

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Fakulta rybnářství a ochrany vod**  
**Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

## **Bakalářská práce**

Porovnání účinnosti a efektivity čtyř běžných anestetik  
používaných v rybnářství u mníka jednovousého (*Lota lota* L.)

**Autor :** Martin Růžek

**Vedoucí práce :** Ing. Miroslav Blecha

**Konzultant :** Ing. Jiří Křišťan, Ph.D.

**Studijní program a obor :** Zootechnika, Rybnářství

**Forma studia :** Prezenční

**Ročník studia :** III.

České Budějovice, 2016

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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

Podpis studenta

## **Poděkování**

Chtěl bych touto cestou poděkovat svému vedoucímu Ing. Miroslavu Blechovi za poskytnutou pomoc, metodické vedení, rady a cenné připomínky, které mi s ochotou poskytoval v průběhu zpracování celé balalářské práce.

Rovněž děkuji všem pracovníkům VÚRH ve Vodňanech, kteří mi umožnili vypracovat tuto práci. Zejména pak Ing. Petru Svačinovi a dr hab. Ing. Josefu Velíškovi, Ph.D., za poskytnutou pomoc v průběhu samotného experimentu.

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin RŮŽEK**

Osobní číslo: **V13B059P**

Studijní program: **B4103 Zootechnika**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Porovnání účinnosti a efektivity čtyř běžných anestetik používaných v rybářství u mníka jednovouseho (*Lota lota* L.)**

Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Mník jednovousí (*Lota lota* L.) je jediným zástupcem hrdloploutvých ryb, který se trvale vyskytuje ve sladkých vodách. I když je tento druh cirkumpolárně rozšířen, tak v některých zemích se stal ohroženým druhem nebo dokonce zcela vymizel. Zvládnutí jeho odchovu je základem předpokladem pro možnosti budoucí reintrodukce či posílení stávajících populací. Mník se však jeví i jako vhodný kandidát pro akvakulturu díky vysoké kvalitě masa a játrům bohatým na vitamíny a omega-3 mastné kyseliny. Chov mníka v kontrolovaných podmínkách se v posledních letech začal více studovat a první výsledky jsou již k dispozici.

V průběhu experimentálního a produkčního chovu je nutné ryby uspávat vhodným anestetikem z důvodu omezení stresu a usnadnění následné manipulace. Za čtyři nejběžněji používaná anestetika lze považovat hřebíčkový olej s účinnou látkou eugenol, 2-phenoxyethanol a MS-222 (Tricaine mehanesulofante) a Propiscin.

Cílem této práce bude porovnat účinnost a následný efekt těchto anestetik na mníka jednovouseho pomocí hematologických a biochemických ukazatelů a zaznamenat časy jednotlivých fází anestéze.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 50 stran**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

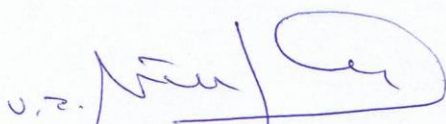
- Stapanian, M. A., Paragamian, V. L., Madenijan, C. P., Jackson, J. R., Lappalainen, J., Evenson, M. J., Neufeld, M. D., 2010. Worldwide status of burbot and conservation measures, *Fish and Fisheries* 11 (1), 34-56 s.
- Mcphail, J. D., Paragamian, V. L., 2000. Burbot biology and life history. In: *Burbot: Biology, Ecology, and Management* (eds V. L. Paragamian and D. W. Willis), American Fisheries Society, Fisheries Management Section, Publication Nr. 1, 11-23 s.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Acta Veterinaria Brno*, 74 (1), 139-146 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 (2), 81-87 s.
- Marking, L. L., Meyer, F. P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10 (6), 2-5 s.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miroslav Blecha**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

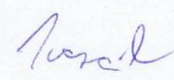
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jiří Křišťan, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **22. ledna 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **6. května 2016**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

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

  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 4. února 2016

## **OBSAH**

1. ÚVOD .....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
2.1. Pojem anestezie a využití anestetik v chovech ryb .....	9
2.2. Druhy anestetických přípravků používaných v akvakultuře.....	10
2.2.1. Použití anestetik u mníka jednovousého.....	13
2.3. Způsoby použití anestetických přípravků .....	14
2.3.1. Anestetická koupel.....	14
2.3.2. Sprejování žaber .....	14
2.3.3. Hypotermie .....	15
2.4. Popis jednotlivých fází anestezie a zotavení z anestezie .....	15
2.4.1. Anestetická fáze .....	15
2.4.2. Zotavení z anestezie.....	16
2.5. Hodnocení vedlejších účinků anestezie .....	17
2.5.1. Biomarkery oxidativního stresu.....	17
2.5.2. Hematologický profil krve.....	17
2.5.3. Biochemický profil krve .....	18
2.6. Mník jednovousý .....	21
2.6.1. Systematické zařazení, biologie a popis .....	21
2.6.1.1. Systematické zařazení.....	21
2.6.1.2. Biologie a popis mníka .....	22
2.6.2. Důvody optimalizace chovu mníka jednovousého .....	24
3. MATERIÁL A METODIKA.....	25
3.1. Použité ryby a experimentální podmínky .....	25
3.2. Druhy použitých anestetik a rozdělení ryb do skupin.....	25
3.3. Odběr krve .....	27
3.4. Vyhodnocení hematologických ukazatelů .....	28
3.4.1. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu.....	28
3.4.2. Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu .....	31
3.5. Vyhodnocení biochemických ukazatelů .....	31
3.6. Statistické vyhodnocení dat .....	32
4. VÝSLEDKY .....	33
4.1. Hematologický profil krve.....	33

4.2. Biochemický profil krve .....	35
5. DISKUZE .....	38
6. ZÁVĚR .....	42
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	43
8. Abstrakt.....	51
9. Abstract.....	52

## 1. ÚVOD

Anestetika jsou látky, které navozují stav nazývaný anestezie neboli umělý spánek (Kolářová a kol., 2007). Hlavní význam anestetik spočívá v omezení stresu, který nastává během manipulace (ryba snáší lépe manipulaci v umělém spánku). Použití anestezie také usnadňuje obsluhu práci a je tak vhodnou prevencí před potenciálním zraněním ryby. V intenzivních chovech ryb jsou uplatňována především při umělých výtěrech, biopsii generačních ryb, značkování či značení ryb, třídění, vážení nebo veterinárních vyšetřeních ryb (Summerfelt a Smith, 1990). Množství anestetik vhodných pro použití v akvakultuře je poměrně veliké, ale počet povolených a certifikovaných anestetických preparátů je výrazně nižší. I když anestetika usnadňují manipulaci s rybami a jsou prevencí proti stresu, tak nelze nezmínit jejich vedlejší účinky, ke kterým tyto chemické látky mohou u ryb vést (Marking a Meyer, 1985). U komerčně nejvýznamnějších druhů ryb chovaných v akvakultuře jsou popsány nejen vhodné preparáty a dávky, ale i vedlejší účinky těchto přípravků na ryby. U mnohých druhů ryb však vedlejší účinek anestetik na jejich organismus nebyl dosud popsán. Mezi tyto druhy patří i mník jednovousý (*Lota lota* L.).

Analýza krevního profilu je vhodným nástrojem pro monitoring a determinaci vedlejších účinků různých chemických preparátů na vodní organismy (Velíšek a kol., 2009). Cílem této práce je porovnat vliv čtyř v akvakultuře běžně používaných anestetik na hematologické a biochemické složení krve mníka jednovouseho. Získaná data budou následně statisticky porovnána a na základě vyhodnocení těchto údajů bude stanoveno nejšetrnější anestetikum vhodné pro běžné použití při anestezii mníka jednovouseho.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Pojem anestezie a využití anestetik v chovech ryb

Anestezie je biologický stav, při kterém dochází k celkovému zklidnění organismu, po kterém následuje ztráta rovnováhy a vědomí vedoucí k efektivnímu tlumení bolesti (Summerfelt a Smith, 1990). Anestezie jako taková se v chovech ryb začala využívat v 40. a 50. letech minulého století, kdy byla používána pouze pro znehybnění ryb za účelem snadnější manipulace (McFarland a Klontz, 1968). Jako jedno z prvních anestetik byl použit plynný CO<sub>2</sub>. Tento plyn z vody ovšem vytěsňoval kyslík a při opakovaném použití tak docházelo k úmrtím ryb. Proto bylo potřeba vyvinout nové přípravky, které by se vyznačovaly vysokou efektivitou a větší šetrností k rybám samotným (Fish a kol., 2008). S rozvojem chemického průmyslu v 50. letech bylo objeveno a otestováno mnoho přípravků, mezi které patřil např. Methylpentynol, Chlorbutanol, Halothan, Urethan, Diethyl éter, Chlór hydrát a mnoho dalších. Tyto látky svůj účel splnily (tj. navodily anestezii), ale spolu s dalšími výzkumy bylo zjištěno, že některé z nich jsou toxické pro rybí plůdek, zanechávají rezidua v rybách a navíc jsou nebezpečné i pro samotné spotřebitele. Z těchto důvodů byly tyto látky vyřazeny a zakázány pro použití u ryb (Ackerman a kol., 2005).

Současné moderní akvakultury si vyžadují přípravek, který bude splňovat kritéria tzv. „ideálního anestetika“. Ideální anestetikum je charakterizováno vysokou rozpustností ve vodě, rychlým nástupem anestezie a bezpečností pro ryby a spotřebitele (Brožová a Svobodová 1986; Treves-Brown, 2000). Charakteristiku ideálního anestetika doplňují autoři Marking a Meyer (1985), podle kterých by mělo anestetikum poskytovat úměrnou dobu anestezie, která by měla nastoupit během 3 minut a do 5 minut odeznít. Zároveň by měla být rezidua z tkání ryb odstraněna do jedné hodiny. V moderní akvakultuře je použití anestetik nezbytnou součástí chovu ryb. Anestezie je využívána především během třídění, značkování, umělé reprodukci, vážení ryb, odběrech krve a během chirurgických zákroků (Ross a Ross, 1999). Může být také využita při dlouhotrvajícím převozu akvariálních ryb, protože anestetika oslabují metabolické procesy, které vedou ke snížení spotřeby kyslíku organismem a nižší produkci metabolitů (Svoboda a Kolářová, 1999). Použitím anestetik se značně sníží problémy způsobené stresem, který je vyvolán během manipulace. Mezi tyto problémy patří především pokles příjmu krmiva a snížení imunitní funkce organismu (Čítek a

kol., 1997). Kolářová a kol. (2007) doporučuje používání anestetik i z důvodu předcházení porušení zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Samotné použití anestetik je řízeno přesným návodem k jejich použití (Kolářová a Nepejchalová, 2006).

U anestetických přípravků spočívá problém v jejich registraci pro použití u ryb, sloužících ke konzumaci (tj. ryby, které se mohou potenciálně dostat na trh s potravinami), u kterých je třeba provést testy týkající se chemického složení, účinku anestetika, snášenlivosti na cílový organismus a vlivu na životní prostředí. Nejdůležitějším bodem je přetrvávání reziduí anestetik v tělech ryb. Na základě toho je k danému přípravku přidělena ochranná lhůta (OL), která se odvozuje od maximálního reziduálního limitu (MRL = maximální množství účinné látky, jež lze v tkáních ryby akceptovat). Ochranná lhůta je uváděna v takzvaných „stupňodnech“, které jsou počítány jako suma průměrných teplot (v °C) po dobu 24 h. V případě, že přípravek nepodléhá registraci, je nutno dodržet ochrannou lhůtu 500 stupňodnů, která je předepsána zákonem č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon). V průběhu trvání ochranné lhůty nesmí být takto ošetřené ryby prodávány na trhu (Svobodová, 2015; Kolářová a kol., 2007).

## **2.2. Druhy anestetických přípravků používaných v akvakultuře**

### **MS – 222**

Tento druh anestetika patří k nejčastěji používaným anestetickým přípravkům na světě (Marking a Meyer, 1985). Chemický název pro MS – 222 je trikain methansulfonát. Jedná se o izomer benzokainu s dodatečným sulfonátovým radikálem, který umožňuje vyšší rozpustnost ve vodě (Congleton, 2006). Je dodáván ve formě bílého krystalického prášku, který může být rozpuštěn ve vodě až do jedenácti procentního roztoku (Coyle a kol., 2004). MS – 222 se rychle absorbuje žábrami a proniká do centrálního nervového systému, kde má bezprostřední účinek na autonomní nervový systém (Treves-Brown, 2000). Za doporučenou koncentraci je považováno  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Marking a Mayer, 1985). Účinnost MS – 222 je značně ovlivněna chemismem vody, a to především její teplotou, množstvím rozpuštěného kyslíku, tvrdostí a salinitou. Z biologických faktorů, které mohou mít vliv na jeho účinnost, jsou to druh, věk, pohlaví, hmotnost a velikost ryb a také koncentrace lipidů ve svalovině

(Houston a Woods, 1976). Coyle (2004) popisuje značnou afinitu MS – 222 k lipidům, a to především u dospělých jikernaček. Tato afinita zpomaluje zotavovací fázi, v důsledku vyplavování anestetika z jiker a tukových zásob. Holcomb a kol. (2004) ovšem tvrdí, že i přes pomalou zotavovací fázi nedochází ke znehodnocování po hlavních produktech a k snížení líhivosti larev.

Hlavní nevýhoda MS – 222 spočívá ve zvyšování hladiny kortizolu v krvi i v případech, že jsou ryby hluboce uspané (Coyle, 2004). Small (2003) poukazuje na skutečnost, že v extrémních případech může být hladina kortizolu téměř stejně vysoká jako u ryb, které anestezii před manipulací nepodstoupily. Výhodou MS – 222 je jeho vysoká efektivita při nízkých teplotách vody, čehož je využíváno především v chovech lososovitých a jeseterovitých ryb (Wilga a Lauder, 1999).

### **Hřebíčkový olej**

Hřebíčkový olej je jako anestetikum využíván již po staletí. První dochované zprávy o jeho aplikaci pocházejí ze starověké Indonésie, kde se jako slabé anestetikum hojně používal v dentistice a také při bolestech kloubů (Taylor a Roberts, 1999). Své postavení ve stomatologii si udržel až do současné doby. Díky svým aromatickým vlastnostem se využívá i v potravinářství jako přírodní ochucovadlo pokrmů (Curtis, 1990). Jako anestetikum pro ryby byl poprvé testován před více než třiceti lety (Endo a kol., 1972).

Hřebíčkový olej je tmavě hnědá kapalina získaná destilací stonků, květů a listů hřebíčkových stromů *Eugenia aromatica* L. (Soto a Burhanuddin, 1995) nebo rostliny *Eugenia caryophyllata* Thunb (Keene a kol., 1998). Hlavní účinnou složkou hřebíčkového oleje je eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), který může tvořit 70 – 90 % celkové hmotnosti oleje (Woody a kol., 2002). Kromě eugenolu také obsahuje vedlejší složky jako eugenol acetát (> 17 %) a kariofilen 5 (> 12 %) (Keen a kol., 1998). Charakteristické aroma oleje je způsobeno širokou škálou terpenových sloučenin (Coyle a kol., 2004).

Doporučená minimální dávka pro dosažení anestezie je  $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  vodní lázně (Svoboda a Kolářová, 1999). Se zvyšující se teplotou účinnost eugenolu klesá. Například efektivní anestezie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)

nastává při 40 – 60 mg·l<sup>-1</sup>, u kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) při dávce 40 – 120 mg·l<sup>-1</sup> (Coyle, 2004). Při vyšších dávkách hřebíčkového oleje byl prokázán antimykotický a antibakteriální efekt, který však může být využitelný pouze v chovech teplomilných ryb, protože dávka, která tento účinek vyvolá, je pro chladnomilné druhy ryb smrtelná (Hussein a kol., 2000). Keene a kol. (1998) se zabýval porovnáním účinnosti hřebíčkového oleje a MS – 222 na pstruha duhového. Oproti MS – 222 byl zjištěn rychlejší nástup anestezie, ale zotavovací čas byl u hřebíčkového oleje šestkrát delší než u MS – 222. Tato nevýhoda eugenolu je však vyvážena tím, že po zotavení dochází k rychlému odstranění metabolitů anestetika z krevního řečiště a tkání (Fisher a kol., 1990). Hlavní výhody hřebíčkového oleje spočívají v nízké ceně, relativní bezpečnosti pro ryby a pracovníky provádějící anestezii a v neposlední řadě také v nezávadnosti vůči životnímu prostředí (Marking a Mayer, 1985).

## **2 – phenoxyethanol**

Celý název pro 2 – phenoxyethanol je ethylen glykol monofenyl éter (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>). Jedná se o olejovitou neprůhlednou kapalinu, která je hůře rozpustná ve vodě (26,7 mg·l<sup>-1</sup> při 25 °C), ale snadno rozpustná v ethanolu (Coyle a kol., 2004).

V ČR je používán pro krátkodobou imobilizaci ryb před umělým výtěrem, a to v doporučené koncentraci 0,40 ml·l<sup>-1</sup> vodní lázně (Hamáčková a kol., 2008). Při této koncentraci nastává anestezie ryb po 5 – 10 minutách a k zotavení ryb dochází do 10 minut (Velíšek a Svobodová, 2004). Do těla ryb je 2 – phenoxyethanol vstřebáván přes kůži a žábry. Roztok 2 – phenoxyethanolu má zároveň baktericidní a fungicidní vlastnosti, které si udržuje až po dobu 3 dnů (Coyle a kol., 2004). Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím účinnost 2 – phenoxyethanolu je teplota vody, kdy se zvyšující se teplotou vody účinnost anestetika vzrůstá. Navíc opakované použití vede ke zvýšení tolerance ryb vůči tomuto anestetiku (Weyl a kol., 1996). Obecně platí, že mladší ryby jsou k tomuto anestetickému přípravku citlivější než starší ryby (Barton a Helfrich, 1981). 2 – phenoxyethanol je označován jako jeden z kandidátů na ideální anestetikum. Důvod pro toto označení je jeho snadná příprava, nízká cena a rychlý nástup anestezie i zotavovací fáze (Pucéa a kol., 1989). Velíšek a kol. (2007a) uvádí, že při koncentraci 0,30 ml·l<sup>-1</sup> nedochází u kapra obecného a pstruha duhového k žádným změnám v hematologickém profilu.

## **Propiscin**

Propiscin byl vyvinut teprve nedávno na Institutu vnitrozemského rybolovu v Polsku, speciálně pro použití v akvakultuře (Hajek a Klyszejko, 2004; Kazuń a Siwicki, 2012). Jeho aktivní složkou je etomidát (etomidat - ethyl 1-(*a*-methylbenzyl)imidazol-5-karboxylát), který je běžně používán k imobilizaci ryb (Limsuwan a kol., 1983). Doporučené dávkování Propiscinu je  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  vodní lázně (Hamáčková a kol., 2001). Při stejné dávce dochází u lososovitých ryb k rychlejšímu nástupu anestezie než u ryb kaprovitých. Avšak zotavovací fáze je stejně dlouhá u obou skupin ryb (Limsuwan a kol., 1983; Plumb a kol., 1983). Szkudlarek a Zakes (1996) ve své studii popisují, že Propiscin je velice efektním anestetikem, které dokáže indukovat anestezii trvající až 30 minut, ale po přenesení ryb do čerstvé vody dochází k obnovení fyziologických funkcí do 2 – 4 minut .

Oproti běžně používaným přípravkům má Propiscin hned několik výhod. Nepoškozuje dýchací soustavu, mírně snižuje krevní tlak a není škodlivý pro osobu provádějící anestezii. Navíc u něj nebyla prokázána teratogenita či karcinogenita. Propiscin nijak nesnižuje hodnotu pH, ale během déletrvající anestezie dochází ke značnému poklesu rozpuštěnému kyslíku ve vodní lázni (Kazuń a Siwicki, 2012). Siwicki (1984) ve své studii přirovnává účinnost propiscinu k účinnosti propanidinu. U obou přípravků nedochází během anestezie k nežádoucímu podráždění ryb a umožňují tak opakované ošetření.

### **2.2.1. Použití anestetik u mníka jednovousého**

V současné době stále neexistuje žádná publikace, která by se této problematice věnovala hlouběji. Celá řada autorů použila mníka jednovousého pouze okrajově a o přesném účinku vybraného anestetika se dále nezmiňuje (Stupka, 2002; Vandergoot a kol., 2011; Kazuń a Siwicki, 2012). Kazuń a Siwicki (2012) experimentálně ověřovali, společně s dalšími rybami, reakci mníka na přípravek Propiscin. Podobným testováním se zabýval i Stupka (2002), který sledoval vliv 2 – phenoxyethanolu na skupinu několika druhů ryb, ve které byl přítomen i mník jednovousý, a došel k závěru, že 2 – phenoxyethanol může být vhodnou alternativou k hřebíčkovému oleji. Vandergoot a kol. (2011) se zabýval vlivem oxidu uhličitého (použitého jako anestetikum) na celou řadu rybích druhů, včetně mníka jednovousého.

## 2.3. Způsoby použití anestetických přípravků

### 2.3.1. Anestetická koupel

Nejjednodušší a nejpoužívanější způsob aplikace anestetického přípravku představuje koupel ryb v roztoku anestetika o požadované koncentraci. Velmi důležitou součástí anestetické koupele je kontrola chemismu vody v průběhu celého procesu anestezie. To platí především v případech, kdy je koupel používána opakovaně (Coyle a kol., 2004).

Brown (1988) popsal jakési osmero zásad bezpečné anestetické koupele:

1. Kontrola parametrů kvality vody (pH, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, teplota, organické znečištění vody).
2. Evidence změn kvality vody, způsobené použitím anestetika (pH a alkalita).
3. Použití vody, ve které byly ryby chovány.
4. Vždy mít k dispozici nádrž (nádobu) s čerstvou vodou bez anestetika.
5. Používat jedno nebo dvě anestetika a znát přesně jejich účinek.
6. Před plánovanou anestézií ryby 24 hodin nekrmit.
7. Před vlastní anestézií provést test na několika kusech ze skupiny.
8. Zajištění dostatečného množství rozpuštěného kyslíku v anestetické lázni.

### 2.3.2. Sprejování žaber

Tento způsob aplikace je zejména vhodný při anestezii velkých ryb, kde je použití anestetické koupele nepraktické. Pro aplikaci anestetika se používají speciální rozprašovací láhve, kterými se anestetikum nanese na povrch žaber (Kolářová a kol., 2007). Prvními průkopníky této metody se stali Gilbert a Woods (1957), kteří takto uspávali velké žraloky. Žralok byl nejprve uvázan na lano a poté mu byly za pomoci spreje ošetřeny žábry přípravkem MS – 222. Tito autoři dále uvádějí, že u extrémně velkých ryb je možné použít různé vodní pistole nebo speciálně upravené stříkačkové pumpy. Aplikaci této metody v praxi popsal i Kaneko (1982), který řešil problematickou anestezii u velkých ryb, které přijímají atmosférický kyslík. V jeho pokusu byly za pomoci sprejování úspěšně uspány ryby z rodů *Arapaima* a *Lepisosteus*. V produkčním rybářství nachází tato metoda uplatnění především u generačních jedinců lososovitých ryb, jak to dokládají Kidd a Banks (1990). V jejich práci byla metoda sprejování žaber popsána u generačních sivenů obrovských

(*Salvelinus namaycush* Walbaum). Oba autoři se také shodují na tom, že tato metoda je k rybám velmi šetrná a nemá žádný vliv na kvalitu pohlavních produktů.

### **2.3.3. Hypotermie**

Tato metoda patří mezi druh anestezie, kde není přímo použito anestetikum, ale využívá se změny teploty vody. Podchlazení má za následek pomalou a lehkou anestezii, která se vyznačuje absencí pohybu a sníženou citlivostí nervů. Anestezie vyvolaná hypotermií není dostatečně hluboká pro chirurgické zákroky, může ale představovat vhodnou alternativu pro případ, kdy běžná anestetika nejsou k dispozici nebo je jejich použití nežádoucí (Ackerman a kol., 2005). Hypotermie může nalézt své uplatnění také během transportu ryb, kdy díky nízké teplotě vody dochází ke značné redukci spotřeby kyslíku převážnými rybami. Ochlazování vody je možné provést za pomoci speciálních chladičů nebo, jak uvádí Summerfelt a Smith (1990), pomocí rozdrceného ledu. Teplota vody by měla být snižována přibližně o 1 °C za 15 minut. Rychlejší zchlazení může vést k teplotnímu šoku. Kapra obecného je možné bezpečně uchovávat v této anestezii při teplotě vody 4 °C až po dobu 5 hodin (Coyle a kol., 2004). Hypotermii u mořských ryb popsali Hovda a Linley (2000), kteří ji úspěšně ověřili na adultních lososech druhu *Oncorhynchus gorboscha* Walbaum.

## **2.4. Popis jednotlivých fází anestezie a zotavení z anestezie**

### **2.4.1. Anestetická fáze**

Mnozí autoři uvádějí různý počet fází a rozdílný průběh anestezie. Variantu se čtyřmi fázemi popsala Kolářová a kol. (2007) a Coyle a kol. (2004), oproti tomu Keen a kol. (1998) hovoří dokonce o šesti různých fázích anestezie.

#### **Anestezie se čtyřmi fázemi:**

Fáze 1 – *klidová*: běžná pozice a postavení těla, pravidelné dýchací pohyby, normální pohybová aktivita, bezproblémový pohyb a vyhýbání se překážkám.

Fáze 2 – *excitační*: běžná poloha těla, zvyšující se neklid, silný obranný reflex, jedinec se přestává vyhýbat překážkám, nepravidelné dýchací pohyby.

Fáze 3a – *sedace a imobilizace*: postupné snižování pohybové aktivity, naklání se na bok, postupná ztráta obranných reflexů, pravidelné a hluboké dýchací pohyby.

Fáze 3b – *narkóza (anestezie)*: celkový útlum mozkových funkcí, bolest není vnímána, boční poloha, ztráta veškeré pohybové aktivity a obranných reflexů, dýchací pohyby jsou značně zpomalené, probíhají klidně a hluboce.

Fáze 4 – *hraniční mez hluboké anestezie*: boční pozice, dýchací pohyby jsou pomalé a velmi mělké, ztráta všech reflexů.

#### **Anestezie se šesti fázemi:**

Fáze 0 – *normální chování*: přirozené chování a reakce na podněty, přirozené dýchání.

Fáze 1 – *lehké uklidnění*: pomalejší reakce na vnější podněty, rovnováha stabilní, mírně snížená aktivita skřelí.

Fáze 2 – *hluboké uklidnění*: reakce pouze na silné podněty z vnějšího prostředí, nepatrně snížená aktivita skřelí, rovnováha normální.

Fáze 3 – *částečná ztráta rovnováhy*: nekoordinované plavání, zvýšená aktivita skřelí, reakce pouze na vibrační podněty.

Fáze 4 – *úplná ztráta rovnováhy*: úplná ztráta svalového napětí a rovnováhy, pravidelná a pomalá aktivita skřelí, ztráta spinálních reflexů.

Fáze 5 – *úplná ztráta reflexů*: jedinec nereaguje ani na silné podněty, aktivita skřelí je velmi nízká.

Fáze 6 – *medulární kolaps*: aktivita skřelí ustává, dochází k srdeční zástavě.

Všechny fáze anestezie na sebe plynule navazují.

#### **2.4.2. Zotavení z anestezie**

Rovněž u zotavení z anestezie se můžeme setkat s několika rozdílnými fyziologickými stavy organismu, které jsou v závislosti na různých autorech popisovány ve čtyřech (Kazuň a kol., 1999; Trzebiatowski a kol., 1996) nebo pěti (Hikasa a kol., 1986) fázích.

#### **Zotavení z anestezie ve čtyřech fázích**

Fáze 1: boční poloha, pravidelné dýchání, akustický reflex.

Fáze 2: návrat do fyziologické polohy, nekoordinované pohyby.

Fáze 3: fyziologická poloha, nekoordinované pohyby, jedinec naráží do překážek.

Fáze 4: přirozená pohybová aktivita, normální plavání.



## **Zotavení z anestezie v pěti fázích**

Fáze 1: obnovení dýchacích pohybů.

Fáze 2: částečné obnovení rovnováhy a návrat pohybu.

Fáze 3: úplné navrácení rovnováhy.

Fáze 4: získání schopnosti plavat a reagovat na podněty z vnějšího prostředí, pasivní behaviorální odezva.

Fáze 5: celková behaviorální regenerace, normální plavání.

## **2.5. Hodnocení vedlejších účinků anestezie**

### **2.5.1. Biomarkery oxidativního stresu**

Oxidativní stres je považován za zásadní faktor procesu stárnutí, neboť vede k poškození DNA (Hofmanová a kol., 2000). Azzi a kol. (2004) prokázal, že stresované ryby jsou mnohem náchylnější k nemocem, a oxidativní stres popsal jako nerovnováhu mezi oxidačními činidly a antioxidanty ve prospěch oxidantů, což může vést k poškození buněk. Tato nerovnováha je spjata s nadprodukcí reaktivního kyslíku (ROS) v tkáních (Toyokuni a kol., 1995). Huang a kol. (2003) popisuje vliv ROS na buněčné lipidy a dle jeho výsledků dochází k tzv. peroxidaci lipidů (LPO), která je hlavním důvodem ztráty buněčné funkce. Oxidace proteinů je další reakcí, která je způsobena reaktivním kyslíkem. Výsledným produktem reakce je karbonyl (CP), jehož zvýšená hladina vede ke konformačním změnám a dochází tak ke snižování katalytické aktivity enzymů (Almroth a kol., 2008).

Přítomnost oxidačních látek v buňkách vede ke zvýšené produkci antioxidantních látek. Jedná se o přirozenou biologickou ochranu proti oxidačnímu stresu (Parihar a kol., 1997). McCord a kol. (1971) označuje enzym superoxiddismutázu (SOD) za hlavní antioxidant, který katalyzuje superoxid na méně škodlivý peroxid vodíku, který je následně odbouráván enzymy glutathionperoxidázou (GPx) a Chloramphenicol Acetyltransferázou (CAT) (Li a kol., 2009).

### **2.5.2. Hematologický profil krve**

Hematologický profil krve sleduje množství a zastoupení jednotlivých krevních elementů v krevním vzorku. Změny v jejich četnostech mohou indikovat různá onemocnění a také poškození vnitřních orgánů, především pak orgánů krevetvorby

(slezina a ledviny). Změny v hematologickém vyšetření jsou také důkazem stresu, který je způsobený např. anestézií ryb (Kolářová a kol., 2007). Nesmírnou výhodou tohoto vyšetření je možnost pozorovat samotný průběh jednotlivých nemocí (Svobodová a kol., 1986). Jeden z mnoha příkladů popisuje Řehulka (1998). V jeho výzkumu byli použiti pstruzi duhový, kteří byli napadeni plísní *Saprolegnia parasitica* a bakteriemi druhu *Aeromonas hydrophila*. Z výsledků hematologického vyšetření byl patrný značný pokles erytrocytů (RBC) a hemoglobinu (Hb), avšak střední objem erytrocytu (MCV) vykazoval výrazné zvýšení, což jednoznačně vypovídalo o onemocnění sledovaných ryb. Významné změny v hematologickém krevním profilu po použití anestetik popsal Velíšek a kol. (2006), který poukazuje na významné snížení leukocytů u sumce velkého (*Silurus glanis* L.) po anestezii hřebíčkovým olejem. Významné snížení lymfocytů po anestezii bylo zjištěno i u jeseterů sibiřských (*Acipenser baeri* L.) (Gomulka a kol., 2008).

### **2.5.3. Biochemický profil krve**

Analýza krevních parametrů je jedna z nejvíce ceněných metod v moderní diagnostice zdravotního stavu (Celik, 2004) a stala se neodmyslitelnou součástí komplexního vyšetření ryb (Velíšek a kol., 2011). Biochemický profil krve poskytuje velmi důležité informace o vnitřním prostředí organismu (Masopust, 2000).

Na vnitřní stav organismu ryb mají vliv jak exogenní faktory (teplota vody, koncentrace kyslíku ve vodě, nutriční podmínky atd.), tak i faktory endogenní (druh ryby, linie, věk, kondice atd.) (Řehulka, 1997). Na rozdíl od teplokrevných živočichů je variabilita biochemických ukazatelů u ryb velmi vysoká (Pravda a Paláčková, 1989). Biochemické vyšetření plazmy je velmi důležité i při hodnocení výsledků akutních a chronických testů toxicity (Gallardo a kol., 2003).

Výhody tohoto vyšetření dokládá Velíšek a kol. (2011), podle kterého mezi ně patří malá zátěž pro ryby, a především pak poskytnutí informací o metabolických funkcích sledovaného jedince. Samotné změny biochemických parametrů krve poukazují na hepatotoxický a stresový účinek anestetické koupele (převážně reverzibilního charakteru) na organismus ryb (Kolářová a kol., 2007).

Sledovanými parametry biochemického vyšetření krve jsou:

### **Glukóza (Glu)**

Glukóza je hlavním zdrojem energie a její zvýšená koncentrace ( $10 - 30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) indikuje stres. Naopak výrazné snížení hladiny glukózy poukazuje na akutní selhání jater v důsledku náhlého vyčerpání glykogenu (Svobodová a kol., 1986).

### **Celkové proteiny (TP)**

Koncentrace TP v plazmě je souhrnem všech bílkovin, které se nacházejí v krvi. U zdravého organismu tvoří hlavní složku albumin (ALB), těmi zbývajících jsou alfa, beta a gama globuliny (GLOB). Snížení hladiny celkových proteinů poukazuje na infekci nebo otravu organismu pesticidy (Velíšek a kol., 2008).

### **Albumin (ALB)**

Albumin je vytvářen především v játrech a tvoří 40 – 60 % plazmatických krevních bílkovin. Jeho důležitost spočívá především v regulaci osmotického tlaku a transportu metabolických produktů. V případě, že se albumin dostane do mezibuněčných prostor, je to odpověď organismu na prožitá trauma. Stanovení albuminů sleduje také stav jater a ledvin (Svobodová a kol., 1986).

### **Globuliny (GLOB)**

Koncentrace globulinů může být stanovena například oddělením albuminu od TP. Zvýšená hladina GLOB indikuje zánětlivé procesy (Kaplan a Pesce, 1989).

### **Amoniak ( $\text{NH}_3$ )**

Je extrémně toxický a je výsledným produktem metabolismu bílkovin. Hladina amoniaku v krevní plazmě je velmi variabilní a je silně ovlivněna různými exogenními a endogenními vlivy. Zvýšené hodnoty amoniaku jsou indikátorem selhání funkce jater nebo metabolických defektů v Krebsově cyklu (Svobodová a kol., 1986).

### **Triglyceridy (TAG)**

Jsou syntetizovány převážně v játrech, a to především ve formě karbohydrátů poskytujících organismu sekundární zdroj energie. Jsou součástí tukové tkáně a jejich stanovením se zjišťují změny v metabolismu lipidů (Colombo, 1994).

### **Aspartát aminotransferáza (AST)**

Nachází se především v mitochondriích a cytoplazmatické tekutině. Uvolnění mitochondriálního AST provází těžší poškození buněk narušující i membrány mitochondrií. Výrazné zvýšení hodnoty AST poukazuje na nekrózu jaterního parenchymu (Folmar, 1993).

### **Alanin aminotransferáza (ALT)**

Jedná se o cytoplazmatický enzym, který se nachází v cytoplazmě jaterních buněk. Do krevního oběhu je vyplaven při zvýšení permeability hepatocytární membrány. Vysoké zvýšení ALT indikuje toxické poškození jater (Neff, 1985).

### **Laktát dehydrogenáza (LDH)**

Tento enzym je všudypřítomný v cytoplazmě. Stanovení LDH indikuje poškození jater, kosterní a srdeční svaloviny a výskyt některých nádorových onemocnění (Svobodová a kol., 1986).

### **Kreatinkináza (CK)**

Kreatinkináza je složena ze dvou podjednotek, M (v kosterní svalovině) a B (v mozku). Maximální aktivita CK byla prokázána 6 hodin po poškození tkáně, přičemž poločas odbourání je přibližně 15 hodin. Změna aktivity CK indikuje poškození svaloviny (Svobodová a kol., 1986; Musil, 1991).

### **Vápník ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

Vápník je esenciálním prvkem, který se účastní mnoha tělních pochodů. Snížená hladina vápníku je spojena s onemocněním ledvin, kostního aparátu a s defekty vápníkového metabolismu (Svobodová a kol., 1986).

### **Hořčík ( $\text{Mg}^{2+}$ )**

Hořčík je důležitý především při aktivaci enzymů. Jeho změny jsou v biochemickém profilu krve vzácné (Svobodová a kol., 1986).

### **Anorganický fosfát (PHOS)**

Fosfáty jsou důležitou součástí pufrujících systémů uvnitř tkáňových tekutin. Změny hladiny krevního PHOS poukazují na těžké poškození ledvin (Svobodová a kol., 1986).

### **Alkalická fosfatáza (ALP)**

ALP se vyskytuje nejvíce ve výstelkách žlučových cest. Ovlivňuje membránový transport, metabolismus glykogenu a syntézu bílkovin. Změna aktivity ALP je charakterizována poškozením jater a její zvýšené hodnoty se mohou navíc vyskytnout i po podávání léků (Bhavan a Garaldine, 2001).

### **Laktát (LACT)**

Laktát je produktem anaerobní glykolýzy. Nadměrná hladina laktátu způsobuje hyperlaktatémii, které je spojena s tkáňovou hypoxií laktátovou acidózou. Za normálních okolností je laktát degradován v játrech a ledvinách. Hromadění laktátu způsobuje svalovou únavu a bolest (Schneiderka, 2004).

### **Amyláza (AMYL)**

Amyláza je enzymem, který je typický svou vysokou aktivitou v pankreatu a změny jeho aktivity poukazují na poruchu funkce pankreatu (Svobodová a kol., 1986).

## **2.6. Mník jednovousý**

### **2.6.1. Systematické zařazení, biologie a popis**

#### **2.6.1.1. Systematické zařazení**

Kmen: Strunatci - Chordata

Podkmen: Obratlovci - Vertebrata

Třída: Ryby - Osteichthyes

Nadřád: Kostnatí - Teleostei

Řád: Hrdloploutví - Gadiformes

Čeleď: Mníkovití - Lotidae

Rod: Mník - *Lota*

### 2.6.1.2. Biologie a popis mníka

Pro mníka, stejně jako celou čeleď Lotidae, je charakteristické válcovité, u ocasu zploštělé tělo, mohutná hlava s široce roztažitelnými ústy, jeden vous na spodní čelisti, umístění břišních ploutví před prsními a úplná absence tvrdých ploutevních paprsků (Morrow, 1980; Baruš a Oliva, 1995; McPhail a Paragamian, 2000) (Obr. 1 a Obr. 2). Shodu s mořskými druhy najdeme i v jiných vlastnostech, ke kterým patří především preference chladné vody, vysoká plodnost a reprodukce při nízkých teplotách vody (McPhail a Paragamian, 2000). Mník jednovousý je charakterizován cirkumpolárním rozšířením. V praxi to znamená, že areál jeho rozšíření se rozprostírá od Britských ostrovů přes téměř celou Evropu a Asii až k Beringově úžině (Berg, 1949). V Severní Americe je možné se s mníkem setkat od východu poloostrova Seward na Aljašce až po New Brunswick na pobřeží Atlantiku (McPhail a Lindsey, 1970; Scott a Crossman, 1973).

V podmínkách České republiky dorůstá maximálně 50 – 80 cm a hmotnosti okolo 1 – 2 kg (Baruš a Oliva, 1995). Růst mníka je poměrně rychlý a do značné míry závisí na podmínkách prostředí (Dyk, 1952). Pro svůj život vyhledává pomalu tekoucí chladné řeky a hluboká jezera, kde se teplota vody pohybuje v rozmezí 4 – 8 °C (Cohen a kol., 1990; Riede, 2004). Pro výskyt mníka je také důležitý obsah kyslíku, který by neměl klesnout pod 4 mg·l<sup>-1</sup>. Mník je rybou, která pro svůj život vyžaduje úkryty v podobě balvanů, ponořené vegetace, kořenových systémů stromů a keřů, tarasů a kamenných záhozů. Z těchto úkrytů vyplouvá ve večerních hodinách za potravou (Dillen a kol., 2008).

Přes den se zdržuje v úkrytech, jeho aktivita stoupá při zakalené vodě a ve večerních hodinách. Nejvíce potravy přijímá od podzimu do jara při teplotách vody okolo 5 až 7 °C (Dubský a kol., 2003). Mník je v mnoha vodních ekosystémech vrcholovým predátorem (McPhail a Paragamian, 2000). První potravu pro plůdek mníka tvoří především planktonní organismy ze skupiny *Rotifera*. Počátkem čtvrtého týdne života začíná přijímat nauplia buchanek *Cyclopoda* a také drobné zástupce rodu *Dafnia*. Juvenilní jedinci přijímají především larvy hmyzu a různé druhy měkkýšů (Bailey, 1972; Tolanen a kol., 1999). Dospělí jedinci jsou převážně piscivorní, ale nepohrdnou ani žábami, raky nebo jikrami ostatních druhů ryb (Dyk, 1952).

Mník pohlavně dospívá ve 2 – 3 (4) letech (Muth a Smith 1974). Samotné výtěrové období začíná v zimě, kdy se teplota vody pohybuje okolo 1 – 4 °C a trvá 2 – 3 týdny (Kouřil a kol., 1985). Říční populace mníků vyhledávají jako výtěrový substrát především štěrky a písky, oproti tomu jezerní populace využívají hrubého štěrku a valounů (Fabricius, 1954). Samotný výtěr probíhá většinou pod ledem a ve večerních hodinách (Simpson a Wallace, 1978). Mlíčáci vytvoří kolem několika jikernaček tzv. „klubko“, kde dochází k hromadnému uvolňování jiker a mlíčí (MacCrimmon, 1959). Jikry mníka jsou žlutavé, slabě lepivé a velmi malé, mají v průměru 0,71 – 1,7 mm (Chen, 1969). Množství jiker je úměrné hmotnosti jikernaček a pohybuje se v rozmezí 700 000 – 3 500 000 kusů (Kirillov, 1988; Roach a Evenson, 1993). Relativní plodnost je 582 766 – 984 963 kusů jiker na kilogram hmotnosti jikernaček (Vught a kol., 2008). Jikry obsahují tukovou kapénku, proto se nejprve vznášejí ve vodním sloupci a poté zvolna klesají ke dnu, kde se zachytávají ve skulinách substrátu (Sorokin, 1971). Takto uložené jikry se inkubují přibližně 180 – 200 °D (Baruš a Oliva, 1955). Optimální teplota pro vývoj embryí je 4 °C, přičemž vývoj trvá v průměru 41 dní (Sorokin, 1971). Vylíhlé larvy jsou drobné a dosahují délky 3 – 4 mm (McPhail a Paragamian 2000). Žloutkový váček je tráven přibližně 21 dní, poté nastupuje fáze exogenní výživy, která je spjata s poproudovou migrací (Fischer, 1999).



**Obr. 1** Mník jednovousý (*Lota lota*). Zdroj [www.chytej.cz](http://www.chytej.cz).



**Obr. 2** Detail hlavy mníka jednovousého (*Lota lota*). Zdroj BioLib.cz (PUBLIC - DOMAIN) Tomáš Zapletal.

### **2.6.2. Důvody optimalizace chovu mníka jednovousého**

Klesající stavy populací vedou ke zvýšenému zájmu o produkci násadových a generačních ryb mníka. Již koncem 20. století bylo uskutečněno několik záchranných programů s cílem navrátit mníka do původních lokalit a zároveň posílit jeho stávající populace. Během těchto programů byl zefektivněn umělý výtěr těchto ryb a zároveň došlo ke značnému rozvoji v odchovu jeho plůdku (Kucharczyk a kol., 1998; Woher a kol., 2012). Velkou měrou se na úspěšnosti odchovu larev podepsalo použití nových druhů živých krmiv. Vysokou úspěšnost odchovu larev za použití nauplií artemie popsal Wolnicki a kol. (2002).

Zarski a kol. (2009) a Woher a kol. (2012) označují mníka za zajímavého kandidáta pro studenodvodní akvakultury. Podle obou autorů by mník mohl zvýšit produkci rybiho masa ve vnitrozemských státech, které nemohou provozovat mořský rybolov. Důvodem pro zařazení mníka do studenodvodních akvakultur je jeho rychlý růst a vysoká dietetická hodnota masa a jater. Jejich kvalitu dokládá Wong (2008), který je označuje za bohatý zdroj n-3 mastných kyselin, vitamínu A, D a K. Z kulinářského hlediska je mník vyhledávanou rybou především v Polsku, Rakousku a Finsku (Zarski a kol., 2009). Navzdory všem skutečnostem je současná produkce mníků z akvakultury



poměrně nízká. Woche (2011) poukazuje na nutnost dalšího výzkumu v oblasti růstu těchto ryb v podmínkách intenzivní akvakultury.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1. Použité ryby a experimentální podmínky

Celý pokus byl proveden v prostorách a laboratořích Experimentálního a rybochovného zařízení (ERZ) Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech a v laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie na téže fakultě. Všichni mníci, kteří byli v průběhu tohoto pokusu testováni, byli 2 roky starí a pocházeli z intenzivního chovu v místě ERZ (Obr. 2). Odchovné podmínky v tomto zařízení byly: teplota vody  $15 \pm 1$  °C, světelný režim 12L:12D, druh a velikost krmiva (BioMar Inicio plus, 1,5mm) a krmná dávka 1 % hmotnosti obsádky. Přibližně 24 hodin před zahájením pokusu bylo zastaveno krmení ryb.



**Obr. 3** Recirkulační systém použitý pro intenzivní chov pokusných jedinců mníka jednovousého (*Lota lota*).

#### 3.2. Druhy použitých anestetik a rozdělení ryb do skupin

K tomuto pokusu byla použita 4 následující anestetika o přesně stanovených koncentracích: Hřebíčkový olej ( $0,33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), MS – 222 ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanol ( $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Propiscin ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Délka expozice ryb v anestetickém roztoku byla stanovena na 10 minut a období pro odběr vzorků krve bylo stanoveno v závislosti na skupině ryb – ihned po expozici v anestetickém roztoku, nebo 24 hodin po expozici. Teplota vody v nádobách s anestetickým roztokem byla 15 °C.

Pro samotný pokus bylo celkem použito 63 kusů mníka o celkové délce  $245 \pm 52$  mm a průměrné hmotnosti  $110 \pm 23$  g. Zde je nutné zmínit, že byl kladem důraz na to, aby byly použity ryby velikostně i hmotnostně co nejvíce podobné. Všech 63 ryb bylo rozděleno do 9 skupin po 7 rybách. Z tohoto počtu jedna skupina představovala skupinu kontrolní (skupina C), kde byla všem jedinců odebrána krev (viz kapitola 3.3) bez předchozího umístění do anestetické koupele. Dalším 4 skupinám ryb (hřebíčkový olej 10; MS - 222 10; 2 - phenoxyethanol 10; Propiscin 10) byly odebrány vzorky krve ihned po ukončení procesu anestezie. Zbylé 4 skupiny (hřebíčkový olej 24; MS - 222 24; 2 - phenoxyethanol 24; Propiscin 24) ryb byly po vyjmutí z anestetické koupele a zotavení z anestezie samotné vráceny zpět do recirkulačního systému a vzorky krve jim byly odebírány po 24 hodinách.

#### Pracovní postup u skupin ryb s odběrem krve ihned po vyjmutí z anestetika

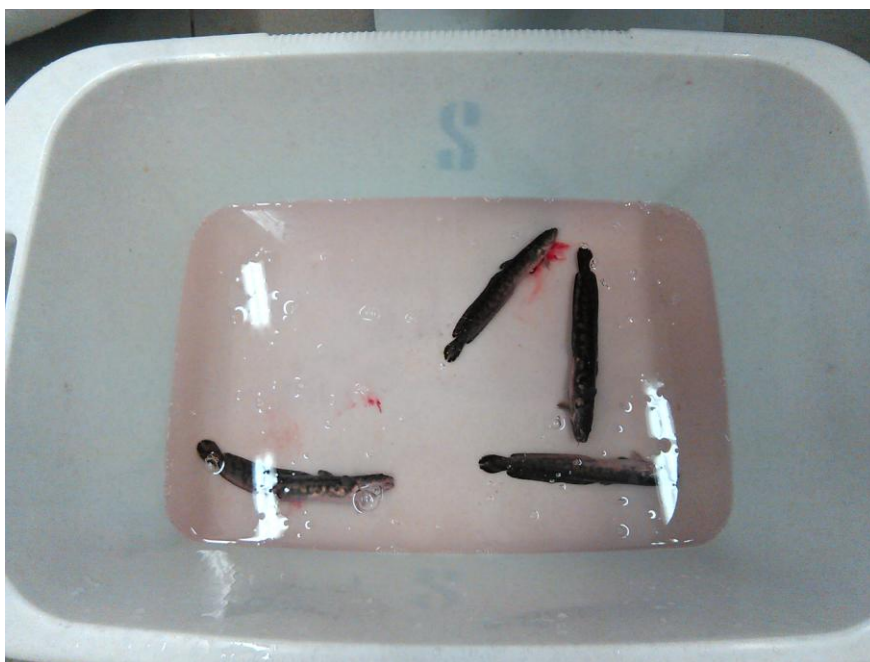
- 1) příprava anestetické koupele – vanička s 10 l vody a požadovaná koncentrace daného anestetika
- 2) umístění ryb do anestetika na dobu 10 minut (Obr. 4)
- 3) okamžitý odběr krve (viz kapitola 3.3)
- 4) zotavení ve vaničce s čerstvou vodou
- 5) vrácení ryb zpět do recirkulačního systému



**Obr. 4** Testovaná skupina mníků (*Lota lota*), vystavená účinkům vybraných druhů anestetik.

### Pracovní postup u skupin ryb s odběrem krve 24 hodin po vyjmutí z anestetika

- 1) příprava anestetické koupele – vanička s 10l vody a požadovaná koncentrace daného anestetika
- 2) umístění ryb do anestetika na dobu 10 minut
- 3) zotavení ve vaničce s čerstvou vodou (Obr. 5)
- 4) vrácení ryb zpět do recirkulačního systému
- 5) odběr krve (viz kapitola 3.3) 24 h po vyjmutí z anestetika, vrácení ryb zpět do recirkulačního systému



**Obr. 5** Mnící (*Lota lota*) v zotavovací vaničce po odběru krve.

### **3.3. Odběr krve**

Krev ryb byla odebírána tzv. punkcí ocasní cévy. K odběru bylo třeba použít injekční stříkačku o objemu 1 ml s jehlou o průměru 0,5 mm, která byla propláchnuta heparinem kvůli zamezení srážlivosti (Svobodová a kol., 1986).

Po uplynutí 10 minutové anestetické koupele (nebo 24 hodin po podstoupené anestezii) byly jednotlivé ryby z koupele vyjmuty a přeneseny na pracovní stůl opatřený vlhkým hadrem. Místo odběru krve se nacházelo na ventrální straně ocasního násadce, kaudálně od báze řitní ploutve, kam byl směřován vpich jehly. Jehla byla do těla ryby zaváděna ve střední rovině, asi 1 cm kaudálně od řitní ploutve, kraniodorzálním směrem pod úhlem 45°. Následně došlo k propíchnutí ocasní cévy, což bylo patrné z přítomnosti malého množství krve v kónusu stříkačky, a odsátí potřebného 1 ml krve (Obr. 6).

Krev bylo zapotřebí stabilizovat proti srážlivosti. K tomuto účelu byl použit vodný roztok heparinu (HEPARIN SOFA inj.) o koncentraci 5 000 IU sodné soli heparinu. Pro stabilizaci 1 ml krve postačilo 0,01 ml heparinu o zmíněné koncentraci (Svobodová a kol., 1986).



**Obr. 6** Odběr krve punkcí ocasní cévy.

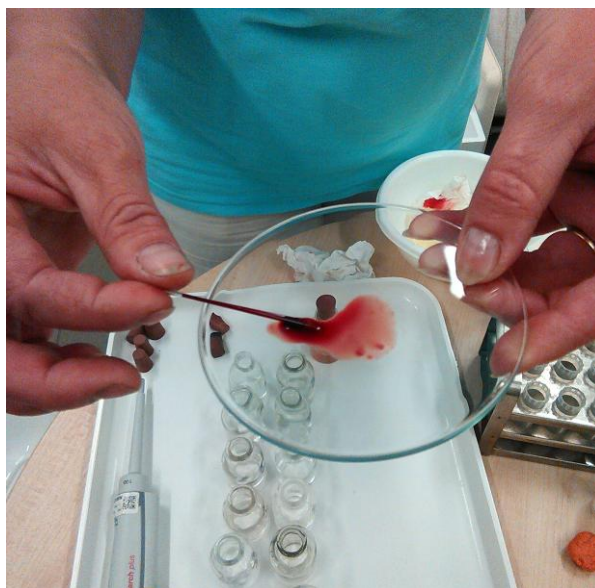
### **3.4. Vyhodnocení hematologických ukazatelů**

Jednotlivá stanovení červeného a bílého krevního obrazu (PCV, Hb, RBC, MCV, MCH, MCHC a Leuko) byla prováděna podle Svobodové a kol. (1986).

#### **3.4.1. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu**

##### ***Hematokritová hodnota (PCV)***

Toto stanovení bylo prováděno bezprostředně po odběru krve. Přibližně 0,3 ml odebrané krve bylo injekční stříkačkou nakapáno na hodinové sklo, ze kterého byla skleněnou kapilárkou o délce 7,5 cm nasáta krev do 2/3 její délky (Obr. 7). Konec kapilárky byl utěsněn speciální modelovací hmotou (firma Janetzski). Takto připravený vzorek byl vložen na 3 minuty do hematokritové odstředivky (Mini Spin, firma Eppendorf), která byla nastavena na 14 000 otáček za minutu. Následně byla kapilárka z odstředivky vyjmuta a umístěna do speciálního hematokritového měřiče (firma Eppendorf), kde byla za pomoci posuvného měřítka odečtena jednotlivá procenta hematokritu. Zjištěné procento bylo poté vynásobeno koeficientem 0,01, čímž byla získána hodnota hematokritu v  $l \cdot l^{-1}$ .



**Obr. 7** Plnění skleněné kapilárky pro stanovení hematokritové hodnoty.

### ***Množství hemoglobinu (Hb)***

Ke stanovení množství hemoglobinu byla použita fotometrická kyanohemiglobinová metoda. Princip metody spočívá v tom, že pomocí transformačního roztoku je hemoglobin uvolněn z erytrocytů, který je převeden na stálý kyanohemiglobin, jenž je posléze stanoven fotometricky. Jako transformační roztok byl použit roztok podle van Kampena a Zijlstra.

Během vlastní analýzy bylo do zkumavky odměřeno 7 ml transformačního roztoku a 25  $\mu$ l heparizované krve a vše bylo důkladně promícháno. Přibližně po 3 minutách bylo provedeno vlastní fotometrické měření. Měření probíhalo v 1 cm květách umístěných do spektrofotometru (Helios Ypsilon, firma Unicam), který byl nastaven na vlnovou délku 540 – 546 nm. Množství hemoglobinu ve vzorku bylo poté určeno z kalibrační řady.

### ***Počet erytrocytů (RBC)***

Toto stanovení bylo provedeno v heparinizované krvi, která byla ředěna Hayemovým roztokem v poměru 1 : 200 ve prospěch ředícího roztoku. Hayemův roztok byl složen ze sublimátu chloridu rtuťnatého –  $\text{HgCl}_2$  v množství (2,5 g), síranu sodného  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (25 g), chlorinu sodného  $\text{NaCl}$  (5 g) a destilované vody (1 000 ml). Ředění krve (tzv. baničkovou metodou podle Bürkera, (Obr. 8) bylo prováděno ve speciálních skleněných baničkách o objemu 15 – 25 ml, do kterých bylo mikropipetou přidáno 4 975  $\mu$ l

Hayemova roztoku a 25  $\mu\text{l}$  heparizované krve. Poté byla banička uzavřena gumovou zátkou a její obsah byl promícháván přibližně 2 – 3 minuty. Následně byla za pomoci kapátka naplněna počítací Bürkerova komůrka a přenesena pod mikroskop (zvětšení 200 $\times$ ), kde bylo počítáno množství erytrocytů ve 20 náhodně zvolených obdélnících (počítají se všechny erytrocyty uvnitř obdélníku a ty, které se dotýkají dvou jeho okrajů). Celkové napočítané množství všech erytrocytů bylo nakonec vynásobeno číslem 10 000. Výsledný počet erytrocytů je uváděn v  $\text{T}\cdot\text{l}^{-1}$ .



**Obr.8** Použité baničky a mikropipeta pro stanovení počtu erytrocytů.

### ***Střední objem erytrocytu (MCV)***

Hodnota středního objemu erytrocytu byla vypočítána z hematokritové hodnoty a počtu erytrocytů podle následujícího vzorce:  $\text{MCV} = \text{PCV} \cdot 1\,000 / \text{Er}$ . Výsledek je udáván ve fentolitrech (fl).

### ***Hemoglobin erytrocytu (MCH)***

Hemoglobin erytrocytu byl vypočítán pomocí tohoto vzorce:  $\text{MCH} = \text{Hb} / \text{PCV}$  a je udáván v pikogramech.

### ***Střední barevná koncentrace (MCHC)***

Střední barevná koncentrace byla vypočítána podle vzorce:  $\text{MCHC} = \text{Hb} / \text{PCV} \cdot 1\,000$ .

### 3.4.2 Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu

#### *Počet leukocytů (Leuko)*

Podobně jako u stanovení RBC bylo stanovení počtu leukocytů provedeno v heparizované krvi, která byla naředěna roztokem podle Procházky a Škrobáka v poměru 1 : 200 ve prospěch ředícího roztoku. Roztok podle Procházky a Škrobáka měl následující složení: chlorid sodný – NaCl (3,88 g), síran sodný – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,50 g), dodekahydrát monohydrofosforečnanu sodného – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (2,91 g), dihydrofosforečnan draselný KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,25 g), formaldehyd 37% (7,5 ml), brilantkresilová modř (0,10 g) a destilovaná voda (1 000 ml). I zde byla použita baničková metoda, kdy do baniček o objemu 15 – 25 ml bylo odpipetováno 4 975 μl roztoku dle Procházky a Škrobáka a poté 25 μl heparizované krve. Následně byla banička uzavřena gumovou zátkou a krouživými pohyby 2 – 3 minuty míchána. Výpočet množství leukocytů byl prováděn stejným způsobem jako v případě RBC, pouze s tím rozdílem, že byla počítána jednotlivá množství leukocytů v 100 velkých čtvercích. Výsledný počet leukocytů je udáván v G·l<sup>-1</sup>.

### 3.5. Vyhodnocení biochemických ukazatelů

Pro biochemické stanovení byl zbytek odebrané krve tj. 0,6 ml nakapán do plastových zkumavek, jejichž stěny byly ošetřeny heparinem, uzavřen zátkou a po dobu přibližně 15s promícháván tak, aby došlo k promísení vzorku s protisrážecím přípravkem. Takto naplněné a připravené zkumavky byly ukládány do šupinkového ledu, aby nedošlo k znehodnocení krevní plazmy (Obr. 9). Následně byly jednotlivé vzorky uloženy do zchlazené centrifugy (4 °C), kde byly odstředovány po dobu 1 – 2 minut při 12 000 otáčkách za minutu. Po odstředění byla mikropipetou ze zkumavky odsáta odstředěná krevní plazma.

Jednotlivé ukazatele byly v krevní plazmě stanoveny biochemickým analyzátozem krve (VETTEST 8008; firma Medisoft international LTD) podle Velíška a kol. (2005). Výsledkem biochemického vyšetření byly hodnoty: Glu, TP, ALB, GLOB, NH<sub>3</sub>, TAG, AST, ALT, LDH, CK, Ca, Mg, PHOS, ALP, LACT, CREA a AMYL.



**Obr. 9** Plastové zkumavky se vzorky odebrané krve, chlazené šupinkovým ledem

### **3.6. Statistické vyhodnocení dat**

Statistická analýza byla provedena za pomoci softwaru Statistica 8.0 Windows (StatSoft, Česká republika). Všechna získaná data byla nejprve testována na normalitu (Kolmogorův – Smirňův test) a na homoskedasticitu variance (Bartlettův test). V případě, že byly splněny tyto podmínky, bylo přikročeno k analýze dvojího třídění (ANOVA) pro porovnání rozdílných veličin mezi kontrolní a experimentální skupinou ryb. Pokud byl zjištěn rozdíl při hladině významnosti ( $p < 0,05$ ), bylo dále pokračováno v Tukeyho vícenásobném porovnávacím testu, jehož smyslem bylo určit nejvyšší rozdílné hodnoty vyvolané použitím jednotlivých anestetik. Pokud nebyla splněna kritéria pro použití testu ANOVA, bylo přikročeno k neparametrickému testu Kruskal – Wallis.



## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1. Hematologický profil krve**

Ve výsledcích hematologické analýzy krevní plazmy nebyly nalezeny žádné významné změny v porovnání s kontrolní skupinou ryb (Tabulka 1).

**Tabulka 1** Vliv anestetik MS - 222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na hematologické ukazatele mníka jednovousého (*Lota lota*). Hladiny významnosti jsou vypočítány při  $p < 0,05$  ve srovnání s kontrolní skupinou. Všechny hodnoty jsou průměry  $\pm$  SD,  $n = 7$ .

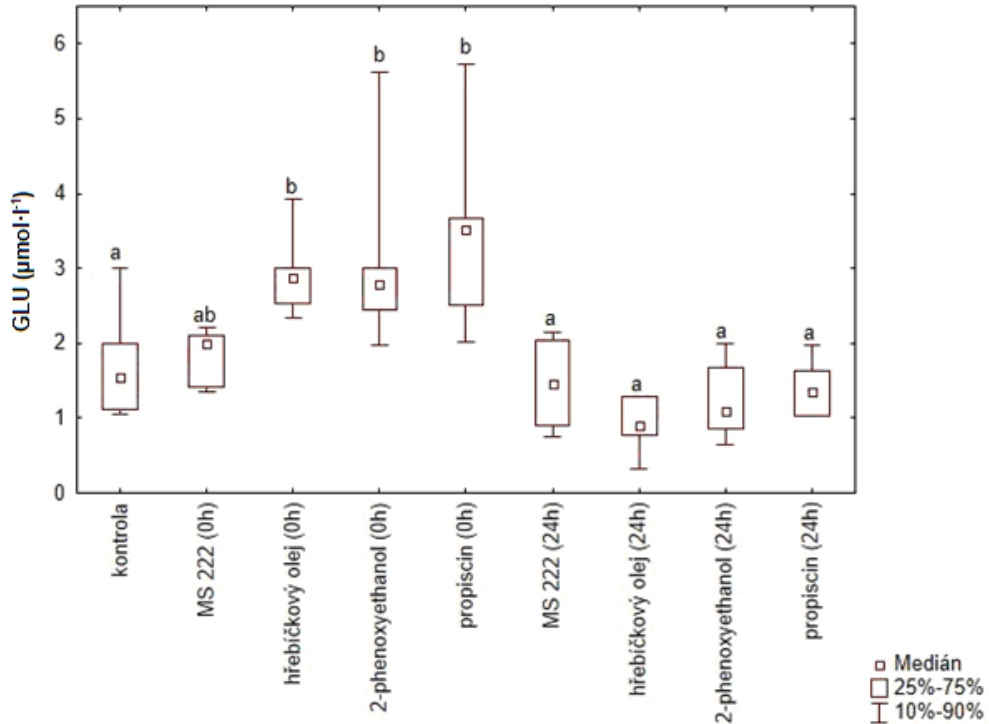
Ukazatel	Kontrola	MS-222 (10 min)	MS-222 (24h)	Hřebíčkový olej (10 min)	Hřebíčkový olej (24h)	2-phenoxyethanol (10 min)	2-phenoxyethanol (24h)	Propiscin (10 min)	Propiscin (24h)
RBC (T/l)	1,82 $\pm$ 0,10	1,66 $\pm$ 0,28	2,05 $\pm$ 0,26	1,72 $\pm$ 0,31	1,96 $\pm$ 0,32	2,30 $\pm$ 0,36	1,97 $\pm$ 0,31	2,04 $\pm$ 0,17	2,10 $\pm$ 0,37
Hb (g/l)	78,11 $\pm$ 10,08	76,94 $\pm$ 6,97	81,44 $\pm$ 9,77	71,82 $\pm$ 8,64	72,49 $\pm$ 8,5	83,18 $\pm$ 8,00	71,41 $\pm$ 12,93	84,66 $\pm$ 8,17	80,16 $\pm$ 10,92
PCV (l/l)	0,44 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,05
MCV (fl)	242,09 $\pm$ 14,87	300,14 $\pm$ 55,05	213,08 $\pm$ 21,54	262,56 $\pm$ 48,83	222,49 $\pm$ 26,86	218,58 $\pm$ 24,64	236,83 $\pm$ 30,65	237,45 $\pm$ 12,05	204,91 $\pm$ 21,02
MCH (pg)	42,79 $\pm$ 79	47,68 $\pm$ 9,70	40,02 $\pm$ 3,79	42,95 $\pm$ 8,76	37,47 $\pm$ 4,79	36,6 $\pm$ 3,96	36,10 $\pm$ 2,37	41,78 $\pm$ 5,03	38,83 $\pm$ 4,85
MCHC (g/l)	177,66 $\pm$ 23,97	158,44 $\pm$ 7,56	188,65 $\pm$ 15,97	163,24 $\pm$ 7,66	168,91 $\pm$ 14,91	167,76 $\pm$ 8,41	154,85 $\pm$ 21,02	8,93 $\pm$ 2,84	190,05 $\pm$ 18,16
Leuko (G/l)	10,20 $\pm$ 1,18	7,07 $\pm$ 1,86	7,84 $\pm$ 2,43	9,11 $\pm$ 1,63	8,03 $\pm$ 1,88	8,10 $\pm$ 0,78	7,60 $\pm$ 3,27	8,93 $\pm$ 2,84	6,24 $\pm$ 3,32

## 4.2. Biochemický profil krve

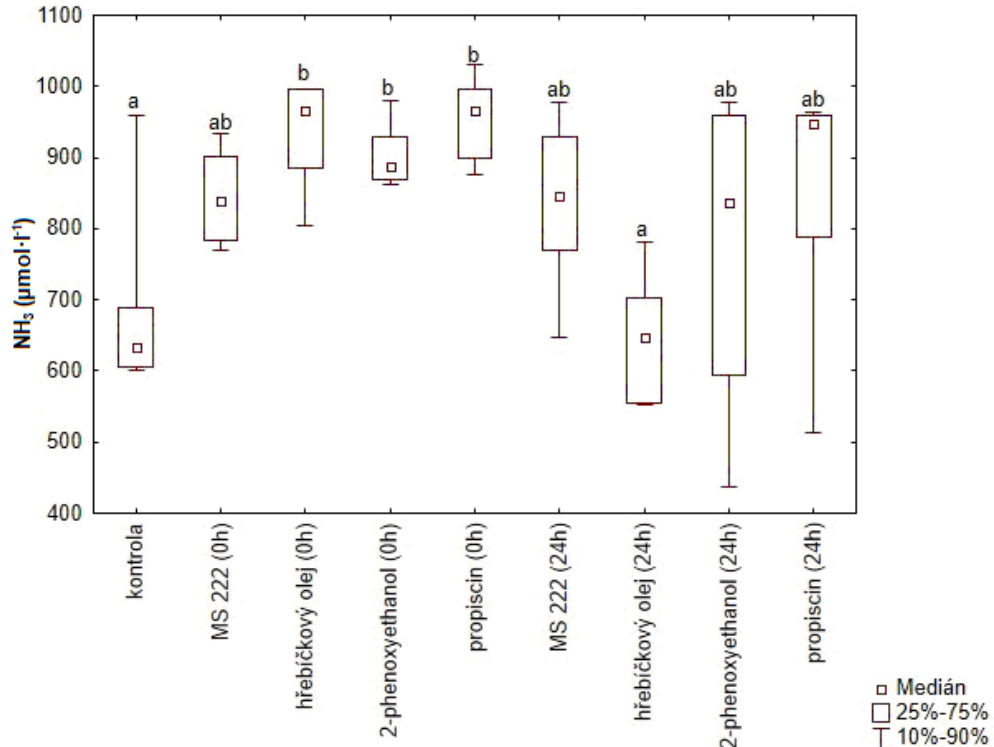
Na základě vyšetření biochemického profilu krevní plazmy mníka jednovousého bylo zaznamenáno celkem 8 detekovatelných změn. Hladiny jednotlivých biochemických ukazatelů jsou uvedené v Tabulce 2. Hladina glukózy, jako hlavního stresového faktoru, byla výrazně zvýšena ( $p < 0,01$ ) ihned po 10 minutové anestezii, a to po použití hřebíčkového oleje, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu v porovnání s kontrolní skupinou ryb. U MS – 222 (10 min a 24 h) nebyly zjištěny významné změny v porovnání s kontrolou (Graf 1). Významné zvýšení hladiny ( $p < 0,01$ ) bylo detekováno i u celkových proteinů, a to po anestezii hřebíčkovým olejem (10 min a 24 h), 2 – phenoxyethanolem (24 h) a Propiscinem (10 min) v porovnání s kontrolou. U MS – 222 (10 min a 24 h) nebyly detekovány statisticky významné změny po porovnání s kontrolní skupinou ryb. Zvýšené hodnoty ( $p < 0,01$ ) byly pozorovány i u hladiny albuminu po anestezii anestetikem MS – 222 (10 min) a hřebíčkovým olejem (10 min a 24 h), U Propiscinu (10 min a 24 h) a 2 – phenoxyethanolu (10 min a 24 h) nebyly zjištěny změny po porovnání s kontrolou. Koncentrace amoniaku byla významně zvýšena ( $p < 0,01$ ) ihned po 10 minutové anestezii v hřebíčkovém oleji, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu oproti kontrolní skupině ryb (Graf 2). U aspartát aminotransferázy bylo detekováno významné zvýšení ( $p < 0,01$ ) aktivity. Toto zvýšení bylo pozorováno po anestezii s MS – 222 (24 h) a hřebíčkovým olejem (10 min) po porovnání s kontrolou. Hladina kreatinkinázy byla významně snížena ( $p < 0,01$ ) po anestézii v hřebíčkovém oleji (24 h) v porovnání s kontrolní skupinou ryb. Koncentrace vápníku vykazovala významné zvýšení ( $p < 0,01$ ) po 24 hodinách od anestezie v hřebíčkovém oleji, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu ve srovnání s kontrolní skupinou ryb. Úroveň laktátu byla významně snížena ( $p < 0,01$ ) s anestetikem 2 – phenoxyethanol (10 min) v porovnání s kontrolou. Rovněž hladina amylázy vykazovala významné snížení ( $p < 0,01$ ) po anestezii anestetikem MS – 222 (10 min) oproti kontrole. Hodnoty celkových globulinů, triacylglycerolů, alaninaminotransferázy, laktátdehydrogenázy,  $Mg^{2+}$ , anorganického fosfátu, alkalické fosfatázy a kreatinu byly podobné u všech skupin ryb (Tabulka 2).

**Tabulka 2** Vliv MS-222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na biochemické ukazatele mňika jednovousého (*Lota lota*). Hladiny významnosti jsou vypočítány při  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  ve srovnání s kontrolní skupinou. Všechny hodnoty jsou průměry  $\pm$  SD,  $n = 7$ . Symboly \*\* za vybranými hodnotami poukazují na statisticky významné rozdíly.

Ukazatele	Kontrola	MS-222	MS-222	Hřebíčkový olej	Hřebíčkový olej	2-phenoxyethanol	2-phenoxyethanol	Propiscin	Propiscin
		(10 min)	(24h)	(10 min)	(24h)	(10 min)	(24h)	(10 min)	(24h)
GLU (mmol/l)	1.68 $\pm$ 0.63	1.87 $\pm$ 0.31	1.45 $\pm$ 0.49	2.91 $\pm$ 0.47**	0.91 $\pm$ 0.30	3.07 $\pm$ 1.10**	1.26 $\pm$ 0.44	3.44 $\pm$ 1.09**	1.37 $\pm$ 0.33
TP (g/l)	33.43 $\pm$ 2.61	36.86 $\pm$ 2.53	34.86 $\pm$ 1.81	38.71 $\pm$ 3.19**	40.43 $\pm$ 2.61**	36.43 $\pm$ 3.06	38.86 $\pm$ 1.46**	39.71 $\pm$ 3.37**	38.57 $\pm$ 2.13
ALB (g/l)	5.57 $\pm$ 1.68	8.57 $\pm$ 1.76**	6.57 $\pm$ 1.01	8.71 $\pm$ 1.03**	8.14 $\pm$ 1.25**	7.29 $\pm$ 0.88	7.86 $\pm$ 1.12	7.14 $\pm$ 1.46	6.86 $\pm$ 0.64
GLOB (g/l)	27.86 $\pm$ 1.96	28.57 $\pm$ 2.19	27.86 $\pm$ 1.25	29.86 $\pm$ 2.59	32.29 $\pm$ 1.98	29.14 $\pm$ 2.85	31.00 $\pm$ 2.00	32.57 $\pm$ 2.72	31.71 $\pm$ 2.37
NH <sub>3</sub> (μmol/l)	678.86 $\pm$ 118.33	849.29 $\pm$ 55.99	836.71 $\pm$ 104.60	933.8 $\pm$ 97.2**	644.71 $\pm$ 77.27	901.00 $\pm$ 38.37**	784.14 $\pm$ 185.96	959.43 $\pm$ 50.06**	855.86 $\pm$ 152.83
TAG (mmol/l)	1.09 $\pm$ 0.17	1.22 $\pm$ 0.13	1.18 $\pm$ 0.17	1.44 $\pm$ 0.24	1.14 $\pm$ 0.21	1.45 $\pm$ 0.28	1.10 $\pm$ 0.26	1.27 $\pm$ 0.23	1.13 $\pm$ 0.26
AST (μkat/l)	1.80 $\pm$ 1.10	1.10 $\pm$ 0.23	3.91 $\pm$ 1.07**	3.02 $\pm$ 0.98**	1.41 $\pm$ 1.45	2.27 $\pm$ 0.16	2.31 $\pm$ 1.39	1.83 $\pm$ 0.27	2.38 $\pm$ 1.31
ALT (μkat/l)	0.20 $\pm$ 0.11	0.14 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.20	0.18 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.10
LDH (μkat/l)	18.96 $\pm$ 1.23	16.86 $\pm$ 2.68	19.55 $\pm$ 2.19	19.54 $\pm$ 1.35	18.07 $\pm$ 1.33	17.58 $\pm$ 1.23	17.90 $\pm$ 1.20	18.62 $\pm$ 1.11	18.91 $\pm$ 1.53
CK (μkat/l)	14.93 $\pm$ 0.88	15.57 $\pm$ 0.97	15.13 $\pm$ 1.13	15.26 $\pm$ 0.85	8.96 $\pm$ 3.70**	16.51 $\pm$ 0.59	16.16 $\pm$ 0.68	15.55 $\pm$ 0.98	15.31 $\pm$ 3.71
Ca <sup>2+</sup> (mmol/l)	2.00 $\pm$ 0.13	2.36 $\pm$ 0.20	2.29 $\pm$ 0.35	2.32 $\pm$ 0.14	2.74 $\pm$ 0.23**	2.27 $\pm$ 0.16	2.50 $\pm$ 0.28**	2.17 $\pm$ 0.23	2.61 $\pm$ 0.29**
Mg (mmol/l)	0.86 $\pm$ 0.14	0.95 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.22	1.09 $\pm$ 0.12	1.18 $\pm$ 0.27	0.99 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.41	1.03 $\pm$ 0.17	1.17 $\pm$ 0.41
PHOS (mmol/l)	2.81 $\pm$ 0.40	3.23 $\pm$ 0.44	2.48 $\pm$ 0.40	3.41 $\pm$ 0.69	2.40 $\pm$ 0.24	2.82 $\pm$ 0.18	2.87 $\pm$ 0.44	2.92 $\pm$ 0.26	2.68 $\pm$ 0.32
ALP (μkat/l)	0.05 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
LACT (mmol/l)	1.80 $\pm$ 1.26	2.31 $\pm$ 1.17	2.33 $\pm$ 0.25	2.59 $\pm$ 0.53	2.57 $\pm$ 0.26	4.46 $\pm$ 0.69**	2.38 $\pm$ 0.27	4.13 $\pm$ 1.07**	2.45 $\pm$ 0.35
CREA	6.14 $\pm$ 8.41	13.29 $\pm$ 9.15	16.01 $\pm$ 6.95	8.29 $\pm$ 10.71	1.29 $\pm$ 1.67	18.71 $\pm$ 13.85	10.29 $\pm$ 10.32	3.01 $\pm$ 3.02	9.01 $\pm$ 8.42
AMYL	0.17 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.44**	0.04 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.36	0.05 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.20



**Graf 1** Vliv MS-222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na hladinu glukózy u mníka jednovousého (*Lota lota*). Všechny hodnoty jsou udávány jako průměry ± SD, n = 7, 0h = 10 min. Různá písmena v horních indexech poukazují na statisticky významné rozdíly ( $p < 0,01$ ) mezi jednotlivými skupinami.



**Graf 2** Vliv MS-222, hřebíčkového oleje, 2-phenoxyethanolu a Propiscinu na hladinu NH<sub>3</sub> u mníka jednovousého (*Lota lota*). Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměry ± SD, n = 7, 0h = 10 min. Různá písmena v horních indexech poukazují na statisticky významné rozdíly ( $p < 0,01$ ) mezi jednotlivými skupinami.

## 5. DISKUZE

Analýza krevních parametrů patří mezi nejdůležitější metody v moderní diagnostice krve. Tato analýza poskytuje zásadní informace o vnitřním prostředí organismu a jeho stavu (Masopust, 2000; Celik, 2004). V případě této studie neměla anestetika MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanol ( $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), hřebíčkový olej ( $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Propiscin ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) významný vliv na hematologické ukazatele pozorovaných ryb. K totožným výsledkům hematologické analýzy se dopracoval i Lepič a kol. (2014), který použil tytéž druhy anestetických přípravků ve shodných dávkách pro anestezii podoustve říční (*Vimba vimba* L.). Velíšek a kol. (2005a) rovněž popisuje neměnnost hematologického profilu krve u kapra obecného uspaného hřebíčkovým olejem v koncentraci  $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Zvýšené hodnoty glukózy poukazují na vystavení organismu nějakému stresovému faktoru, v tomto případě anestetické koupeli, nebo na onemocnění daného jedince. Náhlý pokles úrovně glukózy může například svědčit o selhání jater (Svobodová a kol., 1986). Koncentrace glukózy byla v této práci významně vyšší bezprostředně po 10 minutové anestezii v hřebíčkovém oleji, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu. Po 24 h od anestezie došlo k navrácení hladiny glukózy do původních hodnot u všech jmenovaných přípravků. V tomto ohledu se naše výsledky shodují s Velíškem a kol. (2005b), který pozoroval stejný průběh u biochemického profilu krve pstruha duhového po anestezii hřebíčkovým olejem v dávce  $0,30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Anestetikum MS – 222 (10 min a 24 h) nemělo žádný významný vliv na úroveň glukózy. V tomto případě se naše výsledky shodují s Gomulkou a kol. (2008), který použil MS – 222 v dávce  $125 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a eugenol v koncentraci  $0,075 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  u jesetera sibiřského. Po aplikaci těchto anestetik neshledal žádné změny v biochemickém profilu krve, ale po histopatologickém vyšetření našel změny na žábřácích a játrech sledovaných ryb. Statisticky nevýznamné změny v úrovni hladiny glukózy mohly být způsobeny krátkodobou (tj. 10 min) expozicí ryb v tomto anestetiku. Ke stejnému závěru dospěli i autoři Thomas a Robertson (1991), kteří provedli 15 min anestezii přípravkem MS – 222 u ryb druhu *Sciaenops ocellatus* L. Oba autoři rovněž uvedli, že dlouhodobější expozice k tomuto anestetiku vede ke zvýšení hladiny glukózy i kortizolu. Zvýšenou hladinu glukózy po 10 min anestezii s MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolem ( $0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Propiscinem ( $1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a hřebíčkovým olejem ( $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pozoroval i Velíšek a kol. (2009) u biochemického krevního profilu okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.).

Celkové proteiny jsou složeny z albuminu a třech forem globulinu. Snížená hladina celkových proteinů poukazuje na možnou otravu nebo infekci organismu. Naopak zvýšená koncentrace

indikuje poškození jater a ledvin (Walmsley a kol., 1992, Velíšek a kol., 2008). Významné zvýšení hladiny celkových proteinů bylo u mníka jednovousého zaznamenáno po anestezii 2 – phenoxyethanolem (24 h), hřebíčkovým olejem (10 min a 24 h) a Propiscinem (10 min). Zvýšení hladiny celkových proteinů u 2 – phenoxyethanolu (24 h) se shoduje s prací Velíška a Svobodové (2004), kteří zkoumali vliv tohoto anestetika v koncentraci  $0,30 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  na juvenilní jedince pstruha duhového. Podobné zvýšení úrovně celkových proteinů po 24 h bylo pozorováno i u jeseterů sibiřských, kteří podstoupili anestezii eugenolem ( $0,075 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a MS - 222 v dávce  $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Gomulka a kol., 2008).

Albumin je důležitý v regulaci osmotického tlaku a při transportu metabolických bílkovin. Jeho stanovení je důležité pro indikaci prožitého traumatu a pro kontrolu stavu jater a ledvin (Svobodová a kol., 1986). V této studii bylo zjištěno významné zvýšení hladiny albuminu, které se týkalo všech čtyř testovaných anestetik MS – 222 (10 min), hřebíčkového oleje (10 min a 24 h), Propiscinu (10 min a 24 h) a 2 – Phenoxyethanolu (10 min a 24 h). V tomto ohledu se naše výsledky shodují s Velíškem a Svobodovou (2004), kteří u pstruha duhového použili 2 – phenoxyethanol v koncentraci  $0,30 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ , přičemž zvýšení bylo patrné po 24 h od anestezie. U sumce velkého bylo zvýšení hladiny albuminu detekováno bezprostředně po 10 min anestezii 2 – phenoxyethanolem (Velíšek a kol., 2007b). Zvýšená úroveň albuminu u Propiscinu (10 min a 24 h), hřebíčkového oleje (10 min a 24h) a MS – 222 (10 min) nekoresponduje s žádnými dostupnými zdroji. Vliv těchto anestetik na úroveň albuminu by u mníka jednovousého vyžadoval patrně další a podrobnější pozorování.

Amoniak je velmi toxický a vzniká jako jeden z produktů metabolismu bílkovin. Zvýšená koncentrace amoniaku je indikátorem selhání jater nebo metabolických defektů v Krebsově cyklu. Z našich výsledků je patrné významné zvýšení koncentrace amoniaku bezprostředně po 10 min anestezii v hřebíčkovém oleji, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu. Tyto výsledky nekorespondují s výsledky, které publikoval Kříšťan a kol. (2012). V jeho studii byla použita anestetika MS – 222 ( $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), hřebíčkový olej ( $33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanol ( $0,30 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a Propiscin ( $1,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) pro anestezii candáta obecného (*Sander lucioperca* L.). U všech čtyř zmíněných přípravků bylo po 24 h od anestezie patrné významné snížení koncentrace amoniaku. Zvýšení koncentrace amoniaku po 10 min od anestezie hřebíčkovým olejem ( $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) koresponduje s výsledky, které uvedl Velíšek a kol. (2005b) u pstruhů duhových.

Aspartát aminotransferáza je buněčný enzym, který je součástí cytoplazmatické mitochondriální tekutiny. Významné zvýšení hladiny aspartát aminotransferázy poukazuje na poškození jater (Folmar, 1993). Významné zvýšení aktivity tohoto enzymu bylo u mníka zaznamenáno u anestetik MS – 222 (24 h) a hřebíčkového oleje (10 min). Tento výsledek se neshoduje s Velíškem a kol. (2005a), který u kapra obecného neshledal žádné významné změny v aktivitě aspartát aminotransferázy po anestezii hřebíčkovým olejem v koncentraci  $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Naše výsledky se rovněž neshodují ani s Křišťanem a kol. (2012), který u candáta obecného nepozoroval žádné zvýšení aktivity aspartát aminotransferázy u hřebíčkového oleje ( $33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolu ( $0,30 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Propiscinu ( $1,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a MS – 222 ( $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

Kreatinkináza je enzym, který je přítomný v mozku a kosterní svalovině. Zvýšená aktivita tohoto enzymu indikuje poškození tkáně, které je způsobené prožitým stresem (Svobodová a kol., 1986). Hladina kreatinkinázy byla významně snížena po anestezii v hřebíčkovém oleji (24 h). Tímto se naše práce neshoduje s žádnými dostupnými zdroji. Zvýšenou úroveň kreatinkinázy pozoroval Congleton (2006) u lososů druhu *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, na kterých testoval přípravek MS – 222 v dávce  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Stejný autor dále uvádí, že ke zvýšení aktivity kreatinkinázy dochází v případě, kdy je anestezie delší než 25 min.

Vápník patří mezi esenciální prvky. Jeho snížená hladina souvisí s poškozením ledvin a kostního aparátu (Svobodová a kol., 1986). Koncentrace vápníku vykazovala v této práci u mníka významné zvýšení po 24 hodinách od anestezie v hřebíčkovém oleji, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu. V tomto ohledu se naše práce neshoduje s Gomulkou a kol. (2008), který na jeseterech sibiřských testoval účinek eugenolu ( $0,075 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a MS – 222 ( $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Z jeho výsledků je zřejmý významný pokles koncentrace vápníku, který byl detekován po 10 minutách a 24 hodinách od anestezie. U podoustve říční nebyla po 10 minutách a 24 hodinách od anestezie hřebíčkovým olejem ( $33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolem ( $0,40 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ), MS – 222 ( $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a Propiscinem ( $1,0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) zaznamenána žádná významná změna v koncentraci vápníku (Lepič a kol., 2014). Ke shodnému závěru došel i Velíšek a kol. (2007b), který se zabýval vlivem 2 – phenoxyethanolu ( $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na biochemický profil krve sumce velkého.



Laktát je produktem anaerobní glykolýzy. Pokles úrovně laktátu poukazuje na významné snížení laktátového katabolismu, který je vyvolán změnami v anaerobním metabolismu. Stanovení laktátu se provádí za účelem indikace stresu (Svobodová a kol. 1986). Úroveň laktátu byla významně snížena bezprostředně po 10 minutové anestezii 2 – phenoxyethanolem. V tomto ohledu se výsledky této studie shodují s pozorováním Velíška a kol. (2011). V jeho experimentu byl pstruh duhový testován na účinek MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Propiscinu ( $1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolu ( $0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a hřebíčkového oleje ( $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Významné snížení úrovně laktátu bylo v jeho experimentu pozorováno u 2 – phenoxyethanolu (10 min a 24 h), hřebíčkového oleje (10 min a 24 h), MS – 222 (10 min a 24 h) a Propiscinu (10 min). Naopak zvýšenou koncentraci laktátu pozoroval Iverzen a kol. (2003) u lososů obecných (*Salmo salar* L.), kteří prodělali anestezii hřebíčkovým olejem v koncentraci  $0,30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Lepič a kol. (2014) nepozoroval u podoustve říční uspané 2 – phenoxyethanolem ( $0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), hřebíčkovým olejem ( $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Propiscinem ( $1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) žádné významné změny v koncentraci laktátu.

Amyláza je enzym, který se nachází v pankreatu a změny v aktivitě tohoto enzymu poukazují na poruchu funkce tohoto orgánu (Svobodová a kol., 1986). Hladina amylázy vykazovala u mníka jednovousého významné snížení bezprostředně po 10 minutové anestezii anestetikem MS – 222 o koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Velíšek a kol. (2011) se zabýval účinkem anestetik MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolu ( $0,40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), hřebíčkového oleje ( $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Propiscinu ( $1,0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na biochemický profil krve pstruha duhového a zjistil, že koncentrace amylázy nevykazovala žádné významné změny oproti kontrolní skupině ryb. Relativně stálá úroveň amylázy může být jeden z možných důvodů, proč se v mnoha publikovaných studiích hladina amylázy neuvádí nebo není hodnocena.

## 6. ZÁVĚR

Úkolem této práce bylo porovnat účinek anestetik MS – 222, 2 – phenoxyethanolu, hřebíčkového oleje a Propiscinu na mníka jednovousého, vyhodnotit jejich vliv na hematologický a biochemický krevní profil a určit na základě získaných výsledků nejvhodnější přípravek pro anestezii mníka v běžné praxi. Na základě provedených analýz a získaných výsledků je možné konstatovat, že anestetický přípravek MS – 222 o koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  je bezkonkurenčně nejlepší variantou, protože v porovnání s ostatními použitými anestetiky vykazoval nejnižší vliv a působil nejmenší změny biochemických ukazatelů a odchylky v hematologickém složení krve sledovaných jedinců mníka jednovousého.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ackerman, P. A., Morgan, J. D., Iwama, G. K., 2005. Les Anesthésiques 1.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T. F., Forlin, L., 2008. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar. Environ. Res.*, 66(2), 271-277.
- Azzi, A., Davies, K. J. A., Kelly, F., 2004. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett.*, 558(1), 3-6.
- Bailey, M., 1972. Age, growth, reproduction and food of the burbot, *Lota lota* (L), in Southwestern lake superior. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 101(4), 667-674.
- Barton, B., Helfrich, H., 1981. Time-dose responses of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) to 2-phenoxyethanol. *Prog. Fish. Cult.*, 43(4), 223-231.
- Baruš, V., Oliva, O., 1995. Mihulovci a ryby. Vyd. 1. Praha: Academia, 1995, 623 s. Fauna ČR a SROV., 330-337 s.
- Berg, L. S., 1949. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries III, 7 – 14. Akademia Nauk SSSR, Zoologicheskii Institut, Moscow (English translation by Izrael Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1965).
- Bhavan, P. S., Geraldine, P., 2001. Biochemical stress response in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Phys.*, 70(1), 27 – 41.
- Brown, L. A., 1988. Tropical fish medicine. Anesthesia in fish. *Vet. Clin. North. Am.*, 18(2), 317-330.
- Brožová, V., Svobodová, Z., 1986. Anaesthetics for fish. *Bull VURH Vodňany*, 20, 36-40.
- Celik, E. S., 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotein and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus*) in the Dardanelles. Turkey. *J. Biol. Sci.*, 4(6), 716-719.
- Cohen, D., T. Inada, T. Iwamoto, N. Scialabba., 1990. Gadiform fishes of the world : Order Gadiformes, an annotated and illustrated catalogue. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 10, 90-317.
- Colombo, J. P., 1994. Klinisch-chemische Urindiagnostik. Labofile-Verlagsgemeinschaft, Rotkreuz Schweiz, pp. 153.
- Congleton, J. L., 2006. Stability of some commonly measured blood-chemistry variables in juvenile salmonids exposed to a lethal dose of the anaesthetic MS-222. *Aquacult. Res.*, 37(11), 1146-1149.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M., and Tidwell, J. H., 2004. Anesthetics in aquaculture (No. 3900). Publication 3900, Stoneville, Mississippi: Southern Regional Aquaculture Center., pp 1-6.
- Curtis, E. K., 1990. In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry. *Bull. His. Dentist.* 38(2), 9-14.

- Čítek, J., Svobodová, Z., Tesarčík, J., 1997. General prevention of fish diseases. Diseases of Freshwater and Aquarium Fish. Informatorium, Prague. pp 9-49.
- Dillen, A., Coeck, J., Monnier, D., 2008. Habitat use and seasonal migrations of burbot in lowland rivers in North France. Pages 29-42 in V. L. Paragamian and D. Bennett, editors. Burbot: Ecology, Management, and Culture. American Fisheries Society, Symposium 59, Bethesda, Maryland.
- Dubský, K., Šrámek, V., Kouřil, J., 2003. Obecné rybářství. Vyd. 1. Praha: Informatorium (18)s. barev. obr. Živou přírodou, 308 s.
- Dyk, V., 1952. Doplnky k anatomii mníka jednovouseho (*Lota lota* L.) Spisy Vys. Školy veterinární Brno, 20 (8), 159 – 168s.
- Endo, T., Ogishima, K., Takana, H., Ohshima, S., 1972. Studies on the anaesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. Bull Japan Soc. Sci. Fish., 38(7), 761-767.
- Fabricius, E., 1954. Aquarium observations on the spawning behaviour of the burbot, *Lota vulgaris* L. L. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm, 35, 5-57.
- Fish, R. E., Brown, M. J., Danneman P. J., Karas, A. Z., 2008. Analgesia in Laboratory Animals. 665, 528 - 529.
- Fisher, I. U., Von Uhrh, G. H., Denger, H. J., 1990. The metabolism of eugenol in man. Xenobiotica, 20(2), 209-222.
- Fischer, P., 1999. Otolith microstructure during the pelagic, settlement, and benthic phases in burbot. J. Fish. Biol., 54(6), 1231-1243.
- Folmar, L. C., 1993. Effect of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effect. Environ. Toxicol. Chem. 12(2), 337 – 375.
- Gallardo, M. Á., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padrós, F., Blasco, J., Fernández-Borràs, J., Sánchez, J., 2003. Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquacult., 223(1), 15-27.
- Gilbert, P. W., Wood, F. G., 1957. Method of anesthetizing large sharks and rays safely and rapidly. Science, 126(3266), 212-213.
- Gomulka, P., Własow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., Chmielinska, E., 2008. Effects of eugenol and MS-222 anaesthesia on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt.) Acta. Vet. Brno, 77(3), 447-453.
- Hajek, G., Kzyszejko, B., 2004. The effects of Propiscin (etomidate) on the behaviour, heart rate, and ventilation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta. Ichtyol. Piscat. 34(2), 129 – 143.
- Hamáčková, J., Kozák, P., Lepič, P., Kouřil, J., 2008. Artificial reproduction and rearing hatching material Vimba bream (*Vimba vimba* L.). Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany, Methods No. 82, 14
- Hamáčková, J., Sedova, J. M., Pjanova, S. V., Lepičová, A., 2001. The effect 2-phenoxyethanol, clove oil and Propiscin anaesthetics on perch (*Perca fluviatilis*) in relation to water temperature. J. Anim. Sci., 46, 469 – 473.

- Hikasa, K., 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp (*Cyprinus carpio*). Jpn. J. Vet. Sci., 48(2), 341-351.
- Hofmanová, J., Machala, M., Kozubik, A., 2000. Epigenetic mechanisms of the carcinogenic effects of xenobiotics and in vitro methods of their detection. Folia Biol., 46(5), 165-173.
- Holcomb, M., Woolsey, J., Cloud, J. G., Ingermann, R. L., 2004. Effects of clove oil, tricaine, and CO<sub>2</sub> on gamete quality in steelhead and white sturgeon. N. Am. J. Aquacult, 66(3), 228–233.
- Houston, A. H., Woods, R. J., 1976. Influence of temperature upon tricaine methane sulphonate uptake and induction of anesthesia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 54(1), 1–6.
- Hovda, J., Linley, T. J., 2000. The potential application of hypothermia for anesthesia in adult Pacific salmon. N. Am. J. Aquacult 62(1), 67-72.
- Huang, C. H., Chang, R. J., Huang, S. L., Chen, W. L., 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). Comp. Biochem. Physiol. B., 134(2), 265-270.
- Hussein, M., Wada, S., Hatai, K., Yamamoto, A., 2000. Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. J. Aquat. Animal Health, 12(3), 224 -229.
- Chen, L. C., 1969. The biology and taxonomy of the burbot, *Lota lota leptura*, in interior Alaska. University of Alaska. Institute of Arctic Biology.
- Iverzen, M., Finstad, B., Mckinley, R. S., Eliassen, R. A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Agui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon stress—reducing capacity. Aquacult., 221, 549-566.
- Kaneko, K., 1982. On the removal of larger freshwater fishes. Mar. Parks Aquária, v. 11, pp. 39–45.
- Kaplan, L. A., Pesce, A. J., 1989. Clinical Chemistry. CV Mosby Copany, St. Louis, pp 186.
- Kazuń, K., Siwicki, A. K., 2012. Propiscin—a safe new anaesthetic for fish. Arch. Pol. Fish., 20(3), 173-177.
- Kazuń, K., Siwicki, A. K., Glabski, E., 1999. Badania nad przydatnościa preparatu Propiscin do znieczulenia ogólnego ryb karpiovatych. In: Sb. IV. Krajowa konferencija hodowcow karpia. Wyd. IRS Olsztyn, pp. 57-60 (in Polish).
- 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(2), 89-101.
- Kidd, R. B., Banks, G. D., 1990. Anesthetizing lake trout with tricaine (MS-222) administered from a spray bottle. Prog. Fis. Cult., 52(4), 272-273.
- Kirillov, A., 1988. Burbot of Vilyusk Reservoir. J. Ich., 28(2), 49-55.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2006. Testování veterinárních léčivých přípravků pro ryby podle norem EU. Veterinářství, 56(1), 31-34 .

- Kolářová, J., Velišek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, J., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Plačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Elimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2007. Anestetika pro ryby, Vyd. Jihočeská univerzita v Č. B. Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, ISBN 978-80-85887-61-7, 6-13s.
- Kouřil, J., Linhart, O., Dubský, K., Kvasnička, P., 1985. The fertility of female and male burbot (*Lota lota* L.) reproduced by stripping. Pápera of the Vodňany Research Institute of Fishery and Hydrobiology, 14, 75 – 79.
- Křišťan, J., Stará, A., Turek, J., Polícar, T., Velišek, J., 2012. Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.). Neuroendocrinol. Lett., 33(Suppl 3), 66-71.
- Kucharczyk D., Mamcarz, A., Skrzypczak, A., Kujawa, R., Babiak, I., 1998. Artificial spawning of burbot (*Lota lota* L.) under controlled conditions. Europ. Aquacult. Soc. Spec. Publ., 26, 149–150.
- Lepič, P., Stará, A., Turek, J., Kozák, P., Velišek, J., 2014. The effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in vimba bream, *Vimba vimba*. Vet. Med., 59, 81-87.
- Li, Z. H., Xie, S., Wang, J. X., Sales, J., Li, P., Chen, D. Q., 2009. Effect of intermittent starvation on growth and some antioxidant indexes of (*Macrobrachium nipponense*) (De Haan). Aquac. Res., 40(5), 526-532.
- Limsuwan, C., Grizzle, J. M., Plumb, J. A., 1983. Etomidate as an anesthetic for fish: its toxicity and efficacy – Trans. Am. Fish. Soc., 112(4), 544-550.
- MacCrimmon, H., 1959. Observations on Spawning of Burbot in Lake Simcoe, Ontario. J. Wildlife. Manage., 23(4), 447 – 449.
- Marking, L. L., Meyer, F. P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? Fisheries, 10(6), 2-5
- Masopust, J., 2000. Clinical biochemistry. Karolinum Praha, pp 429.
- McCord, J. M., Keele, B. B., and Fridovich, I., 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. P. Natl. Acad. Sci, 68(5), 1024-1027.
- McFarland, W. N., Klontz, G. W., 1968. Anesthesia in fishes. In *Federation proceedings* .Vol. 28, No. 4, pp. 1535-1540.
- McPhail, J. D., Paragamian, V. L., 2000. Burbot biology and life history. Burbot biology, ecology, and management, 11-23.
- McPhail, J. D., Lindsey, C. C., 1970. Freshwater fishes of northwestern Canada and Alaska. Fisheries Research Board Canada, Bulletin 173 Ottawa.
- Morrow, J., 1980. The Freshwater Fishes of Alaska. University of British Columbia Resource Ecology Library: University of British Columbia.
- Musil, J., 1991. Základy biochemie chorobných procesů. Avicenum, Praha, 321s.

- Muth, K., Smith, L. L., 1974. The burbot fishery in Lake of the Woods. Vol. 296. Agricultural Experiment Station, University of Minnesota.
- Neff, J. M., 1985. Use of biochemical measurement to detect pollutant – mediated damage to fish. ASTM Special Technical Publication, 854, 155 – 183.
- Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K., Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Therm. Biol., 22(2), 151–156.
- Plumb, J. A., Schwedler, T. E., Limsuwan, C., 1983. Experimental anesthesia of three species of freshwater fish with etomidate. Prog. Fish. Cult., 45(1), 30-33.
- Pravda, D., Paláčková, J., 1989. Vybrané hematologicko-biochemické parametry pstruha duhového (*Salmo gairdneri* Rich.) v průmyslových chovech ryb. In: Chov lososovitých ryb. Sborník referátů z konference, ČSVTS při VÚRH a SRŠ ve Vodňanech, s.264-267.
- Pucéa, M., Garin, D., Fréminent, A., 1989. Inhibitory effect of anaesthesia with 2-phenoxyethanol as compared to MS222 on glucose release in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 94(2), 221-224.
- Riede, K., 2004. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final report of the R&D Projekt 808 05 081. Bonn, Germany: Federal Agency for Nature Conservation. ISBN 3-7843-3845-3. pp 5-317.
- Roach, S. M., Evenson, M. J., 1993 A Geometric approach to estimating and predicting the fecundity of tanana river burbot. Alaska Department of Fish and Game, Juneau, AK. Fisheries Data Series, 93-38, pp 1-36.
- Ross, L., Ross, B., 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell Science, Oxford, UK. pp 159.
- Řehulka, J., 1998. Blood indices of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aeromonas-induced ulcerous dermatitis. Acta Vet. Brno, 67, 317-322.
- Řehulka, J., 1997. Haematological parameters in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in cage culture. Živoč. Vyr. 47, 159-164.
- Soto, C. G., Burhanuddin, S., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (*Siganus lineatus*). Aquaculture, 136(1-2), 149-152.
- Scott, W. B., Crossman, E. J., 1973. Freshwaters fishes of Canada. Fisheries Research Board Canada, Bulletin. Vol. 184. Ottawa.
- Schneiderka, P., 2004. Kapitoly z klinické biochemie. Karolinium, Praha, 365 s.
- Simpson, J. C., Wallace, R. L., 1978. Fishes of Idaho. University Press of Idaho. Moscow.
- Siwicki, A., 1984. New anaesthetic for fish – Aquaculture, 38(2), 171-176.
- Small, B. C., 2003. Anaesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quin-aldine and clove oil anaesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 218(1), 177–185.

- Sorokin, V. N., 1971. The spawning and spawning grounds of the burbot, *Lota lota* (L.). J. Ichth., 11(6), 907–915.
- Stupka, Z., 2002. Porovnání účinku vybraných anestetik pro různé druhy ryb. Diplomová práce, ZF JU České Budějovice, 117 s.
- Summerfelt, R. C., Smith, L. S., 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: Schreck C. B., Moyle P. B. (eds.) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA. pp. 213-272.
- Svoboda M., Kolářová J., 1999. A survey of anaesthetics used in the fish farming. Health protection of Fish – Proceedings of Conference Papers. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodňany (In Czech), pp 49-72.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Palaková, J., 1986. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany. Methods, No 22, pp 31.
- Svobodová, Z., 2015. Léčebné koupele ryb a jejich vliv na imunitní systém. Therapeutic baths of fish and their effect on the immune system. Ochrana zvířat a welfare 2015 animal protection and welfare. ISBN 978-80-7306-759-6. 47-51s.
- Szkudlarek, M., Zakes, Z., 1996. Application of Propiscin for total anesthesia of pikeperch (*Stizostedion lucioperca* L.). Komunikaty Rybackie, 6,7 – 8 (in Polish).
- Taylor, P. W., Roberts, S. D., 1999. Clove oil: An alternative anaesthetic for aquaculture. North Am. J. Aquacult., 61(2), 150-155.
- Thomas, P., Robertson, L., 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. Aquaculture, 96(1), 69-86.
- Tolanen, A., Kjellmann, J., Lappalainen, J., 1999. Diet overlap between burbot (*Lota lota* L.) and whitefish (*Coregonus larvaretus* L.) in a subarctic lake. Ann. Zool. Fennici, 36, 205-214.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H., 1995. Persistent oxidative stress in cancer - hypothesis. FEBS Lett, 358(1), 1-3.
- Treves-Brown, K. M., 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht /London, pp. 309.
- Trzebiatowski, R., Stepanowska, K., Siwicki, A. K., Kazuń, K., 1996. Badania nad przydatnością preparatu propiscin do znieczulenia ogólnego sumy europejskiego. Komunikaty Rybackie (Olsztyn), 1, p. 14-18 (in Polish).
- Vandergoot, C. S., Murchie, K. J., Cooke, S. J., Dettmers, J. M., Bergstedt, R. A., Fielder, D. G., 2011. Evaluation of two forms of electroanesthesia and carbon dioxide for short-term anesthesia in walleye. N. Am. J. Fish. Manage. 31(5), 914-922.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Groch, L., Nepejchalová, L., 2005a. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet. Med. Czech, 50(6), 269-275.



- Velíšek, J., Stará, A., Li, Z. H., Silovská, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*, 310(3), 369-375.
- Velíšek, J., Stejskal, V., Kouřil, J., Svobodová, Z., 2009. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch (*Perca fluviatilis*) *Aquac. Res.*, 40(3), 354-361.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2007a. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on haematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Brno*, 76(3), 487-492.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Novotný, L., Bláhová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinární Medicína.*, 53(6), 324 – 332.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2005b. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Brno*, 74(1), 139-146.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, L., 2007b. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *Vet. Med. Praha-*, 52(3), 103.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, L., Ziomek, E., 2006. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). *Acta Vet. Brno*, 75(1), 99-106.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., 2004. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta Vet. Brno*, 73(2), 247-252.
- Vught, I., Harzevilly, A. S., Auwerx, J., De Charleroy, D., 2008. Aspects of reproduction and larviculture of burbot under hatchery conditions. In V. L. Paragamian, and D. H. Bennet (Eds.), *American Fisheries Society Symposium*, Vol. 59, pp 167.
- Walmsley, R. N., Watkinson, L. R., Koay, E. S. C., 1992. Cases in chemical pathology – a diagnostic approach. *World Scientific*, pp. 125 – 136.
- Weyl, O., Kaiser, H., Hecht, T., 1996. On efficacy and mode of 2-phenoxyethanol as an anesthetic for gold fish, (*Carassius auratus* L.), at different temperatures and concentrations. *Aquac. Res.*, 27(10), 757-764.
- Wilga, C. D., Lauder, G. V., 1999. Locomotion in sturgeon: function of the pectoral fins. *J. Exp. Biol.* 202(18), 2413-2432
- Woche, H., Harsányi, A., Schwarz, F. J., 2011. Husbandry conditions in burbot (*Lota lota* L.): Impact of shelter availability and stocking density on growth and behaviour. *Aquacult.*, 315(3), 340-347.
- Woche, H., Harsányi, A., Schwarz, F. J., 2012. Larviculture of burbot (*Lota lota* L.) larval rearing using *Artemia* and weaning onto dry feed. *Aquac. Res.*, 44(1), 106-113.
- Wolnicki, J., Kamiński, R., Myszkowski, L., 2002. Temperature-influenced growth and survival of burbot *Lota lota* (L.) larvae fed live food under controlled conditions. *Arch. Ryb. Polskiego*, 10(1), 109-114.

- Wong, A., 2008. Lipidic profiles of tissue and liver oil of burbot, *Lota lota* (L.). Acta. Ichtyol. Piscat., 38(1).
- Woody, R. G., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. J. Fis. Biol., 60(2), 340-347.
- Zarski, D., W. Sasinowski, W., Kucharczyk, D., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Targońska, K., 2009. Mass initial rearing of burbot *Lota lota* (L.) larvae under controlled conditions. Pol. J. Natur.Sc., 24, 76–84.

**Internetové zdroje:**

[www.chytej.cz](http://www.chytej.cz)

[www.BioLib.cz](http://www.BioLib.cz), (PUBLIC-DOMAIN) Tomáš Zapletal

## 8. Abstrakt

Cílem této studie bylo porovnat účinnost a efektivitu čtyř anestetik na hematologický a biochemický profil krve mníka jednovousého. Hodnocení obou profilů probíhalo okamžitě po 10 minutové anestézii a 24 hodin od anestézie v MS – 222 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), hřebíčkovým olejem ( $33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 2 – phenoxyethanolem ( $0,30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Propiscinem ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v porovnání s kontrolní skupinou ryb, které anestézii nepodstoupily. Testovaná anestetika neměla u mníka jednovousého významný vliv na jeho hematologický profil. Biochemický profil vykazoval významné zvýšení v hladině glukózy a amoniaku po anestézii Propiscinem, 2 – phenoxyethanolem a hřebíčkovým olejem. Hladina celkových proteinů a vápníku byla významně zvýšena po anestézii 2 – phenoxyethanolem, hřebíčkovým olejem a Propiscinem. Úroveň albuminu vykazovala významné zvýšení u MS – 222, hřebíčkového oleje, 2 – phenoxyethanolu a Propiscinu. Aktivita aspartát aminotransferázy významně vzrostla po anestézii s MS – 222 a hřebíčkovým olejem. Aktivita kreatinkinázy byla významně snížena po anestézii v hřebíčkovém oleji. Významné snížení hladiny laktátu bylo pozorováno u 2 – phenoxyethanolu. Úroveň amylázy byla významně snížena u anestetika MS – 222. Anestetikum MS – 222 vykazovalo minimální vliv na hematologický a biochemický profil krve, a proto bylo označeno jako ideální anestetikum pro mníka jednovousého.

Klíčová slova : MS – 222, 2 – phenoxyethanol, hřebíčkový olej, Propiscin, krevní obraz, mník jednovousý.

## 9. Abstract

The aim of this study was to compare the effect of four anaesthetics on haematological and biochemical blood profiles in burbot (*Lota lota* L.). Both blood profiles of burbot were evaluated 10 min and 24 h after anaesthesia with MS 222 (100 mg·l<sup>-1</sup>), clove oil (33 mg·l<sup>-1</sup>), 2-phenoxyethanol (0.30 ml·l<sup>-1</sup>), Propiscin (1 ml·l<sup>-1</sup>) and were compared to non-anaesthetised control. The tested anaesthetics did not have any effect on haematological profile of burbot. The exposure to clove oil, 2-phenoxyethanol and Propiscin significantly influenced level of ammonia and glucose. The level of lactate was significantly increased following anaesthesia with 2-phenoxyethanol and Propiscin. The levels of total protein, aspartate aminotransferase and calcium were higher with clove oil, 2-phenoxyethanol and Propiscin compare to control. The use of MS 222 showed the smallest effect on haematological and biochemical blood profile and is recommended as a suitable anaesthetic for burbot.

Key words : MS – 222, 2 – phenoxyethanol, clove oil, Propiscin, blood count, Burbot.