

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce
Histologie žaber ryb – zpracování a vyhodnocení
preparátů

Autor: Jakub Kocour

Vedoucí bakalářské práce: MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Dipl. Biol. Christoph Antonius Steinbach, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, obor Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: 3.

České Budějovice, 2022

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, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí bakalářské práce MVDr. Elišce Zuskové, Ph.D., i svému konzultantovi Dipl. Biol. Christophu Antoniu Steinbachovi, Ph.D. a v neposlední řadě také pracovníkům VÚRH, za cenné rady, připomínky, ale i za jejich čas, který mi věnovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jakub KOCOUR**
Osobní číslo: **V19B008P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Téma práce: **Histologie žaber ryb – zpracování a vyhodnocení preparátů**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Histologie je vědní disciplína, která se zabývá studiem mikroskopické struktury živočišných tkání a orgánů mnohobuněčných organismů. Histologické vyšetření může odhalit příznaky a důsledky onemocnění, které nelze zachytit běžným makroskopickým vyšetřením, a proto je vhodným diagnostickým nástrojem při sledování zdravotního stavu ryb. Ačkoli jsou histologické metody zpracování tkání ryb v podstatě shodné s těmi, které se používají u savců, jsou zde různé odchylky, které je důležité znát pro správné histopatologické vyhodnocení. Žábry ryb, jakožto multifunkční orgán, jsou stále relativně málo využívány pro hodnocení zdravotního stavu. Je to orgán, který je extrémně citlivý na všechny typy zacházení a nepříznivé změny vnějšího i vnitřního prostředí. Cílem práce je popsat strukturu žaber, kritická místa jejich histologického zpracování a klasifikovat morfologické léze vznikající pod vlivem různých biologických a fyzikálně-chemických faktorů. K průběhu histologického zpracování žaber provést podrobnou fotodokumentaci.

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**
Rozsah grafických prací: **10 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Genten F., Terwinghe E., Danguy A. (eds.) 2008. Atlas of Fish Histology. Science Publishers. Enfield, NH, USA, 223 pp.
Takashima F. T., Hibiy A. (eds.) 1995. An atlas of fish histology: Normal and Pathological features. 2nd edition. Kodansha Ltd, Tokyo, 195 pp.
Bancroft J.D., Gamble M. (eds.) 2008. Theory and practice of histological techniques. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia, PA, USA, 744 pp

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Dipl.-Biol. Christoph Steinbach**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 8. ledna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 2. května 2022


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

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


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

V Českých Budějovicích dne 25. ledna 2021

Obsah:

1. ÚVOD DO HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ RYB	9
2. ŽÁBRY	10
2.1. Morfologický popis	10
2.2. Cévní systém	13
2.2.1. Arterio-arteriální cévní systém	13
2.2.2. Arterio-venózní cévní systém	15
2.3. Nervový systém	15
2.4. Epitel	15
2.5. Buněčné typy	16
2.5.1. Podpůrné buňky „Pillar cells“	16
2.5.2. Epitelové buňky „Pavement cells“	17
2.5.3. Nediferencované buňky	18
2.5.4. Hlenové buňky	18
2.5.5. Neuroepiteliální buňky	19
2.5.6. Chloridové buňky (buňky bohaté na mitochondrie)	19
2.5.6.1. Chloridové buňky u druhů žijících ve slané vodě	20
2.5.6.2. Chloridové buňky u druhů žijících ve sladké vodě	21
3. FYZIOLOGICKÉ FUNGOVÁNÍ ŽABERNÍHO APARÁTU	22
3.1. Přenos a výměna plynů	22
3.1.1. O ₂ chemoreceptory	23
3.1.2. CO ₂ chemoreceptory	23
3.1.3. Přenos O ₂	23
3.1.4. Přenos CO ₂	24
3.2. Osmoregulace a iontová rovnováha	24
3.2.1. Osmoregulace u sladkovodních ryb	24
3.2.1.1. Příjem Na ⁺	25

3.2.1.2. Příjem Cl ⁻	25
3.2.1.3. Příjem Ca ²⁺	26
3.2.1.4. Prostupnost vody.....	26
3.2.2. Osmoregulace u mořských ryb	27
3.3. Regulace pH na žábrách ryb	28
3.3.1. Respirační a metabolická kompenzace.....	28
3.4. Dusík	29
3.4.1. Amoniak	29
3.4.2. Močovina.....	30
3.4.3. Dusitany.....	30
3.5. Hormonální kontrola	31
3.5.1. Prolaktin	31
3.5.2. Kortizol.....	31
4. METODY HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ SE ZAMĚŘENÍM NA ŽÁBRY	32
4.1. Odběr vzorku.....	32
4.2. Fixace	33
4.2.1. Fyzikální fixace	34
4.2.2. Chemická fixace	35
4.3. Odvápňení	36
4.4. Odvodnění	37
4.5. Prosycení tkáně rozpouštědlem a zalití do média	39
4.6. Krájení na mikrotomu	41
4.7. Barvení preparátu	45
4.7.1. Základní druhy barviv	45
4.7.2. Postup barvení	47
4.7.3. Speciální barvicí techniky	49

4.7.3.1. Speciální barvicí techniky pro fyziologickou tkáň žaber.....	49
4.7.3.2. Speciální barvicí techniky pro stanovení infekčních agens	53
4.8. Montování	56
4.9. Vyhodnocování vzorků	57
5. KLASIFIKACE ZMĚN ŽABERNÍHO APARÁTU	58
6. ZMĚNY ŽABERNÍHO APARÁTU	62
7. ZÁVĚR	65
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67
9. ABSTRAKT	75
10. ABSTRACT.....	76

1. ÚVOD DO HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ RYB

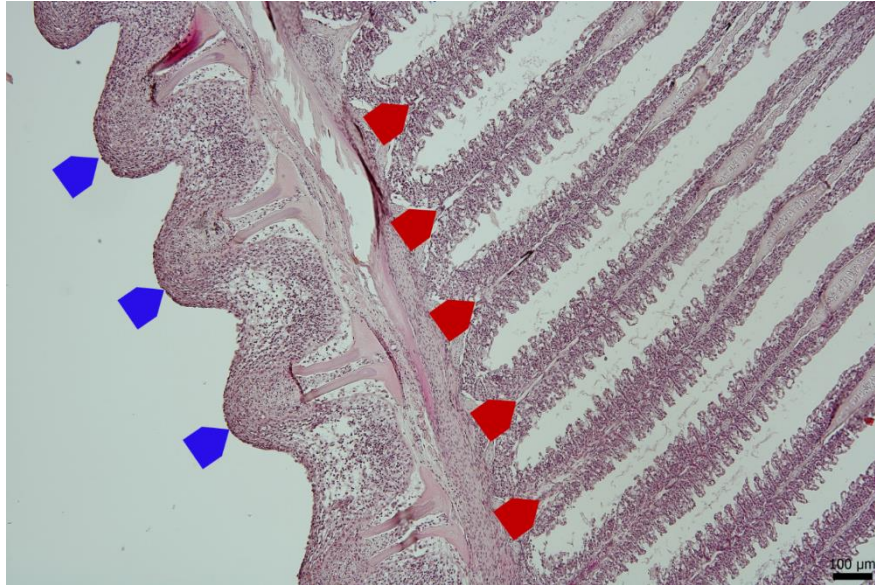
Histologie je nauka o mikroskopické stavbě a struktuře tkání organismů za pomoci jejich nakrájení na tenké řezy s následným obarvením (Genten a kol., 2009). Dle toho, jakou část organismu histologie zkoumá se dále dělí například na nauku o skladbě buňky (cytologii) nebo nauku o mikroskopické stavbě orgánů (mikroskopickou anatomii). Vznik histologie jako oboru je úzce spjat s vynálezem světelného mikroskopu, pomocí kterého můžeme tkáň zvětšit až 2000násobně (Vacek, 1988). Později byl vyvinut elektronový mikroskop, díky kterému můžeme sledovat mnohem detailněji struktury tkání, u kterých můžeme dosáhnout až 400krát většího zvětšení než pomocí světelné mikroskopie (Junqueira a kol., 1997). Při pozorování vzorku optickým mikroskopem využíváme paprsky procházejícího světla. Proto je potřeba vyrobit dostatečně tenký a dobře průsvitný preparát, který musíme předem odpovídajícím způsobem upravit. Úpravou tkání pro histologické pozorování se zabývá histologická technika. V počátcích byly histologické techniky velmi prosté. Příprava vzorku spočívala například v rozcupování tkáň či jejím rozmělněním mezi dvěma sklíčky (Vacek, 1988). S postupem času se přistoupilo k dnešním složitějším, ale také propracovanějším metodám. Jelikož je histologie naukou o mikroskopické struktuře tkání, je pro nás výborným nástrojem pro stanovování chorobných neboli patologických stavů organismů. Histologický obraz rybích orgánů je velmi podobný histologickému obrazu orgánů suchozemských živočichů (Takashima a Hibiya, 1995). Výjimku tvoří unikátní rybí žábry, které suchozemští živočichové nemají a vytváří tak specifický histologický obraz. Navíc jsou rybí žábry orgánem, který je v neustálém kontaktu s vodou a k tomu je to ještě orgán velice citlivý na okolní prostředí. Pomocí histologických technik můžeme odhalit známky onemocnění, které není schopen chovatel ryb ani nikdo jiný jednoduše identifikovat běžným vyšetřením obsádky ryb. Zdravotní stav ryb je v akvakultuře velmi důležitým parametrem, který nelze vyhodnocovat pouze na základě chování a fyzického stavu organismu. Histologie tkání patří do baterie přídatných vyšetření přispívajících ke stanovení správné diagnózy (Genten a kol., 2009). Tato práce se zaměřuje na využití histologického zpracování rybích žaber, které jsou vhodné pro mnoho různých typů vyšetření, neboť jsou v přímém styku s krví a probíhá na jejich povrchu řada chemických pochodů důležitých pro život organismu.

2. ŽÁBRY

2.1. Morfologický popis

Žábry ryb jsou tvořeny 4-mi páry žaberních oblouků (Dubský a kol., 2003), které jsou součástí *splanchokrania* (Dvořák a kol., 2020) a nacházejí se v žaberní dutině na okraji hltanu na kaudálním konci hlavy. Některé ryby, konkrétně ryby dýchající atmosférický kyslík, mohou mít počet žaberních oblouků redukován. Takto redukováný počet žaberních oblouků mají např. ryby z rodu *Anabas* (Bone a Moore, 2007). Žaberní oblouky tvoří párové kosti *os pharyngobranchiale*, *os epibranchiale*, *os ceratobranchiale* a *os hypobranchiale*. Vnější strana těchto kostí je opatřena jakýmsi žlábkem, ve kterém je uložena céva, která slouží pro přívod krve k žaberním lístkům. Na vnější okraj žaberních oblouků navazuje respirační tkáň (Obr. 1). Bez respirační tkáně bývá pátý oblouk, tvořený párovou kostí *os ceratobranchiale*. Některé ryby jej mají zakrnělý anebo ho mají zesílený a nese požerákové zuby (např. u *Cyprinidae*) (Dvořák a kol., 2020). Každý z žaberních oblouků je vybaven svaly umožňujícími získání co nejlepší pozice pro proudění vody (Evans a kol., 2005; Dubský a kol., 2003). Hlavní funkcí rybích žaber je výměna plynů. Přes žábry dochází také k exkreci amoniaku a dalších iontů podílejících se na osmoregulaci (Dubský a kol., 2003).

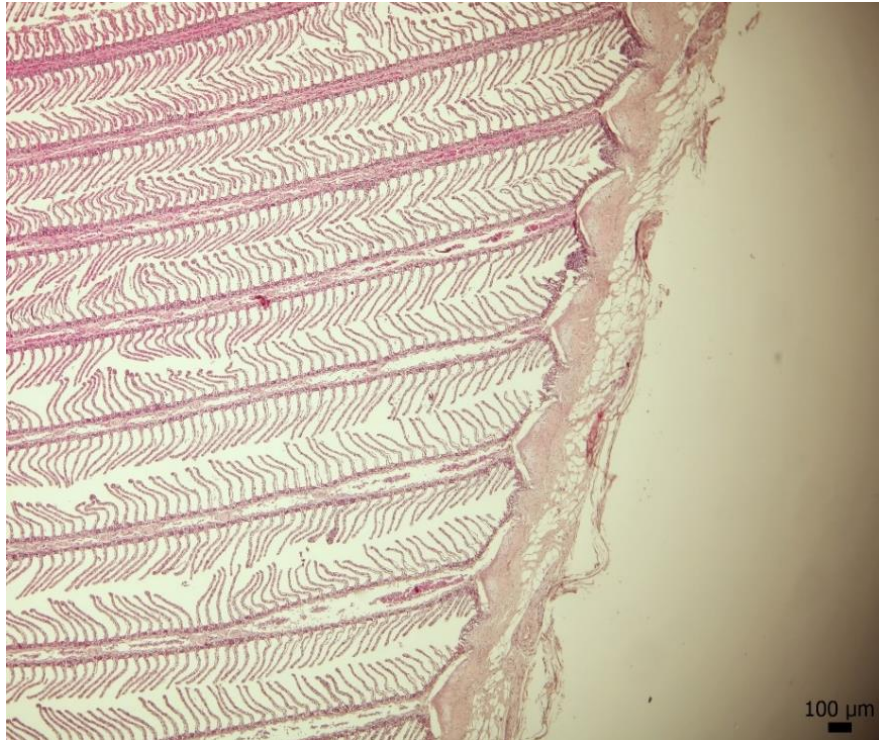
Na vnitřní straně (směrem do ústní dutiny) jsou žaberní oblouky opatřeny žaberními tyčinkami (Obr. 1). Ty rybám slouží k získávání potravy (filtrace) a zároveň ochraňují žaberní lístky před poraněním. Ryba přes ně filtruje potravu nasáváním vody ale i pouhým otevřením tlamy a plaváním. Počet žaberních tyčinek je druhově specifický. U některých druhů a jejich mezidruhových kříženců je dokonce důležitým taxonomickým znakem (Dubský a kol. 2003). Obecně lze říci, že hustější filtrační aparát mají ryby planktonofágní (např. *Hypophthalmichthys molitrix*) než ryby piscivorní (např. *Esox lucius*) (Dvořák a kol., 2020).



Obr. 1: Histologický podélný řez žaberním aparátem plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*), modré šipky označují žaberní tyčinky, červené šipky označují žaberní lístky, barveno H&E, zvětšeno 100×; foto: J. Kocour.

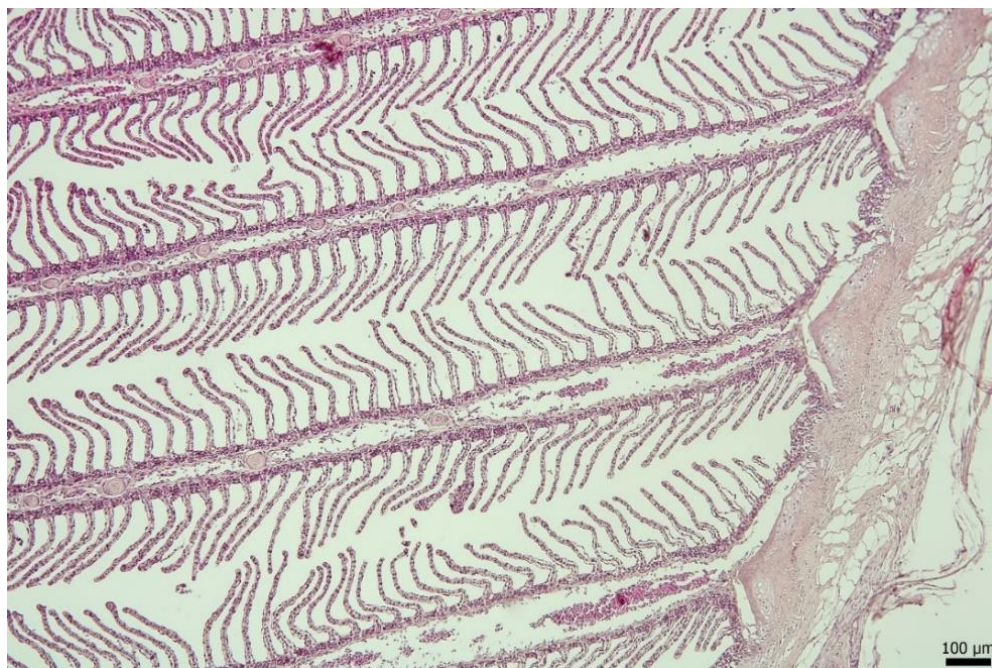
Vnější strana žaberních oblouků je opatřena žaberními lístky (Obr. 1, 2), které na každém oblouku tvoří 2 řady. Takto párově uložené dorzoventrálně zploštělé žaberní lístky na oblouku nazýváme primární žaberní lamela. Každá lamela má svou chrupavčitou oporu, přívodnou (aferentní) a odvodnou (eferentní) cévu a mnoho dalších propojujících cév. Přívodné a odvodné cévy vedou po celé délce primární lamely a v průběhu se větví na mnoho menších tepének. Každá přívodná tepna má jakousi rozšířeninu přibližně ve své první třetině od základu (Takashima a Hibiya, 1995), která funguje jako tzv. „branchiální srdce“. Každá primární lamela nese ze spodu a shora vedle sebe paralelně uspořádané půlkruhové ploché sekundární lamely, které jsou ve velkém počtu postaveny kolmo na primární lamely. V histologických řezech se bere jako pomyslná hranice mezi primární a sekundární lamelou tečna mezi epitelem nacházejícím se mezi dvěma sousedními sekundárními lamelami. Sekundární lamely velmi výrazně zvětšují plochu pro styk s vnějším prostředím, a tím významně zvětšují respirační plochu. Sekundární lamely jsou protkány tenkými cévami, které spojují přívodné a odvodné tepny a jsou pokryté slabým epitelem. Dochází zde k výměně plynů mezi organismem a vnějším prostředím. Povrch sekundárních lamel tvoří 96% plochy výměny plynů na žábřách (Hughes, 1972). Kromě velké plochy k výměně plynů významně přispívá i krátká difuzní vzdálenost mezi vodou a krví. V žaberních lístcích (primárních lamelách) jsou u

kostnatých ryb přítomna i svalová vlákna, která jsou důležitá při postavení žaberního lístku při průtoku vody okolo něj (Wilson a Laurent, 2002). Postavením žaberních lístků dochází k vytvoření jakéhosi jemného síta, přes které protéká voda.



Obr. 2: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), barveno H&E, zvětšeno 40×; foto: J. Kocour.

Žaberní dutinu překrývá a chrání skřelové víčko (Dubský a kol., 2003) tvořené operkulárními kostmi (*os operculare*, *os reoperculare*, *os interoperculare*, *os suboperculare*) (Dvořák a kol., 2020). Vnější okraj skřelového víčka je opatřen kožní řasou, která uzavírá žaberní dutinu při nasávání vody (Dubský a kol., 2003). Rozdíly mezi žábry ryb s rozdílnými životními potřebami porovnali Hoar a Randall (1984). Zjistili, že ryby pelagické, rychle plovoucí, mají mnohem větší plochu žaber než například benticky žijící žabohlavec americký (*Opsanus tau*) či lezoun indický (*Anabas testudineus*). Rovněž se liší difuzní vzdálenost krve, která je u tuňáka pouze 0,533 μm, zatímco u žabohlavce až 10 μm.



Obr. 3: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), barveno H&E, zvětšeno 100×; foto: J. Kocour.

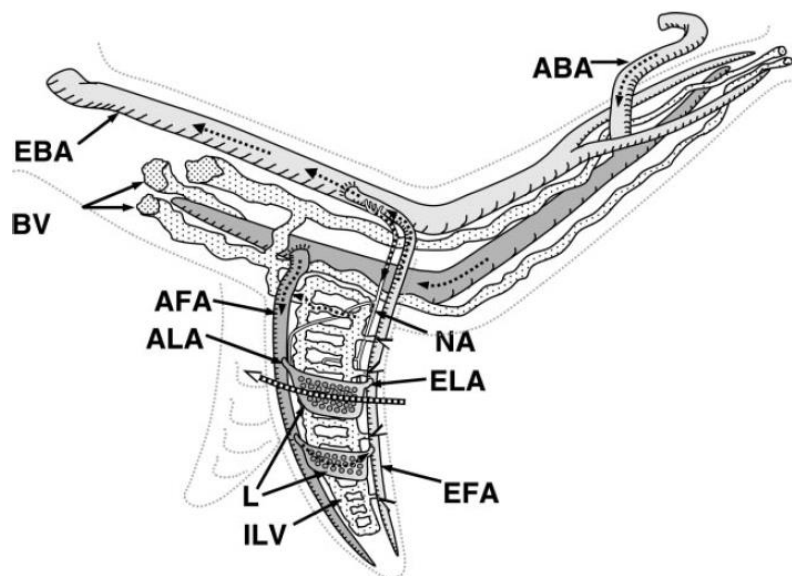
2.2. Cévní systém

Odkysličená krev se do žaber dostává přes břišní aortu a srdce (Dubský a kol., 2003), dále pokračuje do žaber aferentní (přívodnou) tepnou. Z té jsou zásobovány žaberní lístky, ve kterých dochází k okysličení krve. Ze žaberních lístků je sbírána krev do eferentní (odvodné) tepny, odkud je dále krev vedena do hřbetní aorty. Na rybích žábách rozlišujeme 2 typy cévních systémů arterio-arteriální a arterio-venózní.

2.2.1. Arterio-arteriální cévní systém

Cévy tohoto systému jsou často označovány jako dýchací, to z důvodu, že jsou odpovědné za přenos kyslíku mezi krví a okolním prostředím. V tomto systému jsou vyživovány vždy jednotlivé žaberní lístky, a to vždy aferentní (přívodnou) tepnou, která se rozkládá podél celé délky žaberního oblouku. U každého žaberního lístku se větví a tím vzniká síť aferentních (přívodných) vlásečnic. Vlasečnice mohou být vybaveny jakýmsi rozšířením či dilatacemi, u kterých se předpokládá, že hrají aktivní roli při tlumení tlaku pulzující krve. Rozšíření tohoto typu byla nalezena například u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) (Fromm, 1974) nebo u pstruha duhového (*Oncorhynchus*

mykiss) (Laurent a Dunel, 1976). Podél celé délky přívodních vlásečnic jsou pravidelně rozmístěné aferentní lamelární arterioly, které mohou zásobovat pouze jednu nebo i více sekundárních lamel. Průtok krve sekundárními lamelami probíhá v prostorách vymezených tzv. „podpůrnými buňkami“ („pillar cells“). Tyto prostory bývají často označovány jako lamelární sinusoidy. Potom, co rybí krev projde sekundárními lamelami, je sbírána do eferentních (odvodných) arterioly (kapilár). Odtud je dále vedena do eferentní vlásečnice. Směr proudění krve touto cévou je v opačném směru než u aferentní arterioly. V blízkosti přechodu eferentní (odvodné) vlásečnice do eferentní (odvodné) tepny se ve stěně nachází svalový svěrač. Tento svěrač je inervován a může hrát roli při regulaci průtoku krve sekundárními lamelami (Evans a kol., 2005). Po tom, co se rybí krev dostane do eferentní (odvodné) tepny, je krev dále vedena do hřbetní aorty, odkud je rozváděna do těla ryby. Směr toku krve v sekundárních lamelách je opačný než směr proudění vody. Tento fakt výrazně zvyšuje schopnost výměny plynů (Obr. 4) (Takashima a Hibiya, 1995).



Obr. 4: Schéma průtoku krve v cévním systému žaberních oblouků a žaberních lístků, ABA- aferentní tepna, AFA-aferentní vlásečnice, ALA-aferentní lamelární arterioly, ELA-eferentní arterioly, EFA-eferentní vlásečnice, EBA-eferentní tepna, L, ILV, NA, BV-cévy arterio-venózního systému; převzato z Evans a kol. (2005).

2.2.2. Arterio-venózní cévní systém

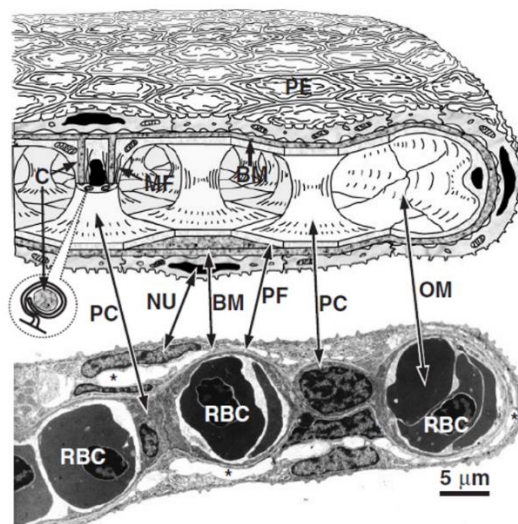
Systém je často označován jako nerespirační (Obr. 4). Jeho funkce není úplně jasná, ale pravděpodobně se podílí na zásobování žaberních tkání živinami (Evans a kol., 2005). Umožňuje vstup krve do žilního oběhu, aniž by tato krev prošla žaberními lamelami. Arterio-venózní systém je tvořen vysoce uspořádanou sítí cév, která připomíná žebřík. Krev vyskytující se v arterio-venózním systému se často vyznačuje nižším hematokritem než krev v arterio-arteriálním systému. To bylo prokázáno například u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Ishimatsu a kol., 1988; Olson, 1984).

2.3. Nervový systém

Nervová zakončení rybích žaber jsou odvozena od VII. (lícního), IX. (jazykohltanového) a X. (bloudivého) nervu. Kromě prvního žaberního oblouku jsou všechny oblouky inervovány X. bloudivým nervem. Histochemickými studii byla popsána nervová vlákna spojená s aferentními, eferentními tepnami a vlásečnicemi (Evans, 1998).

2.4. Epitel

Epitel pokrývající primární a sekundární lamely je odlišný jednak svým umístěním, ale také i tloušťkou krevního oběhu. Epitel primárních lamel je silnější než epitel sekundárních lamel, neboť je složený z více vrstev buněk. V epitelu primárních lamel se vyskytuje velké množství velkých chloridových a hlenových buněk. Epitel sekundárních lamel je dlaždicový (Obr. 5). Obsahuje také endotelové buňky, kterým se říká podpůrné buňky („pillar cells“). Neobsahuje ale chloridové ani hlenové buňky. U některých ryb lze nalézt výjimky (Wilson a Laurent, 2002).



Obr. 5: Schématický náčrt průřezu sekundární žaberní lamelou a mikrofotografie pořízená transmisním elektronovým mikroskopem, PC- podpůrné buňky „pillar cells“, NU- jádra epitelových buněk, PF- „příruby“ (napojení) podpůrných buněk na okolní buňky, PE- epitelové buňky „pavement cells“, RBC- erytrocyty, OM- vnější cévní prostor, BM- bazální membrána, MF- mikrofilamenta, C- kolagenní vlákna; převzato z Olson (2002) (upraveno).

2.5. Buněčné typy

2.5.1. Podpůrné buňky „Pillar cells“

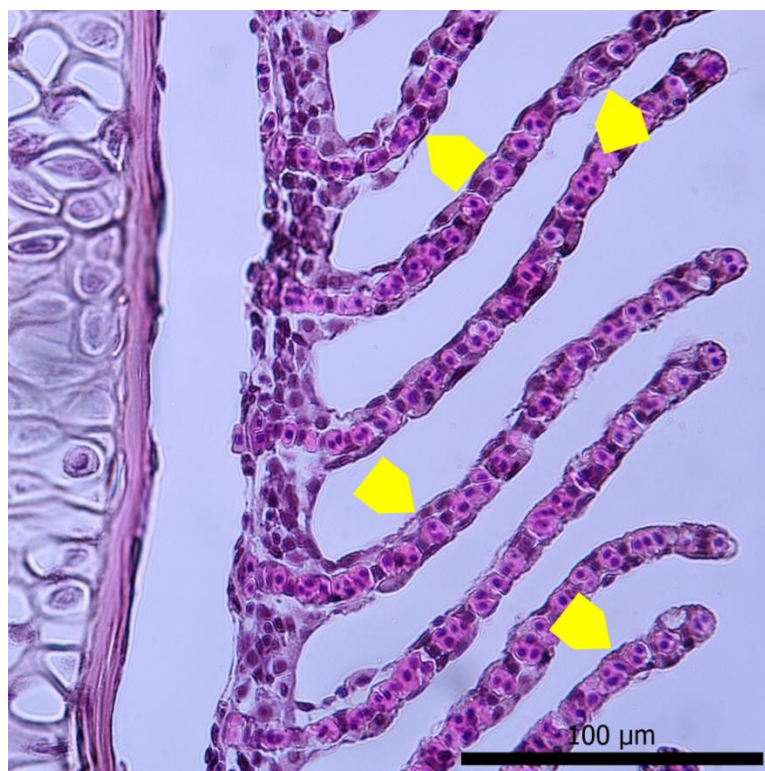
„Pillar cells“ jsou jedinečným typem endotelových buněk vyskytujících se pouze v rybích žábřácích, kde plní hlavně podpůrnou funkci (Obr. 5, 6). Hlavním úkolem tohoto typu buněk je vymezovat prostor pro krev. Skládají se z jakéhosi kmene, ve kterém se nachází centrum buňky. Jsou opatřeny tenkými rozšířeními cytoplazmy, jež mohou připomínat příruby, kterými jsou propojeny s dalšími podpůrnými buňkami. Dochází tak k vymezení celého prostoru pro krev (Evans a kol., 2005) a vytvoření podpůrného systému pro průběh tenkých vlásečnic. Podpůrné buňky jsou tvořeny kolagenovými sloupy buněčné membrány, které jsou umístěné kolmo na epitelové vrstvy (Bettex-Galland a Hughes, 1973). U pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) bylo *in vivo* mikroskopii prokázáno, že pomocí kontrakce podpůrných buněk dochází skrze lamelární sinusoidy k regulaci průtoku krve reagující na stres, hypoxii nebo aktivitu organismu (Evans a Claiborne, 2006; Sundin a Nilsson, 1998).



Obr. 6: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), zelené šipky označují podpůrné buňky „pillar cells“, barveno H&E, zvětšeno 600×; foto: J. Kocour.

2.5.2. Epitelové buňky „Pavement cells“

Známé také pod zkratkou PVC jsou nejhojněji vyskytující se buňky (více než 90%) žaberního epitelu (Obr. 5, 7) (Wilson a Laurent, 2002). Jsou dlaždicovitého až kubického tvaru s tvarově rozličnými jádry, též známé také jako buňky respirační. Jádra buněk dlaždicovitého tvaru bývají stlačená, zatímco jádra buněk kubického tvaru bývají zakulacená. Epitelové buňky obsahují malý počet mitochondrií a jsou propojeny pomocí mikrofilament umístěných v periferní cytoplazmě (desmozomy). Přítomny jsou také mezerovité spoje, pomocí kterých mezi sebou buňky komunikují. U kostnatých ryb, konkrétně euryhalinních druhů (např. *Anguilla Anguilla*) nebyla přítomnost těchto spojů prokázána (Sardet a kol., 1979). Apikální membrány těchto buněk jsou vybaveny mikrokly, které zvětšují jejich plochu pro výměnu plynů nebo iontů (Goss a kol., 1998). Některé PVC se účastní na aktivním příjmu iontů, a tím i na osmoregulaci organismu na úrovni žaber.



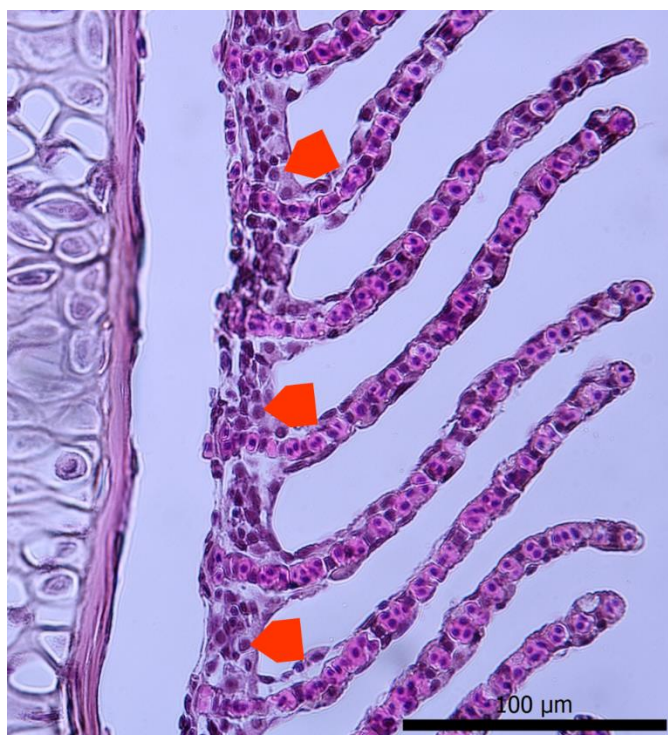
Obr. 7: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), žluté šipky označují epitelové buňky „pavement cells“, barveno H&E, zvětšeno 400×; foto: J. Kocour.

2.5.3 Nediferencované buňky

Na rybích žábřácích se vyskytují i nediferencované buňky. Nachází se hlavně v bazální epitelové vrstvě a jsou typické poměrem velkého jádra ku množství plazmy v buňce. Diferenciací těchto buněk vznikají chloridové a epitelové PVC buňky (Wilson a Laurent, 2002).

2.5.4. Hlenové buňky

Tyto buňky se také označují jako pohárkovité. Mají oválný tvar se zploštělým jádrem (Obr. 8). Cytoplazma obsahuje endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie, podílející se hlavně na tvorbě a transportu mucinu. Na žábřácích se nachází především na eferentních a aferentních okrajích primárních lamel (Takashima a Hibiya, 1995).



Obr. 8: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), červené šipky značí lokalizaci hlenových buněk, barveno H&E, zvětšeno 400×; foto: J. Kocour.

2.5.5. Neuroepiteliální buňky

Neuroepiteliální buňky se nacházejí hluboko v epitelu, po celé eferentní hraně žaberního vlákna, nejvíce však na jeho konci. Zajímavostí těchto buněk je jejich inervace. Nacházejí se uvnitř žaberního vlákna a předpokládá se, že fungují jako sensory kyslíku ve vodě a podílejí se tak na regulaci průtoku krve tím, že produkují serotonin (Wilson a Laurent, 2002).

2.5.6. Chloridové buňky (buňky bohaté na mitochondrie)

Tyto buňky jsou též známé pod názvem „mitochondria rich cells“ či buňky bohaté na mitochondrie. Zatímco epitelové buňky se nacházejí v průběhu celých žaberních lamel, chloridové buňky se vyskytují hlavně na aferentních (zadních) stranách primárních lamel a v místech mezi sekundárními žaberními lamelami. V epitelu sekundárních lamel se tyto buňky zpravidla nevyskytují. Hlavním znakem těchto buněk je jejich tvar, velikost a počet mitochondrií. Oproti okolním buňkám žaberního epitelu jsou veliké a mají vejčitý

tvár. Rozdílný je i počet mitochondrií uvnitř těchto buněk. Buňky bohaté na mitochondrie lze na podkladě funkce a struktury rozdělit do tří skupin typických pro danou kategorii ryb (Evans a kol., 2005). V této práci se budu věnovat pouze jedné skupině buněk bohatých na mitochondrie, které se nacházejí u kostnatých ryb. Zde jsou také nejčastěji označovány jako „chloridové buňky“.

Jednou z funkcí chloridových buněk je vylučovat soli během adaptace na mořskou vodu (Foskett a Scheffey, 1982). Novější studie jim připisují u ryb adaptovaných na sladkou vodu příjem iontů Na^+ a Cl^- v prostředí s nízkým obsahem vápníku (Hirose a kol., 2003).

2.5.6.1. Chloridové buňky u druhů žijících ve slané vodě

Významným znakem těchto buněk je složitý tubulární systém tvořený rozsáhlými záhyby bazolaterální membrány (Philpott, 1980) a zasahující do majoritní části buněčné cytoplazmy. Je to místo exprese aktivního transportního enzymu Na^+ - K^+ -ATP-ázy, který se podílí na exkreci NaCl těmito buňkami (Karnaky a kol., 1976). Apikální membrána buněk je konkávní, zapuštěná, tvořící jakési póry mezi epitelovými buňkami. Membrána je opatřena mikrokly a je funkčně nespécializovaná (Kültz a Somero, 1995). Mezibuněčné spoje chloridových a epitelových buněk jsou těsné a tvoří relativně nepropustnou bariéru pro ionty (Sardet a kol., 1979). Zejména u mořských ryb se chloridové buňky vyskytují v mnohobuněčných komplexech ještě spolu s takzvanými akcesorními buňkami (AC). Ty obsahují také velké počty mitochondrií, ale velikostně jsou mnohem menší. Dokonce i jejich tubulární systém je méně vyvinutý a stupeň exprese Na^+ - K^+ -ATP-ázy je u nich také nižší. Jejich skutečná funkce je sporná. U pstruha obecného (*Salmo trutta*) AC vypadají jako samostatný buněčný typ (Pisam a kol., 2000). U tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) jsou AC pouze vývojovým stadiem buněk bohatých na mitochondrie (Wendelaar Bonga a kol., 1990; Wendelaar Bonga a Van Der Meij, 1989).

2.5.6.2. Chloridové buňky u druhů žijících ve sladké vodě

U sladkovodních druhů ryb se tento typ buněk vyskytuje především na aferentní, tedy zadní straně žaberních primárních lamel (Obr. 9). Některé znaky mají tyto buňky společné s chloridovými buňkami slanovodních druhů ryb. Shodné jsou membránové záhyby tvořící tubulární systém napojený na mitochondrie. Rozdíl je v absenci mnohobuněčných komplexů, kdy se chloridové buňky ve většině případů vyskytují jednotlivě mezi buňkami epitelovými. Mezi chloridovými a epitelovými buňkami existují rozsáhlé mezibuněčné spoje tvořící relativně nepropustnou bariéru pro ionty. Apikální membrány těchto buněk tvoří kryty tak, jak tomu bylo u mořských ryb, ale jsou v jedné rovině, případně mohou i prominovat nad povrch buněk v okolí. Tubulární systém se u těchto buněk vyskytuje, ale je ve srovnání s mořskými rybami mnohem méně vyvinutý. Pisam a kol. (1987; 1988; 1990; 1995; 2000) u některých sladkovodních druhů popsal dva podtypy těchto buněk nacházející se například u lososa obecného (*Salmo salar*), tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) či hrouzka obecného (*Gobio gobio*). Podtypy jsou značeny jako α a β , a to:

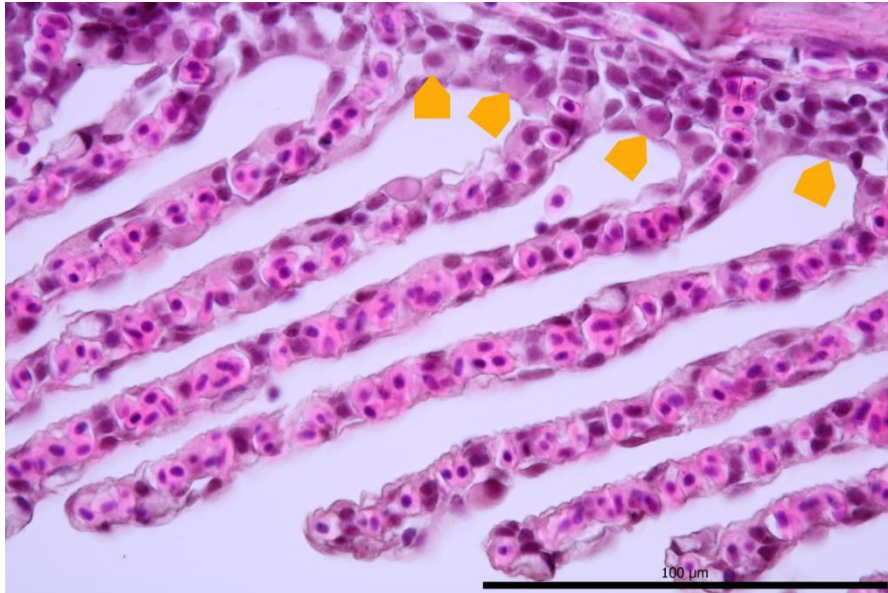
- dle stupně cytoplazmatického barvení osmiem pozorovaného pod mikroskopem
- dle morfologie apikální membrány
- dle rozsahu tubulárního systému a tvaru buňky

α -typ buněk – cytoplazma se barví světle. Apikální membrány jsou obvykle hladké, s dobře vyvinutým tubulárním systémem. Nacházejí se převážně v oblasti mezi sekundárními lamelami a mají protáhlý tvar. Tento typ může tvořit komplexy s AC buňkami.

β -typ buněk – je opakem α -typu. Cytoplazma se osmiem barví tmavě. Mají složitě vyvinuté výběžky apikální membrány, ale tubulární systém je rozvinutý méně. U pstruha obecného (*Salmo trutta*) tvoří tento typ také komplexy s AC buňkami (Pisam a kol., 2000).

U euryhalinních druhů dochází po přechodu ze sladké do slané vody ke zmnožení α -typu buněk, které se mění na chloridové buňky typické pro mořské ryby. U α -typu buněk může docházet ke změně jejich počtu, velikosti, hustoty cytoplazmy a počtu mitochondrií. Zatímco se tyto buňky mění a množí, u druhého typu buněk dochází k opačné situaci, β -buňky při přechodu do slané vody degenerují. Specifické funkce α a β buněk u sladkovodních ryb zatím nebyly dostatečně prozkoumány (Evans a kol., 2005). Shikano

a Fujio (1998) prokázali, že α -typ buněk má v porovnání s β -typem vyšší hladinu Na^+ - K^+ -ATP-ázy.



Obr. 9: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), oranžové šipky označují chloridové buňky, barveno H&E, zvětšeno 1000 \times ; foto: J. Kocour.

3. FYZIOLOGICKÉ FUNGOVÁNÍ ŽABERNÍHO APARÁTU

3.1. Přenos a výměna plynů

Hlavním místem výměny plynů jsou sekundární žaberní lamely. Jejich povrch tvoří 96% plochy výměny plynů na žábřácích (Hughes, 1972). Plocha žaber se udává v rozmezí 0,1-0,4 $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$, ale i více jako např. u tuňáka, kde tato plocha dosahuje až 1,3 $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$. U ryb, které k dýchání využívají pomocné dýchací orgány, může tato plocha dosahovat menších rozměrů, a to kolem 0,1 $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (Evans, 1993). Difuzní vzdálenost, tedy vzdálenost voda-krev, je dle způsobu života druhově specifická a je určena tloušťkou lamelárního epitelu pohybujícího se v rozmezí od 10 μm až po méně než 1 μm , a to například u tuňáka (Evans a kol., 2005).

3.1.1. O₂ chemoreceptory

Receptory jsou rozmístěny po celém žaberním oblouku a jsou inervovány IX. a X. hlavovým nervem. Uvnitř žaberních cév jsou receptory, které jsou schopny reagovat na hypoxemii nebo např. na injekci kyanidu. Není jasné, zdali tyto receptory reagují na změny tlaku kyslíku v krvi. Popsány byly také receptory, které jsou citlivé na snímání kyslíku z vnějšího prostředí u ryb, které mohou dýchat vzduch (Evans a kol., 2005). Neuroendokrinní fyziologie kyslíkových receptorů je velmi málo prozkoumaná, nicméně některé výsledky studií naznačují, že by se na ní mohli podílet neuroepiteliální buňky, jako je tomu v plicích suchozemských organismů (Youngson a kol., 1993).

3.1.2. CO₂ chemoreceptory

Chemoreceptory, které jsou citlivé na změny CO₂, jsou primárně rozmístěné pouze na prvním žaberním oblouku. Je ale možné je nalézt i jinde, protože nervové reakce byly při pokusech přerušeny pouze po denervaci všech žaberních oblouků (Reid a kol., 2000). CO₂ receptory jsou citlivé spíše na vnější než na vnitřní změny CO₂, což bylo prokázáno injekční aplikací acetoalamidu (látka zvyšující tlak CO₂ v krvi), která u pstruha duhového neměla vliv na změnu dýchací frekvence (Gilmour, 2001).

3.1.3. Přenos O₂

Přenos kyslíku přes rybí žábry je druhově variabilní. Experimenty potvrdily, že přenos kyslíku je ovlivněn žaberní perfuzí neboli průtokem krve (Malte a Weber, 1985). Pokud se doba setrvání krve na povrchu určeném pro výměnu plynu přiblíží difuzní rovnovážné době pro konkrétní plyn v systému s omezenou perfuzí, jedná se o difuzní omezení. Model přenosu plynu, který navrhli Malte a Weber (1985) předpokládá, že při velkém průtoku krve bude převládat omezená difuze, a tedy i příjem O₂. Omezení difuze se projeví ihned po snížení gradientu parciálního tlaku mezi vodou a krví, ke kterému dochází například v hypoxickém prostředí (Perry a Gilmour, 2002).

3.1.4. Přenos CO₂

Přestože by se mohlo zdát, že přenos CO₂ u ryb bude limitován průtokem krve žábrymi neboli perfuzí, předpokládá se, že je mnohem více limitován difuzí (Malte a Weber, 1985), a to i přes fakt, že voda má mnohem větší kapacitu pro CO₂ než pro O₂ (Perry a Gilmour, 2002). Omezení difuze souvisí s přesunem HCO₃⁻ do červených krvinek. Většina vyloučeného CO₂ je totiž v plazmě přenášena jako HCO₃⁻, který se musí dostat do červených krvinek, kde je následně dehydratován za pomoci katalyzátoru. Rychlost této nekatalyzované reakce je totiž příliš pomalá (1-3 sekundy) na to, aby proběhlo efektivní vyloučení CO₂ žábrymi (Cameron a Polhemus, 1974). U kostnatých ryb ale CO₂ nemá přístup ke katalyzátoru (Gilmour a kol., 1994), takže HCO₃⁻ vstupuje do červených krvinek přes membránový výměník Cl⁻/HCO₃⁻ a předpokládá se, že právě tento krok následně velmi omezuje rychlost vylučování CO₂. Uvedený mechanismus potvrzují studie Desforges a kol. (2001) a Perry a Gilmour (1993), které poukazují na difuzně omezený systém přenosu CO₂.

3.2. Osmoregulace a iontová rovnováha

Struktura a funkce žaberního epitelu je krom výměny plynů i místem výměny iontů a osmoregulace.

3.2.1. Osmoregulace u sladkovodních ryb

Stejně jako ostatní organismy, tak i ryby vyrovnávají osmotický příjem vody výraznou glomerulární filtrací. Ztráty iontů močí jsou vyrovnávány příjmem iontů na žábách nebo z potravy. Sladkovodní ryby žijí v hypotonickém prostředí, kde pasivně přijímají vodu, a proto ji nepotřebují „pít“ jako mořské ryby. Řeší tedy, na rozdíl od mořských ryb, jak se zbavit přebytečné vody v těle. Děje se tak skrze ledviny, které produkují velmi naředěnou moč a organismus musí následně skrze žábry aktivně přijímat ionty z vnějšího prostředí (Hwang a Lee, 2007).

3.2.1.1. Příjem Na^+

Jako první popsali mechanismy výměny iontů u ryb Smith (1930) a Krogh (1937), kteří zjistili, že Na^+ a Cl^- jsou ze sladké vody vstřebávány nezávisle, a to tak, že sekrece NH_4^+ a H^+ je spojena s absorpcí Na^+ a naopak exkrece HCO_3^- nebo OH^- je spřažena s absorpcí Cl^- (Krogh, 1937). Následné studie tuto myšlenku vcelku potvrdily, pouze upřesnily, že z termodynamických důvodů není možný pasivní příjem Na^+ výměnou za NH_4^+ (Avella a Bornancin, 1989; Kirschner, 2004; Potts, 1994). V průběhu let byly navrženy dva modely příjmu Na^+ žaberními buňkami. První model pracuje s variantou, že příjem Na^+ probíhá spojením V-typu H^+ -ATP-ázy a epiteliálního kanálu pro příjem Na^+ . Druhý model pracuje s myšlenkou, že příjem Na^+ probíhá elektroneutrální výměnou Na^+ za H^+ skrze Na^+/H^+ kanál (Avella a Bornancin, 1989; Kirschner, 1983). Většina pozdějších studií z termodynamických důvodů upřednostňuje model V-typu H^+ -ATP-áza a epiteliální kanál pro příjem Na^+ . Přestože byl druhý model zpochybněn, ve stínu nových zjištění není úplně vyloučen. Důvodem je nález přítomnosti několika izoform epiteliálních kanálů v savčích ledvinách, které se aktivně podílejí na příjmu Na^+ , a že bazolaterální prostup Na^+ probíhá u sladkovodních ryb přes Na^+/K^+ -ATP-ázu chloridových buněk. Zajímavostí je, že enzym Na^+/K^+ -ATP-áza byl použit jako marker přítomnosti chloridových buněk (Evans a kol., 2005).

3.2.1.2. Příjem Cl^-

Příjmem Cl^- iontů se v porovnání s příjmem Na^+ iontů zabývalo mnohem méně studií. Lze předpokládat, že výměna Cl^- probíhá za HCO_3^- . Inhibitory této výměny snižují příjem Cl^- a způsobují metabolickou alkalózu u sladkovodních ryb (Evans a kol., 2005). Hlavní mechanismus byl popsán jako absorpce Cl^- s exkrecí HCO_3^- pomocí apikálních iontových kanálů (Evans a kol., 2005; Tresguerres a kol., 2006). Tento mechanismus katalyzují karboanhydrázy spolu s V- H^+ -ATP-ázou (Wagner, 2007). Aklimatizace tilapií na sladkou vodu s nízkým obsahem Cl^- , podpořila vychytávání Cl^- a stimulovala také aktivity karboanhydráz a V- H^+ -ATPázy (Chang a Hwang, 2004).

3.2.1.3. Příjem Ca^{2+}

Příjem iontů Ca^{2+} chloridovými buňkami je podobný příjmu Ca^{2+} u savců (Hwang a Lee, 2007). Po vstupu přes membránu je Ca^{2+} navázán na kalbindin, který difunduje přes bazolaterální membránu, kde je následně Ca^{2+} odštěpen pomocí Ca^{2+} -ATP-ázy. V žaberním epitelu můžeme nalézt také ionty Ca^{2+} důležité k produkci iontů H^+ a HCO_3^- využívaných pro apikální kanály a pumpy. V histologických studiích, kdy byla použita speciální barvicí technika fosforečnanem kobaltnatým a síranem kobaltnatým, bylo zjištěno, že nitrobuněčný Ca^{2+} se nachází v apikálních oblastech chloridových a epitelových buněk žaber mnoha rybích druhů (Conley a Mallatt, 1988; Flügel a kol., 1991; Lacy, 1983). Tyto závěry byly potvrzeny imunohistochemicky u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Rahim a kol. 1988; Sender a kol. 1999).

3.2.1.4. Prostupnost vody

Starší izotopová a fyziologická měření osmotické a difuzní propustnosti vody přes žábry naznačovaly, že oba dva typy měření dosahují vyšších hodnot u sladkovodních než u mořských ryb (Evans, 1969; Motais a kol., 1969). Značný rozdíl mezi výsledky měření osmotické a difuzní propustnosti naznačuje přítomnost jakýchsi „vodou naplněných váčků“ v epitelových buňkách žaber sladkovodních ryb (Motais a kol., 1969). Existují rovněž tzv. aquaporiny, což jsou známé proteinové přenašeče převážně vody. Vyskytují se hlavně v ledvinách, ale například aquaporin-3 (dále jen AQP-3) byl naklonován ze žaber úhoře a byla zjištěna 67-69% homologní genetická shoda s AQP-3 u potkana, myši a člověka (Cutler a Cramb, 2002). Exprese AQP-3 byla významně snížena po aklimatizaci úhořů ve slané vodě. Homologní protilátka identifikovala imunoreaktivitu AQP-3 v apikálních a bazolaterálních stranách žaberních buněk. Role AQP-3 při osmoregulaci není dostatečně jasná (Cutler a Cramb, 2002). Jiný aquaporin, konkrétně AQP-1 přenáší amoniak (Nakhoul a kol., 2001) a oxid uhličitý (Nakhoul a kol., 1998) proudící krevním řečištěm ryb.

3.2.2. Osmoregulace u mořských ryb

Druhy ryb žijící v mořské vodě čelí jinému osmotickému působení než sladkovodní ryby. Žijí totiž v hypertonickém prostředí. Jejich tělo je hypoosmotické vůči okolní vodě, a tak je pasivní ztráta vody vyrovnávána příjmem mořské vody ústy. Dalo by se říci, že mořské ryby proto musí pít mořskou vodu a sůl vylučují ledvinami i žábami. Mechanismy transportu iontů u mořských ryb jsou mnohem jasnější než u sladkovodních (Hwang a Lee, 2007). Současný model předpokládá, že exkrece NaCl je zprostředkována bazolaterálním kotransportem ve směru elektrochemického gradientu, který katalyzuje $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-áza}$ spolu s exkrecí Cl^- přes kanály a mezibuněčným vytlačováním Na^+ probíhající rovněž ve směru elektrochemických gradientů. Jak je patrné, nejdůležitějším membránovým enzymem je $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-áza}$, která je odpovědná za exkreci Na^+ iontů a příjem K^+ iontů v živočišných buňkách (Hwang a Lee, 2007). Je důležitá pro udržení intracelulární homeostázy, a také je hnací silou pro mnoho transportních systémů. Imunocytochemické studie na žaberních řezech spolu s biochemickými studiemi na izolovaných chloridových buňkách prokázaly nejvyšší výskyt tohoto enzymu v epitelálních buňkách rybích žaber (Brauer a kol., 2005; Dang a kol., 2000; Lee a kol., 2000; Sakamoto a kol., 2001). Většina euryhalinních druhů ryb vykazuje změny v aktivitě $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ po změně salinity (Evans a kol., 2005). Rozdílná salinita je problémem, který vyžaduje aktivaci $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ a chloridových buněk. Tyto procesy jsou nutné pro aklimatizaci ryb. Existují dvě skupiny reakcí $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ vyvolané změnou salinity. První skupina vykazuje vyšší aktivitu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ v hyperosmotickém prostředí a druhá skupina vykazuje vyšší aktivitu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ v hyposmotickém prostředí. První skupina euryhalinních ryb (např. losos či tilapie) reaguje na zvýšenou salinitu vyšší aktivitou $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ a změnou hustoty chloridových buněk. U této skupiny ryb se vyskytuje ještě proteinový enzym $\text{V-H}^+\text{-ATP-áza}$, který je dalším významným hnacím motorem příjmu Na^+ nebo Cl^- . Druhá skupina ryb vykazuje změny v aktivitě $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ a hustotě buněk při snížení salinity. Tyto ryby jsou také vybaveny $\text{V-H}^+\text{-ATP-ázou}$. V případě, že nevzniká elektrochemický gradient v žaberních buňkách pomocí $\text{V-H}^+\text{-ATP-ázy}$, může být u této skupiny ryb potřebná vyšší aktivita $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$ pro příjem Na^+ a Cl^- . Což naznačuje možnost výskytu různých mechanismů regulace iontů na žábrách ryb (Hwang a Lee, 2007).

3.3. Regulace pH na žábrách ryb

Regulovat změny acidobazického stavu extracelulárních tekutin uvnitř těla mohou ryby, stejně jako všichni obratlovci, pomocí tří mechanismů (Evans a kol., 2005):

- 1) Okamžitou změnou hydrogenuhličitanových a nebikarbonátových pufrů v řádu několika sekund.
- 2) Změnou „otevřeného“ pufracího systému $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ v řádu několika minut.
- 3) Transportem odpovídajících acidobazických molekul mezi organismem a prostředím v řádu několika minut až hodin.

Protože ryby žijí ve vodním prostředí, první dva mechanismy mohou používat pouze v omezené míře, zatímco třetí mechanismus je posílen faktem, že žijí ve vodě.

3.3.1. Respirační a metabolická kompenzace

V dobře provzdušněné vodě umožňuje odpovídající žaberní ventilace odcházet metabolicky vzniklému CO_2 z rybího těla pryč. To způsobí velmi nízké hodnoty tlaku CO_2 v krvi, které nikdy nepřevyšují CO_2 nad vodní hladinou na rozdíl od obratlovců, dýchajících atmosférický vzduch. Díky této vlastnosti jsou i koncentrace bikarbonátů v krvi velmi nízké. Omezení způsobená respiračními kompenzacemi dělají ryby silně závislémi na výměně netěkavých látek mezi vnějším a vnitřním prostředím prostřednictvím žaber. Žábry jsou v permanentním kontaktu s vodním prostředím, které může být „nekonečným“ zdrojem i pohlcovačem rozpuštěných látek. Rychlost průtoku vody přes žábry napomáhá rybám v regulaci prostupu rozpuštěných látek do organismu. Vysoké průtoky omezují vznik velkých pH gradientů v době vylučování kyselin. Na žábrách obvykle není potřeba doplňkové produkce pufrů, jak je tomu u ledvin (Koeppen a Stanton, 1997). Obecně bylo zjištěno, že vylučování zásad je spojeno s absorpcí Cl^- iontů a naopak vylučování kyselin je spojeno s absorpcí Na^+ iontů. To však ale neznamená, že všechny druhy ryb mají na žábrách stejné uspořádání acidobazických transportních proteinů. Typy exprimovaných acidobazických transportních proteinů a jejich umístění se liší dle druhu ryby a parametrů vnějšího prostředí, jako je například salinita či pH (Claiborne a kol., 2002; Marshall, 2002).

3.4. Dusík

Přebytečné aminokyseliny v organismu se na rozdíl od jiných biomolekul jako jsou například mastné kyseliny či cukry, neukládají ani nevylučují. Uhlíkaté skelety aminokyselin se po předchozím odstranění aminoskupiny přeměňují na meziproducty metabolických drah (Stryer, 1995), jako jsou mastné kyseliny, ketolátky nebo sacharidy. Přebytek dusíku je obvykle vylučován z těla pryč. U ryb, které přijímají potravu bohatou na bílkoviny se příjem nadbytečného dusíku ještě zvýší. U takových ryb je většina uhlíku získávána z aminokyselin (Evans a kol., 2005). Ryby mohou také aminokyseliny přijímat z vlastní svalové tkáně. Při takovém procesu jsou aminokyseliny deaminovány za vzniku ATP, který je dále využit pro udržení energie nebo přeměnu glukózy v játrech (Walsh a Wright, 1995). Ryby jsou organismy žijící ve vodě, až na některé výjimky neprodukuje močovinu ani kyselinu močovou, kterou produkují suchozemští živočichové (ptáci, plazi, atd.), kteří potřebují šetřit vodou (Wright, 1995). U většiny druhů ryb dochází k produkci dusíkatých odpadních produktů, hlavně tedy amoniaku. Odpadní produkty dusíkového metabolismu jsou tedy ihned z těla vylučovány pryč. Ryby produkují i jiné dusíkaté molekuly než amoniak. Jedná se například o kreatin, taurin nebo methylaminy. Podíl těchto molekul je však zanedbatelný (Evans, 1998). Hlavním místem vylučování amoniaku jsou rybí žábry, je tomu tak z podobného důvodu, z jakého jsou žábry primárním místem výměny plynů.

3.4.1. Amoniak

Amoniak je u nás velmi častou příčinou poškození či úmrtí ryb. Ve vodách se vyskytuje v molekulární nedisociované formě NH_3 nebo v disociované formě amonného iontu NH_4^+ . Poměr výskytu těchto forem závisí na teplotě prostředí a pH. Z hlediska průniku těchto molekul do těla, ale i z těla ryb, je buněčná stěna pro disociovanou formu NH_4^+ téměř nepropustná, naopak nedisociovaná forma NH_3 proniká velmi snadno do tkání a díky své vysoké afinitě k mozku je pro ryby velmi toxická (Palíková a kol., 2019). Disociovaná forma NH_4^+ tvoří v krvi ryb převážnou většinu celkového (součet všech forem) amoniaku (Evans a kol., 2005). Většina akutních účinků amoniaku je pravděpodobně spojena se schopností nahrazovat draslík v iontových přenašečích, a tím narušovat elektrochemické gradienty v centrálním nervovém systému (Cooper a Plum, 1987). Ryby, které mají méně vyvinutý nervový systém jsou vůči vyšším koncentracím

amoniaku v krvi tolerantnější než savci. U savců také dochází k syntetizaci amoniaku v místě vylučování, tedy v ledvinách (Knepper a kol., 1989), zatímco u ryb se na žábách produkuje přibližně jen 25% amoniaku. Ostatní amoniak je produkován převážně v jiných orgánech, a to především játrech, ledvinách a nejméně na žábách (Evans a kol., 2005). Existuje několik způsobů vylučování amoniaku z těla ryb:

- Amoniak prochází přes žábry jako NH_3 po příznivých difuzních gradientech krve a vody. Bylo zjištěno, že mírné snížení pH prostředí (vody) zvýšilo vylučování celkového amoniaku u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a karase zlatého (*Carassius auratus*) (Avella a Bornancin, 1989; Claiborne a Heisler, 1986; Maetz, 1972; Maetz, 1973). Naopak při zvýšení pH vody se snížilo vylučování celkového amoniaku u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (McGeer a Eddy, 1998; Wilkie a Wood, 1991; Wright a Wood, 1985).
- Amoniak je vylučován pomocí přenašeče $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ u sladkovodních ryb. Tento model ale není ještě úplně prozkoumaný (Evans a kol., 2005).
- Amoniak prochází difuzí NH_4^+ , která je však velmi minimální, protože buněčné struktury jsou pro NH_4^+ velmi málo propustné. Mořské ryby mají některé spoje mezi chloridovými buňkami mělké, zvyšující propustnost Na^+ , a z toho důvodu jsou nejspíše propustnější i pro NH_4^+ (Evans a kol., 1989).

3.4.2. Močovina

Koncentrace močoviny v rybí krvi je velmi nízká a pravděpodobně souvisí i liší se dle taxonomických skupin. Většina ryb je amonotelních, a tak v jejich krvi bývá stabilní koncentrace močoviny a vylučování dusíku probíhá převážně formou amoniaku. Vyšší koncentrace močoviny byly naměřeny v krvi ryb žijících v prostředí, které je pro vylučování amoniaku nevhodné, tedy prostředí s vysokým pH (Evans, 1993).

3.4.3. Dusitany

Dusitany jsou meziproductem procesu nitrifikace, při kterém dochází k oxidaci amoniaku. Dusitany jsou pro ryby toxické. Jejich toxické koncentrace se mezidruhově liší (Tomasso, 1994). Při otravě dusitany se oxiduje dvojmocné železo v hemoglobinu

na trojmocné, a tím z hemoglobinu vzniká methemoglobin. Zpětnou redukcí methemoglobinu zprostředkovává NADH-dependentní methemoglobinreduktáza (Kiese, 1974). Methemoglobin není schopen vázat a poté přenášet molekuly kyslíku, proto ryby postižené methemoglobinemií trpí hypoxií. Mimo to mohou také subletální koncentrace inhibovat růst ryb (Kiese, 1974; Williams a Eddy, 1986). Existují důkazy, že mechanismus průniku dusitanů do těla ryb je skrze $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kanál v chloridových buňkách (Evans, 1993; Tomasso a Grosell, 2005). Chloridy a dusitany se navzájem kompetitivně vylučují v možnosti průchodu tímto kanálem. Přítomnost chloridů ve vodním prostředí tedy snižuje míru příjmu dusitanů do těla ryby (Mazik a kol., 1991). Krev ryb po otravě dusitany má v důsledku obsahu methemoglobinu čokoládově hnědou barvu a rybí žábry tedy nejsou červené ale hnědé. Mikroskopicky je na postižených žábrách možné pozorovat hyperplazii či edém (Velíšek a kol., 2018).

3.5. Hormonální kontrola

3.5.1. Prolaktin

Prolaktin je hormon peptidové povahy produkovaný adenohypofýzou. U sladkovodních ryb hraje významnou roli při osmoregulaci (Evans a kol., 2005). Podání prolaktinu některým mořským rybám snížilo aktivitu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$, nicméně nemělo žádný vliv na expresi tohoto enzymu. Aplikace prolaktinu pstruhu obecnému a tilápii neměla na $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázu}$ žádný vliv (Madsen a kol., 1995; Herndon a kol., 1991).

3.5.2. Kortizol

Tento hormon produkovaný interrenální tkání nadledvinek je hlavním kortikosteroidem fungujícím jako glukokortikoid a mineralokortikoid (Evans, 1998; Greenwood a kol., 2003). Na žábrách ryb účinkuje ve spojení s prolaktinem. Bylo totiž zjištěno, že aktivita $\text{H}^+\text{-ATP-ázy}$ žaber byla stimulována právě kortizolem (Lin a Randall, 1993). Kelly a Wood (2001) také zjistili, že tento hormon zvyšuje příjem Na^+ a Cl^- epitelovými buňkami žaber.

4. METODY HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ SE ZAMĚŘENÍM NA ŽÁBRY

4.1. Odběr vzorku

Odběr vzorku tkáně je prvním krokem tvorby histologického preparátu. Samotný odběr může probíhat ze živého nebo usmrceného organismu. V případě odběru vzorku tkáně ze živého organismu se tento odběr nazývá biopsie. Při odběru tkáně z usmrceného organismu takový odběr nazýváme nekropsie. Obecně postupujeme tak, že vyřízneme tkáň, kterou chceme zkoumat a dále ji postoupíme fixaci. Při odběru žaber ryb můžeme u větších ryb odebírat celé žaberní oblouky. U menších ryb je vhodnější odebrat celou hlavu a pouze odstranit žaberní víčka, která zakrývají žaberní oblouky (Obr. 10). U raných vývojových stádií (váčkový plůdek) je vhodné odebírat celé ryby. Velikost námi odebraného vzorku tkáně ovlivňuje následně kvalitu fixace. Pro běžné histologické účely a za použití obvyklých fixačních tekutin je vhodná velikost odebraného bločku o hraně 0,5 cm (Genten a kol., 2009). V případě nutnosti fixace většího vzorku by jeho tloušťka neměla být větší než 1 cm. Velikost vzorku je důležitá z důvodu fixace, kdy u velkých vzorků by fixační činidlo do jádra vzorku proniklo pozdě a mohlo by zde dojít k autolytickým procesům a tím k jeho znehodnocení (Habrová, 1986).

Při samotném odběru je nutné dbát na to, aby nedošlo k jakémukoli mechanickému poškození tkáně (rozdrcení, roztržení atd.) způsobenému například při manipulaci. Takové porušení by totiž mohlo zkreslit či úplně zničit vnitřní strukturu tkáně, která je velice důležitá pro vyhodnocování histologických preparátů. Snaha zamezit mechanickému poškození vzorků by měla platit po celou dobu tvorby histologického preparátu. Zároveň je nutné dbát na to, aby vzorek nebyl po celou dobu kontaminován chemikáliemi, vyjma chemikálií potřebných při tvorbě vzorku (Baria, 2019).



Obr. 10: Odběr vzorku žaber plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.); foto J. Kocour.

4.2. Fixace

Z důvodu zabránění znehodnocení odebraných tkání samovolnými rozkladnými procesy (autolýza) či činností bakterií, musí být odebrané vzorky (tzv. tkáňové bločky) co nejrychleji ošetřeny – fixovány (Vacek, 1988). Fixace je rychlé usmrcení buněk, které zabrání zmíněným autolytickým procesům a provádí se co nejrychleji po odebrání vzorku (Genten a kol., 2009). Postup při fixaci zahrnuje použití prostředků dvojího druhu – fyzikální (zejména suchým teplem) a chemické. V případě zpracování surovin živočišného původu využíváme zejména chemické prostředky (viz. níže). Před vlastní chemickou fixací se vzorky nejčastěji vkládají do tzv. histologických kazet (Obr. 11), které jsou vyrobeny z plastu. Do kazety se vloží odebraný vzorek a následně se zavře příklopným víčkem. Je důležité vzorky důkladně označit jak externě na kazetě, tak i interně vložením papírového štítku s označením do kazety z důvodů možného smazání externího označení. Zavřená kazeta se v případě chemické fixace vloží do fixačního činidla.



Obr. 11: Odebraný vzorek plůdka kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) ve spodním dílu histologické kazety, připravený na chemickou fixaci; foto J. Kocour.

4.2.1. Fyzikální fixace

Metody fyzikální fixace (teplo, chlad) se v histologii využívají velmi zřídka. Asi nejrozšířenější metodou fyzikální fixace je tzv. „freezing-drying“ metoda, která se využívá hlavně při histologickém stanovení citlivých látek jako jsou například enzymy. Při této metodě se využívá chladu a vakua. Kousky tkáně se rychle zmrazí ve vakuu na teplotu přibližně -60°C a následně dojde k jejich vysušení (Vacek, 1988). Takto je možné zpracovávat pouze malé vzorky tkání. Při zpracování větších vzorků tkání nedochází k rychlému zamrazení v jádře, kde vznikají krystaly, které ničí fixovanou tkáň a zkreslují histologické vyšetření. Tento způsob fixace je náročný na technické vybavení a využívá se jen zřídka (Eltoum a kol., 2001).

4.2.2. Chemická fixace

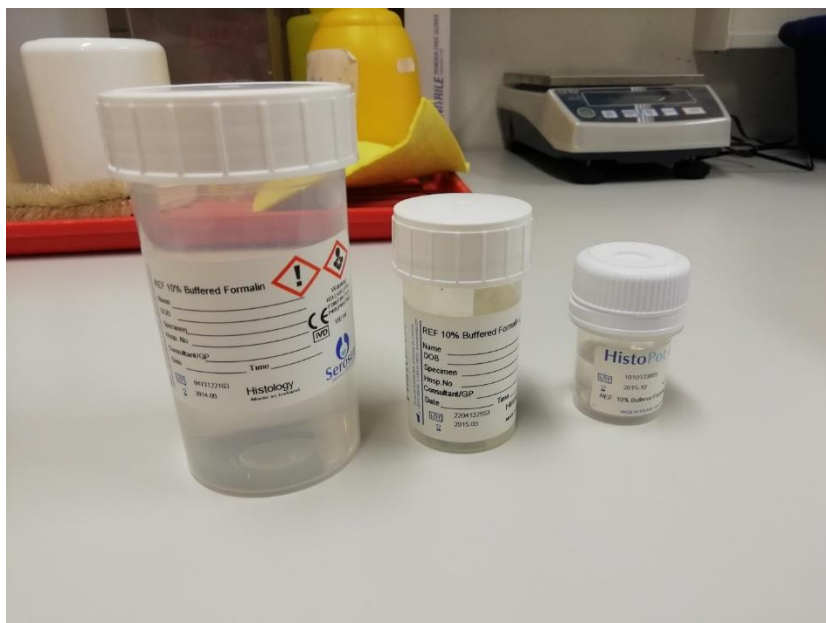
Chemické látky, které využíváme k fixaci nazýváme chemická činidla či fixativa. Využívají se pro jejich snadnou dostupnost, snadnou přípravu a jednoduchost použití. Správné fixativum by mělo splňovat následující požadavky:

- 1) Musí rychle pronikat do jádra odebraného vzorku.
- 2) Nesmí měnit strukturu buněk.
- 3) Nesmí ovlivnit barvitelnost tkání.

Činidel, která splňují tyto požadavky existuje mnoho druhů. Každé činidlo má své přednosti, ale i své nevýhody. Některá fixativa velmi denaturují bílkoviny, ale jsou stále využívána pro svou schopnost udržovat strukturu cytoplazmy a jádra. Takovým činidlem je například chlorid rtuťnatý. Činidlo, které pouze jemně denaturuje bílkoviny je například formalín. Fixační činidla lze dle Habrové (1986) rozdělit do čtyř hlavních skupin:

- 1) Minerální kyseliny – oxid osmičelý (kyselina osmičelá); oxid chromový (kyselina chromová)
- 2) Soli kovů – sublimát chloridu rtuťnatého; dvojchroman draselný
- 3) Organické kyseliny – kyselina octová; kyselina trichloroctová; kyselina pikrová
- 4) Organické redukční prostředky – ethanol; methylalkohol; formaldehyd (formalín)

Proto, aby byly omezeny nebo potlačeny nežádoucí účinky a podpořeny dobré vlastnosti činidel, byly vyvinuty fixační směsi. Existuje mnoho druhů směsí. Nejčastěji používanými jsou: Bouinův roztok a Zenkerův roztok (někdy Hellyho roztok). Fixační činidlo musí být v dostatečném objemu, udává se asi 50x více než je objem námi odebraného vzorku (Habrová, 1986). Jiní autoři uvádějí i poměr 1:20 a je také velmi důležité zvolit dostatečně velkou nádobku nebo histologickou kazetu, aby nedošlo k pomačkání vzorku (Baria, 2019). Fixaci je možné urychlit a zkvalitnit občasným mícháním nádobky s činidlem. Pro fixaci vzorků rybích žaber se ve většině případů využívá 10% pufrovaného formaldehydu (Obr. 12). Občas je také využíváno Davidsonovo fixačního činidla, které obsahuje kyselinu octovou a může způsobit otok a odvápnění tkání. Při užití tohoto činidla je třeba tkáň převést po 12-24 hodinách do 70% ethanolu. Tento krok zabrání ztvrdnutí tkání (Mumford a kol., 2007).



Obr. 12: Lahvičky s chemickým činidlem připravené k fixaci vzorků; foto: J. Kocour.

4.3. Odvápnění

Při histologickém zpracování tkání mohou způsobovat problémy zvápenatělé struktury. Konkrétně u histologického zpracování žaber tento problém představuje kostěný podklad žebních oblouků. V případě, že nás zajímá pouze žaberní tkáň, můžeme se tomuto problému vyhnout tím, že ji odřízneme skalpelem od kostěného podkladu a dále zpracováváme pouze žaberní tkáň. V opačném případě, kdy potřebujeme mít součásti vzorku i žaberní oblouk, nebo zpracováváme vzorky od malých ryb či celou rybu případně máme vzorky starých ryb, je vhodné tkáň odvápnit. Odvápnění se provádí pomocí slabých organických kyselin. Tento proces nemění strukturu buněk, ale mění strukturu vápenatých (mineralizovaných) tkání (Smith a kol., 2018). Samotný proces odvápnění (demineralizace) je založen na přeměně nerozpustných minerálních solí na soli rozpustné. Důležitá je doba odvápnění. Proces by měl být rychlý, proto je nutné zajistit dostatečné množství dekalciфикаčního roztoku. Doba odvápnění je závislá také na velikosti vzorku (Vacek, 1988). Mezi nejznámější dekalciфикаční činidla patří kyselina mravenčí, kyselina dusičná či EDTA.

4.4. Odvodnění

Tímto krokem v přípravě histologického preparátu se zamezí smrštění tkáně. Provádí se řadou alkoholů a xylenů, kde jsou vzorky zbaveny vody, aby mohly být následně prosyceny parafínem (Genten a kol., 2009). Fixovaný tkáňový bloček se přesouvá z lázni o nižší koncentraci alkoholu do lázni s vyšší koncentrací alkoholu. Při přímém vložení vzorku do koncentrovaného alkoholu by došlo ke zmiňovanému smrštění tkáně. První odvodňovací lázni je 70% alkohol, od kterého se postupuje přes 80%, 96% až k tzv. absolutnímu alkoholu (100% alkohol). Obecně platí pravidlo, že čím větší je tkáňový bloček, který chceme odvodňovat, tím déle se musí louhovat v alkoholové lázni (Tab. 1). Pro proces odvodnění se v histologických laboratořích využívá prosycovací automat (Obr. 13, 14). Přestože je automat vítaným pomocníkem, je třeba při jeho použití dbát na správnou volbu programu. Při zvolení špatného programu by totiž mohlo dojít ke znehodnocení vzorku. Při nedostatečně časté výměně či využívání kontaminovaných roztoků chemikálií uvnitř automatu může docházet k nedostatečnému odvodňování. V případě užívání automatu obsahujícího i roztoky na prosycení, tak i ke špatnému prosycení vzorků (Baria, 2019). Níže je uvedena tabulka s přehledem odvodňování:

Tab. 1: Přehled odvodňování, závislost velikosti vzorku na čase (Vacek, 1988).

Alkohol	Bloček menší 0,5 cm³	Bloček do 1 cm³	Bloček přes 1 cm³
70%	2 hod.	2 hod.	4 hod.
80%	2 hod.	4 hod.	6 hod.
96%	6 hod.	6 hod.	6 hod.
100% I.	1 hod.	2 hod.	4 hod.
100% II.	1 hod.	2 hod.	4 hod.
100% III.	1 hod.	2 hod.	4 hod.



Obr. 13: Prosyncovací automat Histomaster
2052/1.5 (MDS-group, Germany) - pohled zprědu; foto: J. Kocour.



Obr. 14: Prosyncovací automat pohled z boku; foto: J. Kocour.

4.5. Prosyncení tkáně rozpouštědlem a zalití do média

Tkáň, která prošla odvodňovací procedurou je nutno prosytit takovou látkou, která rozpouští parafín a zároveň se mísí s absolutním alkoholem (Genten a kol., 2009). To z důvodu, že parafín se nemísí s alkoholem. Takovou látkou je nejběžněji benzen a xylen. Při prosycování benzenem využíváme 3 benzenových lázní, do kterých postupně vkládáme vzorek. V každé lázni jej ponecháme 15 minut, tím dosáhneme dokonalého prosycení a zesvětlení vzorku. To proto, že benzen má vysoký bod lomu světla. Tkáňový bloček zesvětluje až zprůsvitní, proto se někdy tento krok nazývá prosvětlení (Junqueira a kol., 1997; Mumford a kol., 2007). Mléčné zakalení uprostřed tkáňového bločku může být způsobeno nedokonalým odvodněním. V takovémto případě je nutné tkáň vrátit do absolutního alkoholu. Zůstane-li alkohol ve tkáni, tkáň při následném prosycování ztvrdne. To může způsobovat problémy při krájení histologických řezů (Vacek, 1988).

Následným krokem je prosycení parafínem. To můžeme provádět buď přímo parafínem, nebo šetrněji pomocí tzv. benzen-parafínu. Benzen-parafín je nasycený roztok parafínu benzenem při teplotě 40°C. Po lázni v benzen-parafínu musíme vzorek přenést do čistého parafínu. Tkáň je vhodné prosycovat parafínem v otevřených nádobách, a to znovu dvěma nebo třemi lázněmi. Dobu prosycování musíme určovat dle velikosti vzorku. Při prosycování parafínem musíme stále udržovat jeho teplotu. Ta nesmí překročit 58°C, jinak tkáň ztvrdne, smrští se a to způsobí problémy při následném krájení histologických řezů (Vacek, 1988).

K vlastnímu zalévání se nejčastěji využívá kvalitního parafínu (Junqueira a kol., 1997). V případě použití nekvalitního parafínu může dojít k tzv. stlačení řezů (Baria, 2019). Provádí se v zalévací komůrce (Genten a kol., 2009) (Obr. 16), která může být z jakéhokoli materiálu (papír, kov, atd.). Zjednodušeně řečeno, zalévací komůrka je nádoba, do které se naleje předem rozehrátý parafín na teplotu kolem 60°C a co nejrychleji se do něho vloží tkáňový bloček. V průběhu zalévání je potřeba dbát na to, aby nedocházelo k nadměrnému zahřívání vzorku a parafínu. Protože takové zahřívání může vést k potrhání či ke scvrknutí tkáně (Baria, 2019). Pro zalévání vzorku do parafínu existují speciální zalévací automaty (Obr. 15). Takový automat obsahuje zásobník s rozehrátým parafínem. Obvykle je vybaven i vyhřívanou pracovní plochou, která zamezuje chladnutí parafínu. Některé zalévací automaty mají i zchlazovací pracovní plochu, která pomáhá rychleji upevnit vzorek v parafínu v komůrce. Nejvhodnější

pracovní postup je takový, že naplníme zalévací komůrku rozehřátým parafínem a na rozehřáté pracovní ploše do parafínu vložíme vzorek. Jeho polohu můžeme upravit pinzetou či jiným nástrojem tak, aby byly při následném řezání vidět dobře všechny struktury. Následně zalévací komůrku přemístíme na zchlazovací pracovní plochu, kde dojde k zchlazení parafínu, a tím i jeho ztvrdnutí. Zchladnutím parafínu se upevní vzorek v zalévací komůrce (Mumford a kol., 2007).



Obr. 15: Parafinový zalévací automat připravený k zalévání tkání; foto: J. Kocour.



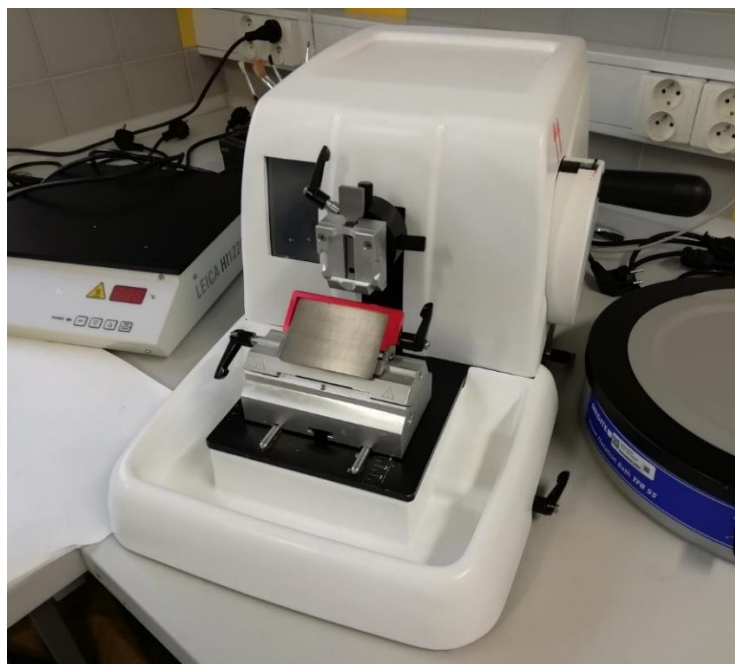
Obr. 16: Různé velikosti zalévacích komůrek; foto: J. Kocour.

4.6. Krájení na mikrotomu

Zalité tkáňové bločky (Obr. 19) se následně musí nakrájet na co nejtenčí plátky. Snažíme se krájet řezy několik mikrometrů silné, zpravidla 5-7 μm (Genten a kol., 2009). Pro histochemické zpracování tkání se dělají řezy o trochu silnější než při obyčejném histologickém zpracování. Obvykle to bývá 7 μm . Pro klasické histologické zpracování se nejběžněji dělají řezy tlusté 5 μm (Obr. 19). Při následném pozorování pod světelným mikroskopem je tato tloušťka vhodná z toho důvodu, že jsou všechny buněčné struktury dobře patrné. V případě moc silných řezů může přes sebe být vidět více překrývajících se buněk, a to může konečné hodnocení znesnadnit či zkreslit. Naopak příliš tenké řezy nemusí zobrazit tkáňové struktury celé a přehledně. Hlavní snahou tedy je seříznout pouze jednu vrstvu buněk (Baria, 2019). Řezy zhotovujeme pomocí speciálních přístrojů, které nazýváme mikrotomy (Junqueira a kol., 1997). Mikrotomů rozeznáváme několik druhů.

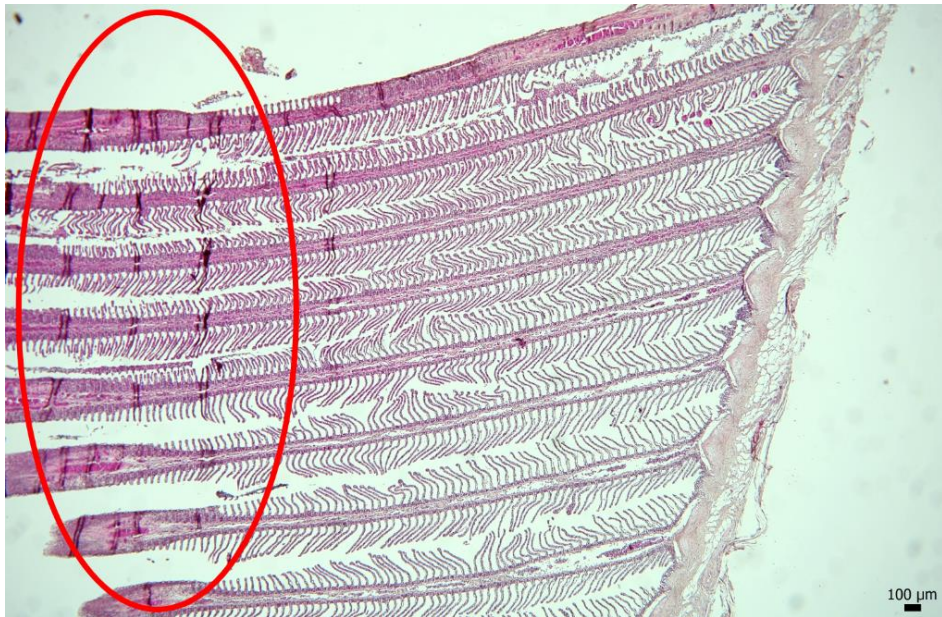
- Prvním druhem je mikrotom sáňkový. Má pohyblivý nůž a námi vytvořený bloček je usazen na místě, kde se nepohybuje.
- Druhým typem je mikrotom rotační (Obr. 17), který funguje v podstatě opačně než mikrotom sáňkový. Má nepohyblivý nůž a pohybuje se zde pouze námi vytvořený parafínový bloček ve svislé rovině. Pomocí rotačního mikrotomu můžeme vytvářet tzv. sériové řezy (Obr. 21), které vznikají spojením jednotlivých řezů. Sériové řezy mohou svým vzhledem připomínat dlouhou pásku.
- Třetím typem je mikrotom zmrazovací. U starších typů se zmrazení provádělo kapalným oxidem uhličitým. Modernější typy mají elektrické zmrazovací zařízení, které velmi zjednodušuje práci. Výkonnější a dokonalejší následovník zmrazovacího mikrotomu se nazývá kryostat. Tento způsob krájení zmrazeného vzorku nalézá využití v klinických provozech, kde potřebují rychle stanovit diagnózu, případně při histochemických stanoveních. Hlavní výhodou je rychlé zhotovení řezů bez zalévací procedury, která je jinak nezbytná (Junqueira a kol., 1997; Vacek, 1988).

Posouvání vzorku o námi zvolenou sílu řezu se dělá automaticky. Například u rotačního mikrotomu dochází k posunu vzorku vždy po odříznutí řezu z parafínového bloku.

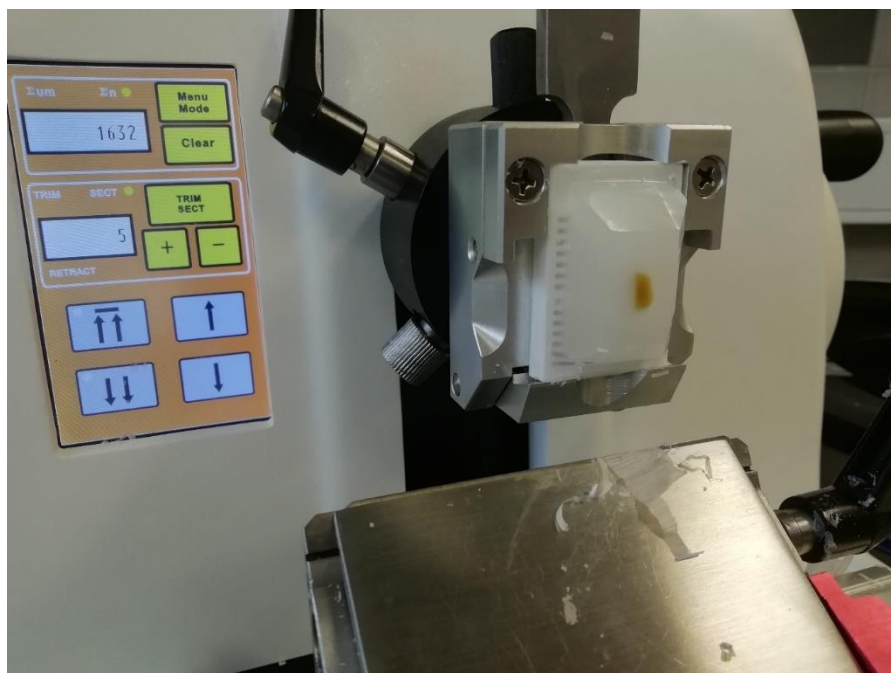


Obr. 17: Rotační mikrotom; foto: J. Kocour.

V případě, že jsme vzorek zalévali do média, musíme před krájením odstranit přebytečnou hmotu média. To můžeme udělat například obyčejným skalpelem. Vrstva média na vzorku by měla zůstat přibližně 5mm. Poté vzorek upneme do svorky a mikrotomem krájíme (Obr. 19). Pokud jsme vzorek předtím nezalévali a využíváme zmrazovacího mikrotomu nebo kryostatu, vzorek rovnou upneme do svorky a poté krájíme (Junqueira a kol., 1997; Vacek, 1988). Kvalitu řezání může ovlivnit kvalita ostří, sklon a rychlost samotného krájení. Pokud se ve vzorku ukazují rýhy, je to znamení že je čepel nože tupá a je potřeba ji vyměnit. Rychlost krájení je také důležitá, vzorky by se měly krájet pomalu a s velkou pečlivostí (Obr. 18). V případě drobného zastavení při krájení mohou vznikat artefakty. Při krájení je také nutné sledovat teplotu vzorků a parafinových bločků. Příliš vysoká teplota může vést ke „shrnování řezů“ neboli vzniku varhánků. Ke shrnování může vést také tupý nůž nebo jeho špatný sklon. Při nedostatečně prosyceném vzorku parafinem může také docházet k rozdrolení a vypadávání tkáně z parafinového bloku (Vacek, 1988).



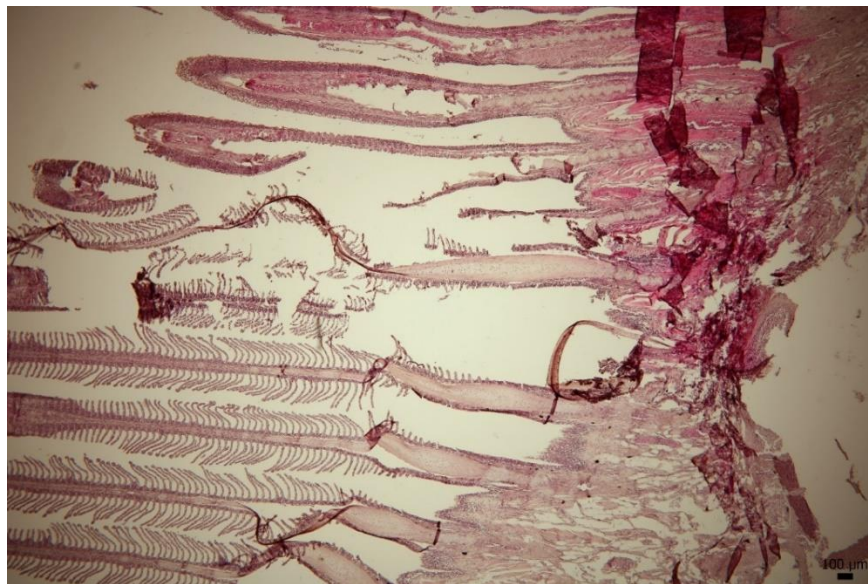
Obr. 18: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), již na první pohled jsou vidět souvislá místa, kde je vzorek špatně nakrájený, barveno H&E, zvětšeno 40×; foto: J. Kocour.



Obr. 19: Detailní snímek krájení 5μm řezů z parafinového bločku na rotačním mikrotomu; foto J. Kocour.

Po krájení je potřeba vzniklé řezy napnout. Napínání se dělá pomocí vyhřívané vodní lázně (Obr. 21) (Junqueira a kol., 1997). Teplota vodní lázně by měla být přibližně o 5-10°C nižší než je teplota tání parafínu. Řezy se snadno při takové teplotě napínají a parafín při takové teplotě nebude tát. Při problému se špatným napínáním řezů (řezy jsou „shrnuté“) se doporučuje mírně zvýšit teplotu vody (Baria, 2019). Řez položíme opatrně na hladinu vody (stačí i kapka vody), kde se rozprostře (napne) na hladině. Pro napínání řezů je také možné využít ethanol, ze kterého ale poté musíme řez přenést na hladinu vody (Suvarna a kol., 2013). Důležité je také udržet čistou vodu v napínací lázni. Při nepravidelné výměně může docházet ke vzniku plísní, které mohou později znehodnotit vzorek. Čistotu je také důležité zachovat u podložních sklíček, která můžeme znečistit kožními buňkami či nečistotami z rukou (Baria, 2019).

Před tím, než začneme napínat řezy, musíme mít připravená čistá podložní skla, kterými se plovoucí řezy podebírají (Genten a kol., 2009). Pod napnuté řezy (na hladině vidíme rovný řez bez záhybů) se do vodní lázně ponoří podložní sklíčko a opatrně se na něj v přijatelné poloze řezy přichytí. Následně se řezy pokládají na vyhřívanou desku nebo vyhřívaný okraj lázně a nechají se oschnout.



Obr. 20: Velmi nepovedený histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového, k rozrušení vzorku tkáně došlo hrubým zacházením při přenášení a následném napínání vzorku, barveno H&E, zvětšeno 40×; foto: J. Kocour.



Obr. 21: Napínání sériových řezů vzorku žaber na vodní hladině; foto: J. Kocour.

4.7. Barvení preparátu

Většina tkání, až na výjimky, je po provedení předchozích operací bezbarvá. Při prohlížení bezbarvého preparátu pod světelným mikroskopem by byly jednotlivé struktury špatně rozeznatelné (Genten a kol., 2009; Junqueira a kol., 1997). Z tohoto důvodu byly vyvinuty barvicí metody, které pomáhají zviditelnit vybrané tkáně a jejich struktury, popřípadě rozlišit jednotlivé typy tkání. Při barvení se využívá rozdílných afinit buněčných organel k vybraným typům barviv (Vacek, 1988).

4.7.1. Základní druhy barviv

Barviva se dělí na dva základní typy:

- Barviva zásaditá, někdy též bazická, která barví intenzivně jádra buněk (jaderný chromatin). Z tohoto důvodu se občas nazývají též barviva jaderná.
- Barviva kyselá, která intenzivně barví cytoplazmu velkého množství buněk. Z tohoto důvodu se někdy nazývají též barviva plazmatická (Vacek, 1988).

I přes to, že barviva nazýváme kyselými a zásaditými, nejsou to kyseliny ani zásady. Jejich název je odvozen od toho, zda barviva obsahují kyselé nebo zásadité radikály. Podle barvitelnosti jednotlivých organel kyselými či zásaditými barvivy mluvíme o jejich bazofilii, eosinofilii a neutrofilii (Junqueira a kol., 1997; Vacek, 1988).

Nejběžněji používaným kyselým barvivem je eosin. Naopak nejčastěji využívaným zásaditým (bazickým) barvivem je hematoxylin. Spojením těchto dvou barviv získáme nejuniverzálnější barvicí metodu – hematoxylin-eosin (H&E) (Genten a kol., 2009; Junqueira a kol., 1997). Stejně tak jako při chemické fixaci, i zde se využívá různého spojení barviv. Většinou dochází ke spojení zásaditého a kyselého barviva. U některých barviv může dojít ke vzniku tzv. metachromazie, což je jev, při kterém se některé složky tkání nebarví základním tónem barviva (Suvarna a kol., 2013). K metachromazii dochází například u roztoku toluidinové modři, kdy se hlen barví fialově červeně (Vacek, 1988).

Barviva se dělí i podle původu:

- přírodní (přirozená). Mezi přirozená barviva řadíme různé extrakty rostlinného nebo zvířecího původu. Příkladem takovýchto barviv jsou hematoxylin, karmín, nebo šafrán.
- syntetická (umělá). Synteticky vyráběná barviva svým využíváním výrazně převyšují barviva přírodní. V dnešní době se již uměle vyrábí dokonce i některá přirozená barviva (např. hematoxylin) a dochází tedy k úplnému nahrazení přírodních barviv (Vacek, 1988).

Podle toho, kdy se v procesu histologického zpracování rozhodneme tkáň obarvit, můžeme barvení rozdělit na dva typy:

- Barvení tkáň až po fixaci. Tento typ barvení je v histologických laboratořích nejběžněji používaný. Tkáň se barví nejčastěji v řezech přichycených na podložním sklíčku.
- Barvení tkáň v živém organismu. Při barvení *zaživa* se jedná o tzv. vitální barvení, které se dále dělí na přísně vitální barvení a barvení supravitální. Přísně vitální barvení je taková technika, kdy se roztok barviva aplikuje do těla živého organismu, zatímco při supravitálním barvení se aplikuje barvivo až na čerstvě odebrané vzorky tkáň, nebo se barvivo aplikuje do cév těsně po smrti (Vacek, 1988).

4.7.2. Postup barvení

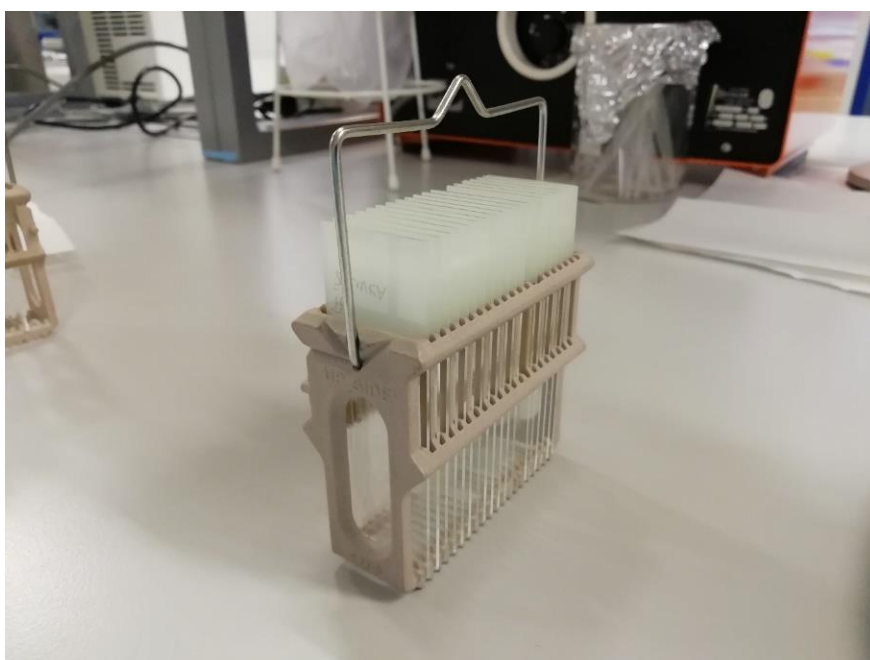
Před samotným barvením je třeba vzorek, v tuto chvíli již nařezaný a přichycený k podložnímu sklíčku, zbavit parafínu (Genten a kol., 2009). Většina barviv je na bázi vody, a tudíž nemísitelná s parafínem. K odparafinování se nejdříve využívá několika lázní xylenu, většinou dvou, po dobu cca 5-ti minut. Jelikož se ani xylen nemísí s vodou, musí následně vzorky projít sestupnou koncentrační ethanolovou řadou (Mumford a kol., 2007; Vacek, 1988).

Vlastní barvení je pro každé barvivo nebo směs barviv specifické. Mezi základní nejpoužívanější barvení patří hematoxylin-eosin (Genten a kol., 2009), kdy se po odparafinování barví řezy nejprve hematoxylinem. Čas barvení je různý a záleží na druhu, stáří barvicího roztoku, typu tkáně a mnoha dalších faktorech. Je však třeba jej dodržovat (Vacek, 1988). Obecně doba barvení hematoxylinem trvá 3-10 minut. V průběhu barvení je možné kontrolovat stupeň obarvení pod mikroskopem (Baria, 2019). Po obarvení řezů hematoxylinem se řezy opláchnou ve vodě, aby se řez zbavil přebytečného barviva. Protože hematoxylin obarví i jiné složky tkáně, musíme je odbarvit, a to pomocí několikavteřinové lázně v kyselém etanolu. Poté je potřeba znovu řezy opláchnout ve vodě a tentokrát zbavit přebytečného etanolu. Následně se řezy obarví v roztoku eosinu, ve kterém jsou ponořeny po dobu 1-5 minut. Po obarvení eosinem je potřeba vzorky opět opláchnout vodou a odvodnit vzestupnou řadou alkoholu. Posledním krokem barvení je tzv. projasnění, a to za pomoci xylenu (Vacek, 1988). Postup barvení je vhodné standardizovat. Celý tento základní barvicí postup je v histologických laboratořích prováděn buďto manuálně, nebo automaticky pomocí barvicích automatů (Obr. 22). Výhodou barvicích automatů je, že všechny kroky jsou stále stejné a nevznikají žádné odchylky mezi jednotlivými preparáty. Odchylky mohou vznikat pouze při nedostatečné výměně barvicích lázní. Ty se proto musí pravidelně měnit dle množství obarvených preparátů (Baria, 2019).

Do automatů se vzorky vkládají ve speciálních košících (Obr. 23), kdy přístroj po vložení košíku provede veškeré lázně a proplachování bez zásahu laboranta.



Obr. 22: Barvicí automat Tissue-Tek® DRS™ 2000 používaný v histologické laboratoři Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech; foto: J. Kocour.



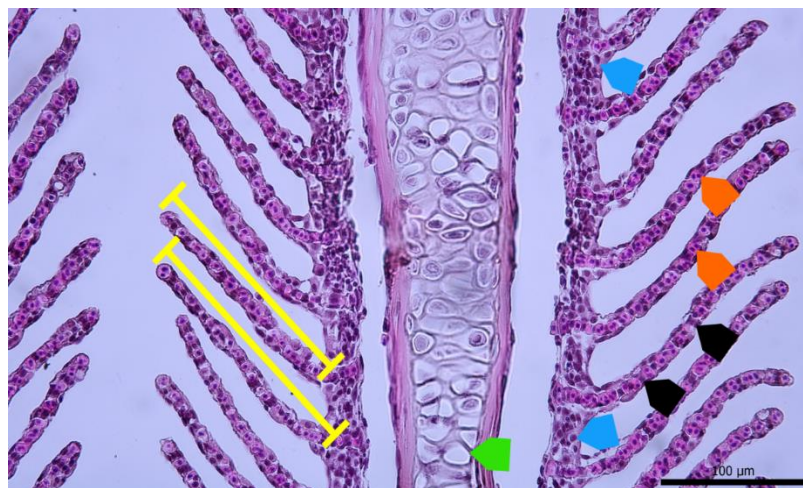
Obr. 23: Speciální košíček naplněný podložními sklíčky s napnutými řezy připravený k obarvení v barvicím automatu; foto: J. Kocour.

4.7.3. Speciální barvicí techniky

V histologii se preparáty běžně barví pomocí hematoxylin-eosinu. Další zmíněné techniky nebývají běžnou součástí histologického vyšetření a používají se jen výjimečně. Konkrétně u vyšetření žaber ryb se speciální barvení využívá pouze pro doplňkové stanovení diagnózy, kdy potřebujeme ve vzorku prokázat konkrétní strukturu a například odlišit určitý typ buněk nebo obsahu. Velká spousta z těchto technik se častokrát kombinuje mezi sebou, a to z důvodu snadnější průkaznosti dané látky (Genten a kol., 2009). Řada barvitelných struktur u ryb má velmi podobné vlastnosti jako mají struktury u savců.

4.7.3.1. Speciální barvicí techniky pro fyziologickou tkáň žaber

Nejprve bych uvedl, jak vypadá žaberní tkáň obarvená hematoxylin-eosinem (Obr. 24). Cytoplazma epitelových, podpůrných, chloridových buněk a hlenových buněk se barví eosinem růžově. Jádra těchto buněk se barví hematoxylinem tmavěji na fialovou barvu. U chondrocytů žaberní tkáně můžeme vidět trošku jiné barvení. Zde se cytoplazma barví světle fialově s tmavším jádrem. Poslední, co můžeme v histologickém preparátu vidět, jsou obarvené erythrocyty. Ty mají růžovou cytoplazmu a tmavě fialové jádro.



Obr. 24: Histologický podélný řez primární lamelou žaberního aparátu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), žlutě jsou označeny sekundární žaberní lamely, zelená šipka označuje chrupavku, modré šipky označují chloridové buňky, černé šipky označují podpůrné buňky a oranžové šipky označují erythrocyty, barveno H&E, zvětšeno 400×; foto: J. Kocour

Barvení Alcianovou modří – Tato technika se běžně užívá pro barvení ve světelné mikroskopii. Alcianová modř byla původně určená k barvení textilu (Suvarna a kol., 2013). V histologii je konkrétně využívána k obarvení kyselých mukopolysacharidů ve vzorcích, které barví do modrozelená. Jádra všech buněk barví do červena (Vacek, 1988). Při aplikaci této techniky barvení na žaberní tkáň se růžově barví erytrocyty, epitelové a podpůrné buňky. Červeně se barví jejich jádra. Cytoplazma hlenových buněk je touto modří obarvena světle modře a jádro není zjevně obarveno. Podobnou barvu cytoplazmy mají také chloridové buňky, u kterých je však jádro obarveno červeně. Červené jádro při tomto barvení vykazují také chondrocyty, které mají cytoplazmu obarvenou na fialovou barvu (Obr. 25A), a tak jsou snadno rozpoznatelné od ostatních (Smith a kol., 2018).

Argyrofilní barvení dle Churukiana a Schenka – Využívá se k obarvení buněk, které umí absorbovat stříbro, ale ke vzniku viditelné formy potřebují redukční činidlo (Carlson a Hladik, 2009). Metoda využívá impregnační roztok se specifickým pH (3,8-4,4), který výrazně redukuje zabarvení pozadí, čímž se zvyšuje kontrast argyrofilních buněk (Churukian a Schenk, 1979). Epitelové, podpůrné a hlenové buňky se touto metodou barví světle žlutohnědě. Při pohledu do mikroskopu se nám může zdát, že buňky jsou odbarvené. Jejich jádra jsou obarvena hnědě. Podobnou barvu vykazují jádra a cytoplazma erytrocytů. Téměř bezbarvě vypadají chondrocyty, jejichž jádra jsou také slabě obarvena (Obr. 25B) (Smith a kol., 2018).

„Fontana-Masson“ barvení – Při této technice se využívá solí stříbra, ale není zde potřeba redukčního činidla jako u předchozí techniky. Tato technika se využívá pro průkaz melaninu ve vzorku (Suvarna a kol., 2013). Rybí žábry se po aplikaci této techniky barví následným způsobem. Epitelové, podpůrné, hlenové a chloridové buňky mají obarvenou cytoplazmu do světle růžové až červené. Podobnou barvu vykazují i chondrocyty a erytrocyty (Obr. 25C). Smith a kol. (2018) při této barvicí technice také zaznamenali v tkáni černá granula, která svým složením odpovídala melaninu.

„Verhoeff“ barvení – Elastické barvení Verhoeff-Van Gieson je jednoduchá metoda, která se používá pro vizualizaci elastických vláken (Kazlouskaya a kol., 2013). Rybí žábry, konkrétně následující typy buněk – epitelové buňky, hlenové buňky, podpůrné buňky a chloridové buňky barví svou cytoplazmu na šedofialovou barvu a jejich jádra jsou tmavě fialová. Podobnou barvu jádra vykazují i chondrocyty, které mají však cytoplazmu růžovou (Obr. 25D) (Smith a kol., 2018).

Trichomové barvení (jednokrokové Gomoriho barvení) – Tuto metodu barvení objevil v roce 1950 George Gömöri a běžně se využívá pro barvení svalových vláken a na buněčné úrovni též ke stanovení mitochondriálních myopatií. V rybí histologii se tato metoda barvení mimo jiné využívá i k diferenciaci rybích žábrolístů – parazitů přítomných na žábřácích (Kritsky a kol., 1978). Při tomto jednokrokovém barvení vykazují epitelové, podpůrné, hlenové a chloridové buňky červenou a fialovou cytoplazmu a tmavě modrá jádra. Cytoplazma erytrocytů se barví na tmavě růžovou až červenou, zatímco jejich jádra se barví na červenou až fialovou barvu. Jádra chondrocytů se barví na modrou až fialovou barvu a jejich cytoplazma se jeví jako světle modrá až světle šedá (Obr. 25E). Kolagen obsažený v žaberním oblouku bývá světle modrý až šedý (Smith a kol., 2018).

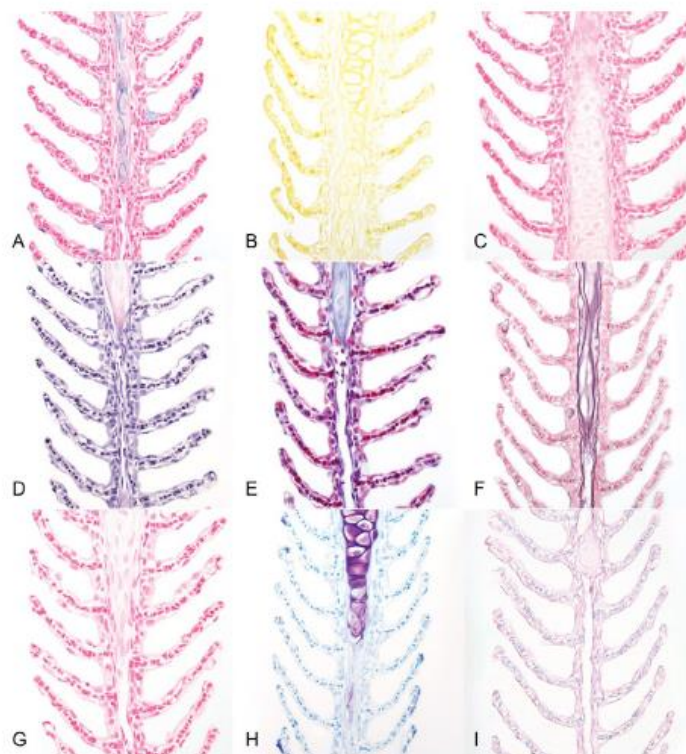
„Reticulin“ barvení – Běžně se této techniky využívá pro průkaz retikulárních vláken tvořících architekturu hypofýzy nebo stromatu různých orgánů a tkání (Rendon a kol., 1997). Toto barvivo se používá ve spojení s hematoxylinem. Epitelové, podpůrné a chloridové buňky mají při této barvicí technice světle růžovou cytoplazmu. Jejich jádra jsou obarvena na tmavě růžovou barvu. Hlenové buňky jsou tentokrát lépe rozeznatelné, jejich cytoplazma je obarvena na šedivou barvu, ale jádra nejsou zřetelná. Na rozdíl od hlenových buněk mají erytrocyty šedo-růžovou barvu a jejich jádra jsou růžová. Kolagen v žaberním preparátu vykazuje šedou až černou barvu a chondrocyty uvnitř vlákna mají šedou až bezbarvou cytoplazmu s růžovým jádrem (Obr. 25F) (Smith a kol., 2018).

Průkaz vápníku dle Kossy – Pro rutinní průkaz solí vápníku ve vzorku se využívá právě této metody (Suvarna a kol., 2013). V případě výskytu vápníku ve vzorku při užití této metody bychom mohli vápník pozorovat jako černé skvrny ve vzorku (Vacek, 1988). Smith a kol. (2018) ve vzorku žaber pstruha duhového vápník neprokázali. Epitelové, podpůrné, hlenové a chloridové buňky jsou buňky, které při tomto barvení běžně mají šedo-růžovou cytoplazmu s červeným jádrem. U erytrocytů se cytoplazma vůbec neobarvila ale jejich jádro se obarvilo na červenou barvu. Jádra chondrocytů se barví na růžovou až červenou barvu a okolní cytoplazma bývá růžová až bezbarvá (Obr. 25G). Podobné barvy vykazuje i kolagen uvnitř preparátů (Smith a kol., 2018).

„Toluidine blue“ barvení – Podobně jako Giemsovo barvení (uvedeno později) se této techniky využívá často ke stanovení heparinu v cytoplazmatických granulích savčích mastocytů (Smith a kol., 2018). Toluidinová modř je využívána k identifikaci glykosaminoglykanů ve tkáni (Carvajal a kol., 2001) a rovněž ke kvantifikaci rybích

krevních bazofilů (Tavares-Dias, 2006). Při užití této techniky barvení na žábřácích mívají světle modrou až bezbarvou cytoplazmu s modrými jádry epitelové, podpůrné a chloridové buňky. Hlenové buňky jsou při tomto barvení fialové s nezřetelnými jádry. Zřetelně modré jádro uvnitř bezbarvé cytoplazmy mají erytrocyty. Na první pohled odlišné jsou chondrocyty, které mají tmavě fialovou cytoplazmu s modrými jádry (Obr. 25H) (Smith a kol., 2018).

Barvení pruskou modří – Toto barvivo je také známé pod názvem Berlínská modř. Běžně se toto barvivo využívá pro průkaz železa ve vzorku. Pomocí této techniky je možné ve vzorku prokázat hemoglobin (Suvarna a kol., 2013). Obarvením rybích žaber mají epitelové, podpůrné a chloridové buňky světle růžovou cytoplazmu a uvnitř mají modrá jádra. Odlišné jsou hlenové buňky, které mají růžovou cytoplazmu s tmavě růžovými jádry. Světle modrou cytoplazmu s tmavě modrými jádry mají erytrocyty. Chondrocyty mají růžovou cytoplazmu s růžovými jádry (Obr. 25I) (Smith a kol., 2018).



Obr. 25: Speciální barvicí techniky pro zdravou tkáň, A-Barvení alcianovou modří, B-Argyrofilní barvení, C-„Fontana-Masson“ barvení, D-„Verhoeff elastic“ barvení, E-Trichomové barvení, F-„Reticulin“ barvení, G- Průkaz vápníku dle Kossy, H-„Toluidine blue“ barvení, I- Barvení pruskou modří; převzato ze Smith a kol. (2018).

4.7.3.2. Speciální barvicí techniky pro stanovení infekčních agens

Protože žábry jsou orgán, který je neustále ve styku s vodou, ve které mohou být infekční agens, je možné využít i barvicích technik určených primárně pro detekci přítomných patogenů.

„Acid-fast bacteria“ barvení – U tohoto typu barvení je nutno hned na začátek uvést, že nezobrazuje dostatečně dobře strukturu žaber. Není tedy vhodné pro sledování jejich struktury. Využívá se zde kyseliny a kontrastního barviva, jako je například methylenová modř. Pomocí acid-fast technik můžeme ve vzorku rybích žaber identifikovat především acid-fast organismy, především tedy bakterie. Je ale možné identifikovat i mykobakterie, *Cryptosporidium* sp., *Isospora* sp. a spory některých mikrosporidií. Klasické acidorezistentní techniky barvení pro světelnou mikroskopii používají karbol-fuchsin, kde je hlavní složkou žíravý a nebezpečný fenol. Nová technika využívající zahřátý vodný zásaditý fuchsin může obarvit acidorezistentní patogeny jako je např. *Mycobacterium marinum*. Tato metoda je potenciálně cenným a bezpečnějším diagnostickým nástrojem pro vybrané vodní patologie (McCollough, 2008). Histologický vzorek žaber se při této technice obarví následovně – epitelové, podpurné, hlenové a chloridové buňky se totiž při tomto obarvení jeví odbarveny. Podobně na tom jsou erytrocyty, které mohou mít slabě modrou cytoplazmu s modrým jádrem. Hezky zřetelné jsou při tomto barvení chondrocyty, které vykazují fialovou cytoplazmu s tmavě modrým jádrem (Obr. 26A) (Smith a kol., 2018).

„Fite“ barvení – Tato technika je používána také pro stanovení acid-fast organismů ve vzorku například pro stanovení *Mycobacterium leprae* (Suvarna a kol., 2013). Stejně jako předchozí technika, ani tato není vhodná pro stanovování struktury žaber. Protože odbarvenou cytoplazmu s modrými jádry při tomto barvení vykazují epitelové, podpurné, hlenové a chloridové buňky. Erytrocyty se barví podobně, ale některá jejich jádra vykazují růžovou až fialovou barvu. Tmavě fialová jádra s fialovou okolní cytoplazmou mívají chondrocyty (Obr. 26B) (Smith a kol., 2018).

„Grocott methenamine silver“ barvení – Toto barvivo se využívá pro průkaz polysacharidů a to tak, že je pod mikroskopem můžeme pozorovat jako černé skvrny. Konkrétně se tímto způsobem dají ve vzorku určovat různé houby, protože jejich buněčné stěny jsou plné polysacharidů (Suvarna a kol., 2013). U vzorku rybích žaber tímto způsobem můžeme zjišťovat přítomnost *Saprolegnia* sp. nebo *Aphanomyces* sp.

Epitelové, podpůrné, chloridové buňky, a dokonce i erytrocyty a chondrocyty se při této technice barví na modro-zelenou barvu. Jejich jádra jsou o trochu tmavší než okolní cytoplazma, ale vykazují podobnou barvu. Z této skupiny buněk se mohou „oddělit“ některé chondrocyty, které mohou mít lehce nahnědlou barvu (Obr. 26C). V cytoplasmě hlenových buněk se vyskytují tmavě šedá až černá granula, jejich jádra ale nejsou rozeznatelná od okolní cytoplazmy (Smith a kol., 2018).

Barvení mucikarmínem – Mucikarmín je barvivo používající se ve světelné mikroskopii k obarvení hlenu, kyselých mukopolysacharidů (Suvarna a kol., 2013). Ve vzorku rybích žaber nám může tato technika být užitečná v případě zvýšeného vylučování hlenu například k prokázání zánětlivého onemocnění. Hlen se barví červeně. Cytoplazma epitelových, podpůrných, hlenových a chloridových buněk se barví na žlutohnědou barvu, jejich jádra na tmavě hnědou. Jádra erytrocytů se barví na světle až tmavě hnědou a okolní cytoplazma na žlutou barvu. Chondrocyty mají růžovou cytoplazmu s hnědými jádry (Obr. 26D) (Smith a kol., 2018).

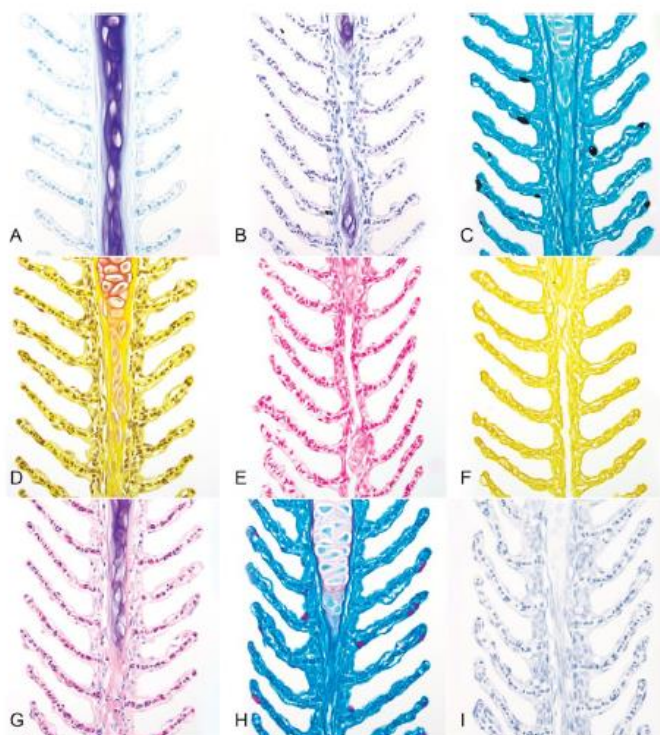
Gramovo barvení (dle Browna a Brenna) – Gramovo barvení je technika, která se běžně využívá k odlišení dvou velkých skupin bakterií, a to dle uspořádání jejich buněčných stěn. Bakterie rozlišuje na gram-pozitivní a gram-negativní (Lee, 1968; Carlson a Hladik, 2009). Mezi gram-negativní původce onemocnění žaber u ryb můžeme zařadit například *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp. Do skupiny gram-pozitivních původců onemocnění rybích žaber se řadí *Mycobacterium* sp. Tato technika cytoplazmu epitelových, podpůrných, hlenových a chloridových buněk a spolu s nimi i erytrocytů téměř nebarví, jeví se bezbarvě, ale jejich jádra jsou tmavě fialová až červená. Světle červenou až růžovou cytoplazmu s tmavě růžovými jádry mají chondrocyty (Obr. 26E) (Smith a kol., 2018).

„Steiner“ barvení – Těto metody se využívá hlavně pro detekci nevláknitých bakterií. Při výskytu bakterií rodu *Flavobacterium* sp. a dalších nevláknitých bakterií ve vzorku se tyto bakterie barví na tmavě hnědou až černou barvu. Cytoplazma a jádra buněk v žaberních lamelách se při této technice barví podobně jako u předchozí metody, a to na zlatou barvu. Jádra ale bývají o trochu tmavší než cytoplazma. Barva erytrocytů bývá podobná. Chondrocyty mívají hnědo-zlatou cytoplazmu s tmavšími zlatými jádry (Obr. 26F). Je nutné říci, že tato metoda nezvýrazňuje žádné specifické struktury rybích žaber (Smith a kol., 2018).

Giemsovo barvení – Giemsovo barvení je technika, při které se kombinují kyselá a zásaditá barviva (eosin a methylenová modř). Běžně je používána lékaři v praxi. Jde totiž o rutinní techniku pro stanovování jaderných cytoplazmatických znaků. Jsme pomocí ní schopni identifikovat protozoa (Suvarna a kol., 2013). Při této technice barvení jsou barveny acidické struktury do červena, zatímco bazické struktury do modra. Při aplikaci na vzorek rybích žaber se vzorek obarví následovně. Epitelové a podpůrné buňky jsou buňky, kterým se cytoplazma barví na velmi světlou růžovou, jejich jádra se barví ale na modro. Chloridovým a hlenovým buňkám se cytoplazma barví na světle šedou až modrou barvu s modrými jádry. Erytrocyty mají tmavě růžovou cytoplazmu s modro-fialovými jádry. Cytoplazma chondrocytů se barví na modro a jejich jádra bývají tmavě fialová (Obr. 26G) (Smith a kol., 2018).

„Periodic acid-Shiff“ metoda barvení – Tato technika je známa také pod zkráceným názvem PAS. Její využití prokazuje přítomnost polysacharidů ve vzorku, především glykogenu, ale i mucinu (Suvarna a kol., 2013). Epitelové, podpůrné a chloridové buňky i erytrocyty mívají jádra, ale i okolní cytoplazmu obarvenou na modrozelenou barvu. Tmavě růžovou cytoplazmu s nezřetelnými jádry vykazují hlenové buňky. Chondrocyty se při této technice dají lehce rozeznat proto, že jejich cytoplazma bývá růžová a jádra zeleno-modrá (Obr. 26H) (Smith a kol., 2018).

„Luna“ barvení – Tento způsob barvení se využívá pro barvení elastinu. Cytoplazma epitelových, podpůrných, hlenových a chloridových buněk bývá bezbarvá až světle modrá s tmavě modrými jádry. Erytrocyty bývají podobně obarveny, jejich cytoplazma bývá světle až tmavě modrá s tmavě modrými jádry. Tmavě modrá jádra mívají i chondrocyty (Obr. 26I) (Smith a kol., 2018).

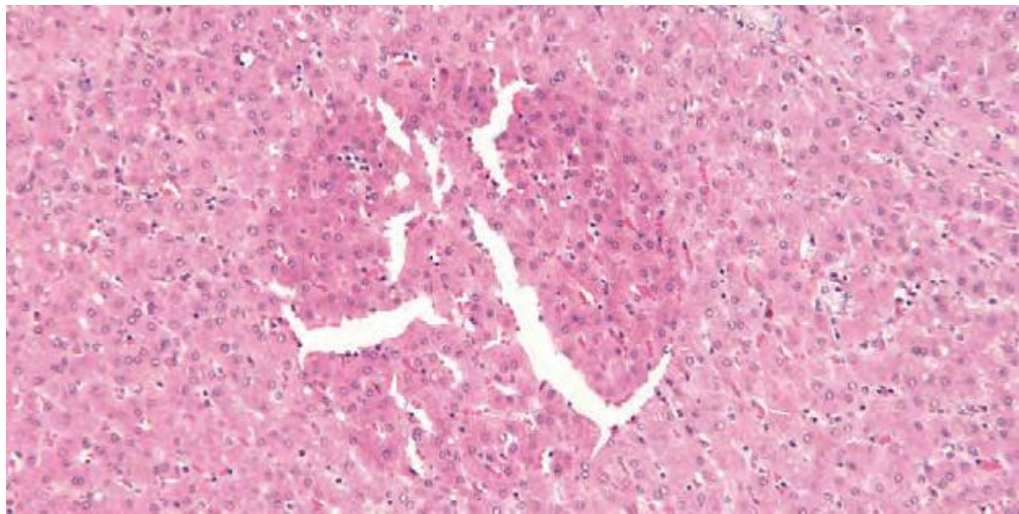


Obr. 26: Speciální barvicí techniky pro stanovení infekčních agens, A-„Acid-fast bacteria“ barvení, B-„Fite“ barvení, C-„Grocott methenamine silver“ barvení, D- Barvení mucikarmínem, E- Gramovo barvení, F-„Steiner“ barvení, G- Giemsovo barvení, H-„Periodic acid-Shiff“ barvení, I-„Luna“ barvení; převzato ze Smith a kol. (2018).

4.8. Montování

Úplně posledním krokem při tvorbě histologických preparátů je montování. Tomuto kroku se někdy říká také uzavírání preparátů, protože jde o zakrytí preparátu krycím sklíčkem a uzavírajícím médiem (Genten a kol., 2009). Uzavírající médium je látka, v podstatě by se dalo říci lepidlo, které přichytí krycí sklíčko k podložnímu. Médium by mělo mít vysoký index lomu světla, musí být dokonale průhledné a nesmí poškozovat tkáň a jejich obarvení. Média lze rozdělit dle mísitelnosti do dvou skupin. První skupinou jsou látky nemísící se s vodou, ale rozpustné v xylenu. Jsou to například kanadský balzám či různé syntetické preparáty. Do druhé skupiny řadíme látky mísící se s vodou. Takovými látkami jsou například glycerin či glycerinová želatina. Uzavírání pomocí látek mísících se s vodou je vhodné pro vzorky, které nesmí přijít do styku s xylemem například při prokazování lipidů (Vacek, 1988).

Samotný postup montování probíhá tak, že na vzorek nanese potřebnou vrstvu uzavírajícího média a položíme na něj krycí sklíčko. Snažíme se o to, aby nevznikly bubliny a tkáň byla celá zalitá médiem. V případě vzniku bubliny na vzorku se ji opatrně snažíme odstranit pomocí tlaku na krycí sklo (Obr. 27). Musíme však dávat pozor na to, aby nedošlo ke znehodnocení tkáně. Kritickým místem při montování je také oschnutí tkáně na podložním sklíčku. Takové oschnutí může způsobit zčernání některých jader (Baria, 2019). Při montování musíme postupovat rychle, aby řezy neoschly.

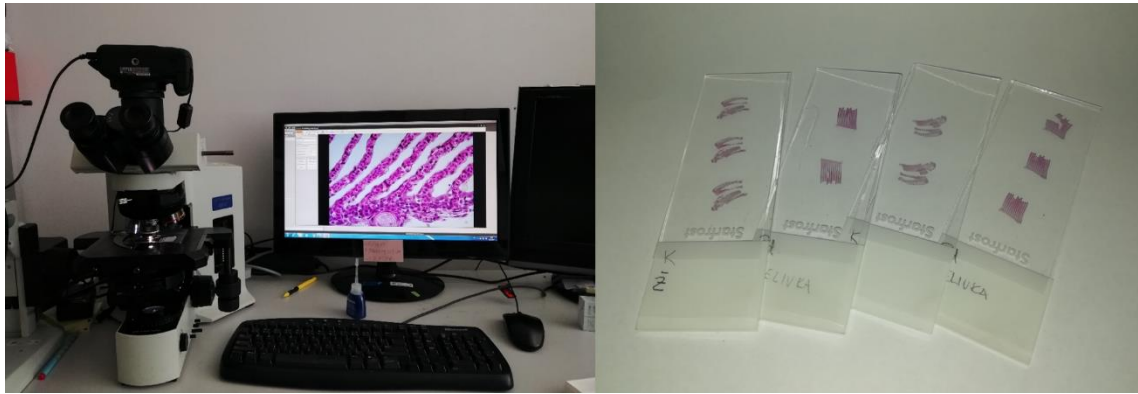


Obr. 27: Histologický řez jaterní tkáně člověka, vzorek byl znehodnocen vznikem bubliny při montování, barveno H&E, převzato z Baria (2019).

4.9. Vyhodnocování vzorků

K vyhodnocování histologických preparátů dochází většinou pod optickým mikroskopem (Obr. 28), kdy hodnotitel pohledem do mikroskopu studuje předem obarvené vzorky. Při vyhodnocování musíme pečlivě prohlédnout celý vzorek. Kritickým místem vyhodnocování je rozlišovací schopnost mikroskopů. Můžeme ji definovat jako nejmenší vzdálenost mezi dvěma částicemi, při které je ještě dokážeme od sebe odlišit jako dva samostatné objekty. Rozlišovací schopnost nejlepších světelných mikroskopů bývá $0,2\mu\text{m}$ a je dána především čočkou objektivu (Junqueira a kol., 1997). Výsledek může být ovlivněn nejen mikroskopem, ale i celou řadou dalších faktorů. Je proto nutné být při přípravě preparátu pečlivý, ale také znát výsledky dalších vyšetření konkrétní ryby

(Marinović a kol., 2021). K porovnání histologických preparátů lze využít řadu parametrů. V kapitole 6 je pro příklad rozepsána metoda hodnocení, kterou navrhl Bernet a kol. (1999).



Obr. 28: Vlevo vyhodnocování vzorku žaberního aparátu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), vpravo hotové histologické preparáty; foto: J. Kocour.

5. KLASIFIKACE ZMĚN ŽABERNÍHO APARÁTU

Ryby jsou organismy trvale žijící ve vodě, čímž jsou neustále vystaveny všem látkám, které jsou ve vodě rozpuštěny. Vyšším koncentracím nebezpečných látek jsou ryby vystaveny například v místech, kde dochází k malému ředění odpadních vod. Jak uvádí Bernet a kol. (1999), na světě neexistuje žádná standardizovaná metoda, kterou by bylo možné hodnotit histologické změny způsobené takovými vlivy. Hodnocení histopatologických změn tkání se využívá například v toxikologii. Nørregaard a kol. (2022) dokonce doporučuje začlenění histologie spolu s biochemickým rozбором krve a stanovením koncentrací prvků v rybách mezi standardní vedlejší ukazatele při frekventovaném hodnocení účinků různých typů znečištění na volně žijící ryby. Histopatologické změny se posuzují v rámci porovnávání (monitoringu) různých vodních ekosystémů. Pro histopatologické zkoumání jsou vhodné ledviny, žábry, játra a kůže. Nejcitlivějšími orgány jsou žábry a kůže, protože jsou neustále v přímém kontaktu s vodním prostředím, zaujímají velkou plochu a mají tenký epitel, čímž jsou však i nejsnáze ovlivnitelnými orgány (Mallatt, 1985). Tato práce je zaměřena pouze na rybí žábry.

Bernet a kol. (1999) navrhli metodu pro srovnávání histopatologických změn. U každého orgánu, tedy i žaber, je možné klasifikovat změny do pěti reakčních vzorců, jakýchsi skupin změn (Tab. 2). Každý vzorec obsahuje několik změn týkajících se buď celého orgánu nebo pouze jeho funkční části. V této práci se budu věnovat pouze metodě, která se zabývá studiem rybích žaber, pro které Bernet a kol. (1999) popsali reakční vzorce následovně:

Tab. 2: Rozdělení změn žaber a jejich odpovídající faktory důležitosti (Bernet a kol., 1999).

Reakční vzorec	Funkční jednotka tkáň	Změny	Faktor důležitosti
1) Poruchy krevního oběhu		Hemoragie, hyperémie, aneurysma	W=1
		Mezibuněčný edém	W=1
2) Regresivní změny	Epitel	Strukturní změny	W=1
		Plazmatické změny	W=1
		Usazeniny	W=1
		Nukleární změny	W=2
		Atrofie	W=2
		Nekróza	W=3
	Podpůrná tkáň	Roztrhání pilířových buněk	
		Strukturní změny	W=1
		Plazmatické změny	W=1
		Usazeniny	W=1
		Nukleární změny	W=2
		Atrofie	W=2
3) Progresivní změny	Epitel	Hypertrofie	W=1
		Hyperplazie	W=2
	Podpůrná tkáň	Hypertrofie	W=1
		Hyperplazie	W=2
4) Zánět		Exudát	W=1
		Aktivace retikuloendotelního systému	W=1
		Infiltrace	W=2
5) Nádor		Nezhoubný nádor	W=2
		Zhoubný nádor	W=3

Každý zpracovaný histologický preparát musí být mikroskopicky vyhodnocen a následně ohodnocen, aby mohl být porovnán s jinými preparáty ohodnocenými stejnou metodou (Tab. 3). Ukazatele jednotlivých vzorků se propočítají na základě dvou hodnot, kterými jsou „faktor důležitosti“ a „hodnota skóre“.

Faktor důležitosti (w) je hodnota, která udává, jak je funkce orgánů ovlivněna a tím, jak je ovlivněno přežití ryby (Tab. 2). Dle vyskytujících-se funkčních změn se faktor důležitosti dělí do 3 tříd:

- 1 – minimální význam – patologická změna je reverzibilní, navrátí se po ukončení expozice dané látky působící tuto patologickou změnu
- 2 – střední význam – patologická změna je ve většině případů reverzibilní za předpokladu, že je látka, která tuto změnu působí z prostředí odstraněna a organismus jí dále není vystaven
- 3 – velký význam – patologická změna je ireverzibilní, takovou změnou dochází k trvalému poškození části nebo celé funkce orgánu

Hodnota skóre (a) je druhý ukazatel udávající stupeň a rozsah změny. Toto skóre se pohybuje v rozmezí od 0 do 6. Hodnota 0 označuje takový stupeň a rozsah, který není změněn oproti normálnímu stavu a nepředstavuje tedy žádné ohrožení. Naopak hodnota 6 označuje nejhorší stupeň a tím i závažný výskyt změn (rozptýlené změny).

Tab. 3: Návrh tabulky indexů změn jedné ryby, u které byly vyšetřeny čtyři orgány (Bernet a kol., 1999).

Orgán	Reakční vzorec					Σ
	rv ₁	rv ₂	rv ₃	rv ₄	rv ₅	
org ₁	I org ₁ rv ₁	I org ₁ rv ₂	I org ₁ rv ₃	I org ₁ rv ₄	I org ₁ rv ₅	I org ₁
org ₂	I org ₂ rv ₁	I org ₂ rv ₂	I org ₂ rv ₃	I org ₂ rv ₄	I org ₂ rv ₅	I org ₂
org ₃	I org ₃ rv ₁	I org ₃ rv ₂	I org ₃ rv ₃	I org ₃ rv ₄	I org ₃ rv ₅	I org ₃
org ₄	I org ₄ rv ₁	I org ₄ rv ₂	I org ₄ rv ₃	I org ₄ rv ₄	I org ₄ rv ₅	I org ₄
Σ	I rv ₁	I rv ₂	I rv ₃	I rv ₄	I rv ₅	Tot-I

Pomocí hodnot faktoru důležitosti a hodnoty skóre je možné vypočítat čtyři ukazatele. Pro zkoumání změn pouze v jednom orgánu se využívá dvou prvních vzorců.

Orgánový index

$$I_{\text{org}} = \sum_{\text{rv}} \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rv alt}} \times w_{\text{org rv alt}})$$

kde:

org = orgán (konstanta)

rv = reakční vzorec

alt = alterace

a = hodnota skóre

w = faktor důležitosti

Tímto indexem se vyjadřuje stupeň poškození orgánu a můžeme pomocí něho porovnávat orgány od různých jedinců. Je to součet všech násobků faktorů důležitosti a všech bodových hodnot všech změn ve vyšetřovaném orgánu. Vysoké hodnoty indexu vyjadřují větší stupeň poškození orgánu.

Reakční orgánový index

$$I_{\text{org rv}} = \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rv alt}} \times w_{\text{org rv alt}})$$

kde:

org rv = konstanta

alt = alterace

org = orgán (konstanta)

rv = reakční vzorec

a = hodnota skóre

w = faktor důležitosti

Tento index se vypočítá součtem vynásobených faktorů důležitosti a hodnot skóre změn odpovídajícího reakčního vzorce. Součtem všech pěti reakčních vzorců se získá orgánový index (I_{org}).

Dva níže uvedené vzorce se používají pro hodnocení několika orgánů ryb.

Celkový index (Tot-I)

$$\text{Tot-I} = \sum_{\text{org}} \sum_{\text{rv}} \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rv alt}} \times w_{\text{org rv alt}})$$

kde:

org = orgán (konstanta)

rv = reakční vzorec

alt = alterace

a = hodnota skóre

w = faktor důležitosti

Pomocí tohoto indexu se vypočítává a posuzuje stupeň zdravotního stavu ryby a lze hodnotit stupeň poškození mezi více jedinci. Vypočítá se jako součet všech orgánových indexů jednotlivých ryb.

Celkový reakční index

$$I_{rv} = \sum_{org} \sum_{alt} (a_{org\ rv\ alt} \times w_{org\ rv\ alt})$$

kde:

rv = konstanta

org = orgán (konstanta)

alt = alterace

a = hodnota skóre

w = faktor důležitosti

Celkový reakční index udává hodnotu histologických změn ve všech vyšetřovaných orgánech jednotlivých ryb. Je to součet všech odpovídajících reakčních indexů všech vyšetřovaných orgánů.

6. ZMĚNY ŽABERNÍHO APARÁTU

Strukturální změny žaber vznikají především jako obranné mechanismy nebo v důsledku poškození xenobiotiky či jinými škodlivými faktory vnějšího prostředí. Některé změny mohou být nevratné, jiné se mohou po ukončení expozice vrátit do původního stavu. Některé změny, obvykle vyvolané působením xenobiotik, mohou vyvolat i parazité. Takovými změnami jsou například hyperplazie či nekróza (Hossain a kol., 2007; Santos a kol., 2017). Z tohoto důvodu je vhodné před histologickým vyšetřením provést parazitologické vyšetření, aby došlo k jasnému vymezení účinků xenobiotik od změn způsobených parazitární invazí (Marinović a kol., 2021). Kromě parazitů je třeba dávat pozor na výskyt možných artefaktů. Například odlupování epitelu může být způsobeno špatnou manipulací se vzorkem. Takovéto artefakty mohou být chybně popsány jako změny žaber způsobené například xenobiotiky (Wolf a kol., 2015). Změny žaberního aparátu můžeme dle Berneta a kol. (1999) rozdělit do pěti základních skupin.

- **Oběhové poruchy**

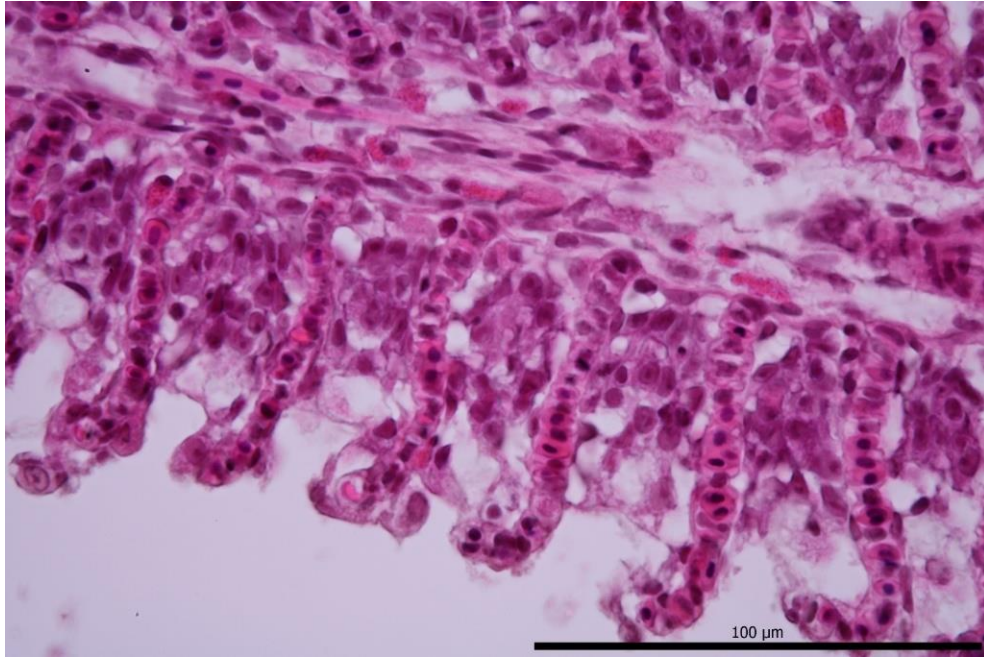
Do této skupiny se řadí poruchy způsobené patologickými změnami průtoku krve a tkáňových tekutin. Takové změny souvisí například s výskytem krvácenin (hemoragie) způsobených únikem krve z cév. Dalším příkladem oběhové poruchy je hyperémie, která je způsobena překrvením orgánu. Aneurysma je rozšíření cévy, způsobené strukturálními změnami cévní stěny. Posledním typem změny, která se řadí do skupiny oběhových poruch je mezibuněčný edém, tedy zvětšení objemu mezibuněčného prostoru (Bernet a kol., 1999).

- **Regresivní změny**

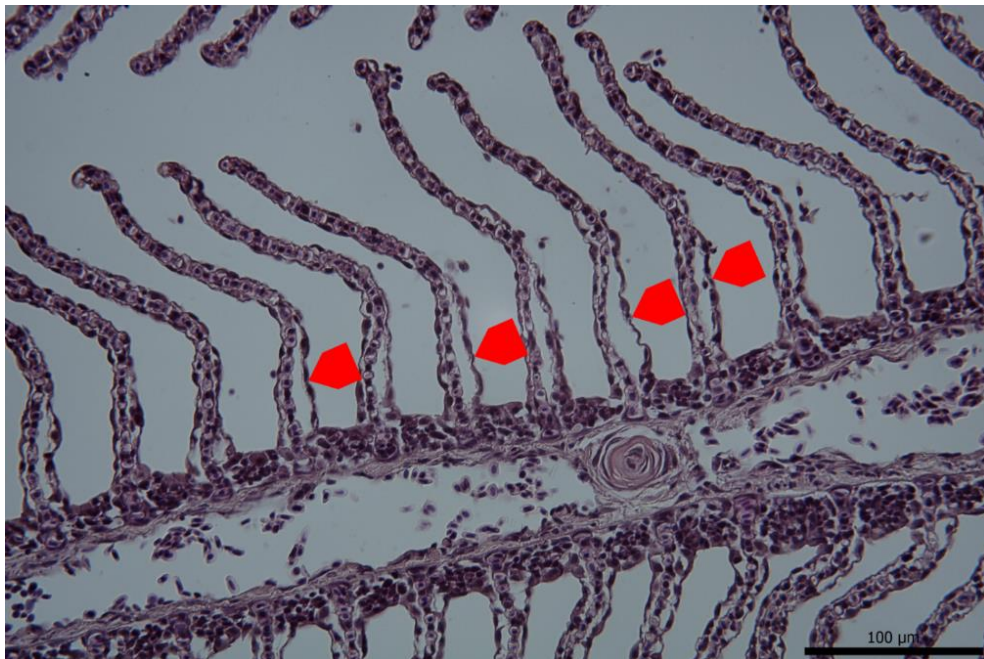
Změny způsobující zmenšení či vymizení části orgánu. Jedná se o změny nevratné, zahrnující architektonické či strukturální změny buněk. Dále sem řadíme změny plazmatické, způsobené různými typy kapének a depozita vzniklá nahromaděním látek z degenerativních procesů. Rovněž sem patří buněčné změny jako jsou atrofie (snížení počtu nebo objemu buněk), jaderné změny (změny tvaru jádra nebo chromatinu) a nekrózy (stav způsobený nevratnou ztrátou funkcí) (Bernet a kol., 1999).

- **Progresivní změny**

Skupina změn vedoucích ke zvýšené aktivitě buněk či tkání. Mezi tyto změny řadíme hypertrofii buněk, což je zvětšení jejich objemu bez zmnožení. Dle Mallatta (1985) je hypertrofie ještě spolu s nekrotizací častým důsledkem působení těžkých kovů. Opakem hypertrofie je hyperplazie (Obr. 29), při které dochází ke zmnožení počtu buněk, ale nedochází ke zvětšení jejich objemu. Hypertrofie, hyperplazie, a odlupování epitelu jsou změny, které jsou považované za obranné mechanismy žaber. Hypertrofie snižuje dýchací plochu a hyperplazie spolu s odlupováním epitelu (Obr. 30) zvětšují difuzní vzdálenost, čímž dochází ke snížení a zabránění příjmu xenobiotik (Mallatt, 1985; Roberts, 2012). Skupina těchto změn je reverzibilní, po ukončení expozice xenobiotikem se tkáň zotaví (Bernet a kol., 1999).



Obr. 29: Histologický řez žaberním aparátem plůdku kapra obecného, v preparátu je vidět zřetelná hyperplazie žaberního epitelu, barveno H&E, zvětšeno 1000×; foto J. Kocour.



Obr. 30: Histologický řez žaberním aparátem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), červené šipky označují místa, kde došlo k odlupování epitelu vlivem působení xenobiotik, barveno H&E, zvětšeno 400×; foto: J. Kocour.

- **Zánět**

Zánětlivé změny většinou souvisí se změnami z jiných skupin. Dle Berneta a kol. (1999) užívají současní autoři pojem zánět pouze ve velmi úzkém smyslu. Do této skupiny řadíme exsudát (tekutina s vysokým obsahem bílkovinných a buněčných zbytků vylučovaná lymfatickými nebo krevními cévami). Dále je sem řazena hypertrofie retikuloendoteliálního systému vystýlajícího malé cévy a infiltrace leukocytů do tkáně skrze stěny cév.

- **Nádory**

Poslední skupinou změn jsou nádory. Nádory jsou místa, kde dochází k nekontrolovanému bujení buněk. Rozdělujeme je na dvě skupiny. První skupinou jsou nádory benigní, tedy nezhoubné, tvořené diferencovanými buňkami, které vytlačují buňky původní. Druhou skupinou jsou nádory maligní, tedy zhoubné, tvořené špatně diferencovanými, velmi rychle se množícími buňkami, které napadají a ničí okolní tkáň. Jejich chování je biologicky nepříznivé (Bernet a kol., 1999).

7. ZÁVĚR

Histologie je výborným nástrojem ke kontrole a hodnocení zdravotního stavu organismů. U lidí se histologických vyšetření běžně využívá pro stanovení diagnózy. Při zjišťování zdravotního stavu ryb tomu tak však není. Histologická vyšetření se u ryb využívají převážně doplňkově, a to i přes to, že se tak dají stanovit i různé patogeny a onemocnění. Problémem je hlavně delší doba zpracování a značná pracnost. Histologické vyšetření navíc není vhodné pro diagnózu všech onemocnění. Například stanovení parazitů není histologicky vůbec snadné. Vidíme je jen v řezu, z čehož vyplývá, že například druh ve většině případů nelze stanovit, neboť parazita nevidíme celého. Velmi často se musí využít dalšího typu vyšetření. Nejčastěji používanou tkání pro vyšetření zdravotního stavu ryb bývají rybí žábry. Pro většinu vyšetření jsou vhodné, neboť jsou neustále prokrvované, mají tenký epitel a velkou plochu určenou hlavně pro výměnu plynů. Navíc jsou velmi citlivé na styk s různými xenobiotiky.

Má práce může být přínosem pro ty, kteří chtějí připravit a vyhodnotit histologický preparát žaber. Do budoucna by se mohla stát zdrojem dalších prací zabývajících se určováním změn žaberního aparátu způsobených konkrétními xenobiotiky.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Avella, M., Bornancin, M., 1989. A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*. 142, 155-175.
- Baria s.r.o., 2019. 101 kroků k lepší histologii. Dostupné z: <https://www.baria.cz/wp-content/uploads/2019/09/101-kroku.pdf>, (navštíveno online 13. 4. 2022).
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22, 25-34.
- Bettex-Galland, M., Hughes, G.M., 1973. Contractile filamentous material in the pillar cells of fish gills. *Journal of Cell Science*. 13, 359-370.
- Bone, Q., Moore, R., 2007. *Biology of fishes*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis. 478 s.
- Brauer, P.R., Sanmann, J.N., Petzel, D.H., 2005. Effects of warm acclimation on Na⁺, K⁺ - ATPase α -subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. *The Anatomical Record Part A*. 285, 600-609.
- Cameron, J.N., Polhemus, J.A., 1974. Theory of CO₂ exchange in trout gills. *Journal of Experimental Biology*. 60, 183-194.
- Carlson, F.L., Hladik, C., 2009. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd ed. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press. 400 s.
- Carvajal, J., Ruiz, G., Sepúlveda, F., 2001. Symbiotic relationship between *Udonella* sp. (Monogenea) and *Caligus rogercressevi* (Copepoda), a parasite of the Chilean rock cod *Eleginops maclovinus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 33, 31-36.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 302-319.
- Claiborne, J.B., Heisler, N., 1986. Acid-base regulation and ion transfers in the carp (*Cyprinus carpio*): pH compensation during graded long- and short-term environmental hypercapnia, and the effect of bicarbonate infusion. *The Journal of Experimental Biology*. 126, 41-61.
- Conley, D.M., Mallatt, J., 1988. Histochemical localization of Na⁺-K⁺ ATPase and carbonic anhydrase activity in gills of 17 fish species. *Canadian Journal of Zoology*. 66, 2398-2405.
- Cooper, A. J. L., Plum, F., 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews*. 67, 440-519.
- Cutler, C.P., Cramb, G., 2002. Branchial expression of an aquaporin 3 (AQP-3) homologue is downregulated in the European eel *Anguilla anguilla* following seawater acclimation. *The Journal of Experimental Biology*. 205, 2643-2651.
- Dang, Z., Balm, P.H.M., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Lock, R.A.C., 2000. Cortisol increases Na⁺/K⁺-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *The Journal of Experimental Biology*. 203, 2349-2355.

- Desforges, P.R., Gilmour, K.M., Perry, S.F., 2001. The effects of exogenous extracellular carbonic anhydrase on CO₂ excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role of plasma buffering capacity. *Journal of Comparative Physiology B*. 171, 465-473.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. První vydání. Praha: Informatorium. 308 s.
- Dvořák, P., Pyszko, M., Velíšek, J., Dvořáková Líšková, Z., Andreji, J., 2020. *Anatomie a fyziologie ryb*. 2. aktualizované vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 231 s.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., Grizzle, W.E., 2001. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *The Journal of Histotechnology*. 24, 173-190.
- Evans, D.H., 1969. Studies on the permeability to water of selected marine, freshwater and euryhaline teleosts. *Journal of Experimental Biology*. 50, 689-703.
- Evans, D.H., 1993. *The physiology of fishes*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press. 608 s.
- Evans, D.H., 1998. *The physiology of fishes*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC. 544 s.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., 2006. *The physiology of fishes*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group. 624 s.
- Evans, D.H., More, K.J., Robbins, S.L., 1989. Modes of ammonia transport across the gill epithelium of the marine teleost fish *Opsanus Beta*. *Journal of Experimental Biology*. 144, 339-356.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*. 85, 97-177.
- Flügel, C., Lütjen-Drecoll, E., Zadunaisky, J.A., 1991. Histochemical demonstration of carbonic anhydrase in gills and opercular epithelium of seawater- and freshwater-adapted killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Acta Histochemica*. 91, 67-75.
- Foskett, K.J., Scheffey, C., 1982. The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. *Science*. 215, 164-166.
- Fromm, P.O., 1974. Circulation in trout gills: presence of "blebs" in afferent filamental vessels. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 31, 1793-1796.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A., 2009. *Atlas of fish histology*. Enfield (New Hampshire): Science Publishers. 215 s.
- Gilmour, K.M., 2001. The CO₂/pH ventilatory drive in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 130, 219-240.
- Gilmour, K.M., Randall, D.J., Perry, S.F., 1994. Acid-base disequilibrium in the arterial blood of rainbow trout. *Respiration Physiology*. 96, 259-272.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119, 107-115.

- Greenwood, A.K., Butler, P.C., White, R.B., Demarco, U., Pearce, D., Fernald, R.D., 2003. Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology*. 144, 4226-4236.
- Habrová, V., 1986. *Biologická technika: mikroskopické a histologické metody*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 155 s.
- Herndon, T.M., McCormick, S.D., Bern, H.A., 1991. Effects of prolactin on chloride cells in opercular membrane of seawater-adapted tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 83, 283-289.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 136, 593-620.
- Hoar, W.S., Randall, D.J., 1984. *Fish physiology: Vol. 10*. 1st ed. Orlando: Academic Press. 456 s.
- Hossain, M.K., Hossain, M.D., Rahman, M.H., 2007. Histopathology of some diseased fishes. *Journal of Life and Earth Science*. 2, 47-50.
- Hughes, G.M., 1972. Morphometrics of fish gills. *Respiration Physiology*. 14, 1-25.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 148, 479-497.
- Chang, I.C., Hwang, P.P., 2004. Cl⁻ uptake mechanism in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physiological and Biochemical Zoology*. 77, 406-414.
- Churukian, C.J., Schenk, E.A., 1979. A modification of Pascual's Argyrophil method. *The Journal of Histotechnology*. 2, 102-103.
- Ishimatsu, A., Iwama, G.K., Heisler, N., 1988. In vivo analysis of partitioning of cardiac output between systemic and central venous sinus circuits in rainbow trout: a new approach using chronic cannulation of the branchial vein. *Journal of Experimental Biology*. 137, 75-88.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1997. *Základy histologie*. Jinočany: H&H. 502 s.
- Karnaky, K.J., Kinter, L.B., Kinter, W.B., Stirling, C.E., 1976. Teleost chloride cell: II. Autoradiographic localization of gill Na⁺,K⁺-ATPase in killifish *Fundulus heteroclitus* adapted to low and high salinity environments. *Journal of Cell Biology*. 70, 157-177.
- Kazlouskaya, V., Malhotra, S., Lambe, J., Idriss, M.H., Elston, D., Andres, C., 2013. The utility of elastic Verhoeff-Van Gieson staining in dermatopathology. *Journal of Cutaneous Pathology*. 40, 211-225.
- Kelly, S.P., Wood, C.M., 2001. Effect of cortisol on the physiology of cultured pavement cell epithelia from freshwater trout gills. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281, 811-820.
- Kiese, M., 1974. *Methemoglobinemia: a comprehensive treatise*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press. 270 s.

- Kirschner, L. B., 1983. Sodium chloride absorption across the body surface: frog skins and other epithelia. *American Journal of Physiology-Regulatory*. 244, 429-443.
- Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*. 207, 1439-1452.
- Knepper, M.A., Packer, R., Good, D.W., 1989. Ammonium transport in the kidney. *Physiological Reviews*. 69, 179-249.
- Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 1997. *Renal Physiology*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book. 256 s.
- Kritsky, D.C., Leiby, P.D., Kayton, R.J., 1978. A rapid stain technique for the haptor bars of *Gyrodactylus* species (Monogenea). *The Journal of Parasitology*. 64, 172-174.
- Krogh, A., 1937. Osmotic regulation in fresh water fishes by active absorption of chloride ions. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*. 24, 656-666.
- Kültz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology*. 198, 1883-1894.
- Lacy, E.R., 1983. Histochemical and biochemical studies of carbonic anhydrase activity in the opercular epithelium of the euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*. *American Journal of Anatomy*. 166, 19-39.
- Laurent, P., Dunel, S., 1976. Functional Organization of the Teleost Gill. *Acta Zoologica*. 57, 189-209.
- Lee, L.G., 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 258 s.
- Lee, T.H., Hwang, P.P., Shieh, Y.E., Lin, C.H., 2000. The relationship between 'deep-hole' mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 23, 133-140.
- Lin, H., Randall, D.J., 1993. H⁺-ATPase Activity in Crude Homogenates of Fish Gill Tissue: Inhibitor Sensitivity and Environmental and Hormonal Regulation. *Journal of Experimental Biology*. 180, 163-174.
- Madsen, S. S., Jensen, M.K., Nhr, J., Kristiansen, K., 1995. Expression of Na⁺-K⁺-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. *American Journal of Physiology-Regulatory*. 269, 1339-1345.
- Maetz, J., 1972. Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish *Carassius auratus*. Effects of ammonia-loading and temperature changes. *Journal of Experimental Biology*. 56, 601-620.
- Maetz, J., 1973. Na⁺/NH₄, Na⁺/H⁺ exchanges and NH₃ movement across the gill of *Carassius auratus*. *Journal of Experimental Biology*. 58, 255-275.

- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42, 630-648.
- Malte, H., Weber, R.E., 1985. A mathematical model for gas exchange in the fish gill based on non-linear blood gas equilibrium curves. *Respiration Physiology*. 62, 359-374.
- Marinović, Z., Miljanović, B., Urbányi, B., Lujić, J., 2021. Gill histopathology as a biomarker for discriminating seasonal variations in water quality. *Applied Sciences*. 11, 1-9.
- Marshall, W.S., 2002. Na^+ , Cl^- , Ca_2^+ and Zn_2^+ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 264-283.
- Mazik, P.M., Hinman, M.M., Winkelmann, D.A., Klaine, S.J., Simco, B.A., Parker, N.C., 1991. Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and hematological profiles of striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society*. 120, 247-254.
- McCullough, C.B., 2008. Application of an aqueous acid-fast staining technique to detect pathogens of aquatic species. *Biotechnic & Histochemistry*. 83, 191-197.
- McGeer, J.C., Eddy, F.B., 1998. Ionic regulation and nitrogenous excretion in rainbow trout exposed to buffered and unbuffered freshwater of pH 10.5. *Physiological Zoology*. 71, 179-190.
- Motais, R., Isaia, J., Rankin, J.C., Maetz, J., 1969. Adaptive changes of the water permeability of the teleostean gill epithelium in relation to external salinity. *Journal of Experimental Biology*. 51, 529-546.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., Blazer, V., 2007. Fish histology and histopathology. U. S. Fish & Wildlife Service: National Conservation Training Center. 357 s.
- Nakhoul, N.L., Davis, B.A., Romero, M.F., Boron, W.F., 1998. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO_2 permeability of *Xenopus* oocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 274, 543-548.
- Nakhoul, N.L., Hering-Smith, K.S., Abdunour-Nakhoul, S.M., Hamm, L.L., 2001. Transport of NH_3/NH_4 in oocytes expressing aquaporin-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 281, 255-263.
- Nørregaard, R.D., Bach, L., Geertz-Hansen, O., Nabe-Nietzen, J., Nowak, B., Jantawongstri, K., Dang, M., Søndergaard, J., Leifsson, P.S., Jenssen, B.M., Ciesielski, T.M., Arukwe, A., Sonne, C., 2022. Element concentrations, histology and serum biochemistry of arctic char (*Salvelinus alpinus*) and shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*) in northwest Greenland. *Environmental Research*. 1-10.
- Olson, K.R., 1984. Distribution of flow and plasma skimming in isolated perfused gills of three teleosts. *Journal of Experimental Biology*. 109, 97-108.
- Olson, K.R., 2002. Vascular anatomy of the fish gill. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 214-231.

- Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežíková, I., Kolářová, J., Pojezdal, Ľ., Dyková, I., Scholz, T., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. 1. vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 462 s.
- Perry, S.F., Gilmour, K., 1993. An evaluation of factors limiting carbon dioxide excretion by trout red blood cells in vitro. *Journal of Experimental Biology*. 180, 39-54.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2002. Sensing and transfer of respiratory gases at the fish gill. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 249-263.
- Philpott, C.W., 1980. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 238, 171-184.
- Pisam, M., Boeuf, G., Prunet, P., Rambourg, A., 1990. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *The American Journal of Anatomy*. 187, 21-31.
- Pisam, M., Caroff, A., Rambourg, A., 1987. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. *American Journal of Anatomy*. 179, 40-50.
- Pisam, M., Massa, F., Jammet, C., Prunet, P., 2000. Chronology of the appearance of beta, A, and alpha mitochondria-rich cells in the gill epithelium during ontogenesis of the brown trout (*Salmo trutta*). *The Anatomical Record*. 259, 301-311.
- Pisam, M., Moal, C., Auaperin, B., Prunet, P., Rambourg, A., 1995. Apical structures of "mitochondria-rich" alpha and beta cells in euryhaline fish gill: their behaviour in various living conditions. *The Anatomical Record*. 241, 13-24.
- Pisam, M., Prunet, P., Boeuf, G., Rambourg, A., 1988. Ultrastructural features of chloride cells in the gill epithelium of the atlantic salmon, *Salmo salar*, and their modifications during smoltification. *The American Journal of Anatomy*. 183, 235-244.
- Potts, W.T., 1994. Kinetics of sodium uptake in freshwater animals: a comparison of ion-exchange and proton pump hypotheses. *American Journal of Physiology-Regulatory*. 266, 315-320.
- Rahim, S.M., Delaunoy, J.P., Laurent, P., 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. *Histochemistry*. 89, 541-459.
- Reid, S.G., Sundin, L., Kalinin, A.L., Rantin, T.F., Milson, W.K., 2000. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*): CO₂/pH chemoresponses. *Respiration Physiology*. 120, 47-59.
- Rendon, C., Rodriguez-Gomez, F.J., Muñoz-Cueto, J.A., Piñuela, C., Sarasquete, C., 1997. An immunocytochemical study of pituitary cells of the Senegal cole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Histochemical Journal*. 29, 813-822.
- Roberts, R.J., 2012. Fish Pathology. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd. 590 s.

- Sakamoto, T., Uchida, K., Yokota, S., 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zoological Science*. 18, 1163-1174.
- Santos, M.A., Jerônimo, G.T., Cardoso, L., Tancredo, K.R., Medeiros, P.B., Ferrarezi, J.V., Gonçalves, E.L.T., da Costa Assis, G., Martins, M.L., 2017. Parasitic fauna and histopathology of farmed freshwater ornamental fish in Brazil. *Aquaculture*. 470, 103-109.
- Sardet, C., Pisam, M., Maetz, J., 1979. The surface epithelium of teleostean fish gills: Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. *Journal of Cell Biology*. 80, 96-117.
- Sender, S., Böttcher, K., Cetin, Y., Gros, G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater- and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 47, 43-50.
- Shikano, T., Fujio, Y., 1998. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. *Journal of Experimental Zoology*. 281, 80-89.
- Smith, H.W., 1930. The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 93, 480-505.
- Smith, S., Newman, S., Coleman, M., Alex, C., 2018. Characterization of the histologic appearance of normal gill tissue using special staining techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 30, 688-698.
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. 4. ed. New York: W.H. Freeman and Company. 1064 s.
- Sundin, L., Nilsson, G.E., 1998. Endothelin redistributes blood flow through the lamellae of rainbow trout gills. *Journal of Comparative Physiology B*. 168, 619-623.
- Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D., 2013. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th ed. Churchill Livingstone. 557 s.
- Takashima, F., Hibiya, T., 1995. *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. 2nd ed. Tokyo: Kodansha Ltd. 195 s.
- Tavares-Dias, M., 2006. Cytochemical method for staining fish basophils. *Journal of Fish Biology*. 69, 312-317.
- Tomasso, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*. 2, 291-314.
- Tomasso, J.R., Grosell, M., 2005. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater and freshwater-acclimated euryhaline fishes. *Environmental science and technology*. 39, 98-102.
- Tresguerres, M., Katoh, F., Orr, E., Parks, S.K., Goss, G.G., 2006. Chloride uptake and base secretion in freshwater fish: a transepithelial ion-transport metabolon?. *Physiological and Biochemical Zoology*. 79, 981-996.

- Vacek, Z., 1988. Histologie a histologická technika: učebnice pro střední zdravotnické školy. 1. vydání. Praha: Avicenum. 496 s.
- Velíšek, J., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. Druhé aktualizované vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 658 s.
- Wagner, C.A., 2007. The emerging role of pendrin in renal chloride reabsorption. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 292, 912-913.
- Walsh, P.J., Wright, P., 1995. Nitrogen metabolism and excretion. 1st ed. Boca Raton: CRC Press. 352 s.
- Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., Balm, P.H.M., Van Der Meij, J.C.A., 1990. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cell and Tissue Research*. 259, 575-585.
- Wendelaar Bonga, S.E., Van Der Meij, J.C.A., 1989. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis, of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Cell and Tissue Research*. 255, 235-243.
- Wilkie, M.P., Wood, C.M., 1991. Nitrogenous waste excretion, acid-base regulation, and ionoregulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to extremely alkaline water. *Physiological Zoology*. 64, 1069-1086.
- Williams, E.M., Eddy, F.B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology B*. 156, 867-872.
- Wilson, J., Laurent, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 192-213.
- Wolf, J.C., Baumgartner, W.A., Blazer, V.S., Camus, A.C., Engelhardt, J.A., Fournie, J.W., Frasca, S., Groman, D.B., Kent, M.L., Khoo, L.H., Law, J.M., Lombardini, E.D., Ruehl-Fehlert, C., Segner, H.E., Smith, S.A., Spitsbergen, J.M., Weber, K.L., Wolfe, M.J., 2015. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. *Toxicologic Pathology*. 43, 297-325.
- Wright, P.A., 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology*. 198, 273-281.
- Wright, P.A., Wood, C.M., 1985. An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: effects of environmental pH change and sodium uptake blockade. *Journal of Experimental Biology*. 114, 329-353.
- Youngson, C., Nurse, C., Yeager, H., Cutz, E., 1993. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature*. 365, 153-155.

9. ABSTRAKT

Histologie žaber ryb – zpracování a vyhodnocení preparátů

Histologie je věda zabývající se mikroskopickou stavbou a strukturou tkání organismů. Tato věda je jedinečná tím, že se zabývá zkoumáním tkání nakrájených na velmi tenké řezy. Díky tomu můžeme nahlédnout do mikroskopických struktur, které nejsou vidět pouhým okem. Cílem této práce je popsat strukturu žaber, kritická místa při jejich histologickém zpracování a klasifikovat změny žaber. Dále pak celý průběh zpracování až po vznik histologického preparátu fotograficky zdokumentovat.

První část této práce je věnována rybím žábrám. Žábry jsou multifunkčním orgánem, který je neustále ve styku s okolní vodou. Probíhá přes ně výměna plynů a dalších látek, navíc jsou velmi citlivé na vnější podněty. Přes žábry ryb dochází k výměně, příjmu, ale i exkreci různých iontů a látek. Zajímavostí je například průnik dusitanových iontů, které se do těla ryb dostávají skrze výměník $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Takovému průniku zamezují chloridové ionty, které se s dusitanovými kompetitivně vylučují.

V další části této práce jsou uvedeny metody histologického zpracování ryb a je zde popsáno několik možností histologického zpracování, které vedou ke stejnému cíli, tedy histologickému, většinou také trvalému, preparátu. V průběhu tvorby preparátu je jedním krokem barvení. Nejčastějším barvivem je hematoxylin-eosin, které velmi dobře zobrazuje buněčné struktury. Nicméně některé struktury jdou od sebe rozlišit hůře, v takovém případě je možné použít speciální barvicí metody.

Všechny tyto vlastnosti z žaber dělají orgán vhodný pro diagnostiku řady patologických stavů, nicméně vzhledem k pracnosti a časté nízké specifitě popsaných změn se histologické vyšetření žaber většinou využívá pouze jako vyšetření doplňkové.

Klíčová slova: vyšetření, vzorek, hematoxylin-eosin, primární lamely, sekundární lamely, výměna plynů, osmoregulace

10. ABSTRACT

Histology of fish gills – processing and evaluation of preparations

Histology is the science that deals with the microscopic structure and structure of the tissues of organisms. This science is unique in that it deals with the study of tissues cut into very thin sections. This allows us to look into microscopic structures that may not be visible to the naked eye. The aim of this work was to develop a literature review where the main task was to describe the structure of the gills, the critical points in their histological processing and to classify the gill changes. The aim was also to create a photographic documentation of the histological preparation process.

The first part of this thesis is devoted to fish gills. The gills are a multifunctional organ that is constantly in contact with the surrounding water. It is a medium for the exchange of gases and other substances and is very sensitive to external stimuli. Through the gills of fish, various ions and substances are exchanged, taken in and excreted. An interesting feature is, for example, the passage of nitrite ions, which enter the body of the fish through the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. Such passage is prevented by chloride ions, which are competitively excreted with nitrite ions.

In the next part of this thesis are the topic of methods of histological processing of fish. Several histological processing options are described in this thesis, which lead to the same goal, i.e. a histological, mostly also permanent preparation. During preparation, one step is staining. The most common dye is haematoxylin-eosin. This dye shows the cellular structures very well. However, some structures are more difficult to distinguish from each other, in which case special staining methods can be used.

All these properties of gills make it an organ that is suitable for many fish health evaluation. Despite this, the gills, specifically the histological evaluation of the gills, are usually only an additional evaluation.

Keywords: evaluation, sample, haematoxylin-eosin, primary lamellae, secondary lamellae, gas exchange, osmoregulation