). Činnost superoxiddismutázy probíhá na základě této reakce (Racek, 2003):



Superoxid (O₂⁻) je vytvářen z kyslíku ztrátou jednoho elektronu. Tento radikál je nejvíce přítomen v živých organismech, jeho produkce je spojena např. s autooxidací thiolů, s enzymatickými reakcemi a je produkován fagocytujícími buňkami za aktivity NADPH – oxidázy. Samotný superoxid nevykazuje příliš velkou reaktivitu (ani velkou škodlivost pro organismus), ale může se zúčastnit produkce mnohem reaktivnějších a tedy nebezpečnějších ROS – např. peroxid vodíku, HClO a hydroxylového radikálu, který je řazen mezi nejnebezpečnější látky pro organismus, protože v organismu neprobíhá účinný systém jeho detoxikace. Proto je snahou organismu odstranit právě superoxid, který může být potenciálním zdrojem hydroxylového radikálu. Vzniklý peroxid vodíku je také nebezpečný pro organismus, avšak ten dále podléhá detoxikaci pomocí enzymů glutathionperoxidázy a katalázy (Racek, 2003).

Existuje několik typů superoxiddismutázy, které mají odlišný kofaktor, tedy atom kovu (Fe²⁺ SOD, Mn²⁺ SOD, Cu²⁺/Zn²⁺ SOD), který je důležitý pro katalytickou aktivitu enzymu (Štípek a kol., 2000; Racek, 2003).

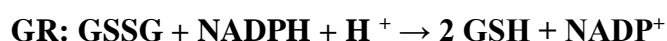
2.3.4.2 Glutathionperoxidáza a glutathionreduktáza

Z organismu se může peroxid vodíku odstranit dvěma způsoby a to pomocí: katalázy (přeměňuje H_2O_2 na vodu a kyslík) a peroxidázy (také přeměňuje peroxid vodíku, avšak dochází k oxidaci jiné látky - substrátu) (Racek, 2003).

Existuje mnoho typů peroxidáz. U mnoha živočichů včetně lidí je to hlavně glutathionperoxidáza (oxidace glutathionu), u rostlin je to askorbátperoxidáza (zde se uplatňuje kyselina askorbová) (Štípek a kol., 2000; Racek, 2003).

Enzym glutathionperoxidáza katalyzuje přeměnu H_2O_2 , přičemž umožňuje oxidaci glutathionu (GSH). Glutathion, který se nachází v buňkách ve velkém množství, patří mezi nejdůležitější vnitrobuněčné antioxidanty. Může být ve dvou formách – v redukované formě – thiol (GSH) nebo v oxidované formě – disulfid (GSSG). Rovnováhu mezi těmito dvěma formami udržuje glutathionreduktáza (Racek, 2003; van der Oost a kol., 2003). Cardoso a kol. (1998) uvádí, že mezi hlavní úkoly glutathionu patří ochrana bílkovin, které jsou tvořeny (-SH) skupinami, např. dehydrogenázy. Dále se glutathion uplatňuje například při destrukci lipidových hydroperoxidů (van der Oost a kol., 2003).

Aby mohl být peroxid vodíku stále odstraňován, je nutná opětovná aktivace glutathionu, který se nachází v oxidované formě. Opětovnou aktivaci zajišťuje glutathionreduktáza za pomoci koenzymu NADPH (Štípek a kol., 2000; Racek, 2003). Činnost glutathionperoxidázy a glutathionreduktázy znázorňuje rovnice (Racek, 2003):

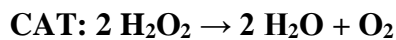


Existují tři formy enzymu glutathionperoxidázy, které se mezi sebou liší stavbou molekuly a vyskytují se v mnoha místech buňky (krevní plazma, cytoplazma, buněčná membrána) (Racek, 2003). Glutathionperoxidáza je významná z hlediska ochrany buňky před lipidní peroxidací (van der Oost a kol., 2003).

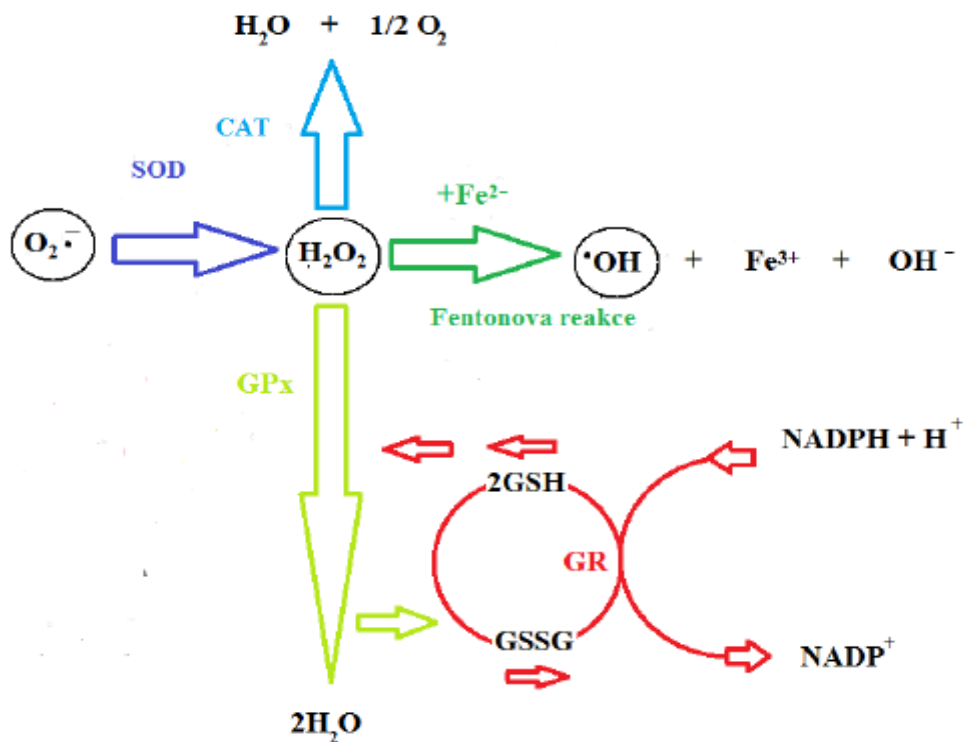
2.3.4.3 Kataláza

Enzym kataláza rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Podmínkou aktivity katalázy při odbourávání peroxidu vodíku je zvýšená koncentrace tohoto radikálu. Naproti tomu, glutathionperoxidáza štěpí peroxid vodíku jak v jeho vysoké, tak nízké

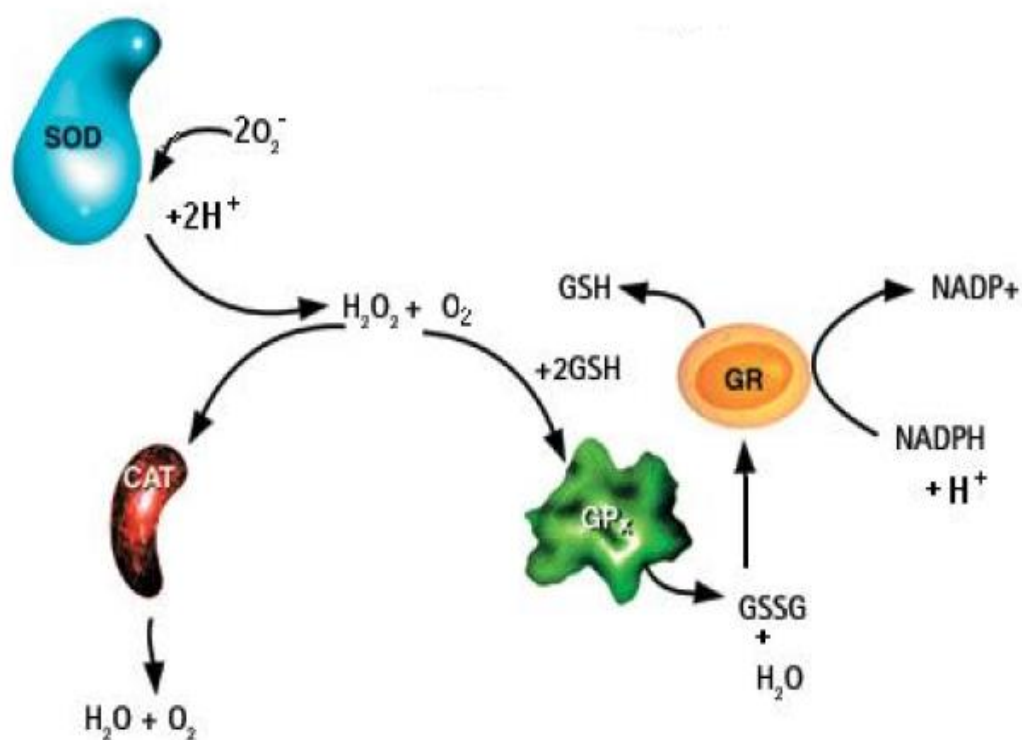
koncentraci (Leopold a Loscalzo, 2000; Štípek a kol., 2000; Racek, 2003). Navíc glutathionperoxidáza při reakci využívá tzv. kosubstrát, který podléhá oxidaci. Racek (2003) znázorňuje činnost katalázy reakcí:



Mezi výše popsánymi antioxidačními enzymy existuje určitý vzájemný vztah (obr. č. 9 a obr. č. 10) (Racek, 2003).



Obr. č. 9. Vztah antioxidačních enzymů (převzato a upraveno podle Štípek a kol. (2000)).



Obr. č. 10. Vztah antioxidačních enzymů (převzato a upraveno podle Amira a Adly (2010)).

2.3.5 Biomarkery

Jestliže proniknou do organismu cizorodé látky, jejich přítomnost je detekována tzv. biomarkery. Tyto biomarkery pomáhají vytvářet reakce (odpovědi) organismu na přítomnost cizorodé látky. Tyto biologické ukazatele (biomarkery) informují například o zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku, o změně struktury enzymů, o změnách kosterní soustavy (například skolióza – vychýlení páteře) apod. (Boelsterli, 2003). Van der Oost a kol. (2003) charakterizuje biomarkery jako látky, které s časovým předstihem signalizují možné nebezpečí organismu (například znečištění životního prostředí), populace a také celého ekosystému. Dodává, že biomarkery jsou měřitelné hodnoty, které vypovídají o působení cizorodých látek, například chemického původu, na organismus. Jedná se tedy o změnu odpovědi (reakce) organismu vystaveného škodlivému (toxickému) zdroji (např. chemické látky). Škodlivý účinek toxické látky může růst od molekulární úrovně přes tkáň a organismus až k celému ekosystému (van der Oost a kol., 2003).

Oxidativní stres je posuzován těmito biomarkery (Burýšková a kol., 2006):

- zvýšená produkce ROS po vystavení exponátu cizorodé látce,
- množství neenzymatických antioxidantů,
- schopnost detoxikačních či enzymatických antioxidačních enzymů (SOD, atd.),
- stanovení výsledných forem oxidace – stanovení malondialdehydu (MDA).

Ballantyne a kol. (1999) uvádí, že mezi odpovědi organismu na xenobiotika patří také hematologické (množství hemoglobinu, stanovení erytrocytů atd.), biochemické a histopatologické ukazatele. Li a kol. (2003) uvádí, že v případě zkoumání oxidativního stresu se biomarkery uplatňují pro signalizaci narůstající hodnoty reaktivních forem kyslíku v exponované tkáni. Reaktivní formy kyslíku nemají dlouhou životnost, proto jsou pokusy prováděny *in vitro* (mimo organismus).

3 Materiál a metodika

Vliv čtyř nejpoužívanějších anestetik v evropské akvakultuře, a to MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin na parmu obecnou, byl hodnocen ve dvou fázích. V první fázi byl hodnocen vliv anestetik na hematologický profil krve parmy. Ve druhé fázi byl hodnocen vliv anestetik na oxidativní stres a antioxidační systémy parmy.

Pokus probíhal v Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví, hematologické vyšetření a stanovení biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních enzymů probíhalo v Laboratoři vodní toxikologie a ichthyopatologie na Fakultě rybářství a ochrany vod, Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém (VÚRH) JU ve Vodňanech.

3.1 Experimentální materiál a pracovní postup

V dnešní době je mnoho nevyřešených otázek ohledně používání anestetik, resp. ohledně jejich vlivu na vodní organismy.

Parmám použitým pro test nebyla 24 hodin před začátkem testu podávána potrava. Pro tuto studii bylo použito 63 kusů plůdku parmy obecné (obr. č. 11) o průměrné celkové hmotnosti těla $18,41 \pm 2,79$ g a průměrné celkové délce těla $114,21 \pm 3,76$ mm. Plůdek parmy byl získán z chovu Experimentálním a rybochovným pracovištěm a pokusnictvím, Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech.



Obr. č. 11. *Parma obecná (Barbus barbus) použita pro studii.*

Pro tuto studii byly použity čtyři nejpoužívanější anestetika v evropské akvakultuře a to MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin (obr. č. 12). MS 222 byl zakoupený od firmy Sigma-Aldrich Chemicals Ltd. (St. Louis, USA), hřebíčkový olej (koncentrace eugenolu byla 78%) byl zakoupen od firmy Dr. Kulich Pharma s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika), 2-phenoxyethanol od firmy Merck (Hohenbrunn, Německo) a Propiscin byl dodán z oddělení rybí patologie a imunologie, Národního institutu pro rybařství (Zabieniec, Polsko).



Obr. č. 12. Anestetika použitá pro studii. Z levé strany: MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin.

Před začátkem pokusu byly ryby rozděleny do devíti skupin po sedmi kusech umístěných ve 40 litrových skleněných akváriích se vzduchováním (obr. č. 13). Rozdělení skupin bylo následující:

- 1) **Kontrola** (ryby, které nebyly vystaveny žádnému testovanému anestetiku).
- 2) **Čtyři skupiny**, z kterých byly odebrány vzorky **ihned po 10 minutové anestésii** v doporučených koncentracích a označeny jako:

MS 222 (10 min.) v koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$,
hřebíčkový olej (10 min.) v koncentraci $33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$,
2-phenoxyethanol (10 min.) v koncentraci $0,4 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$,
Propiscin (10 min.) v koncentraci $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$.

- 3) **Čtyři skupiny**, z kterých byly odebrány vzorky **24 hodin po 10 minutové anestésii** v doporučených koncentracích a označeny jako:

MS 222 (24 hod.),
hřebíčkový olej (24 hod.),

2-phenoxyethanol (24 hod.),

Propiscin (24 hod.).

U těchto skupin po 10 minutové anestezii nebyly ryby usmrceny, ale byly přemístěny zpět do akvária s čistou vodou a vzduchováním a odběr vzorků proběhl po 24 hodinách. Studie byla provedena v opakování včetně kontroly.



Obr. č. 13. Akvária s testovanými parmami.

Během pokusu byly zaznamenávány parametry vody: teplota vody v průběhu pokusu byla udržována v rozmezí 20,1 až 20,8 °C, hodnota pH vody byla 6,93 a hodnota nasycení kyslíku vody byla 8,7 mg·l⁻¹. Podmínky v průběhu testu byly pro všechny testované skupiny organismů stejné.

3.2 Odběr vzorků

Pro stanovení hematologického profilu krve byl z každé parmy odebrán vzorek krve. Nejprve byla odebírána krev rybám z kontrolní skupiny a poté z první skupiny (ihned po 10 minutové anestezii). Rybám z druhé skupiny byla odebírána krev až 24 hodin po 10 minutové anestezii (druhý den experimentu).

Krev byla odebírána pomocí injekční stříkačky z *vena caudalis* ocasního násadce (obr. č. 14).



Obr. č. 14. Odběr krve parmy obecné.

Rybí krev disponuje velmi vysokou srážlivostí, proto musela být injekční stříkačka nejprve propláchnuta heparinem (Heparin inj., Léčiva, Česká republika; obr. č. 15), resp. roztokem vody se sodnou solí heparinu. V 1 ml tohoto roztoku je přibližně 5 000 m.j. sodné soli heparinu. Tento roztok následně posloužil ke stabilizaci odebraného vzorku krve. V případě množství 1 ml vzorku rybí krve stačí aplikovat 0,01 ml roztoku heparinu, což odpovídá přibližně jedné kapce (Svobodová a kol., 2012).



Obr. č. 15. Protisrážecí přípravek heparin.

Odebraná krev byla použita pro stanovení hematologického profilu krve podle metodiky Svobodová a kol. (2012). Popis metodik stanovení jednotlivých hematologických ukazatelů je uveden níže v kapitole č. 3.3.

Po odběru krve byly ryby usmrceny a byly z nich odebrány vzorky (obr. č. 16) žaber, hepatopankreatu, mozku a svaloviny pro stanovení biomarkerů oxidativního stresu a antioxidačních enzymů (obr. č. 17).

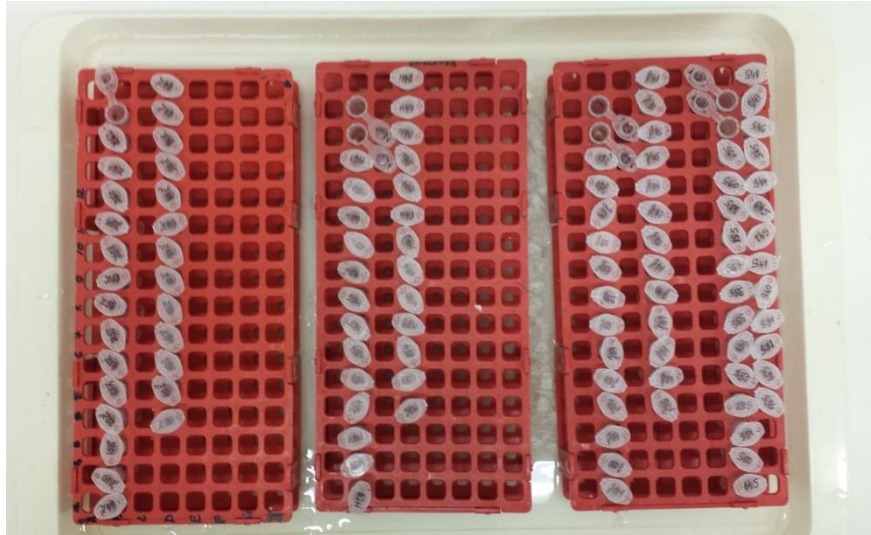


Obr. č. 16. Odběr tkání parmy obecné.



Obr. č. 17. Odebrané tkáně parmy obecné na Petriho misce. Na obrázku vlevo je část žaberního aparátu, vpravo je část hepatopankreatu, nahoře je část svaloviny a dole se nachází mozek.

Všechny odebrané vzorky byly uloženy do malých popsanych plastových zkumavek (obr. č. 18) a co nejdříve umístěny do hlubokomrazícího boxu s teplotou - 80 °C a uchovány do doby analýz enzymatické aktivity (druhá fáze studie). Popis metodik stanovení jednotlivých biomarkerů oxidativního stresu a antioxidačních enzymů je uveden níže v kapitole č. 3.4.



Obr. č. 18. Zkumavky umístěné na ledu pro odběr tkání.

3.3 Hematologický profil krve

Hematologický profil krve byl stanoven podle metodiky Svobodová a kol. (2012) Metody hematologického vyšetřování ryb. Stanoveny byly následující ukazatele hematologického profilu:

- stanovení počtu erytrocytů (RBC),
- stanovení množství hemoglobinu (Hb),
- hematokritová hodnota (PCV),
- střední objem erytrocytu (MCV),
- hemoglobin erytrocytu (MCH),
- střední barevná koncentrace (MCHC),
- stanovení počtu bílých krvinek (WBC).

3.3.1 Stanovení počtu erytrocytů (RBC)

Mezi erytrocyty (červené krvinky) ryb a savců jsou různé odlišnosti. Červené krvinky ryb jsou charakterizovány jako plnohodnotné buňky s jádrem nacházejícím se uprostřed. Tyto buňky mají oválný a diskovitý tvar, a proto jsou charakteristickým znakem postupného vývoje ryb od nižších organismů (Pokorný a kol., 2004; Svobodová a kol., 2012).

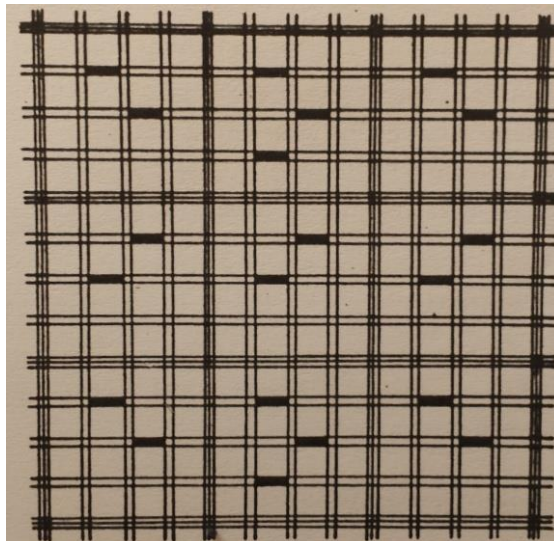
Pro stanovení počtu červených krvinek je nutné aplikovat do roztoku krve s heparinem Hayemův roztok v poměru 1 : 200. **Hayemův roztok obsahuje:** chlorid sodný (NaCl) v množství 5 g, chlorid rtuťnatý (HgCl₂ – sublimát; váže erytrocyty) v množství 2,5 g, síran sodný (Na₂SO₄) v množství 25 g a destilovanou vodu v množství *ad.* 1 000 ml (Svobodová a kol., 2012).

Jelikož je sublimát HgCl₂ jedovatý, je při manipulaci s Hayemovým roztokem nutná opatrnost. Před aplikací Hayemova roztoku je nutná jeho filtrace přes filtrační papír. Po filtraci probíhá ředění krve. Roztok je aplikován do lahvičky (obr. č. 19) a postupuje se podle tzv. Bürkerovy metody. Ředění krve probíhá ve skleněných lahvičkách, které mají objem v rozmezí 15 až 25 ml. Do těchto lahviček se pomocí pipety napipetuje 4 975 µl Hayemova roztoku a poté 25 µl krve s heparinem. Po tomto dávkování je skleněná lahvička uzavřena gumovým uzávěrem a promíchána přibližně 1 minutu. Heparinizovaná krev s Hayemovým roztokem je poté napipetována do tzv. Bürkerovy komůrky (obr. č. 20), v níž se červené krvinky počítají při 200× zvětšení ve 20 obdélnících rozprostřených po celé mřížce B. komůrky. Při stanovení červených krvinek se započítávají krvinky, které se nalézají uvnitř obdélníků, ale nesmí být v přímém kontaktu s obdélníkovou stranou. V případě kontaktu krvinek s hranou obdélníku se započítávají ty krvinky, které se dotýkají obdélníku na pravé či horní straně uvnitř či mimo obdélníku. Stanovený počet erytrocytů v každém z 20 obdélníků je sečten dohromady a výsledek následně vydělen číslem 100 (Svobodová a kol., 2012).

Výsledné stanovení celkového počtu erytrocytů je vyjádřeno v jednotkách T·l⁻¹ (T – tera = 10¹²) (Svobodová a kol., 2012).



Obr. č. 19. Skleněné lahvičky pro počítání červených krvinek.



Obr. č. 20. Bürkerova komůrka pro stanovení počtu erytrocytů. Erythrocyty se stanovují ve 20 označených obdélnících (převzato z Svobodová a kol. (1986)).

3.3.2 Stanovení množství hemoglobinu (Hb)

Hemoglobin, uložený v erythrocytu, je protein (krevní bílkovina) červené barvy obsahující železo. Jedna molekula hemoglobinu obsahuje 4 hemové skupiny – pigment

obsahující železo. Každé železo váže jednu molekulu O_2 za vzniku oxyhemoglobinu. Hlavním úkolem hemoglobinu je transport krevních plynů. Hemoglobin má tedy schopnost na sebe vázat a odevzdávat kyslík při dýchání a také transportuje odpadní CO_2 (Pokorný a kol., 2004; Svobodová a kol., 2012).

Tato metoda stojí na základě tzv. fotometrické kyanohemoglobinové analýze. Pomocí transformačního roztoku dojde k uvolnění hemoglobinu z červených krvinek a dojde k jeho přeměně (transformaci) na neměnný kyanohemoglobin, který je stanoven fotometricky na spektrofotometru Helios ϵ (Spectronic Unicam, USA; obr. č. 21) (Svobodová a kol., 2012).

Transformační roztok byl použit ve složení: ferrikyanid draselný ($K_3[Fe(CN)_6]$) v množství 0,20 g, kyanid draselný (KCN) v množství 0,05 g, dihydrofosforečnan draselný (KH_2PO_4) v množství 0,14 g a destilovaná voda v množství *ad* 1 000 ml. Transformační roztok obsahuje kyanid draselný a proto je nutné vzhledem k jeho jedovatosti dbát opatrnosti při manipulaci. Tento roztok se uskládňuje v tmavé nádobě v chladničce a je stálý až jeden měsíc. Jestliže roztok přemrzne, nelze ho již nadále využívat při pokusech (Svobodová a kol., 2012).

Při stanovení množství hemoglobinu je nejprve napipetováno do zkumavky 5 ml transformačního roztoku, do kterého se následovně napipetuje 25 μ l čerstvého vzorku krve (obr. č. 22). Celý obsah zkumavky je nutné promíchat. V případě stanovení množství hemoglobinu heparinizované krve je nutné tuto krev analyzovat do 24 hodin po odebrání a uchování vzorku krve při teplotě do 4 $^{\circ}C$ (Svobodová a kol., 2012).

Převedení hemoglobinu na kyanohemoglobin je při použití transformačního roztoku podle Kampena a Zijlstra rychlé. Při použití tohoto roztoku se smí již po 3 minutách odečítat hodnota. Měření se provádí fotometrickou metodou v kyvetě při vlnové délce 545 nm proti transformačnímu roztoku a výsledné množství hemoglobinu se spočítá pomocí kalibrační křivky. Pro přípravu kalibrační křivky je nutné použít již předem stanovený kyanohemoglobinový standard, jehož koncentrace je uvedena na etiketě, a transformační roztok v konkrétním složení. Výsledek stanovení množství hemoglobinu se udává v jednotkách $g \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).



Obr. č. 21. Spektrofotometr pro stanovení hemoglobinu.



Obr. č. 22. Zkumavky pro stanovení množství hemoglobinu. Ve zkumavkách je obsažen roztok krve a transformační roztok.

3.3.3 Stanovení hematokritové hodnoty (PCV)

Hematokritová hodnota udává poměr objemu červených krvinek k celkovému objemu krve organismu (Svobodová a kol., 2012).

Do čerstvého vzorku krve je vsunuta kapilára (dlouhá 75 mm) a krev je nabrána přibližně do 2/3 kapiláry. Jeden konec kapiláry je utěsněn modelovací plastelínou, přičemž je důležité, aby nebyl přítomen vzduch v kapiláře mezi odebraným vzorkem krve a plastelínou (Svobodová a kol., 2012).

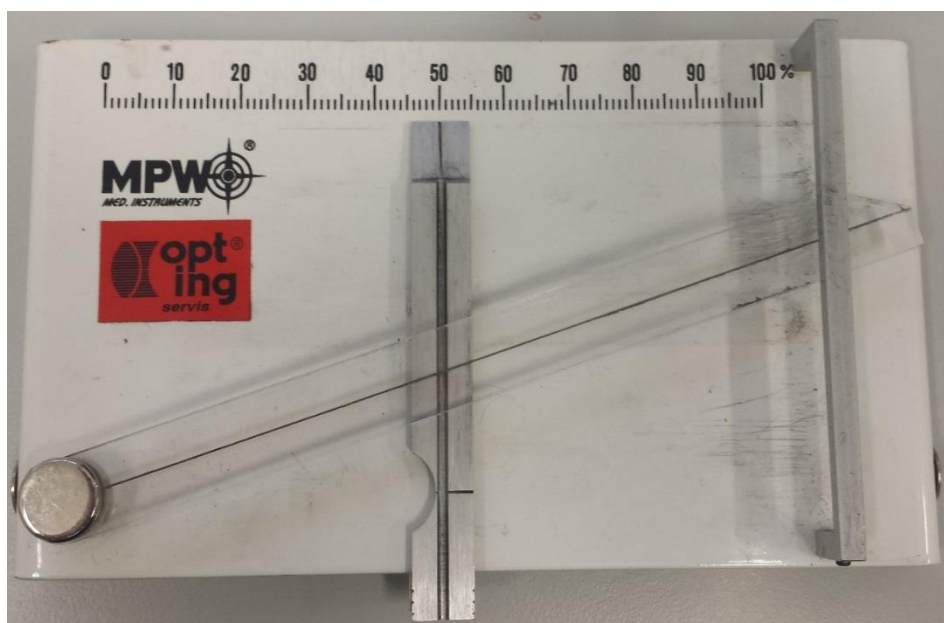
Kapiláry jsou poté vloženy do hematokritové odstředivé centrifugy (obr. č. 23), ve které se odstředují po dobu 3 minut při 14 000 otáčkách za minutu. Poté se jednotlivé kapiláry (obr. č. 24) přiloží k hematokritovému měřidlu (obr. č. 25) a odečítají se procenta hematokritu. Konkrétní naměřená hodnota (vyjádřena v %) je vynásobena koeficientem 0,01. Výslednou jednotkou hematokritové hodnoty je $l \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).



Obr. č. 23. Hematokritová odstředivá centrifuga.



Obr. č. 24. Kapiláry s odstředivými erytrocyty a plazmou. Oranžová barva představuje modelářskou plastelínu, černá barva (kapalina) představuje erytrocyty a bílá barva (kapalina) představuje plazmu.



Obr. č. 25. Hematokritové měřidlo.

3.3.4 Střední objem erytrocytu (MCV)

Střední objem erytrocytu se počítá podle vzorce:

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

kde PCV znamená výsledek hematokritové hodnoty ($l \cdot l^{-1}$) a RBC udává počet erytrocytů ($T \cdot l^{-1}$). Výsledná hodnota MCV se udává v jednotkách fentolitrech (fl) (Svobodová a kol., 2012).

3.3.5 Hemoglobin erytrocytu (MCH)

Výsledná hodnota hemoglobinu erytrocytu udává průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých červených krvinkách. Vypočítá se podle vzorce:

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

kde Hb znamená hemoglobin ($g \cdot l^{-1}$) a RBC znamená počet erytrocytů ($T \cdot l^{-1}$). Výsledná hodnota je udávána v jednotkách pg (10^{-12} g) (Svobodová a kol., 2012).

3.3.6 Střední barevná koncentrace (MCHC)

Hodnota střední barevné koncentrace udává koncentraci hemoglobinu v objemu erytrocytu. Vypočítá se podle vzorce:

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

kde Hb znamená hemoglobin ($g \cdot l^{-1}$) a PCV znamená hodnotu hematokritu ($l \cdot l^{-1}$). Výsledná hodnota je udávána v jednotkách $l \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

3.3.7 Stanovení počtu bílých krvinek (WBC)

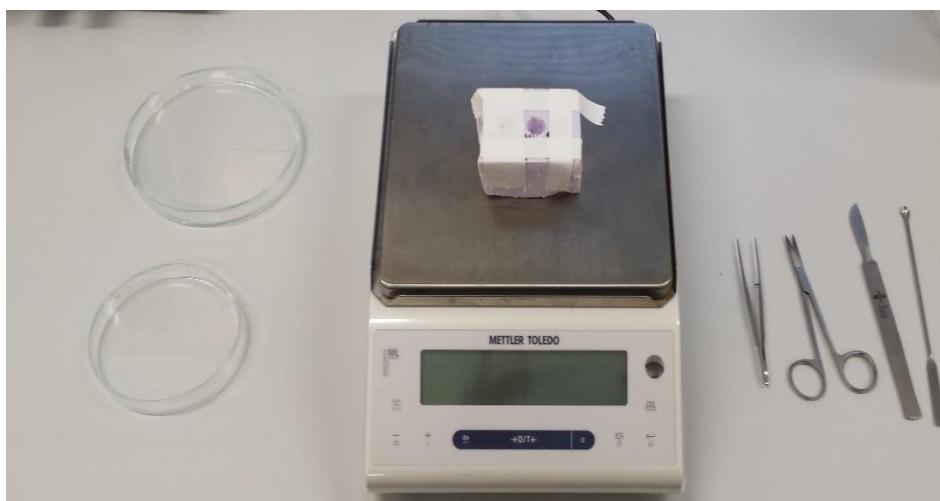
Při stanovení počtu bílých krvinek se používá vzorek roztoku krve s heparinem, přičemž je do tohoto roztoku přidán Natt–Herrickův roztok v poměru 1:200. **Natt–Herrickův roztok je složen z:** chloridu sodného (NaCl) v množství 3,88 g, síranu sodného (Na₂SO₄) v množství 2,50 g, hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄) v množství 1,74 g, dihydrogenfosforečnanu draselného (KH₂PO₄) v množství 0,25 g, formaldehydu (37%) v množství 7,5 ml a methylové violeti (2B) v množství 0,1 g. Takto smíchaný roztok je nutné dolít destilovanou vodou, aby celkový objem roztoku dosáhl 1 litru. Čerstvě namíchaný roztok se nemůže použít po dobu 24 hodin. Až po této době se roztok přefiltruje přes filtrační papír a tím je připraven pro pokus (Svobodová a kol., 2012).

Ředění krve probíhá ve skleněných lahvičkách, které mají objem v rozmezí 15 až 25 ml. Do těchto lahviček se pomocí pipety aplikuje 4 975 µl Natt-Herrickova roztoku a poté 25 µl krve. Po tomto dávkování je skleněná lahvička uzavřena gumovým uzávěrem a promíchána přibližně v rozmezí 2 až 3 minut. Aby bylo lépe poznat, co jsou drobné bílé krvinky a co jsou trombocyty, je vhodné nechat obarvit krvinky v namíchaném roztoku v rozmezí 10 až 15 minut. Poté se roztok opět promíchá a napipetuje se do Bürkerovy komůrky, kde jsou bílé krvinky počítány (při 200× zvětšení) ve 100 velkých čtvercích (červené krvinky se počítají ve 20 obdélnících) rozprostřených po celé mřížce B. komůrky. V případě, že jsou leukocyty v kontaktu se čtvercovou hranou, jsou do celkového počtu započítávány leukocyty, které se dotýkají pouze pravé a horní strany uvnitř či mimo čtverce. Celkový počet leukocytů ze všech čtverců je vydělen dvěma. Výslednou hodnotou je počet leukocytů udávaný v jednotkách G·l⁻¹ (G – giga = 10⁹). Tato analýza probíhá ihned po odběru vzorku krve (Svobodová a kol., 2012).

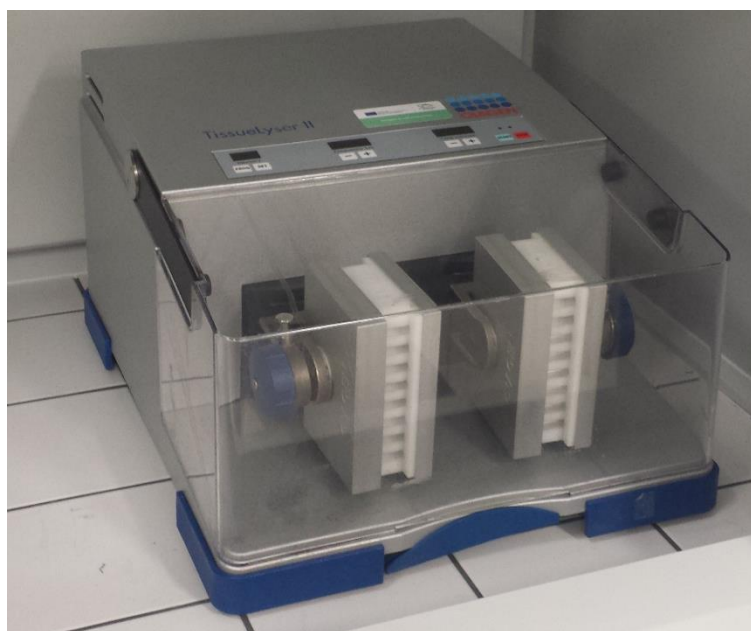
3.4 Stanovení biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních enzymů

Vzorky tkání byly postupně váženy na analytických vahách (obr. č. 26) a homogenizovány (1:10, w/v) rotačním homogenizátorem TissueLyser II (QIAGEN,

Německo; obr. č. 27) s připraveným fosfátovým pufrém (50 mM PP pufr (KH_2PO_4) s 1 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) o hodnotě pH 7,4).



Obr. č. 26. Analytické váhy Mettler Toledo.



Obr. č. 27. Rotační homogenizátor TissueLyser II.

Takto vzniklý homogenát byl rozdělen na dvě části, jedna byla použita pro měření lipidní peroxidace (metoda stanovení TBARS) a druhá část homogenátu byla použita pro stanovení aktivity antioxidantních enzymů (CAT, SOD a GR). Homogenát pro stanovení antioxidantních enzymů byl ještě před vlastní analýzou centrifugován

centrifugou Mikro 200R (Hettich, Německo; obr. č. 28) při 15 000 g po dobu 30 minut, při teplotě 4 °C. Takto vzniklý supernatant byl použit pro vlastní analýzu.



Obr. č. 28. Centrifuga Mikro 200R.

Stanoveny byly následující biomarkery:

- stanovení lipidní peroxidace (metoda TBARS),
- aktivita superoxiddismutázy (SOD),
- aktivita katalázy (CAT),
- aktivita glutathionreduktázy (GR).

3.4.1 Stanovení lipidní peroxidace

Pojem lipidní peroxidace vyjadřuje změnu (poškození) lipidů, konkrétně mastných kyselin tvořených převážně dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, kdy jsou narušovány dvojně vazby lipidů a tím jsou produkovány zdraví škodlivé aldehydy a hydroperoxydy (Racek, 2003; Kovacic a kol., 2005; Lushchak, 2011).

Princip metody

Metoda je založena na měření barevných molárních sloučenin (aduktů), které jsou výsledkem reakce mezi produkty lipidní peroxidace a kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Při lipidní peroxidaci, která je měřena metodou TBARS (z angl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances – látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou*) je sledováno několik ukazatelů. K základním ukazatelům patří stanovení malondialdehydu (z angl. *Malondialdehyde*, MDA), což je výsledný sekundární oxidační produkt lipidní peroxidace, který vzniká reakcí reaktivních forem kyslíku (ROS) s nenasycenými mastnými kyselinami nebo také produkty reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Aktivita TBARS byla měřena spektrofotometriky na mikrodestičkovém spektrofotometru Infinite M200PRO (Tecan) s fluorescenčním a luminiscenčním modulem při vlnové délce 532 nm. Metodika byla provedena podle Lushchak a kol. (2005).

Potřebné chemikálie a reagující činidla

TCA - BHT (20% kyselina trichloroctová (w/v), 2% butylovaný hydrotoluen (w/v), v poměru 200 : 1 TCA : BHT),

0,6 M HCl,

TRIS - TBA (25 mM TRIS, 100 mM TBA v destilované vodě, pH 7,4),

Standard MDA (0,22% 1,1,3,3 - tetraethoxypropan (w/v) v 1% H₂SO₄),

2 mM FeSO₄ v PBS.

Pracovní postup

Při lipidní peroxidaci (TBARS metoda) byl testován homogenizovaný vzorek tkáně bez centrifugace. Tento vzorek byl v množství (v objemu) 250 µl preinkubován po dobu půl hodiny s množstvím 12,5 µl 2 mM FeSO₄ (síranu železnatého) na tzv. termodesce při teplotě 37 °C. Poté byl k homogenátu přidán roztok TCA – BHT v poměru 250 µl : 75 µl, celý obsah byl promíchán na vortexu MS3 basic (Ika, USA) a následně centrifugován po dobu 20 minut při 4 000 rpm a teplotě 4 °C.

Do mikrodestiček bylo napipetováno 250 μl již centrifugovaného vzorku, dále 50 μl HCl a 200 μl TRIS TBA. Takto vzniklý roztok byl následovně vařen po dobu 45 minut na termobloku při 90 $^{\circ}\text{C}$. Po ochlazení bylo napipetováno 250 μl vzorku do mikrotitrační destičky a intenzita zbarvení byla stanovena spektrofotometricky.

Kalibrace

Křivka kalibrace byla určena v rozmezí 0,5 – 0,8 nmol malondialdehydu, přičemž standard malondialdehydu byl 10 mM zásobní roztok malondialdehydu - 11,02 mg tetraethoxypropanu rozpuštěného v 5 ml 1% H_2SO_4 . S takto vzniklým roztokem nebylo manipulováno po dobu dvou hodin. Po uplynutí této doby byl roztok naředěn na 100 μM roztok malondialdehydu obsaženého v 1% H_2SO_4 (100 \times ředění). Poté byla zhotovena koncentrační řada (tab. č. 5).

Tab. č. 5. Koncentrační řada TBARS metody.

nmol/reakci	100 μM roztok MDA (μl)	PBS (μl)
blank	0	750
0,5 (tzn. 2 μM)	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

Kalibrační křivkou bylo vyhodnoceno množství vytvořeného produktu, kdy byl standard MDA přichystán kyselou hydrolyzou MDA. Konečné číselné hodnoty jsou charakterizovány jako nmol TBARS $\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.4.2 Měření enzymatické aktivity superoxiddismutázy

Superoxiddismutáza je řazena mezi hlavní antioxidační enzymy organismu patřící do skupiny metaloenzymů obsahující iont kovu (např. měď, zinek), který způsobuje jejich aktivitu. Tento enzym se nachází ve všech buňkách organismu, především v játrech, která mají nejvýznamnější detoxikační účinek organismu. Tento enzym je významný z hlediska katalyzačních reakcí reaktivních superoxidových aniontů (radikálů) za vzniku H_2O_2 a molekulového kyslíku (Štípek a kol., 2000; Ozturk-Urek a Tarhan, 2001; Racek, 2003; van der Oost a kol., 2003).

Princip metody

Principem metody je inhibice chemické reakce superoxiddismutázou, kdy tuto reakci řídí superoxidy. Dochází ke vzniku superoxidů za pomoci systému NADH a chemické látky phenazin methosulfonátu (PMS). Vzniklé superoxidy se hodnotí za pomoci chemické látky NBT (nitroblue tetrazolium), která se po reakci přeměňuje na stabilní formazanový produkt. Tento produkt je následně spektrofotometricky měřen. Superoxiddismutáza reaguje s vytvořenými superoxidy, tím je tedy inhibována přeměna NBT na barevný produkt. Určuje se tedy úbytek přeměny NBT (Ewing a Janero, 1995).

Enzymatická aktivita superoxiddismutázy byla měřena spektrofotometrem vybaveným fluorescenčním a luminiscenčním modulem značky Infinite M200PRO (Tecan) při vlnové délce 560 nm. Metodika stanovení aktivity superoxiddismutázy byla provedena podle metody Marklund a Marklund (1974).

Potřebné chemikálie a reagující činidla

Homogenizační pufr 50 mM PP pufr (KH_2PO_4) s 1 mM EDTA (0,68 g KH_2PO_4 ; 29,22 mg EDTA ve 100 ml destilované vody (pH 7,4)),

PP pufr: 50 mM PP pufr s 0,1 mM EDTA (0,68 g KH_2PO_4 ; 2,922 mg EDTA ve 100 ml destilované vody (pH 7,4)),

60 μ M NBT (nitroblue tetrazolium) v PP pufru – 4,9056 mg NBT ve 100 ml PP pufru,

100 μ M NADH v 60 μ M NBT TMA (alobal) - 7,9 mg / 100 ml 60 μ M NBT,

35 μ M PMS (phenazine methosulfonate) TMA (alobal) (1,072 mg ve 100 ml PP pufru).

Pracovní postup

Do mikrodestičky bylo napipetováno 10 μl homogenizovaného vzorku tkáně a 15 μl 50 mM homogenizačního PP pufru (pro blank 25 μl PP pufru). Dále bylo do vzniklého roztoku přidáno 200 μl PP pufru s NADH a NBT. Celý roztok byl pečlivě promíchán a následně spektrofotometricky měřen každých 20 vteřin po dobu dvou minut při vlnové délce 560 nm.

Pro vznik reakce bylo do mikrodestičky s roztokem aplikováno 25 μl 35 μM PMS (phenazine methosulfonate). Takto vzniklý roztok byl měřen každých 20 vteřin po dobu 5 minut při vlnové délce 560 nm. Každý vzorek měl trojnásobné opakování měření.

Vyhodnocení

Při měření je hodnocen pokles tetrazolinové soli na formazan. Konečná hodnota enzymatické aktivity superoxiddismutázy byla vypočtena následujícím vzorcem a vyjádřena v jednotkách $\text{nmol NBT min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$\text{SOD aktivita} = \frac{(\text{Směrnice křivky blanku} + \text{směrnice křivky směsi se vzorkem/min}) - \text{směrnice křivky s PMS se vzorkem/min}}{0,6791 * 15\,000 * (\text{mg/m protein}) * 10^6}$$

3.4.3 Měření enzymatické aktivity katalázy

Enzym kataláza, vyskytující se především v jaterních buňkách, rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento enzym je tvořen hemovými skupinami nebo atomy manganu (Štípek a kol., 2000; Zamocky a kol., 2008).

Princip metody

Principem metody je měření snižující se absorbance směsi vzorku tkáně s peroxidem vodíku v mikrokyvetách při vlnové délce 240 nm (Aebi, 1984). Metodika stanovení aktivity katalázy byla provedena podle metody Beers a Sizer (1952).

Potřebné chemikálie a reagující činidla

Homogenizační pufr: 50 mM PP pufr (KH₂PO₄) s 1 mM EDTA (0,68 g KH₂PO₄, 229,22 mg EDTA/100 ml destilované vody) (pH 7,4),

TRIS EDTA pufr: 50 mM TRIS pufr s 0,1 mM EDTA (pH 7,6) (1,5125 g TRIS; 7,306 mg EDTA/250 ml destilované vody),

0,09% H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru s 0,1 mM EDTA (pH 7,6) (600 μl 3% H₂O₂/19,8 ml TRIS EDTA pufru).

Pracovní postup

Do mikrokyvety bylo v pořadí aplikováno: 5 μl supernatantu vzorku tkáně a 50 μl 50 mM PP pufru. Do roztoku se dále aplikovalo 250 μl 0,09% H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru s 0,1 mM EDTA. Celý obsah se následně promíchal. Absorbance testovaného vzorku (roztoku) byla měřena po pěti vteřinách po dobu třiceti vteřin při vlnové délce 240 nm. Každý vzorek tkáně byl podroben trojitému měření.

Vyhodnocení

Výsledek enzymatické aktivity katalázy je vyjádřený jako směrnice křivky, od které byla odečtena směrnice blanku a následně přepočtena podle zmíněné rovnice na jednotku μmol H₂O₂ min⁻¹·mg⁻¹ proteinů.

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{39,4 * 1 * (\text{mg/ml protein})} * 10^3$$

3.4.4 Měření enzymatické aktivity glutathionreduktázy

Jedním ze způsobů odstranění peroxidu vodíku z organismu je peroxidace, při které dochází k přeměně peroxidu vodíku na vodu, ale také souběžně dochází k oxidaci substrátu. Aby mohlo neustále probíhat vylučování peroxidu vodíku, je nutná zpětná aktivace oxidovaného substrátu GSSG (glutathionu) do redukované formy (GSH) (Racek, 2003).

Princip metody

Enzymatická aktivita glutathionreduktázy se měří v závislosti na poklesu množství NADPH při reakci. Princip metody je založen na vkládání mikrodestiček s připravenými vzorky konkrétní tkáně (homogenizované a zředěné s předem připraveným pufrům) do spektrofotometru vybaveného fluorescenčním a luminiscenčním modulem značky Infinite M200PRO (Tecan). Oxidace NADPH se měří při vlnové délce 340 nanometrů. Metodika stanovení aktivity glutathionreduktázy byla provedena podle metody Carlberg a Mannervik (1975).

Potřebné chemikálie a reagující činidla

GR pufr (0,1 M KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, pH 7,0),

GSSG (10 mM ve vodě) (MW = 656,5),

NADPH (1 mM v GR pufru) (MW = 833,4).

Pracovní postup

Postupně bylo do mikrodestiček napipetováno: 80 μl GR pufru, 20 μl NADPH, 20 μl GSSG a 30 μl destilované vody. Takto vzniklý roztok se 20 vteřin pozvolna promíchával. Úbytek NADPH byl měřen spektrofotometricky. Nejdříve se měřil úbytek absorbance NADPH bez připraveného vzorku tkáně při stanovené vlnové frekvenci (340 nm) po dobu 120 vteřin.

Vlastní reakce začala po přidání 50 μl vzorku homogenátu tkáně do připravené destičky s již změřeným NADPH a byla měřena 5 minut v 15 vteřinových intervalech při vlnové délce 340 nm. Každý vzorek tkáně i blanku byl podroben trojitému měření.

Vyhodnocení

Enzymatická aktivita glutathionreduktázy byla stanovena v jednotkách na mililitr (ml) ze vztahu: $\text{mU} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{nmol NADPH min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vyhodnocení enzymatické aktivity je stanoveno na základě dvou vzorců:

$$\text{Pozad'ová přeměna NADPH} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,4075 * 6\,220 * (\text{mg/ml protein})} * 10^6$$

(bez vzorku)

$$\text{GR aktivita} = \frac{\text{Směrnice křivky/min}}{0,5433 * 6\,220 * (\text{mg/ml protein})} * 10^6$$

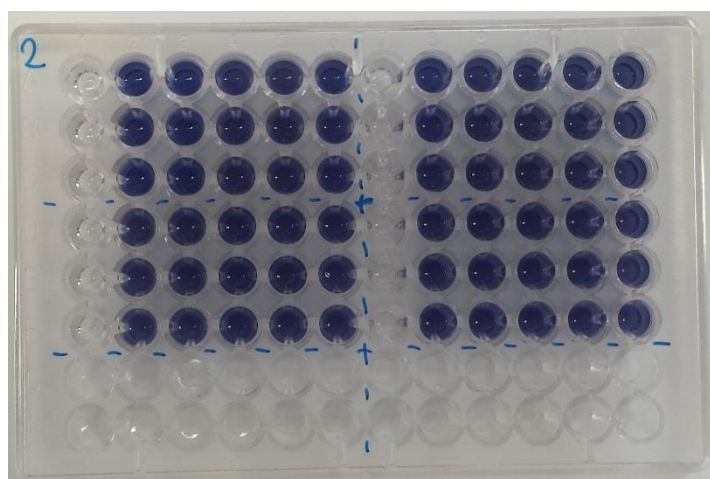
(se vzorkem)

3.4.5 Stanovení koncentrace proteinů

Lowry a kol. (1951) uvádí, že pro stanovení koncentrace proteinů je důležitá Folin – Ciocalteu fenolová reagensie, kdy dochází k vytvoření modrého komplexu (obr. č. 29). Reakce vznikají komplexacemi měďnatých iontů (Cu^{2+}) ze síranu měďnatého (CuSO_4) a redukcemi fosfomolybdátu. Koncentrace proteinů je zjišťována v rozmezí od 0,005 do 2 mg proteinů na 1 ml.

Princip metody

Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometrem vybaveným fluorescenčním a luminiscenčním modulem značky Infinite M200PRO (Tecan) při vlnové délce 680 nm. Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno podle metodiky Bradford (1976).



Obr. č. 29. Modrý komplex v pracovní mikrodestičce.

Potřebné chemikálie a reagující činidla

NaOH (4,5% NaOH (w/v), 8,5% NaHCO₃ (w/v)),

CuSO₄ (0,1% CuSO₄ (w/v), 0,392% citrónan sodný (w/v)),

Folin reagent (1 díl Folin-Ciocalteu reagentu : 4 díly destilované vody),

BSA - bovinní albumin (1 mg·ml⁻¹ PBS).

Pracovní postup

Do mikrodestiček bylo aplikováno 40 µl BSA standardu nebo 10 × naředěný vzorek tkáně. Dále bylo do mikrodestičky aplikováno 35 µl NaOH, 105 µl CuSO₄ a 70 µl Folin reagentu (činidla). Roztok byl důkladně promíchán. Pracovní postup znázorňuje tab. č. 6.

Tab. č. 6. Znázorněná pracovní mikrodestička.

µl	Mikrodestička				
	BSA	Vzorek	NaOH	CuSO ₄	Folin reagent
Blank	40	-	35	105	70
Vzorek	-	40	35	105	70

Kalibrace

Nejdříve bylo nutné připravit si roztok BSA, který vznikl z 1 mg·ml⁻¹ PBS naředěného dle koncentrační řady (tab. č. 7).

Tab. č. 7. Koncentrační řada pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku tkáně.

mg·ml ⁻¹	1 mg·ml ⁻¹ BSA (µl)	PBS (µl)
1	200	0
0,8	160	40
0,6	120	80
0,4	80	120
0,2	40	160
0,1	20	180
0,05	10	190
0,02500	5	195
blank	0	200

Vyhodnocení

Koncentrace proteinů ze vzorku tkání byla stanovena kalibrační křivkou pro BSA v rozmezí 0,1 až 1,0 mg·ml⁻¹.

3.5 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení rozdílu mezi experimentálními skupinami a skupinou kontrolní byla použita jednosměrná analýza variance (ANOVA). Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem Statistica, verze 12.0 pro Windows (StatSoft).

4 Výsledky

Experiment byl rozdělen na dvě části. V první části byl sledován vliv anestetik (hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu, Propiscinu a MS 222) na hematologický profil krve parmy obecné (kapitola 4.1.). Ve druhé části experimentu byl posuzován vliv zmíněných anestetik na biomarker oxidativního stresu (kapitola 4.2.) a na antioxidační enzymy (kapitola 4.3.). Během experimentu nebyla zaznamenána mortalita testovaných palem.

4.1 Výsledky vlivu anestetik na hematologický profil krve parmy obecné

Výsledky vlivu čtyř anestetik v doporučených koncentracích pro ryby MS 222 ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), hřebíčkového oleje ($33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-phenoxyethanolu ($0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) a Propiscinu ($1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) na hematologický profil parmy obecné jsou uvedeny v tab. č. 8.

Anestésie MS 222, hřebíčkovým olejem, 2-phenoxyethanolem a Propiscinem neměla signifikantní vliv na hematologické ukazatele (RBC, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC a WBC) parmy obecné.

Tab. č. 8. Vliv anestetik MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na hematologické ukazatele parmy obecné.

Ukazatel	Kontrola	MS 222 (10 min)	MS 222 (24h)	Hřebíčkový olej (10 min)	Hřebíčkový olej (24h)	2-phenoxyethanol (10 min)	2-phenoxyethanol (24h)	Propiscin (10 min)	Propiscin (24h)
RBC (T·l ⁻¹)	1,30 ± 0,32	1,44 ± 0,36	1,26 ± 0,10	1,33 ± 0,20	1,22 ± 0,12	1,35 ± 0,17	1,25 ± 0,15	1,36 ± 0,17	1,28 ± 0,10
Hb (g·l ⁻¹)	53,19 ± 15,72	68,79 ± 17,05	35,94 ± 7,41	64,19 ± 6,31	41,82 ± 10,62	60,77 ± 5,01	39,39 ± 10,59	67,20 ± 7,26	45,49 ± 13,07
PCV (l·l ⁻¹)	0,31 ± 0,10	0,43 ± 0,13	0,20 ± 0,04	0,36 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,26 ± 0,04
MCV (fl)	259,73 ± 117,87	325,42 ± 138,31	156,71 ± 38,92	278,09 ± 41,49	185,31 ± 54,41	251,99 ± 44,65	178,88 ± 38,19	279,34 ± 33,26	202,37 ± 47,11
MCH (pg)	46,08 ± 24,29	51,44 ± 18,42	28,71 ± 7,01	49,01 ± 5,58	34,82 ± 10,96	45,86 ± 6,37	32,04 ± 9,73	50,48 ± 10,43	35,56 ± 9,51
MCHC (g·l ⁻¹)	185,37 ± 54,40	170,66 ± 62,18	192,80 ± 53,62	179,93 ± 34,28	197,18 ± 53,47	186,16 ± 36,79	181,74 ± 48,18	181,14 ± 31,11	188,64 ± 69,18
WBC (G·l ⁻¹)	34,00 ± 9,91	31,93 ± 7,43	30,57 ± 4,20	31,29 ± 6,88	26,86 ± 6,10	31,57 ± 6,21	33,79 ± 8,00	30,86 ± 4,52	31,14 ± 6,62

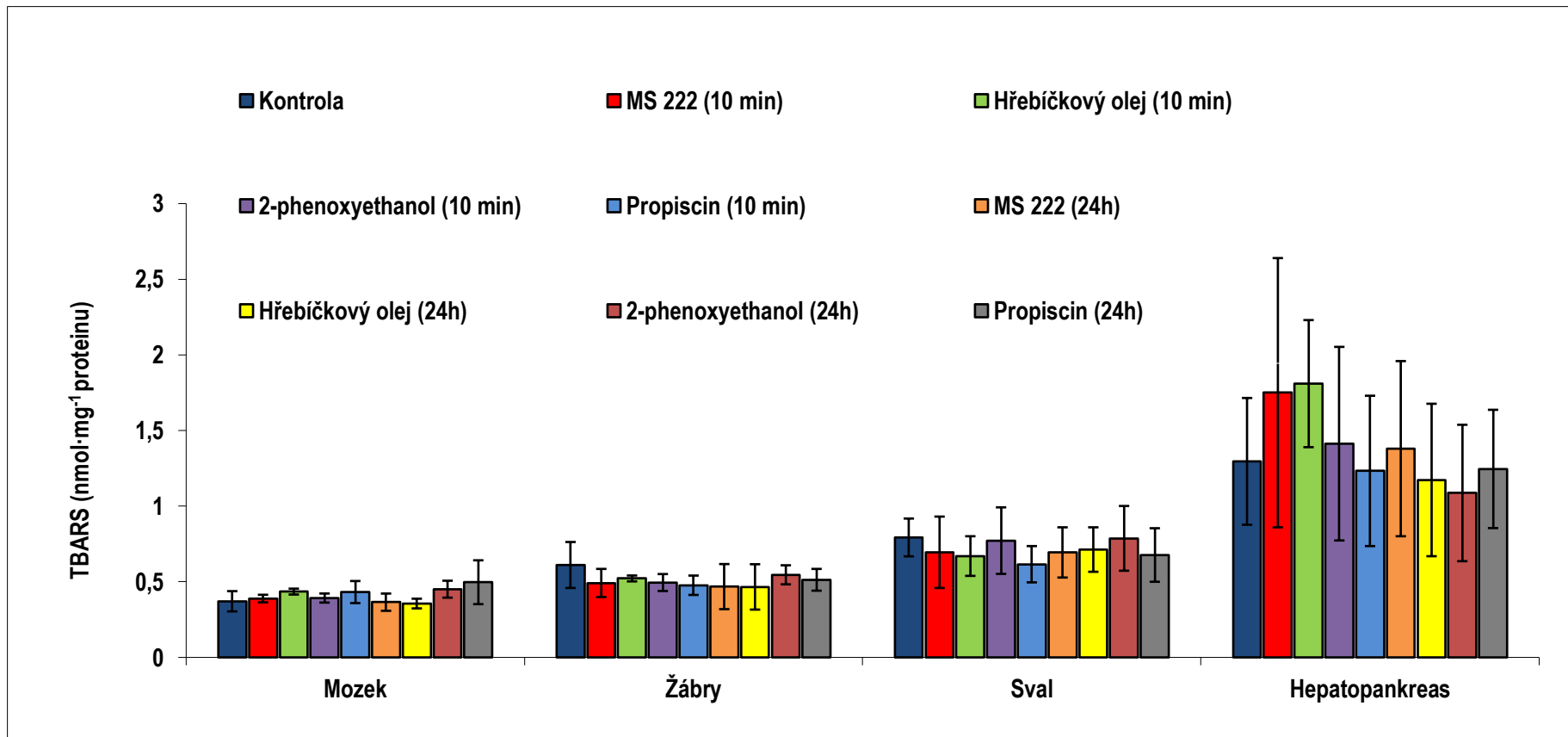
Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Hodnoty v tabulce uvádějí průměr (x) ± směrodatná odchylka (SD), $N=7$.

4.2 Biomarker oxidativního stresu

4.2.1 Lipidní peroxidace

Vliv čtyř anestetik v doporučených koncentracích pro ryby MS 222 ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), hřebíčkového oleje ($33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-phenoxyethanolu ($0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) a Propiscinu ($1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) na hladinu TBARS v tkáních (svalu, mozku, hepatopankreatu a žábrách) parmy obecné je uveden v grafu č. 3.

Testovaná anestetika (MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin) v doporučených koncentracích nezpůsobila statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v hladině TBARS v tkáních parmy obecné v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 3. Hladina TBARS v tkáních parmy obecné po anestezii MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Hodnoty v grafu uvádějí průměr (\bar{x}) \pm směrodatná odchylka (SD), $N=7$.

4.3 Antioxidační enzymy

4.3.1 Superoxiddismutáza

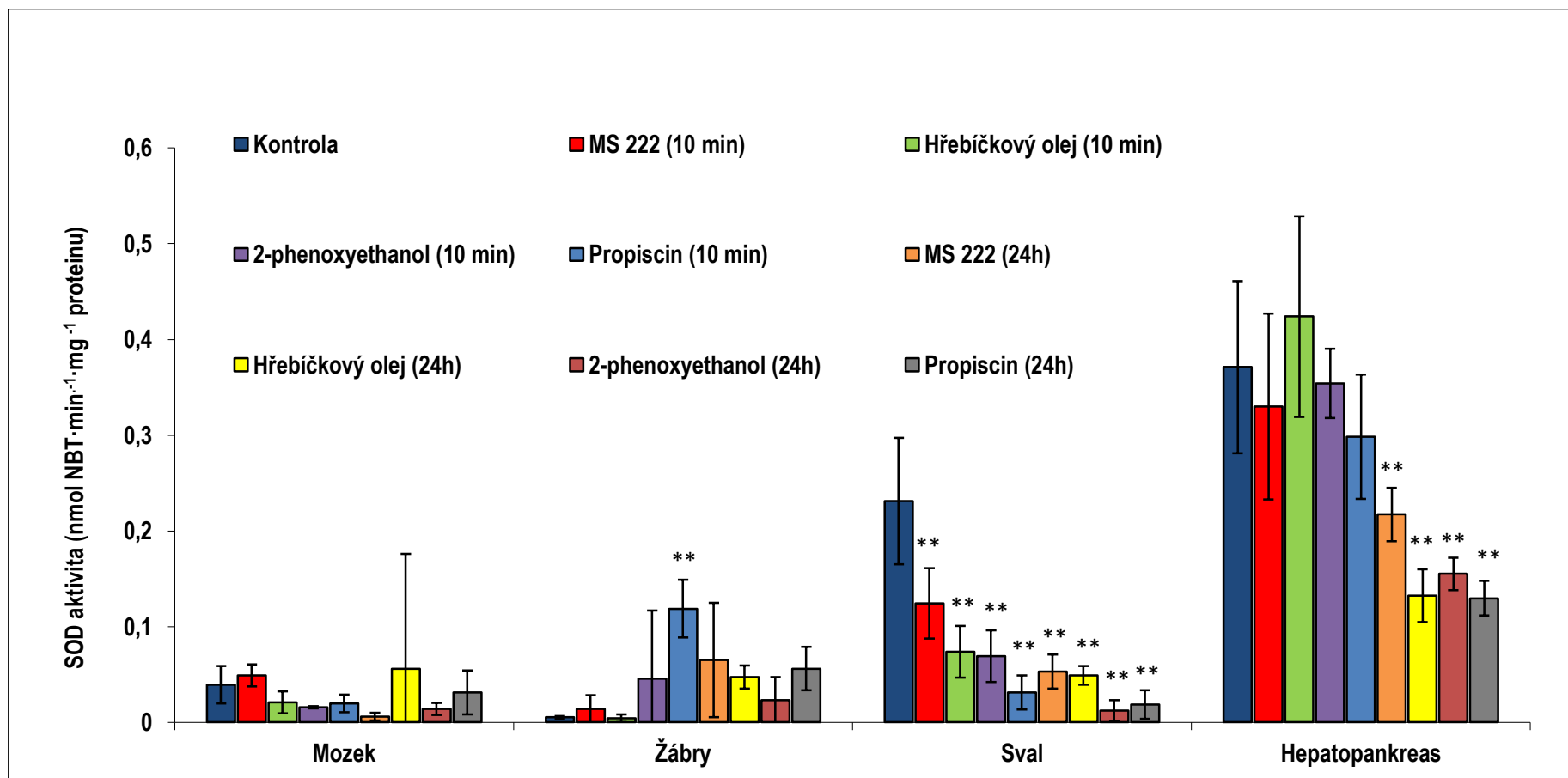
Vliv testovaných anestetik na aktivitu SOD v tkáních (svalu, mozku, hepatopankreatu a žábrách) parmy obecné je uveden v grafu č. 4.

Statisticky významné ($p < 0,01$) snížení aktivity superoxiddismutázy ve svaly parmy obecné bylo zjištěno ve všech experimentálních skupinách (po 10 minutové anestezii a i 24 hodin po anestezii všech testovaných anestetik) ve srovnání s kontrolní skupinou.

Statisticky významné ($p < 0,01$) snížení aktivity SOD v hepatopankreatu parmy obecné bylo zjištěno 24 hodin po anestezii s MS 222 (24 h), hřebíčkovým olejem (24 h), 2-phenoxyethanolem (24 h) a Propiscinem (24 h) ve srovnání s kontrolou.

V žábrách parmy obecné došlo k signifikantnímu zvýšení ($p < 0,01$) aktivity SOD ihned po 10 minutové anestezii Propiscinem (10 min) v porovnání s kontrolní skupinou.

V aktivitě SOD v mozku parmy obecné nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v experimentálních skupinách v porovnání s kontrolní skupinou.



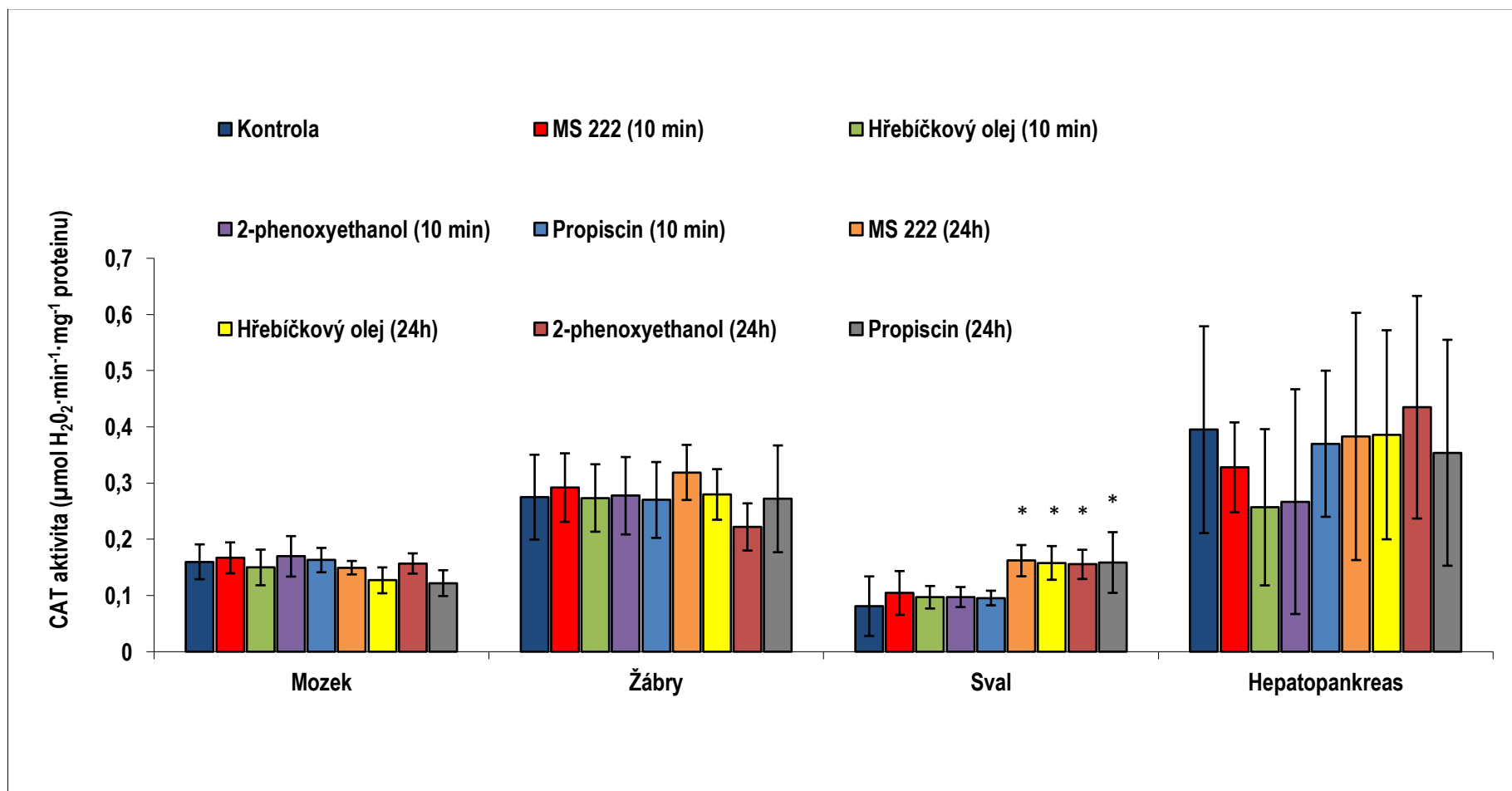
Graf č. 4. Aktivita superoxidodismutázy v tkáních parmy obecné po anestezii MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Hodnoty v grafu uvádějí průměr (\bar{x}) \pm směrodatná odchylka (SD), $N=7$.

4.3.2 Kataláza

Vliv testovaných anestetik na aktivitu katalázy v tkáních (svalu, mozku, hepatopankreatu a žábřách) parmy obecné je uveden v grafu č. 5.

Statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení aktivity katalázy ve svalu parmy obecné bylo zjištěno 24 hodin po anestezii všech testovaných anestetik MS 222 (24 h), hřebíčkového oleje (24 h), 2-phenoxyethanolu (24 h) a Propiscinu (24 h) ve srovnání s kontrolní skupinou.

V tkáních (mozek, hepatopankreas a žábry) parmy obecné nebyl zjištěn žádný statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl v aktivitě katalázy mezi experimentálními skupinami v porovnání s kontrolní skupinou.

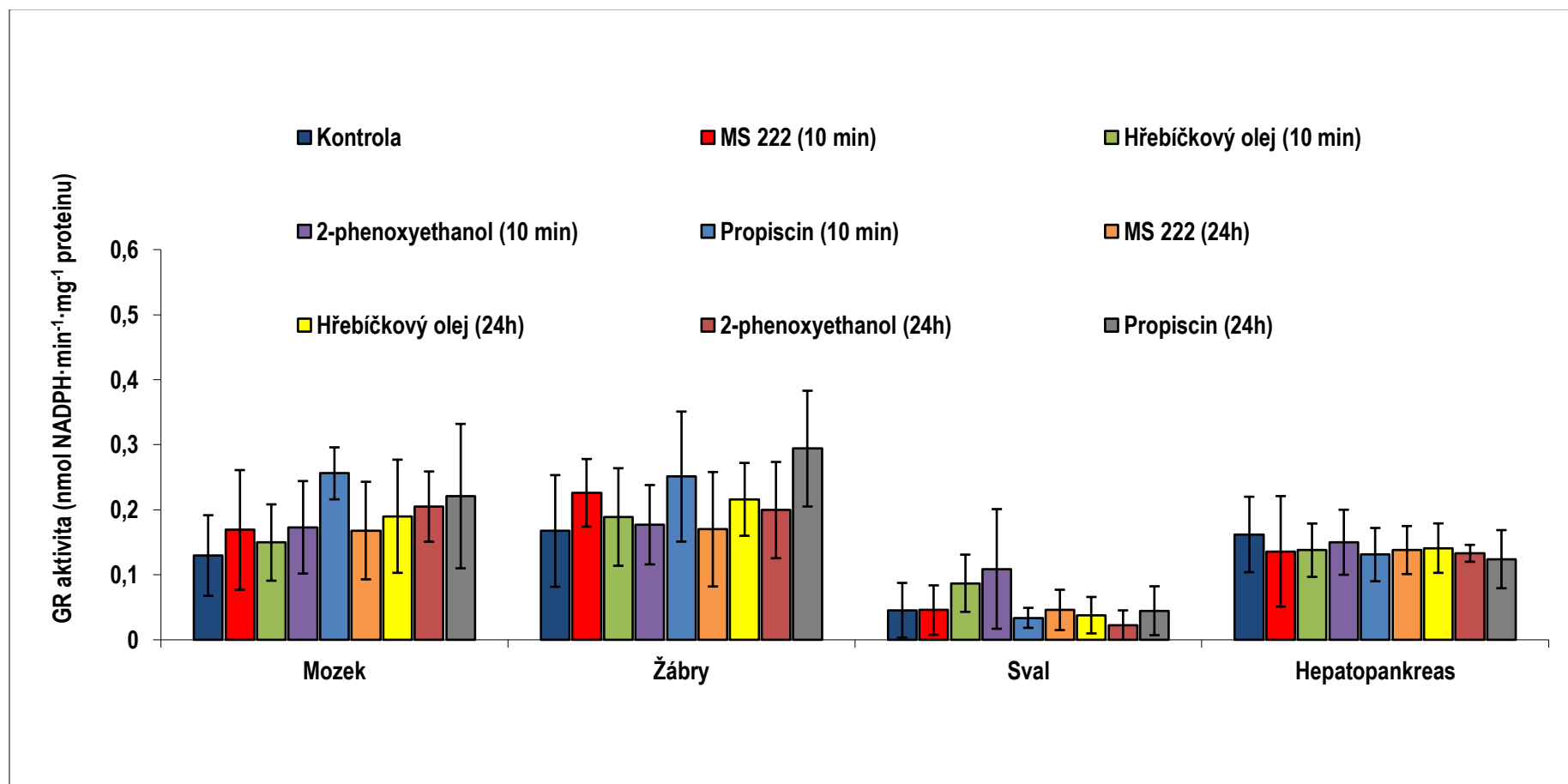


Graf č. 5. Aktivita katalázy v tkáních parmy obecné po anestezii MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Hodnoty v grafu uvádějí průměr (\bar{x}) \pm směrodatná odchylka (SD), $N=7$.

4.3.3 Glutathionreduktáza

Vliv testovaných anestetik na aktivitu glutathionreduktázy v tkáních (svalu, mozku, hepatopankreatu a žábrách) parmy obecné je uveden v grafu č. 6.

Testovaná anestetika (MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin) neměla statisticky významný ($p < 0,05$) vliv na aktivitu GR v mozku, žábrách, svalu a hepatopankreatu parmy obecné ve srovnání s kontrolou.



Graf č. 6. Aktivita glutathionreduktázy v tkáních parymy obecné po anestezii MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Hodnoty v grafu uvádějí průměr (\bar{x}) \pm směrodatná odchylka (SD), $N=7$.

5 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo vybrat vhodné a bezpečné anestetikum a posoudit jeho vliv na parmu obecnou a zároveň přispět k rozšíření poznatků o bezpečnosti čtyř nejpoužívanějších anestetik v evropské akvakultuře, tak jak požaduje zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Ve studii byla testována čtyři nejpoužívanější anestetika v evropské akvakultuře, konkrétně MS 222, hřebíčkový olej, 2-phenoxyethanol a Propiscin. Vliv anestetik byl posuzován pomocí hematologického profilu, biomarkeru oxidačního stresu a antioxidačních enzymů.

Výsledky této studie mohou být do budoucna využity při výběru vhodného anestetika pro umělý výtěr parmy obecné, jejíž výskyt ve volných vodách zaznamenává stále klesající trend (RybSvaz, 2017a, b).

5.1 Vliv anestetik na hematologický profil krve ryb

Hematologický profil krve má významnou vypovídací schopnost o stavu vnitřního prostředí organismu (Masopust, 2000). V současné době nejsou k dispozici žádné literární údaje o vlivu anestetik na hematologický profil parmy obecné. V této práci nebyl prokázán vliv anestetik (MS 222, Propiscin, 2-phenoxyethanol a hřebíčkový olej) na hematologický profil tohoto druhu. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že testovaná anestetika neovlivnila hematopoetickou tkáň parmy obecné. Výsledky této studie jsou v souladu s výsledky dalších autorů, kteří také neprokázali vliv anestetik (MS 222, Propiscin, 2-phenoxyethanol a hřebíčkový olej) na hematologický profil kapra obecného, *Cyprinus carpio* (Velíšek a kol., 2005b), podoustve říční, *Vimba vimba* (Lepič a kol., 2014) a mníka jednovousého, *Lota lota* (Svačina a kol., 2016). Tort a kol. (2002) nezjistil vliv 2-phenoxyethanolu v koncentraci $0,50 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ na hematologický profil pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

Naproti tomu některé studie popisují změny hematologického profilu krve ryb po anestezii. Například studií Velíšek a kol. (2006) popisuje snížení hodnoty MCHC a procentualního zastoupení lymfocytů u sumce velkého (*Silurus glanis*) ihned

po 10 minutové anestezii hřebíčkovým olejem v dávce $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Adámek a kol. (1993) popisuje zvýšení počtu červených krvinek a koncentrace hemoglobinu u kapra obecného ihned po anestezii 2-phenoxyethanolem v koncentraci $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$. Zvýšení těchto hodnot u kapra po anestezii 2-phenoxyethanolem v koncentracích $0,15$ a $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ popisují i Witeska a kol. (2015). U kapra obecného způsobila anestezie 2-phenoxyethanolem v koncentraci $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ signifikantní zvýšení hodnoty hematokritu a počtu monocytů ihned po anestezii. Tyto hodnoty se však během 24 hodin vrátily zpět do fyziologických hodnot (Velíšek a kol., 2007). Změny v hematologickém profilu (snížení RBC, zvýšení hodnot MCV a MCH) jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) po anestezii hřebíčkovým olejem ($75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) popisuje Gomulka a kol. (2008). Phuong a kol. (2017) zjistili zvýšení hodnoty PCV a snížení pH u pangase spodnookého (*Pangasianodon hypophthalmus*) po anestezii MS 222 v koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hoseini a Ghelichpour (2012) popisuje změny v hematologickém profilu (snížení hodnoty MCV a zvýšení hodnot RBC, Hb, PCV, MCH, MCHC) u vyzy velké (*Huso huso*) po anestezii hřebíčkovým olejem v koncentraci 300 a $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Změny hematologických parametrů v těchto studiích dokladují stres, který u ryb vyvolala anestezie.

5.2 Vliv anestetik na oxidativní stres a aktivitu antioxidantních enzymů

5.2.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres, jako projevem toxicity některých xenobiotik vyskytujících se v životním prostředí, může způsobit oxidativní poškození vodních organismů. Toto oxidativní poškození může být velice často příčinou poškození zdravotního stavu ryb. Vliv látek na organismus je právě možné posuzovat metodou tzv. oxidativního stresu a s ním souvisejících pojmů (volné radikály, biomarkery, antioxidantní enzymy apod.) (Hofmanová a kol., 2000; Livingstone, 2001; Racek, 2003, Lushchak, 2011).

Oxidativní stres je vyvoláván volnými radikály (hlavně tzv. reaktivními formami kyslíku), které vznikají po působení xenobiotik např. pesticidy, různé chemické přípravky, léčiva (také anestetika) atd. Aktivita a působení volných radikálů

je ovlivněno tzv. antioxidanty. Tyto antioxidanty mají mnoho způsobů dělení, přesto se hlavně používá dělení na neenzymatické (např. vitamíny) a enzymatické (SOD, CAT a GR) antioxidanty. Antioxidanty utvářejí mezi sebou vzájemné vazby, a proto je celková antioxidační aktivita organismu proti volným radikálům výsledkem vzájemné spolupráce antioxidantů (Racek, 2003; van der Oost a kol., 2003; Lushchak, 2011).

Testovaná anestetika (MS 222, 2-phenoxyethanol, hřebíčkový olej a Propiscin) nezpůsobila statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v hladině TBARS, resp. v markeru oxidace lipidů, v tkáních parmy obecné v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu Velišek a kol. (2011) popisuje zvýšení hladiny TBARS v mozku, svalu, játrech a střevu pstruha duhového 24 hodin po anestezii MS 222, hřebíčkovým olejem, 2-phenoxyethanolem a Propiscinem. Dále tito autoři zjistili i zvýšení hodnoty TBARS v žaberním aparátu pstruha duhového 24 hodin po anestezii hřebíčkovým olejem. Zvýšení hodnoty TBARS v játrech anténovky nejpodivnější (*Rhamdia quelen*) po anestezii MS 222 v koncentraci $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ popisují i Gressler a kol. (2015). Zvýšení hodnot TBARS v těchto dvou studiích znamená zvýšení tvorby ROS v tkáních a ukazuje na oxidativní poškození tkání ryb po anestezii.

5.2.2 Aktivita antioxidačních enzymů

Superoxiddismutáza a kataláza jsou hlavní enzymy při odstraňování reaktivních kyslíkových látek, které vznikají při bioaktivaci cizorodých látek v tkáních (SK a Bhattacharya, 2006) a indukované SOD a CAT systémy poskytují první linii obrany proti reaktivním kyslíkovým radikálům (Racek, 2003). Superoxiddismutáza je enzym, který se účastní jako jeden z prvních enzymů boje proti volným radikálům (Racek, 2003). Zhang a kol. (2004) uvádí, že superoxiddismutáza je antioxidační enzym důležitý při inhibici kyslíkových radikálů a je používán jako biomarker pro indikaci oxidativního stresu. Jeho činností je přeměňován superoxidový radikál na peroxid vodíku (Štípek a kol., 2000; Racek, 2003). V této studii bylo zjištěno statisticky významné ($p < 0,01$) snížení aktivity superoxiddismutázy ve svalu parmy obecné ihned a 24 hodin po anestezii všech testovaných anestetik a snížení aktivity SOD v hepatopankreatu parmy 24 hodin po anestezii všech anestetik v porovnání s kontrolou. Navíc v žaberním aparátu bylo zjištěno statisticky významné ($p < 0,01$) zvýšení aktivity SOD ihned po 10 minutové anestezii Propiscinem (10 min) v porovnání s kontrolní

skupinou. V aktivitě SOD v mozku parmy obecné nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v experimentálních skupinách. Změny aktivity SOD v tkáních můžou být v důsledku zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku nebo v důsledku přímého poškození struktury proteinu parmy obecné. Naproti tomu ve studii Velíšek a kol. (2011), nebyl zjištěn vliv anestetik (MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu) na aktivitu SOD v žaberním aparátu, játrech, střevu a svalu pstruha duhového, ale tito autoři zjistili snížení aktivity SOD v mozku pstruha duhového ihned a 24 hodin po anestezii. Tyto rozdílné výsledky oproti mým mohou být dány rozdílným druhem ryby a teplotou vody, při níž byla provedena anestezie.

Kataláza se převážně nachází v peroxizomech a je zodpovědná za redukci peroxidu vodíku vzniklého z metabolismu mastných kyselin s dlouhým řetězcem v peroxizomech (Sheikh a kol., 1998). V této studii došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení aktivity CAT ve svalu parmy obecné 24 hodin po anestezii všemi testovanými anestetiky. V ostatních tkáních (mozek, žábry, hepatopankreas) parmy obecné nebyly zjištěny změny aktivity CAT po anestezii testovanými anestetiky. Změna aktivity CAT ve svalu může být v důsledku zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku nebo v důsledku přímého poškození struktury proteinu parmy obecné. Naproti tomu Gressler a kol. (2015) uvádějí zvýšení aktivity CAT v játrech anténovky nejpodivnější (*Rhamdia quelen*) po anestezii MS 222 v koncentracích 150 a 300 mg·l⁻¹.

Glutathionreduktáza je enzym, který katalyzuje přeměnu H₂O₂, přičemž umožňuje oxidaci glutathionu (GSH) (Racek, 2003). Cardoso a kol. (1998) uvádí, že mezi hlavní úkoly glutathionu patří ochrana bílkovin, které jsou tvořeny (-SH) skupinami. Dále se glutathion uplatňuje například při destrukci lipidových hydroperoxidů (van der Oost a kol., 2003). V této studii nedošlo ke statisticky významné změně aktivity GR ve tkáních parmy obecné po anestezii testovanými anestetiky. Naproti tomu Velíšek a kol. (2011) popisuje snížení aktivity GR v mozku a žábrech pstruha duhového ihned a 24 hodin po anestezii MS 222, hřebíčkovým olejem, 2-phenoxyethanolem a Propiscinem. Dále tito autoři zjistili zvýšení aktivity GR ve svalu pstruha duhového 24 hodin po anestezii.

Výsledky dále ukazují, že antioxidační systémy parmy jsou silně alternovány anestetikem Propiscin, a jen nepatrně alternovány anestetiky MS 222, hřebíčkovým olejem a 2-phenoxyethanolem.

6 Závěr

V této práci byl posuzován vliv čtyř nejpoužívanějších anestetik (MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu) na hematologický profil, biomarkery oxidativního stresu a antioxidační enzymy parmy obecné. Testované ryby byly podrobeny 10 minutové anestezii v doporučených koncentracích pro anestezii ryb, konkrétně MS 222 ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), hřebíčkový olej ($33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-phenoxyethanol ($0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) a Propiscin ($1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$). Vliv anestetik byl hodnocen ihned po desetiminutové anestezii a 24 hodin po anestezii.

Testovaná anestetika nezpůsobila poškození hematopoetické tkáně a nezpůsobila statisticky významné rozdíly v hladině TBARS v tkáních parmy obecné v porovnání s kontrolou. Výsledky dále ukazují, že antioxidační systémy parmy jsou silně alternovány anestetikem Propiscin, a jen nepatrně alternovány anestetiky MS 222, hřebíčkovým olejem a 2-phenoxyethanolem.

Na základě výsledků této studie, lze doporučit pro anestezii parmy obecné anestetika hřebíčkový olej a 2-phenoxyethanol jako alternativu náhrady za anestetikum MS 222. Nicméně, konečná volba anestetika musí vždy zohlednit několik skutečností, a to právní předpisy, dostupnost anestetika, účinnost anestetika, snadnost použití, bezpečnost pro ryby a bezpečnost pro uživatele a životní prostředí.

Tato studie přináší nové poznatky o bezpečnosti používaných anestetik v akvakultuře, kde anestetika plní významnou roli při mnoha manipulacích s rybami, např. výtěr, veterinární vyšetření, odběry vzorků atd.

7 Přehled použité literatury

- Adámek, Z., Obrdlík, P., 1977. Food of important cyprinid species in warmed barb – zone of the Oslava river. *Folia Zool.* 26, 171-182.
- Adámek, Z., Fašaic, K., Paul, A., Lamašic, M., 1993. The effect of 2-phenoxyethanol narcosis on blood parameters of young carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Arch.* 63, 245-250.
- Adámek, Z., Andreska, J., Dubský, K., Edelmann, Z., Hanel, L., Hanzély, P., Hartvich, P., Kepr, T., Křivanec, K., Kučera, M., Lusk, S., Navrátilová, J., Tomi, P., Tychler, M., Stupka, P., Vostradovský, J., 2012. *Rybářství a rybolov. Český rybářský svaz, Praha, 376 s.*
- Adámek, Z., Dubský, K., Jarolímková, B., Just, T., Kolářová, J., Lusk, S., Navrátil, S., Nusl, P., Svobodová, Z., Šíma, A., Štípek, J., Vančura, Z., Vrána, K., 2015. *Příručka pro rybářské hospodáře. Český rybářský svaz, z.s., Praha, 512 s.*
- Aebi, H., 1984. Catalase *In vitro*. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 459-469.
- Amend, D.F., Goven, B.A., Elliot, D.G., 1982. Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111, 337-341.
- Amira, A., Adly, M., 2010. Oxidative stress and Disease: An Updated Review. *Res. J. Immunol.* 3, 129-145.
- Babior, B.M., 1997. Superoxide: a two – edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 141-155.
- Ballantyne, B., Marrs, T.C., Syversen, T., 1999. *General and Applied Toxicology. Vol. 2, part 2, MacMillan, London, pp. 1 842-1 897.*
- Bănărescu, P.M., Bogutskaya, N.G., Movchan, Y.V., Smirnov, A.I., 2003. *Barbus barbus* (Linnaeus, 1758). In: Bănărescu, P.M., Bogutskaya, N.G. (Eds.), *The Freshwater Fishes of Europe, vol. 5/II, Cyprinidae 2, Part II: Barbus. AULA – Verlag, Wiesbaden, 454 pp.*
- Barton, B.A., Helfrich, H., 1981. Time-dose responses of juvenile rainbow trout to 2-phenoxyethanol. *Prog. Fish-Culturist.* 43, 223-223.
- Baruš, V., Černý, K., Gajdůšek, J., Hensel, K., Holčík, J., Kálal, L., Krupauer, V., Kux, Z., Libosvářský, J., Lom, J., Lusk, S., Moravec, F., Oliva, O., Peňáz, M., Pivnička, K., Prokeš, M., Ráb, P., Špinar, Z., Švátora, M., Vostradovský, J., 1995a. Mihulovci (*Petromyzontes*) a ryby (*Osteichthyes*) (1). *Academia, Praha, 623 s.*
- Baruš, V., Černý, K., Gajdůšek, J., Hensel, K., Holčík, J., Kálal, L., Krupauer, V., Kux, Z., Libosvářský, J., Lom, J., Lusk, S., Moravec, F., Oliva, O., Peňáz, M., Pivnička, K., Prokeš,

- M., Ráb, P., Špinar, Z., Švátora, M., Vostradovský, J., 1995b. Mihulovci (*Petromyzontes*) a ryby (*Osteichthyes*) (2). Academia, Praha, 698 s.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- Bell, G.R., 1964. A guide to properties, characteristics, and uses of some general anaesthetics for fish. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 148, 1-4.
- Berrebi, P., Kottelat, M., Skeleton, P., Ráb, P., 1996. Systematics of *Barbus*: state of the art and heuristic comments. *Folia Zool.* 45 (Suppl. 1), 5-12.
- BioLib (Biological Library, Praha), 2017. Parma obecná (*Barbus barbus* Linnaeus, 1758). [cit. 2017-2-11]. Dostupné na: <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id15597/>>.
- Boelsterli, U.A., 2003. Mechanistic toxicology. Taylor and Francis, London, 314 pp.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Briozzo, J.L., Chirife, J., Herzage, L., D'Aquino, M., 1989. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 69-75.
- Brown, E.A.B., Franklin, J.E., Pratt, E., Trams, E.G., 1972. Contributions to the pharmacology of quinaldine (uptake and distribution in the shark and comparative studies). *Comp. Biochem. Physiol.* 42, 223-231.
- Brown, L.A., 1988. Tropical fish medicine. Anesthesia in fish. *Vet. Clin. N. Am-Small.* 18, 317-330.
- Brožová, V., Svobodová, Z., 1986. Anestetika pro ryby (přehled). *Bulletin VÚRH JU Vodňany.* 22, 36-40.
- Burýšková, B., Hilscherová, K., Babica, P., Vršková, D., Maršálek, B., Bláha, L., 2006. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. *Aquat. Toxicol.* 80, 346-354.
- Cardoso, S.M., Pereira, C., Oliveira, C.R., 1998. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 703-710.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from Rat-Liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5 475-5 480.
- Cowx, I.G., Broughton, N.M., 1986. Changes in the species composition of anglers catches in the River Trent (England) between 1969 and 1984. *J. Fish. Biol.* 28, 625-636.
- Čítek, J., Svobodová, Z., Tesarčík, J., 1997. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. Informatorium spol., s.r.o., Praha, 218 s.
- De Leeuw, J.J., Winter, H.V., 2008. Migration of rheophilic fish in the large lowland rivers Meuse and Rhine, the Netherlands. *Fisheries Manag. Ecol.* 15, 409-415.

- DeLeo, F.R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P., Nauseef, W.M., 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* 101, 455-463.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium, spol. s.r.o., Praha, 308 s.
- Đuračková, Z., 1977. Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klin. Biochem. Metab.* 5, 227-231.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 8, 232-243.
- Ferreira, J.T., Schoonbee, H.J., Smith, G.L., 1984. The uptake of the anaesthetic benzocaine-hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species. *J. Fish Biol.* 25, 35-41.
- Fiala, J., Spurný, P., 2001. Intensive rearing of the common barbel (*Barbus barbus* L.) larvae using dry starter feeds and natural diet under controlled conditions. *Czech J. Anim. Sci.* 7, 320-326.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7 719-7 730.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. Genetika a šlechtění ryb (monografie VÚRH JU, Vodňany). In: Policar, T., Drozd, B., Kouřil, J., Hamáčková, J., Alavi, S.M.H., Vavrečka, A., Kozák, P., 2009. Současný stav, umělá reprodukce a odchov násadového materiálu parmy obecné (*Barbus barbus* L.). Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 95, 43 s.
- Gilderhus, P. A., Marking, L. L., 1987. Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. *North Am. J. Fish Manage.* 7, 288-292.
- Gomulka, P., Wlasow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., Chmielinska, E., 2008. Effects of Eugenol and MS-222 Anaesthesia on Siberian Sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt. *Acta Vet. Brno* 77, 447-453.
- Gomulka, P., Fornal, E., Berecka, B., Szmagara, A., Ziomek, E., 2015. Pharmacokinetics of propofol in rainbow trout following bath exposure. *Pol. J. Vet. Sci.* 18, 147-152.
- Gressler, L.T., Sutili, F.J., Teixeira da Costa, S., Parodi, T.V., da Silva Pes, T., Koakoski, G., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto, B., 2015. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 463-472.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 888 pp.

- Hamáčková, J., Lepičová, A., Kozák, P., Stupka, Z., Kouřil, J., Lepič, P., 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature. *Vet. Med-Czech.* 49, 467-472.
- Hanel, L., 2001. Naše ryby a rybaření. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha, 288 s.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky: Rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody Vlašim, Vlašim, 448 s.
- Hartman, P., Příkryl, I., Štědranský, E., 2005. Hydrobiologie. Informatorium, spol. s.r.o., Praha, 359 s.
- Heinecke, J.W., Shapiro, B.M., 1989. Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, 1 259-1 263.
- Hofmanová, J., Machala, M., Kozubík, A., 2000. Epigenetic mechanisms of the carcinogenic effects of xenobiotics and in vitro methods of their detection. *Folia Biol.* 46, 165-173.
- Hochman, L., 1955. Příspěvek k poznání růstu a potravy parmy obecné (*Barbus barbus* L.) v řece Svatce. *Sborník VŠZL, Brno. Řada A 2*, 147-159.
- Hochman, L., 1963. Zkusme získat vlastní plůdek parmy. *Českosl. Ryb.* 2, 23-24.
- Hochman, L., 1965. K významu plodnosti v populační dynamice ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus* L.), jelce tlouště (*Leuciscus cephalus* L.) a parmy obecné (*Barbus barbus* L.) v podmínkách řeky Oslavy. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.* A3, 487-502.
- Holčík, J., Mihálik, J., 1971. Sladkovodní ryby. *Artia, Praha*, 134 s.
- Hoseini, S.M., Ghelichpour, M., 2012. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). *Fish Physiol. Biochem.* 38, 493-498.
- Houston, A.H., Woods, J.R., 1976. Influence of temperature upon tricaine methane sulphonate uptake and induction of anaesthesia in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54, 1-6.
- Hseu, J.R., Yeh, S.L., Chu, Y.T., Ting, Y.Y., 1997. Different anesthetic effect of 2-phenoxyethanol on four species of Teleost. *J. Fish. Soc. Taiwan* 24, 185-191.
- Hseu, J.R., Yeh, S.L., Chu, Y.T., Ting, Y.Y., 1998. Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream (*Sparus sabra*). *J. Taiwan. Fish. Res.* 9, 11-18.
- Hugla, J.L., Thomé, J.P., 1999. Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbel. *Ecotox. Environ. Safe.* 42, 265-273.
- Hunn, J.B., Allen, J.L., 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Ann. Rev. Pharm.* 14, 47-55.
- Isaacs, G., 1983. Permanent local anaesthesia and anhydrosis after clove oil spillage. *Lancet* 1, 882-883.

- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221, 549-566.
- Kazuń, K., Siwicki, A.K., 2012. Propiscin – a safe new anaesthetic for fish. *Arch. Pol. Fish.* 20, 173-177.
- Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 29, 89-101.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2006. Testování veterinárních léčivých přípravků pro ryby podle norem EU. *Veterinářství* 56, 31-34.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2012. Anestetika pro ryby (aktualizované vydání z roku 2007). *Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 77, 25 s.*
- Kotlík, P., Bogutskaya, N.G., Ekmekci, F.G., 2004. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Mol. Ecol.* 13, 87-95.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes.* Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlín, 646 pp.
- Kouřil, J., Stupka, Z., Hamáčková, J., Lepičová, A., 2001. Předběžné výsledky účinku třech anestetik u různých druhů ryb. In: Kolářová, J., (Ed.), *Ochrana zdraví ryb. VÚRH JU Vodňany, s. 131-136.*
- Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, R., O'Brien, P.J., 2005. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 5, 2 601-2 623.
- Krupka, I., 1987. Umělý výtěr a odchov plůdku parmy. *Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 23, 13 s.*
- Lefler, K.K., Hegyi, A., Baska, F., Gal, J., Horvath, A., Urbanyi, B., Szabo, T., 2008. Comparison of ovarian cycles of Hungarian riverine fish species representing different spawning strategies. *Czech J. Anim. Sci.* 53, 441-452.
- Lelek, A., 1987. Threatened fishes of Europe. *The freshwater fishes of Europe, Volume 9, AULA – Verlag, Wiesbaden, 343 pp.*
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, 2 477-2 485.
- Lepič, P., Stará, A., Turek, J., Kozák, P., Velíšek, J., 2014. The effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in vimba bream, *Vimba vimba*. *Vet. Med.* 59, 81-87.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J.S.H., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes

- of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.* 42, 85-89.
- Livingstone, D., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husák, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1 670-1 680.
- Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Phys. C.* 153, 175-190.
- Lusk, S., 1996. Development and status of populations of *Barbus* in the waters of the Czech Republic. *Folia Zool.* 45 (Suppl. 1), 39-46.
- Lusk, S., Hanel, L., Lusková, L., Lojkásek, B., Hartvich, P., 2006. Červený seznam mihulí a ryb České republiky – verze 2005. In: Lusk, S., Lusková, V. (Eds.), 2006. Biodiverzita ichtyofauny ČR (VI), Brno, s. 7-16.
- Lusk, S., Hartvich, P., Lojkásek, B., 2014. Migrace ryb a migrační prostupnost vodních toků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 254 s.
- Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries. *Fisheries* 10, 2-5.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
- Maršić-Lučić, J., Mladineo, I., Tudor, M., 2005. Comparative effectiveness of 2-phenoxyethanol and Propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquacult. Int.* 13, 543-553.
- Masopust, J., 2000. *Klinická biochemie*. Karolinum, Praha, 832 s.
- Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Falceto, M.V., Esteban, J., Josa, A., Espinosa, E., 2014. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile, Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture* 433, 491-495.
- Morton, W.E., 1990. Occupational phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases. *J. Occup. Med.* 32, 42-45.
- Munday, P. L., Wilson, S. K., 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish. Biol.* 51, 931-938.
- Ozturk-Urek, R., Tarhan, L., 2001. The purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comp. Biochem. Phys.* 128, 205-212.

- Peňáz, M., 1973. Embryonic development of the barb, *Barbus barbatus* (Linnaeus, 1758). *Folia Zool.* 22, 363-374.
- Peňáz, M., 1977. Population analysis of the barb, *Barbus barbatus*, from some Moravian rivers (Czechoslovakia). *Acta Sci. Nat. Aca. Sci. Bohemoslavacae Brno* 11, 1-30.
- Peňáz, M., Baruš, V., Prokeš, M., Svobodová, Z., 2002. Změny některých atributů populace parmy obecné v řece Jihlavě během posledních 25 let a jejich příčiny. In: Spurný, P. (Ed.), 2002. Česká ichtyologická konference, MZLU, Brno, s. 5-10.
- Peňáz, M., Pivnička, K., Baruš, V., Prokeš, M., 2003. Temporal changes in the abundance of barbel, *Barbus barbatus* in the Jihlava River, Czech Republic. *Folia Zool.* 52, 441-448.
- Phuong, L.M., Damsgaard, C., Huong, D.T.T., Ishimatsu, A., Wang, T., Bayley, M., 2017. Recovery of blood gases and haematological parameters upon anaesthesia with benzocaine, MS-222 or Aqui-S in the air-breathing catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Ichthyolog. Res.* 64, 84-92.
- Pirhonen, J., Schreck, C.B., 2003. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 220, 507-514.
- Pivnička, K., 1994. The abundance, biomass and yield of fish in the Labe and Danube Basins – a comparison with the other waters. *Acta Univ. Carolinae Environ.* 6, 39-61.
- Pivnička, K., Švátora, M., Křížek, J., Humpl, M., Sýkora, P., 2005. Fish assemblages in the Berounka River and its tributaries (Úhlava and Mže) in 1975 – 2004, environmental parameters, fishery statistics, and electroshockers data. *Acta Univ. Carolinae Environ.* 19, 33-90.
- Plumb, J.A., Schwedler, T.E., Limsuwan, C., 1983. Experimental anesthesia of three species of freshwater fish with etomidate. *Prog. Fish. Cult.* 45, 30-33.
- Pokorný, J., Lucký, Z., Lusk, S., Pohunek, M., Jurák, M., Štědranský, E., Prášil, O., 2004. Velký encyklopedický rybářský slovník. Nakladatelství Fraus, Plzeň, 649 s.
- Polcar, T., Drozd, B., Kouřil, J., Hamáčková, J., Alavi, S.M.H., Vavrečka, A., Kozák, P., 2009. Současný stav, umělá reprodukce a odchov násadového materiálu parmy obecné (*Barbus barbatus* L.). *Edice Metodik, FROV JU Vodňany*, č. 95, 43 s.
- Pospíšil, O., 2008. Atlas našich ryb. Ottovo nakladatelství, Praha, 198 s.
- Prokeš, M., Šovčík, P., Peňáz, M., Baruš, V., Spurný, P., 2006. Growth of barbel, *Barbus barbatus*, in the River Jihlava following major habitat alteration and estimated by two methods, reservoir and ecosystems in Czechoslovakia. *Folia Zool.* 55, 86-96.
- Racek, J., Holeček, V., 1999a. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy* 93, 774-780.
- Racek, J., Holeček, V., 1999b. Nové specifické markery lipoperoxidace – isoprostany. *Klin. Biochem. Metab.* 7, 88-91.

- Racek, J., Holeček, V., Trefil, L., 2000. Antioxidační ochrana organismu – pokus o zhodnocení významu laboratorních ukazatelů. *Lab. Diagnost.* 5, 54.
- Racek, J., 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galén, Praha. 89 s.
- Reiser, F., 1996. Ryby našich vod. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha, 144 s.
- Ross, L.G., Ross, B., 1999. Anaesthetic and Sedative techniques for aquatic animals. Institute of aquaculture University of Stirling, Stirling, pp. 58 -155.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anaesthetic and Sedative techniques for aquatic animals. Wiley-Blackwell, 240 pp.
- RybSvaz (Český rybářský svaz, z.s.), 2017a. Celková statistika úlovků parmy obecné (*Barbus barbus*) na mimopstruhových revírech ČRS v letech 1990 – 2014. [cit. 2017-2-11]. Dostupné na: https://www.rybsvaz.cz/?page=reviry%2Fstatistiky&lang=other&statistiky_typ=vse.
- RybSvaz (Český rybářský svaz, z.s.), 2017b. Celková statistika úlovků parmy obecné (*Barbus barbus*) na pstruhových revírech ČRS v letech 1990 – 2014. [cit. 2017-2-11]. Dostupné na: https://www.rybsvaz.cz/?page=reviry%2Fstatistiky&lang=other&statistiky_typ=vse
- Santos, S., Ghanawi, J., Saoud, P., 2015. Effects of water temperature and body weight on anaesthetic efficiency in marbled rabbitfish (*Siganus rivulatus*). *Aquacul. Res.* 46, 928-936.
- Sehdev, H.S., McBride, J.R., Fagerlund, U.H.M., 1963. 2-phenoxyethanol as a general anaesthetic for sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 20,1 435-1 440.
- Sheikh, F.G., Pahan, K., Khan, M., Barbosa, E., Singh, I., 1998. Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, 2 961-2 966.
- Silva, L.L., Garlet, Q., Koakoski, G., Oliveira, T., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto, B., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.M., 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 215-223.
- Siwicki, A., 1984. New anaesthetic for fish. *Aquaculture* 38, 171-176.
- Sk, U.H, Bhattacharya, S., 2006. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by a series of novel organoselenocyanates. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22, 298-302.
- Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.
- Soto, C.G., Burhanuddin, S., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 136, 149-152
- Štípek, S., a kol., 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Praha, 320 s.

- Svačina, P., Příborský, P., Blecha, M., Polícar, T., Velíšek, J., 2016. Haematological and biochemical response of burbot (*Lota lota* L.) exposed to four different anaesthetics. Czech J. Anim. Sci. 61, 414-420.
- Svoboda, M., Kolářová, J., 1999. Přehled anestetik používaných v chovech ryb. VÚRH JU, Vodňany, s. 49-72.
- Svobodová, Z., Hejtmánek, M., 1985. Total mercury content in the components of running water, reservoir and pond ecosystems in Czechoslovakia. Symp. Hung. Biol. 29, 171-178.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, č. 22, 36 s.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Vykusová, B., Wohlgemuth, E., 1987. Toxikologie vodních živočichů. SZN, Praha. 231 s.
- Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B., 1993. Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper, FAO, Rome. 59 pp.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. Informatorium, spol. s.r.o., Praha, 264 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 122, 36 s.
- Terofal, F., 2006. Sladkovodní ryby v evropských vodách. Euromedia Group, k. s. – Knižní klub, Praha, 288 s.
- Theinpoint, D., Niemegeers, C.J.E., 1965. R 7464 - a new potent anaesthetic in fish. Int. Zoo Yearbook 5, 202-205.
- Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S., Padros, F., 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. Aquacult. Res. 33, 907-910.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermuelen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2005a. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Vet. Brno 74, 139-146.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Groch, L., Nepejchalová, L., 2005b. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet. Med. 50, 269-275.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, L., Zíonek, E., 2006. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). Acta Vet. Brno 75, 99-106.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, L., 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). Vet. Med. 52, 103-110.

- Velíšek, J., Stará, A., Li, Z.H., Silovská, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profile and oxidative stress biomarkers of rainbow trout. *Aquaculture* 310, 369-375.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 600 s.
- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 197/2004 Sb. k provedení zákona č. 99/2004 Sb., o rybníkářství, výkonu rybářského práva, rybářské strážní, ochraně mořských rybolovných zdrojů a o změně některých zákonů (zákon o rybářství).
- Witeska, M., Dudyk, J., Jarkiewicz, N., 2015. Haematological effects of 2-phenoxyethanol and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Anaesth. Analg.* 42, 537-546.
- Woody, C. A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J. Fish. Biol.* 60, 340-347.
- Zahl, I.H., Samuelson, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 201-218.
- Zakes, Z., Demska-Zakes, K., 2005. Artificial spawning of pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) stimulated with human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue with a dopamine inhibitor. *Arch. Pol. Fish.* 13, 63-75.
- Zamocky, M., Furtmuller, P. G., Obinger, C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1 527-1 547.
- Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.
- Zhang, X., Shan, P., Sasidhar, M., Chupp, G.L., Flavell, R.A., Choi, A.M.K., Lee, P.J., 2003. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 28, 305-315.
- Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55, 167-174.

8 Abstrakt

Vliv anestetik na parmu obecnou

Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv čtyř nejpoužívanějších anestetik v evropské akvakultuře, a to MS 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na parmu obecnou (*Barbus barbus*). Vliv anestetik byl posuzován pomocí hematologického profilu krve, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidantních enzymů. Dílčím cílem této práce bylo přispět k rozšíření poznatků o bezpečnosti testovaných anestetik a výběr bezpečného anestetika pro parmu obecnou.

Parmy obecné byly podrobeny 10 minutové anestezii s MS 222 (v doporučené koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), hřebíčkovému oleji (v doporučené koncentraci $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-phenoxyethanolu (v doporučené koncentraci $0,4 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) a Propiscinu (v doporučené koncentraci $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$). Vliv anestetik byl hodnocen ihned po desetiminutové anestezii a 24 hodin po anestezii.

Anestezie s MS 222, hřebíčkovým olejem, 2-phenoxyethanolem a Propiscinem neměla signifikantní vliv na hematologické ukazatele, hladinu oxidativního stresu (TBARS) a aktivitu glutathionreduktázy v tkáních parmy obecné. Statisticky významné zvýšení aktivity katalázy ve svalu parmy obecné bylo zjištěno 24 hodin po anestezii všech testovaných anestetik ve srovnání s kontrolní skupinou. Změny aktivity superoxiddismutázy byly zjištěny ve všech experimentálních skupinách (po 10 minutové anestezii a i 24 hodin po anestezii).

Výsledky dále ukazují, že antioxidantní systémy parmy jsou silně alternovány anestetikem Propiscin, a jen nepatrně alternovány anestetiky MS 222, hřebíčkovým olejem a 2-phenoxyethanolem.

Na základě výsledků této studie, lze doporučit pro anestezii parmy obecné anestetika hřebíčkový olej a 2-phenoxyethanol jako alternativu náhrady za anestetikum MS 222.

Klíčová slova: anestetika, hřebíčkový olej, MS 222, 2-phenoxyethanol, Propiscin

9 Abstract

Effects of anaesthetics on barbel

The aim of this study was to assess the effects of the four most used anaesthetics in European aquaculture MS 222, clove oil, 2-phenoxyethanol and Propiscin on barbel (*Barbus barbus*). The effects of anaesthetics were assessed based on haematological profile, biomarker of oxidative stress and antioxidant enzymes. This study contributed to the expansion of knowledge on the safety of tested anaesthetics and selected safe anaesthetics for barbel.

Barbels were exposed to a 10-minute anaesthesia with MS 222 (in recommended concentration $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), clove oil (in recommended concentration $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-phenoxyethanol (in recommended concentration $0.4 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) and Propiscin (in recommended concentration $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$). The effects of anaesthetics were evaluated immediately after 10 min. anaesthesia and 24 hours after anaesthesia.

Anaesthesia with MS 222, clove oil, 2-phenoxyethanol and Propiscin had no significant effect on haematological indices, level of oxidative stress (TBARS) and activity of glutathione reductase in barbel tissues. The activity of catalase was significantly increased in the muscle 24 h after anaesthesia of all anaesthetics compared to the control. Superoxide dismutase activity was changes in all experimental groups (immediately after 10 min. anaesthesia and 24 hours after anaesthesia).

The tested anaesthetics not altered hematopoietic tissue and had not effect on the level of lipid peroxidation in barbel's tissues. The results of this study suggest that the antioxidant systems of barbel are altered by Propiscin anaesthesia, but they are slightly affected by MS 222, clove oil, and 2-phenoxyethanol anaesthesia.

On the basis of the results of this thesis, for anaesthesia of barbel we can recommend clove oil and 2-phenoxyethanol as an alternative MS 222.

Keywords: anaesthetics, clove oil, MS 222, 2-phenoxyethanol, Propiscin