

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**MOŽNOSTI FIXACE VZORKŮ PRO  
MĚŘENÍ OBSAHU DNA U RYB  
PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ**

**Autor:** Bc. Martin Hubálek

**Vedoucí diplomové práce:** prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.

**Konzultanti diplomové práce:** MSc. Sahana Shivaramu, MSc. Ievgen Lebeda, Ph.D.

**Studijní program a obor:** Zemědělská specializace, Rybnářství a ochrana vod

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 2.

České Budějovice, 2018

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích 4. května 2018

.....

Bc. Martin Hubálek

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl vyjádřit svůj velký dík vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Martinovi Flajšhansovi, Dr. rer. agr. za odborné vedení, ochotné a vstřícné jednání a pohotovou pomoc s řešením všech komplikací, které v průběhu psaní této práce vznikaly. Dále bych z konzultantů rád poděkoval zvláště MSc. Ievgenovi Lebedovi, Ph.D., který mi byl v případě potřeby vždy ochoten pomoci s realizací experimentální části práce a poskytl mnoho užitečných rad. Rovněž bych rád mnohokrát poděkoval paní Marii Pečené za velkou pomoc při odběrech vzorků i práci v laboratoři. V neposlední řadě patří můj dík Ing. Martinu Prchalovi za cenné rady ohledně vyhodnocování výsledků experimentální části této kvalifikační práce.

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin HUBÁLEK**  
Osobní číslo: **V16N007P**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Název tématu: **Možnosti fixace vzorků pro měření obsahu DNA u ryb  
průtokovou cytometrií**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je zhodnotit možnost využití různých biologických fixativ k prodloužení uchovatelnosti vzorků rybích buněk a tkání pro pozdější měření obsahu DNA průtokovou cytometrií. Student získá přehled o metodách odběru a fixace vzorků rybích tkání a vlivu fixativa na DNA, stejně jako o průtokové cytometrii a jejím využití v rybářské biologii.

V experimentální části bude student pracovat s vybranými modelovými druhy ryb a typy tkání. Bude testovat dostupná fixativa, jejichž využití v průtokové cytometrii bylo dosud publikováno a pokusí se navrhnout a odzkoušet nový efektivní postup fixace buněk nebo tkání pro terénní a provozní využití. Testované postupy zhodnotí měřením průtokovou cytometrií. Student si tak prakticky osvojí manipulaci s rybami, postupy odběru a uchování vzorků, měření na flow cytometru, softwarové zpracování výsledných histogramů a interpretaci získaných výsledků včetně statistického hodnocení.

Rozsah grafických prací: podle potřeby (do 20 stran)

Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A., 1994. Flow cytometry, 2nd edition. Part A. In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.) Methods in Cell Biology Vol 41, Academic Press Inc. San Diego. 591 s.

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A., 1994. Flow cytometry, 2nd edition. Part B. In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.) Methods in Cell Biology Vol 42, Academic Press Inc. San Diego. 697 s.

Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 305 s.

a další podle zadání vedoucího

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. Agr.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: MSc. Sahana Shivaramu

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Ostatní konzultanti: MSc. Ievgen Lebeda, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 21. října 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 4. května 2018

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

L.S.

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

Ve Vodňanech dne 21. října 2016

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>11</b>
2.1. Obecný základ průtokové cytometrie .....	11
2.1.1. Principy metody .....	11
2.1.2. Výhody a nevýhody metody .....	12
2.1.3. Využití.....	13
2.1.4. Instrumentace.....	14
2.1.4.1. Fluidní systém.....	14
2.1.4.2. Optický systém .....	14
2.1.4.3. Elektronický systém .....	15
2.1.5. Interpretace výsledků měření .....	15
2.2. Průtoková cytometrie u ryb.....	17
2.2.1. Využití.....	17
2.2.2. Používané typy vzorků .....	19
2.3. Fixace biologických vzorků.....	20
2.3.1. Chemická fixace – přehled základních fixativ .....	23
2.3.1.1. Aldehydy .....	23
2.3.1.2. Organická rozpouštědla .....	25
2.3.1.3. Oxidační fixativa.....	28
2.3.1.4. Fixativa obsahující rtuť .....	29
2.3.1.5. Fixativa s kyselinou pikrovou .....	29
2.3.2. Fyzikální fixace – přehled používaných metod.....	30
2.3.2.1. Sušení .....	30
2.3.2.2. Fixace teplem.....	31
2.3.2.3. Fixace chladem .....	32
2.4. Fixace vzorků pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií .....	35
2.4.1. Chemická fixace - koagulující fixativa.....	36
2.4.2. Chemická fixace - nekoagulující fixativa .....	37
2.4.3. Zalévání vzorků do parafínu .....	39
2.4.4. Fyzikální fixace – mražení.....	39
2.5. Fixace rybích buněk a tkání pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií.....	40
2.5.1. Chemická fixace – koagulující fixativa (alkoholy) .....	40
2.5.2. Chemická fixace – nekoagulující fixativa (aldehydy) .....	42
2.5.3. Fyzikální fixace – mražení.....	44
2.6. Fixace rybích buněk a tkání v terénních a provozních podmínkách pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií .....	46

<b>3. Materiál a metodika .....</b>	<b>49</b>
3.1. Zvolené fixační metody .....	49
3.2. Odběr vzorků .....	51
3.3. Protokoly pro fixaci a uchování vzorků.....	51
3.3.1. Fixace 1% paraformaldehydem a 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolem ve fyz. roztoku .....	51
3.3.2. Mražení vzorků ve fyz. roztoku a 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolu ve fyz. roztoku.....	52
3.3.3. Mražení vzorků s kryoprotektantem.....	52
3.4. Kontrolní (nativní) vzorky .....	52
3.5. Příprava vzorků na analýzu průtokovou cytometrií.....	53
3.5.1. Krev.....	53
3.5.2. Ploutevní tkáň .....	53
3.5.3. Ocasní tkáň plůdku.....	54
3.5.4. Standard a jeho přidávání .....	54
3.6. Měření na průtokovém cytometru .....	55
3.7. Hodnocení výsledků .....	55
3.7.1. Variační koeficienty (CV) .....	55
3.7.2. Fluorescence .....	56
3.7.3. Závěrečná shrnutí.....	57
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>58</b>
4.1. Jeseter malý – krev.....	58
4.1.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy.....	58
4.1.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	59
4.1.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků krve jesetera pro měření relativního obsahu DNA.....	60
4.2. Jeseter malý – ploutevní tkáň.....	61
4.2.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	61
4.2.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevní tkáně jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy.....	63
4.2.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ploutevních tkání jesetera pro měření relativního obsahu DNA .....	64
4.3. Jeseter malý – ocasní tkáň plůdku.....	64
4.3.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	64
4.3.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy.....	66
4.3.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ocasních tkání plůdku jesetera pro měření relativního obsahu DNA.....	67
4.4. Lín obecný – krev .....	68

4.4.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy.....	68
4.4.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	69
4.4.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků krve lína pro měření relativního obsahu DNA.....	70
4.5. Lín obecný – ploutevní tkáň .....	71
4.5.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	71
4.5.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevní tkáně lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy.....	73
4.5.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ploutevních tkání lína pro měření relativního obsahu DNA .	74
4.6. Lín obecný – ocasní tkáň plůdku.....	75
4.6.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	75
4.6.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy .....	76
4.6.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ocasních tkání plůdku lína pro měření relativního obsahu DNA.....	77
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>79</b>
5.1. Zvolené typy vzorků.....	79
5.2. Volba standardu .....	79
5.3. Volba fixačních metod .....	81
5.4. Hodnocené parametry.....	81
5.5. Zhodnocení efektivity fixace .....	82
5.5.1. Fixace různými koncentracemi etanolu ve fyz. roztoku .....	82
5.5.2. Fixace 1% paraformaldehydem ve fyz. roztoku.....	84
5.5.3. Mražení bez kryoprotektantu .....	85
5.5.4. Mražení s kryoprotektantem .....	86
<b>6. Závěr .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>90</b>
<b>8. Seznam tabulek, grafů a příloh.....</b>	<b>106</b>
<b>9. Přílohy .....</b>	<b>110</b>
<b>10. Abstrakt.....</b>	<b>124</b>
<b>11. Abstract .....</b>	<b>126</b>



# 1. Úvod

Průtoková cytometrie je moderní instrumentální metoda umožňující simultánní analýzu fyzikálních a chemických vlastností buněk či jiných biologických i nebiologických částic během jejich průchodu světelným paprskem. Jedná se o velmi přesnou a reprodukovatelnou metodu, s jejíž pomocí je navíc možné provádět měření velkého množství objektů ve velmi krátkém časovém úseku. Pro tyto své přednosti je v současné době používána v základním i aplikovaném výzkumu celé řady biologických oborů. Výjimkou není ani rybářská biologie, v níž je průtoková cytometrie nejčastěji využívána k analýze obsahu DNA nativních rybích buněk.

Realizovat cytometrickou analýzu neprodleně po odběru biologického materiálu, kdy jsou buňky v nativním stavu nejvhodnějším pro uskutečnění měření jejich parametrů, však nemusí být vždy možné. Komplikace mohou nastat při získávání vzorků z jedinců, kteří se nacházejí v chovu nebo byli naloveni či nasbíráni v lokalitě značně vzdálené od laboratoře, a odebraný biologický materiál tak není možné podrobit okamžité analýze na průtokovém cytometru. V běžné praxi navíc nejsou výjimečné ani situace, kdy je zapotřebí zpracovat velké množství vzorků ve stejný čas, ačkoliv není jejich okamžitá a rychlá analýza zajišťující práci s živými buňkami zrovna z různých důvodů možná. V těchto případech je opodstatněné prodloužit uchovatelnost rybích vzorků, čehož lze docílit jejich fixací. Během té se buňky a tkáně stávají odolné vůči autolýze způsobené vlastními hydrolytickými enzymy, či narušení struktury kontaminujícími mikroorganismy.

Fixací rybích vzorků pro následnou kvantifikaci obsahu DNA průtokovou cytometrií se doposud zabývala celá řada autorů, kteří ve svých pracích pro tento účel představili hned několik efektivních metod. Naneštěstí je pro většinu z nich typická vysoká časová náročnost na přípravu vzorků, potřeba speciálního vybavení a další vlastnosti, které komplikují nebo znemožňují jejich aplikaci v terénních nebo provozních podmínkách. Jako další úskalí existujících protokolů se může jevit skutečnost, že byly často navrhovány pro jediný typ rybích tkání nebo buněk, lze tedy jen těžko odhadovat, do jaké míry jsou uplatnitelné pro jiné typy vzorků.

Cílem této práce je zhodnotit možnost využití různých biologických fixativ k prodloužení uchovatelnosti různých vzorků rybích buněk a tkání pro pozdější měření obsahu DNA průtokovou cytometrií. Při výběru fixačních metod byl kladen zvýšený

důraz na jejich časovou nenáročnost a snadnou proveditelnost v praxi, například při výjezdu k chovateli nebo v terénu, bez možnosti okamžitého přístupu do laboratoře.

Teoretická část práce se zabývá obecnými základy průtokové cytometrie a blíže specifikuje uplatnění této metody při analýze vzorků pocházejících z ryb. Dále seznamuje čtenáře se zásadami fixace biologických vzorků a přináší přehled základních fixativ i metod používaných při fyzikální fixaci. Rovněž shrnuje dostupné informace o fixaci vzorků za účelem měření obsahu DNA průtokovou cytometrií a zvláštní důraz klade na publikované skutečnosti ohledně fixace rybích buněk a tkání. Experimentální část práce přináší výsledky testování 13 navržených fixačních metod, které byly použity pro prodloužení uchovatelnosti různých typů vzorků pocházejících ze zástupců chrupavčitých a kostnatých ryb (jesetera malého a lína obecného) za účelem analýzy obsahu DNA průtokovou cytometrií. Na základě vyhodnocení efektivity testovaných metod navrhuje postupy fixace vhodné pro jednotlivé typy vzorků každého modelového rybího druhu.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Obecný základ průtokové cytometrie

#### 2.1.1. Principy metody

Cytometrie je proces, při němž jsou měřeny geometrické, fyzikální a/nebo chemické charakteristiky jednotlivých buněk nebo i jiných biologických a nebiologických částic přibližně stejného velikostního rozsahu (Shapiro, 2003). Obecně se rozlišuje obrazová cytometrie a průtoková cytometrie (Motherby a kol., 2002). Princip obrazové cytometrie je založen na kombinaci optického mikroskopu a elektroniky používané k zobrazování a zpracovávání výsledků pozorování namísto prostého lidského vnímání. Světlo je převáděno na elektronický signál a v závislosti na jeho intenzitě na pixely, jejichž analýza je podstatou moderní obrazové cytometrie (Mayall, 1988). Jednou z metod obrazové cytometrie je denzitometrie, jejímž základem je stechiometrické obarvení vzorku a následná světelná mikroskopie za současného počítačového měření optické hustoty obarvených buněk (Hardie a kol., 2002). V případě průtokové cytometrie probíhají měření během průchodu buněk v unášecím médiu měřícím aparátém – průtokovým cytometrem (Shapiro, 2003), uskutečňují se tedy v pohybu (Suda, 2005). Ačkoliv mohou být měření teoreticky prováděna různými způsoby, v praxi je termín průtoková cytometrie nejčastěji spjat s použitím přístrojů, jež měřené buňky vystavují světlu o definované vlnové délce a následně zaznamenávají buňkami vyzařovanou fluorescenci a jimi rozptýlené světlo (Ormerod, 1994). Před vlastním měřením je tedy stejně jako v případě denzitometrické aplikace obrazové cytometrie nezbytné navázání fluorescenčního barviva na dvoušroubovici DNA studovaného objektu, které je součástí přípravy vzorku (Suda, 2005).

Suspenze jednotlivých buněk může být obarvena jedním nebo několika fluorescenčními barvivy (Weaver a Stetler–Stevenson, 2008), přičemž musí být zachována podmínka, že se zvolená látka váže specificky (nebarví jiné orgány) a kvantitativně (množství navázaného fluorochromu je přímo úměrné množství DNA) (Suda, 2005). V průtokovém cytometru jsou buňky laminárním prouděním unášecího média seřazeny do jedné řady a procházejí jedním nebo více světelnými paprsky, jež excitují fluorescenční barviva. Světlo emitované z těchto barviv je následně sbíráno, rozdělováno a měřeno a výsledná data odesílána do počítače řídicího přístroj (Weaver a Stetler–Stevenson, 2008). Měření každé jednotlivé částice v pohybující se suspenzi je

prováděno jednotlivě, výsledek tedy není jen průměrnou hodnotou celé populace (Ormerod, 2000).

### **2.1.2. Výhody a nevýhody metody**

Jednou z hlavních předností metody je možnost provádět měření velkého množství buněk ve velmi krátkém časovém úseku, což umožňuje získat robustní soubor dat pro statistické zpracování, který dobře reprezentuje celou buněčnou populaci (Radbruch, 2000). Průtoková cytometrie umožňuje analýzu několika parametrů u desítek tisíců buněk během pouhých pár minut (Ormerod, 1994), což ji z pohledu statistiky zvyhodňuje oproti cytometrii obrazové, při níž jsou měřeny obvykle jen stovky buněk za vyšší časové i manuální náročnosti (Kaern, 1992). Motherby a kol. (2002) uvádí jako příklad analýzu vzorku běžné velikosti okolo 300 buněk, jež zabere okolo 30 minut. Během jednoho dne je tak s pomocí průtokové varianty možno studovat desítky až stovky vzorků, tato skutečnost ji z praktického hlediska favorizuje ve srovnání s jinými postupy. Ze zkoumaných objektů navíc postačí zpravidla odebrat vzorek nepatrné velikosti, což činí z průtokové cytometrie velmi ohleduplnou a neinvazivní metodu (Suda, 2005), pokud neuvažujeme o analýze embryí nebo vykultivovaného plůdku, u nichž bývá odběr vzorku letální. Problém může nastat hlavně v případě extrémně malých vzorků o nízkém počtu buněk, kdy je vhodné upřednostnit obrazovou analýzu (Koss a kol., 1989). Další nespornou výhodou průtokové cytometrie je možnost jejího využití pro rychlou separaci jednotlivých částic nebo buněk ze smíšených populací, nazývanou buněčné třídění. Každá buňka je při něm na základě definovaných vlastností fyzicky umístěna do určité kyvety pro pozdější analýzu, kultivaci nebo chemickou dekompozici (Robinson a Grégori, 2007).

I průtoková cytometrie má však samozřejmě svá úskalí, a hlavním z nich je především nemožnost vidět individuálně měřené buňky. To může za určitých okolností vést k přehlédnutí málo početných buněčných (sub)populací, které mohou být pro výsledek analýzy rozhodující (Del Campo a kol., 1989), jež přístroj sice detekoval, ale ve výsledném histogramu byl jejich pík snižen k nebo pod hranici šumu díky píku jiných buněk o mnohonásobně vyšší početnosti. Z tohoto hlediska je výhodnější využití obrazové cytometrie, při níž operátor individuální buňky přímo pozoruje a může brát v potaz jejich morfologické charakteristiky a odlišnosti, a rovněž se snadno vyhnout analýze buněčných shluků nebo dublet (Kaern, 1992), což je velkou předností

i navzdory faktu, že je výsledek do určité míry ovlivněn přítomností biasu (Del Campo a kol., 1989). Obrazové analýze je možno podrobit i běžné již existující cytologické preparáty (Motherby a kol., 2002), zatímco pro měření průtokovou cytometrií je nezbytné připravit speciální suspenzi buněk obsahující minimum shluků a nečistot, při čemž navíc dochází k narušení architektury z buněk složené tkáně a ztrátě informací o jejich prostorovém uspořádání (Ormerod, 2008). Opětovné přeměření vzorku s časovým odstupem pak v případě průtokové varianty nepřichází v úvahu, jelikož buňky po změření ihned putují do odpadu na rozdíl od varianty obrazové (Shapiro, 2003).

Závěrem lze dodat, že případná simultánní aplikace obou cytometrických metod (průtokové i obrazové cytometrie) může významně přispět ke zvýšení citlivosti a specifčnosti analýzy, jelikož je při ní možné využít předností každé ze zmiňovaných variant (Kaern, 1992).

### **2.1.3. Využití**

Průtoková cytometrie je moderní a perspektivní metodou, která našla svoje uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu mnoha biologických oborů (Suda, 2005). Největší nárůst zaznamenala na poli klinických studií. Průtokové cytometry jsou v současné době používány pro rutinní měření v imunologii, hematologii i patologii (Ormerod, 1994). Celkový rozsah aplikací je značně široký a zahrnuje například stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, analýzu buněčného cyklu, studium genové exprese, počítání a určení typu krevních buněk, detekci a charakterizaci mikroorganismů, třídění požadovaných částic (Suda, 2005), měření aktivity intracelulárních enzymů nebo pH (Ormerod, 1994), membránového potenciálu (Carter a Ormerod, 2000), stanovení proliferativních změn buňky nebo měření iontových toků korelujících s fyziologií buněk (Radbruch, 2000). Rovněž je možno provádět simultánní měření hned několika parametrů (Ormerod, 1994). Ormerod (1994) uvádí, že rozsah aplikací průtokové cytometrie je limitován pouze dostupností fluorescenčních barviv a fantasií osoby, jež přístroj obsluhuje.

Cytometrické analýze je navíc možno podrobit širokou škálu biologických objektů (řazených dle klesající velikosti) od buněk mnohobuněčných organismů (například embryí octomilky *Drosophila* nebo dospělců háďátka obecného *Caenorhabditis elegans*), přes buněčné shluky (například pankreatické ostrůvky nebo nádorové

sféroidy), eukaryotické buňky (včetně řas, plísní, kvasinek (Hutter a Eipel, 1978) nebo například drobného planktonu (Li a Dickie, 2001)), buněčné organely (například mitochondrie), bakterie, liposomy, viry a imunitní komplexy, až po jednoduché molekuly proteinů, nukleových kyselin a organických barviv. Cytometry mohou být však rovněž použity i pro citlivé chemické analýzy zahrnující vazby vhodně barvených ligandů na pevné substráty nebo částice (Shapiro, 2003).

#### **2.1.4. Instrumentace**

Mezi základní komponenty průtokového cytometru patří fluidní, optický a elektronický systém (Pekarčíková a kol., 2014).

##### **2.1.4.1. Fluidní systém**

Pomocí fluidiky je zajišťován transport částic uvnitř průtokového cytometru (Givan, 2004). Zde je zapotřebí vytvořit tenký proud buněčné suspenze, v němž se buňky pohybují za sebou jako korálky na niti a nedochází k průchodu dvou nebo více buněk současně, čehož je dosaženo vstříkáváním obarvených buněk přes malý otvor (trysku) (Hrušák, 2011) do unášecí kapaliny tvořené destilovanou vodou nebo slabým roztokem solí (Suda, 2005). Ideální pozice jednotlivých částic vůči sensorům je pak docíleno pomocí hydrodynamické infokusace (Givan, 2004). Jejím principem je přivádění suspenze částic tenkou kapilárou do tzv. průtokové komůrky (jádra průtokového cytometru) o relativně velkém průměru, jíž proudí unášecí kapalina. Ta do komůrky přichází pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak soustředěny do úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu paprsku kapaliny z komůrky nutí částice k uspořádanému pohybu za sebou a jejich proud prochází přes ohnisko zdroje excitačního záření (Suda, 2005).

##### **2.1.4.2. Optický systém**

Optický systém sestává z excitační části a části sběrné (Pekarčíková a kol., 2014). Zdrojem excitačního záření může být laser, oblouková lampa nebo LED, v současné době jsou nejvíce používané lasery pro svou schopnost produkovat paprsek monochromatického světla o vysoké intenzitě. Navíc umožňují zaměřit paprsek do velmi malého bodu, což napomáhá přesnému zacílení buněk k zisku jejich maximální excitace a minimalizuje pravděpodobnost, že paprsek projde dvěma nebo více buňkami

(Ormerod, 2008). V komerčních analyzátoch je nejběžněji využíván vzduchem chlazený argonový laser emitující záření při 488 nm.

Sběrná optika se skládá z objektivové soustavy čoček, jež usměrňují fotony emitovaného záření, a zrcadel a filtrů, které rozdělují světelné paprsky na příslušné detektory. Interakcí částice se zářením vzniká signál, který je následně detekován v závislosti na jeho intenzitě (Šinkorová a Zárybnická, 2008). Při interakci se světlo rozptýlí, odrazí, nebo při určité vlnové délce vyvolá fluorescenci šířící se všemi směry od zdroje (Novák a kol., 2008). Údaje o jednotlivých buňkách tak obsahují dva rozptylové parametry – rozptyl v přímém směru (forward scatter, FSC) a boční rozptyl pod úhlem 90° (side scatter, SSC) a dále poměrně velký počet fluorescenčních parametrů (Šinkorová a Zárybnická, 2008). Úhel rozptylu světla ve směru toku paprsku je rozpoznáván tzv. *forward scatter* detektorem, jehož signál odpovídá velikosti měřených objektů. Světlo rozptýlené pod úhlem 90° vzhledem ke směru toku paprsku je detekováno tzv. *side scatter* detektorem, jehož odezva informuje o granularitě objektů. Světlo excitačního zdroje má ve srovnání s vyvolanou fluorescencí, jež je detekována několika fluorescenčními detektory, vždy nižší vlnovou délku (Walker, 1998; Novák a kol., 2008). Boční rozptyl a fluorescenční záření jsou pro jejich nízkou intenzitu zesilovány fotonásobiči (Šinkorová a Zárybnická, 2008).

#### **2.1.4.3. Elektronický systém**

Převod optického signálu na elektrický a digitalizace pro počítačovou analýzu jsou zabezpečovány elektronickým systémem (Pekarčíková a kol., 2014). Běžným prvotním výstupem dat experimentu bývá datový soubor, např. FCS, který obsahuje souhrn měřených parametrů (např. intenzit fluorescence) každé jednotlivé události (např. buňky) (Seamer a kol., 1997). Naměřené parametry se v počítači ve formě matic uchovávají pro hledání libovolných vztahů mezi nimi (Hrušák, 2011). Pomocí počítačového softwaru jsou signály získané z optiky zobrazovány uživateli, k čemuž se používají různé grafické záznamy.

#### **2.1.5. Interpretace výsledků měření**

Vynesení intenzity signálu na osu x a množství buněk na osu y vzniká nejjednodušší zobrazení – jednoparametrový histogram (Šinkorová a Zárybnická, 2008). To může uživatele přístroje informovat například o tom, kolik buněk je

pozitivních pro daný parametr, nebo jaké fluorescence dosahuje určitá subpopulace buněk a umožňuje rovněž zjištění základních statistických dat (četnost, průměrná intenzita fluorescence, její medián, modus, standardní odchylka, geometrický průměr apod.) (Hrušák, 2011). Častěji používaným zobrazením jsou histogramy dvouparametrové, které zobrazují intenzitu jednoho signálu na ose x a signálu druhého na ose y. V tomto případě je každé jednotlivá událost vykreslena jako tečka a množství částic je tedy určováno hustotou bodů (v tzv. dot-plot histogramu) nebo hustotou čar (tzv. contour-plot histogram) (Šinkorová a Zárybnická, 2008). Jinou možností interpretace dat je isometrický graf používající osu Z k vizualizaci frekvence proměnlivých událostí, který disponuje možností libovolného otáčení a zobrazení z různých úhlů (Ormerod, 2000).

Běžné průtokové cytometry umožňují zachytit 6 – 12 parametrů proměřované částice (Achilles a kol., 2004), je tedy jasné, že je obtížné zobrazit všechny současně. Pro získání kompletní informace z měření se nabízí metoda ohraničení polohy, při níž jsou nejprve zobrazena data podle jednoho nebo dvou parametrů a následně ohraničením definovány regiony k výběru určitých buněčných populací, pro něž jsou vizualizovány další parametry (Ormerod, 1994).

Mezi klíčové parametry cytometrické analýzy patří její přesnost, popisující do jaké míry vede měření identických částic k získání identických výsledků (Shapiro, 2003). V případě ideálního měření by měla být fluorescence všech analyzovaných jader ve stejné růstové fázi zcela shodná, v praxi však běžně dochází k určitému rozptylu hodnot, způsobenému například rozdílnou barvitelností částic, ne zcela identickými podmínkami či přístrojovou chybou (Suda, 2005). Rozptyl distribuce je běžně popisován variačním koeficientem, tzv. CV, který v procentech odpovídá podílu směrodatné odchylky (SD) a průměrné pozice píku vynásobenému stem (Ormerod, 1994). Čím je stanovená hodnota koeficientu nižší, tím přesnější dané měření je. Ve většině případů jsou CV pod 5 % brána jako přijatelná, při analýzách DNA jsou vhodnější CV pod 3 % (Shapiro, 2003). Při posuzování CV je však nutné přihlížet rovněž ke konkrétnímu studovanému materiálu a fluorescenčnímu barvivu, jež bylo použito (Suda, 2005). Suda (2005) uvádí, že při nejlepších měřeních, jež byla v literatuře prezentována, dosahovala CV slabě přes 0,5 % a hodnoty okolo 1 % v současnosti nebývají při pečlivé přípravě vzorků a správném seřízení přístroje ničím ojedinělým.



## 2.2. Průtoková cytometrie u ryb

### 2.2.1. Využití

Jednou z frekventovaných aplikací metody průtokové cytometrie u ryb je stanovení ploidní úrovně kvantifikací relativního obsahu DNA (Thorgaard a kol., 1982; Benfey a kol., 1986; Vinogradov, 1998; Ciudad a kol., 2002). Metoda umožňuje stanovovat ploidní úrovně ryb ve srovnání se standardem o známé ploidní úrovni (počtu chromozómů) a od 80. let 20. století je celosvětově používána k hodnocení úspěšnosti chromozomových manipulací i studiím diploidně – polyploidních komplexů (Ráb a kol., 2007). Výskyt polyploidie není u vyšších obratlovců běžný, u ryb k němu však v průběhu jejich vývoje a diversifikace opakovaně docházelo (Leggatt a Iwama, 2003).

Snadnost, s jakou lze u ryb polyploidní stavy experimentálně vyvolat a s úspěchem využívat v akvakultuře, jen utvrzuje o významu tohoto biologického jevu, souvisejícího s evoluční plasticitou rybích genomů (Flajšhans a kol., 2013). Pro determinaci ploidní úrovně ryb lze obecně použít celou řadu různých metod, které je možné klasifikovat jako přímé a nepřímé (Flajšhans, 2006). Přímé metody mají svůj základ v určování počtu chromozómů nebo množství DNA a kromě metod založených na kvantifikaci obsahu DNA ve specificky barvených buněčných jádrech (průtoková cytometrie, spektrofluorometrie nebo mikrodensitometrie) zahrnují i stanovování karyotypu a kvantifikaci obarvených jadérek v buňkách. Principy nepřímých metod jsou stanovování velikosti buněk a buněčných jader pomocí klasických hematologických postupů, stanovování velikosti buněk Coulterovou metodou na základě impedance, měření buněčných a jaderných geometrických charakteristik nebo případné rozlišení diploidů a polyploidů na základě morfologických odlišností (Flajšhans, 2008). Navzdory značnému množství přístupů využívaných při určování ploidní úrovně ryb Maxime (2008) uvádí, že je průtoková cytometrie pro tento účel metodou nejrychlejší a nejvhodnější. Navíc umožňuje determinovat výskyt mosaicismu, čehož bylo v minulosti u ryb opakovaně využito, například u lososa nerky (*Oncorhynchus nerka*) (Tanaka a kol., 2003), štiky obecné (*Esox lucius*) (Lin a kol., 2001) nebo živorodky trpasličí (*Poecilia formosa*) (Lamatsch a kol., 2000).

Prostřednictvím kvantifikace obsahu DNA průtokovou cytometrií je při použití vhodného fluorescenčního barviva možné stanovovat i velikost genomu v buněčném jádře studovaného organismu (Flajšhans a kol., 2013). Ta je fundamentální charakteristikou každého jednoho druhu (Vinogradov, 1998) a velmi užitečným

parametrem taxonomických (Ciudad a kol., 2002) i evolučních studií (Gregory, 2001). Shromažďování informací o velikosti genomu může pomoci k porozumění ohledně existence a evoluce ohromného množství eukaryotických genomů (Vinogradov, 1998). Průtoková cytometrie vyniká mezi ostatními metodami používanými k determinaci velikosti genomu, jako je např. mikrodenzitometrická analýza (*Feulgen Densitometry*, FD) nebo denzitometrická analýza obrazu buněk obarvených Feulgenovou reakcí (*Feulgen Image Analysis Densitometry*, FIAD) (Filipiak a kol., 2012) svou rychlostí, přesností a objektivitou zvyšující reprodukovatelnost výsledků a v neposlední řadě také relativní jednoduchostí, umožňující snadnou standardizaci měřicího procesu (Jakobsen, 1983; Vindelov a kol., 1983a). Nezbytností je však použití standardu o známém haploidním obsahu jaderné DNA, např. erytrocytů lína obecného (*Tinca tinca*,  $1C = 1,02 \text{ pgDNA} \times \text{jádro}^{-1}$ ) nebo pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*,  $1C = 2,60 \text{ pgDNA} \times \text{jádro}^{-1}$ ) (Flajšhans a kol., 2013).

Měření relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií se jeví jako citlivá metoda pro detekci poškození DNA způsobeného environmentálními mutageny (například ozářením nebo chemikáliemi) (Dallas a Evans, 1990). Její základ vychází z předpokladu, že buňky organismu mají za běžných okolností stejný obsah DNA, v případě expozice genotoxickým látkám však může mitóza vést ke vzniku skupin buněk o abnormálně vysokém nebo nízkém obsahu DNA. Zvýšená variabilita mezi buňkami se poté při měření na průtokovém cytometru může projevit nárůstem CV obsahu DNA buněk během G0/G1 fáze buněčného cyklu (Bickham a kol., 1988). Změnami v obsahu DNA u ryb pocházejících z kontaminovaných lokalit se zabývala například práce Lingenfelsera a kol. (1997b) u okounků pstruhových (*Micropterus salmoides*) z několika lokalit Gruzie a Jižní Karolíny, nebo Lingenfelsera a kol. (1997a) u karasů obecných (*Carassius carassius*) z dvanácti rybníků v okolí Černobylu.

Průtoková cytometrie se dále jeví jako užitečný nástroj ke studiu imunologických a patologických procesů u ryb. S její pomocí je možno analyzovat subpopulace leukocytů v rybí krvi a buněčné imunitní funkce prostřednictvím studia cytogramů determinujících modifikace buněčných počtů a morfologie buněk v případě onemocnění (Chilmonczyk a Monge, 1999). Chilmonczyk a Monge (1999) například použili průtokovou cytometrii k hodnocení buněčných odpovědí u pstruha duhového infikovaného proliferativním onemocněním ledvin (PKD) a virovou hemoragickou septikémií (VHS), Esteban a kol. (1998) zase za použití průtokové cytometrie

a elektronové mikroskopie posuzovali fagocytózu *Vibrio anguillarum* leukocyty mořana zlatého (*Sparus aurata*).

Použití průtokové cytometrie jako metody k počítání krevních buněk, která má svůj základ ve měření parametrů rozptylu v přímém směru, bočního rozptylu a fluorescence, našlo své uplatnění i u ryb. Kvantifikace hlavních typů krevních buněk pomocí průtokové cytometrie umožňuje rychlé a přesné hodnocení hematologických změn (Morgan a kol., 1993), které mohou být zaviněny například onemocněním (Lester a Budd, 1979), expozicí polutantům (Dick a Dixon, 1985) nebo environmentálním stresem (Pottinger a Pickering, 1992). Morgan a kol. (1993) odlišili u pstruha potočního (*Salmo trutta*) a pstruha duhového tři různé populace krevních buněk (erytrocyty, lymfocyty společně s trombocyty a neutrofilly) a monitorovali jejich změny při vystavení sledovaných ryb stresu. Inouemu a kol. (2002) se u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) podařilo odlišit pět různých populací krevních buněk (erytrocyty, směs lymfocytů s trombocyty, monocyty, neutrofilly a bazofily) za použití DiOC<sub>6</sub> jako barviva.

### 2.2.2. Používané typy vzorků

Průtoková cytometrie je univerzální metodou, s jejíž pomocí je možno analyzovat široké spektrum různých tkání (Thornthwaite a kol., 1980). Je ideální pro měření buněk tělních tekutin (např. krve), v nichž jsou buňky přirozeně suspendovány, hodí se však i pro pevné tkáně, z nichž je suspenzi buněk možno vytvořit mechanickou a/nebo enzymatickou disagregací (Weaver a Stetler–Stevenson, 2008). V případě ryb byla průtoková cytometrie využita k měření krevních buněk (Van Eenennaam a kol., 1996), spermií (Linhart a kol., 2006), buněk z tkání rybích embryí (Lecommandeur a kol., 1994) a plůdku (Ewing a Scalet, 1991) i z tkání juvenilních a adultních jedinců (Thorgaard a kol., 1982). Z pevných tkání je pro analýzu možné využít například ploutve (Lamatsch a kol., 2000) nebo vnitřní orgány (především ledviny, srdce a játra, nikoliv však střevo, které může obsahovat parazitické organismy způsobující nepřesnosti v měření) (Gold a kol., 1991). Jenkins a Thomas (2007) pro analýzu ploidie amura černého (*Mylopharyngodon piceus*) úspěšně použili i vzorky z očních bulv.

Při studiu ryb pomocí průtokové cytometrie byla v publikované literatuře doposud nejčastěji využívána jádra erytrocytů (Filipiak a kol., 2012). Jejich použití umožňuje realizaci velmi přesných měření, Filipiak a kol. (2012) například při stanovování

velikosti genomu slunky obecné (*Leucaspius delineatus*) dosáhli měřením jader erytrocytů průměrného CV 2,0 %, zatímco v případě hepatocytů 2,5 %. Krevní vzorky lze odebírat z ocasní žíly nebo ze srdce ryby a jejich srážení je nutné eliminovat použitím heparinu (Gold a kol., 1991). Podmínkou je dostatečná velikost zkoumaných jedinců (Lamatsch a kol., 2000), Gold a kol. (1991) například uvádí, že krevní vzorky je možné získávat z ryb delších než 40 mm.

Za určitých okolností je vhodnější provést analýzu menších exemplářů ryb (Lecommandeur a kol., 1994). Lamatsch a kol. (2000) například determinovali ploidii a velikost genomu u jedinců živorodky křížené (*Poecilia formosa*), pro jejichž drobnou délku (3 – 5 cm) by byl odběr krve značně komplikovaný a ryby by mohl usmrtit. Tehdy je velmi vhodné použití vzorku ploutve (především ocasní), jejíž odběr je ve srovnání s odběrem jiných tkání velmi šetrný a ve zmiňovaném experimentu nezpůsobil žádné ztráty na zkoumaných jedincích ani změny v jejich schopnosti plavat (Lamatsch a kol., 2000). Ryby jsou navíc schopny regenerovat všechny tkáně (paprsky, mezenchymální tkáň, krevní cévy, nervy a epidermis) amputované ploutve (Petrie a kol., 2014). Pro analýzu je plně dostačující odebrat drobný kousek okraje ploutve, odběr je dobře proveditelný v terénu a lze ho samozřejmě uplatnit nejen u drobných ryb, ale i u ryb větších velikostí (Lamatsch a kol., 2000).

Při některých experimentech je výhodné provést měření krátce po vykulení plůdku (Lebeda a kol., 2014; Blecha a kol., 2016). Příkladem může být stanovování úspěšnosti indukce triploidie, kdy by se mohl během odchovu larev do větších velikostí v důsledku ztrát změnit poměr jedinců různých ploidních úrovní. Plůdku je navíc při odchovu nutno věnovat značnou pozornost a ani to nemůže zaručit, že nedojde k úhynům znemožňujícím vyhodnocení pokusu (obzvláště u druhů s velmi variabilním a nízkým přežitím, např. candáta severoamerického *Stizostedion vitreum*). Nevýhodou této metody je nutnost usmrcení plůdku (Ewing a kol., 1991), které je možno realizovat např. předávkováním CO<sub>2</sub>. Buňky pro analýzu jsou získávány z ocasu nebo trupu plůdku nařezáním tkáně skalpelem nebo rozstřiháním anatomickými nůžkami (Lebeda a kol., 2015).

### **2.3. Fixace biologických vzorků**

Termín „fixace“ byl původně používán na poli mikroskopie k popisu procesu, během něhož se buňky stanou dostatečně odolné proti autolýze způsobené vnitřními

hydrolytickými enzymy a/nebo rozrušení jejich struktury kontaminujícími mikroorganismy (Shapiro, 2003). Hlavním cílem fixačních kroků je zajistit imobilizaci buněčných konstituentů ve stavu, který je co možná nejbližší stavu nativnímu, a zároveň umožnit buňkám snášet rozpouštědla a dovolit přístup aplikovaných barviv nebo činidel (Gabe, 1968) a dosáhnout určité stability materiálu nezbytné pro jeho další zpracování (Wisse a kol., 2010). I většina barvicích procedur v histologii a histopatologii byla ostatně původně vyvinuta za použití fixovaných vzorků, stejně jako mnoho histochemických a cytochemických procedur (Shapiro, 2003).

Fixace je jedním z nejdůležitějších kroků přípravy tkáně, není tedy divu, že se jí doposud zabývala celá řada studií (Huang a Yeung, 2015). Ideální fixační prostředek, s jehož použitím by bylo možné zachovat tkáň v nezměněném stavu totožném se stavem nativním, však neexistuje (Vacek, 1990). Ze samotné podstaty fixativ totiž vyplývá, že v důsledku jejich působení na tkáň dochází k pozměnění jejího původního chemického a fyzikálního složení (Nowacek a Kiernan, 2010). Nelze se tedy zcela vyhnout ani některým z doprovodných jevů fixace, jakými jsou například ztráta nebo přeměna některých buněčných komponentů, změna biologických charakteristik komponentů tkáně jako například enzymové aktivity, antigenity a dalších biologických funkcí, nebo rozdíly v třidimenzionální architektuře tkání nebo buněk (Park a kol., 2016). Na druhou stranu je si však možné zvolit takovou fixační proceduru, která je vyhovující s přihlédnutím ke konkrétním cílům dané studie a spokojit se s tím, že je procedura efektivní zrovna v těch ohledech, které jsou pro výzkumníka klíčové (Hayat, 1986).

Samotný fixační proces je ovlivňován celou řadou různých faktorů, jakými jsou například pH a přítomnost pufrů, rychlost penetrace fixativa, jeho objem, teplota, při níž je proces realizován, koncentrace použitých látek nebo časový interval procesu. Optimální pH pro zdárný průběh fixace by mělo být přibližně neutrální a proti jeho nadměrným výkyvům do kyselé oblasti je vhodné tkáň chránit použitím pufrů k zajištění potřebné pufrací kapacity (Ganjali a Ganjali, 2013). Rychlost penetrace fixativa záleží především na jeho konkrétním typu a vzrůstá se zvyšující se teplotou. Teplota zároveň ovlivňuje úroveň destrukce a deformace tkáně během fixace (Park a kol., 2016). Běžnou praxí je fixovat vzorky při pokojové teplotě (Ganjali a Ganjali, 2013), v úvahu však připadá v závislosti na situaci i použití odlišných teplot, například za účelem dosažení specifických efektů (Park a kol., 2016). Pro správný průběh fixace je dále nezbytné zajistit dostatečný objem fixativa (Kuhlmann, 2009), kterým musí být

vzorek kompletně obklopen (Wisse a kol., 2010). To by mělo mít optimální koncentraci, neboť pokud nebude tato podmínka splněna, může docházet k produkci artefaktů a dalším nežádoucím procesům (Kuhlmann, 2009). Neméně důležité je minimalizovat prodlevu mezi odběrem tkáně a jejím přemístěním do fixačního prostředí, která by za běžných podmínek neměla být delší než několik sekund (Wisse a kol., 2010). Samozřejmostí by mělo být také dodržení optimálního času fixace, během něhož je zapotřebí dosáhnout zdárného dokončení fixačního procesu, nikoliv však „přefixování“ tkáně (Ganjali a Ganjali, 2013).

K docílení fixace biologických vzorků jsou obecně využívány dva hlavní přístupy – použití fyzikálních a chemických fixačních metod (Dykstra a Reuss, 2003). Ve snaze o optimalizaci fixačního procesu bývá uplatňována i jejich kombinace (Jenkins a Burg, 2003). Při fyzikální fixaci bývá stabilizace buněčných komponentů dosaženo vystavením vzorku teple nebo chladu (Dykstra a Reuss, 2003), aplikace těchto procedur by měla vést k rychlému zastavení buněčné aktivity (Huang a Yeung, 2015). Nejjednodušší způsoby fixace vzorků spočívají v aplikaci tepla a sušení používaném při tvorbě buněčných nátěrů (Grizzle a kol., 2008). Jako efektivní metoda ohřevu vzorku se jeví použití mikrovlnného záření, kterému byla v poslední době věnována velká pozornost především v souvislosti se zkracováním času potřebného pro realizaci fixace (Nowacek a Kiernan, 2010). Opakem zahřívání je pak použití chladu k rychlému zmrazení vzorku, kterého je běžně dosahováno pomocí tekutého dusíku. V souvislosti s touto metodou byla vyvinuta celá řada různých technik, umožňujících efektivní fixaci materiálu (viz níže) (James, 1997).

Častěji používaná chemická fixace je obvykle uskutečňována prostým ponořením vzorku do fixativa (tzv. imerzní fixace), které zabíjí a stabilizuje buněčný obsah (Huang a Yeung, 2015). Lze ji však realizovat také například cirkulací fixativa cévním řečištěm pokusného zvířete (tzv. perfúzní fixace) (Park a kol., 2016). Fixativa bývají tradičně rozdělována na koagulující a nekoagulující (Baker, 1966), mohou být však klasifikována rovněž jako aditivní a neaditivní, či jako kyselé a zásadité (Ruzin, 1999). Koagulující fixativa (např. etanol, metanol nebo aceton) (Huang a Yeung, 2015) koagulují proteiny v neprůhlednou směs granulárních nebo retikulárních objektů suspendovaných v kapalině. Většinu z těchto činidel lze rovněž označovat za fixativa neaditivní pro jejich schopnost fixovat proteiny, ale zároveň se nestat jejich součástí (Hayat, 1986). Naproti tomu nekoagulující fixativa (např. aldehydy a oxid osmičelý)

reagují s proteiny a jinými komponenty za vzniku intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb, což vede k lepšímu zachování buněčné organizace (Huang a Yeung, 2015). Na základě své afinity k proteinům a jiným buněčným konstituentům jsou tato fixativa zároveň nazývána aditivními (Hayat, 1986).

Fixativa mohou být organického nebo anorganického původu a nezávisle na výše uvedené klasifikaci bývají v běžných laboratořích častěji rozdělována na aldehydy, organická rozpouštědla, fixativa obsahující rtuť, oxidační činidla a fixativa s kyselinou pikrovou (Kuhlmann, 2009).

### **2.3.1. Chemická fixace – přehled základních fixativ**

#### **2.3.1.1. Aldehydy**

Aldehydová fixativa jsou známá svou schopností vytváření příčných vazeb (tzv. cross-linking fixatives). Tvorba intra a intermolekulárních příčných vazeb aldehydů s proteinovými molekulami vede k formování rigidnějších heteropolymerů, na čemž je fixace aldehydy založena (Hayat, 1981). Konkrétně utvářejí methylenové můstky mezi amino, imino, amido, guanidylovými, hydroxylovými, karboxylovými, sulfhydrylovými a aromatickými skupinami proteinů (Hopwood, 1985). Aldehydy zabraňují autolýze a ochraňují mukózní substance, většinu lipidů a některé enzymové systémy. Jejich použití pro fixaci má však i své nevýhody, často vede například ke ztrátě některých makromolekul nebo jejich přemístění difuzí a rovněž ovlivňuje mnoho enzymů a antigenů nebo vazebných míst pro protilátky, přičemž není možno přesně určit, která vazebná místa budou po vypláchnutí fixativa uvolněna a která zůstanou obsazena (Dawson, 1973). Podstatnou nevýhodou aldehydových fixativ je, že mohou ve velké míře způsobovat extrakci RNA a DNA z fixované tkáně (Howat a Wilson, 2014), jimi indukovaná tvorba příčných vazeb v chromatinu může navíc významně ovlivňovat stechiometrii případného barvení DNA fluorescenčními látkami (Darzynkiewicz a Juan, 1997).

#### Formaldehyd

Formaldehyd je nejjednodušším aldehydem a jeho použití jako fixačního činidla má dlouhou historii a je velmi frekventované (Fox a kol., 1985). Jeho molekula je pro svou drobnou velikost schopna rychlé penetrace exponovanou tkání, po níž následuje reakce aldehydové skupiny s dusíkem obsaženým v proteinech a utváření methylenových můstků. Úvodní navázání k proteinům probíhá rychle, následná formace methylenových

můstků je však pomalá (Kiernan, 1999), z čehož vyplývá potřeba delšího času pro fixaci (Eltoum a kol., 2001). Iniciální fáze vytváření příčných vazeb je považována za reversibilní, v pokročilejším stádiu fixace už je však množství vytvořených kovalentních vazeb příliš vysoké a reakce začínají být nevratné (Thavarajah a kol., 2012). Formaldehyd může být používán samostatně nebo v kombinaci s jinými chemikáliemi (Kuhlmann, 2009). Komerčně je nejběžněji dostupný ve formě nasyceného vodného roztoku nazývaného formalin, kde tvoří okolo 37 % (Culling a kol., 1985). Běžnou praxí je jeho ředění na úroveň 10 % (přibližně 4% formaldehyd) destilovanou vodou nebo roztokem pufru (neutrální pufrovaný formalin = NBF). Formalin je vhodný především pro histologické preparáty, méně pak pro cytologická vyšetření, tkáň se po jeho užití dobře barví, lipidy nejsou při krátké fixaci rozpuštěny a tkáň je dobře vytvrzena a konzervována. Nevýhodami jsou určitá míra bobtnání tkáně dodávající buňkám sklovitý vzhled, tvorba rezavě hnědých formolových sraženin v případě fixace krevnatých orgánů (Vacek, 1990) a toxicita (Cogliano a kol., 2005). Kvalita fixace je navíc negativně ovlivňována přítomností kyseliny mravenčí, která ve formalinu v neznámém množství vzniká jako důsledek oxidačních změn, a metanolu, který je do něj přidáván (10 – 15 % roztoku) za účelem zamezení spontánním kondenzačním reakcím (Howat a Wilson, 2014). Nežádoucím působení těchto sloučenin se lze vyhnout použitím formaldehydu ve stabilní pevné formě, obsahujícím jeho polymery o vysoké molekulární hmotnosti – paraformaldehydu (Pearse, 1980). Zahřátím a přidáním NaOH je polymerizovaný formaldehyd přetvořen v monomery a výsledný roztok neobsahuje žádné nechtěné příměsi, což je velmi pádným důvodem pro jeho upřednostňování ve výzkumu na úkor formalinu (Burry, 2010). Nevýhodou je však velmi omezená skladovatelnost tohoto roztoku, ve kterém se formaldehyd krátce po depolymerizaci začíná opět polymerizovat (Dykstra, 1992).

### Glutaraldehyd

Objev glutaraldehydu jako fixačního činidla znamenal velký posun především na poli ultrastrukturálních studií (Sabatini a kol., 1963). Chemicky se skládá ze dvou aldehydových skupin oddělených třemi methylenovými můstky. Předpokládá se, že jeho reakční mechanismus je stejný jako v případě formaldehydu, na rozdíl od něj však glutaraldehyd spojuje komponenty mnohem pevněji – jeho řetězec je delší a dvě aldehydové skupiny umožňují propojení vzdálenějších párů proteinových molekul, než



je tomu v případě formaldehydu, což z něj zároveň činí i efektivnější fixativum. Jeho reakce s makromolekulami jsou pokládány za nevratné (Eltoum a kol., 2001) a je schopen inhibovat enzymovou aktivitu lépe než formaldehyd (Hopwood, 1963). Rychlostí penetrace exponovanou tkání však za formaldehydem zaostává a v neposlední řadě makromolekuly intenzivněji narušuje. Pro optimalizaci fixačního procesu tedy připadá v úvahu případná kombinace obou aldehydů (Kuhlmann, 2009). Glutaraldehyd je komerčně dostupný v různých formách, od 70% vodného roztoku skladovaného v suchém plynném dusíku, přes 50% nebo 25% vodné roztoky v 500ml hnědých lahvích po 8% roztoky v zapečetěných ampulkách (Dykstra, 1992). Během skladování dochází v roztoku glutaraldehydu k polymeračním reakcím, které se projevují jeho žloutnutím a změnami pH a mohou vést ke snížení reprodukovatelnosti výsledků a produkci artefaktů. Protože se rychlost polymeračních změn zvyšuje s teplotou, je vhodné roztoky skladovat alespoň při -20 °C a po rozmrazení ve stejný den i zpracovat (Bacallao a kol., 1995). Pro fixaci jsou nejčastěji používány roztoky 1,5 – 4% glutaraldehydu s odpovídajícím množstvím pufru. Nejvíce se uplatňuje při fixaci vzorků pro elektronovou mikroskopii (Dykstra, 1992).

### ***2.3.1.2. Organická rozpouštědla***

Ve snaze vyhnout se manipulaci s toxickými aldehydy, jimi indukované tvorbě příčných vazeb a ztrátám reaktivity buněčných molekul byla hledána nová fixativa. Mnoho z objevených alternativních činidel je řazeno mezi koagulující fixativa (Kuhlmann, 2009), která se vyznačují redukcí rozpustnosti proteinových molekul v důsledku disruptčních hydrofobních interakcí, na proteiny se však kovalentně neváží na rozdíl od aldehydů (Grizzle a kol., 2008). Jejich příkladem je většina fixativ řazených mezi organická rozpouštědla, do kterých patří například alkoholy, aceton nebo kyselina octová (Kuhlmann, 2009).

#### Alkoholy

Alkoholy neemitují žádné toxické výpary a ve srovnání s aldehydy méně narušují nukleové kyseliny, lépe uchovávají glykogen a snáze se na ně váží barviva (Bostwick a kol., 1994). Mechanismus jejich působení spočívá v denaturaci proteinu odstraňováním vody z karboxylových, hydroxylových, amino, amido a imino skupin proteinů, což vede v proteinovou koagulaci a srážení tkáně (Baker, 1958). Voda

v tkáních je alkoholy nahrazena za současného pozměnění terciární struktury proteinů (Shao a kol., 2012) a ztráty jejich funkce (Grizzle a kol., 2008). Ačkoliv jsou však samy schopny velmi rychlé koagulace proteinů, zároveň způsobují také značné narušení mikroanatomie částí zvířecí tkáně (Nowacek a Kiernan, 2010). Dalšími nevýhodami souvisejícími s použitím alkoholů jsou tvrdnutí tkáně, variabilita v jejím barvení, možná tvorba pigmentových depozic v krevních vzorcích, částečná nebo kompletní lýza červených krvinek a zvýšená hořlavost (Bostwick a kol., 1994). Některé nežádoucí změny mohou být eliminovány ředěním alkoholů, například s chloroformem (nemísitelný s vodou), vodou a/nebo kyselinou octovou (koaguluje chromatin a zabraňuje srážení, je mísitelná s vodou, alkoholy a uhlovodíky) (Nowacek a Kiernan, 2010).

#### *Etanol a metanol*

Etanol a metanol patří mezi nejběžněji používaná koagulační fixativa (Dykstra, 1992). Jejich nízká molekulární hmotnost a schopnost rychlé penetrace přispívá k uniformní fixaci tkáně a minimálním ztrátám jejich komponentů (Noguchi a kol., 1997). Přesto však Held (2015) uvádí, že i když je cytoskeletální struktura proteinů s použitím metanolu pro fixaci zachována, může docházet ke ztrátám drobných molekul, které nebyly sraženy. Například lipidy nejsou při použití metanolu ani etanolu pro fixaci zachovány a tak mohou být během procesu fixace a následujících procedur ztraceny (Huang a Yeung, 2015). Na druhou stranu vede použití obou fixativ k dobrému uchování morfologie buněčných jader (Kumarasinghe a kol., 1997). Grizzle a kol. (2008) uvádí, že ve srovnání s aldehydy jsou metanol i etanol schopny lepšího uchování nukleových kyselin z důvodu vyvolávání menších chemických změn. Svou roli však hraje také koncentrace alkoholů, přičemž platí, že metanol je ve srovnání s etanolem svou strukturou bližší vodě, z čehož vyplývá i tvorba slabších hydrofobních interakcí. Běžně používané koncentrace etanolu tak začínají na 50 – 60 %, zatímco v případě metanolu jsou obvyklejší roztoky o koncentracích vyšších než 80 % (Lillie a Fullmer, 1976) (které bývají před aplikací ještě chlazeny na -20 °C) (Held, 2015). Noguchi a kol. (1977) uvádí, že 100% etanol a metanol jsou excelentními fixativy pro prezervaci DNA i RNA. Rovněž lze však obě fixativa modifikovat přidáním jiných chemikálií za účelem dosažení specifických efektů (Grizzle a kol., 2008). Příklady mohou být Carnoyova fixační tekutina, v níž je k absolutnímu etanolu přidán chloroform a kyselina octová

(poměr 6:3:1) působící proti srážení a navozující fixaci tkáně spojením jejích složek vodíkovými můstky (Puchtler a kol., 1968), nebo Clarkův roztok, který se skládá z absolutního etanolu a ledové kyseliny octové (poměr 3:1) (Grizzle a kol., 2008). Analogií Carnoyovy fixační tekutiny působící na stejném principu je metakarn, v němž je namísto etanolu použit metanol (Puchtler a kol., 1970).

### Aceton

Při použití acetonu probíhá fixační proces stejně jako v případě alkoholů – i zde dochází k denaturaci a rychlému srážení proteinů a dehydrataci tkáně (Huang a Yeung, 2015) a navíc ještě k destrukci buněčných organel (Kiernan, 1980). Aceton také efektivně rozpouští lipidy, tkáň však zůstává po jeho použití o něco křehčí (Huang a Yeung, 2015). Na komponenty obsahující sacharidy působí méně než na lipidy, přesto na ně má jeho působení větší dopad než například formalinu (Kiernan, 1980). Jako velká výhoda se však jeví možnost zachovat s použitím studeného (4 °C) acetonu aktivitu enzymů (Eltoum a kol., 2001). I proto je používán pro fixaci vzorků v histochemických a imunofluorescenčních studiích (Leong, 1994). Jinou možností je využití acetonu jakožto dehydratačního rozpouštědla (Huang a Yeung, 2015). Bývá používán i ve směsích a to například s metanolem (1:1), který dobře uchovává strukturu, zatímco aceton zkvalitňuje permeabilizaci (Held, 2015).

### Kyselina octová

Při použití kyseliny octové pro fixaci dochází k bobtnání buněk, což je rozdíl oproti alkoholové fixaci iniciující srážení (Ronne a kol., 1979). Kyselina způsobuje koagulaci jaderných proteinů a nepřímo stabilizuje a napomáhá předejít ztrátě nukleových kyselin (McCully a O'Brien, 1981), jinak má však jen minimální nebo nulový fixační efekt (Ronne a kol., 1979) a s jinými proteiny nereaguje (Huang a Yeung, 2015). Proto o ní např. Nowacek a Kiernan (2010) uvádí, že ji lze klasifikovat zároveň jako koagulující i nekoagulující fixativum. Vyniká kvalitní fixací jader a chromozomů, rovněž zabraňuje nebo potlačuje srážení během fixace a je schopna velmi rychlé penetrace exponovanou tkání (Baker, 1958). Těchto předností je obvykle využíváno v jejích směsích s jinými chemikáliemi, příkladem může být kombinace s alkoholy, která obecně vede třeba k lepšímu uchování buněčné morfologie (Kuhlmann, 2009).

### **2.3.1.3. Oxidační fixativa**

Mezi oxidační činidla používaná pro fixaci biologických vzorků patří například oxid osmičelý, manganistanová fixativa (manganistan draselný), dichromanová fixativa (dichroman draselný) (Ganjali a Ganjali, 2013) nebo kyselina chromová. Mechanismus jejich působení spočívá v reakcích s různými postranními řetězci biomolekul (včetně proteinů), což vede k utváření příčných vazeb, které stabilizují strukturu fixované tkáně (Kuhlmann, 2009). Oxidační fixativa obecně obsahují iont kovu, který je během reakcí s řetězci molekul utvářejícími tkáň redukován, zatímco molekuly triglyceridů a proteinů jsou oxidovány (Tahmisian a kol., 1964). Jako nevýhoda oxidačních činidel se jeví skutečnost, že jsou schopny štěpit proteinové molekuly a způsobovat tak ztrátu některých peptidových fragmentů (Hopwood, 1969). Obecně jsou uplatňována v rámci některých specifických histologických studií (Kuhlmann, 2009). Oxid osmičelý je běžně používán ve světelné nebo elektronové mikroskopii (obvykle přibližně 1% roztok) (Bradbury a Evennett, 1996).

#### Oxid osmičelý

Použití oxidu osmičelého jako fixačního činidla má dlouhou tradici (Glauert a Lewis, 2014). Jedná se o toxickou pevnou látku rozpustnou v polárních i nepolárních rozpouštědlech a schopnou penetrovat a fixovat hydrofilní i hydrofobní oblasti buněk. Způsobuje určité bobtnání tkáně a také její tvrdnutí (Dykstra, 1992). Během fixace a procesu utváření příčných vazeb dochází k redukci osmia spojené s tvorbou tmavě hnědých až černých sloučenin (Huang a Yeung, 2015). Oxid osmičelý je velmi silný oxidant a okamžitě interaguje s dvojnými vazbami nenasycených mastných kyselin, zatímco nasyčené mastné kyseliny s ním za běžných podmínek nereagují (Elbers a kol., 1965). Pokud je však používán sám, není schopen fixovat všechny proteiny, což vede k jejich ztrátě v průběhu fixace (Huang a Yeung, 2015). Ani na nukleové kyseliny nemá jeho používání příznivý dopad, jelikož může vést k formaci drsných sraženin DNA (Dykstra, 1992). Hlavním problémem oxidu osmičelého je velmi pomalá a nerovnoměrná penetrace, kvůli které je nezbytné použití tenkých a drobných kousků tkáně (Culling a kol., 1985). V elektronové mikroskopii jsou limitované pronikání tkání a pomalá reakční rychlost kompenzovány iniciační fixací s použitím glutaraldehydu (Grizzle a kol., 2008).

#### **2.3.1.4. Fixativa obsahující rtuť**

Fixativa obsahující rtuť se ukázala jako vhodná obzvláště pro speciální histologické studie (Kuhlmann, 2009). Základní chemickou sloučeninou, kterou v sobě tento typ fixativ obsahuje, je chlorid rtuťnatý. Ačkoliv se však jedná o jednu z nejvíce funkčních solí používaných pro tkáňovou fixaci, bez dalších chemikálií bývá používán jen velmi zřídka, jelikož iniciuje silné srážecí reakce (Gezer İnce a kol., 2016). Nejznámější fixativa, která jej obsahují, nesou název B5 a Zenkerova tekutina (Ganjali a Ganjali, 2013). B5 se připravuje rozpuštěním 12 g chloridu rtuťnatého a 2,5 g octanu sodného ve 200 ml destilované vody, do 20 ml výsledného roztoku jsou těsně před užitím přidány 2 ml formaldehydu (37 %). Zenkerovu tekutinu je možno připravit z 250 ml destilované vody, 12,5 g chloridu rtuťnatého, 6,3 g dichromanu draselného a 2,5 g síranu sodného, před použitím se k 95 ml tohoto roztoku přidává 5 ml ledové kyseliny octové (Grizzle a kol., 2008).

Obecně není mechanismus působení fixativ obsahujících rtuť doposud zcela objasněn (Ganjali a Ganjali, 2013). Ví se však alespoň, že chlorid rtuťnatý reaguje s amonnými solemi, aminy, amidy, aminokyselinami a sulfhydrylovými skupinami (Grizzle a kol., 2008). Během fixace dochází k tvorbě nerozpustných kovových sraženin (McDonough a Southard, 2017) a rovněž k určitému tvrdnutí tkáně (Khanna, 2017). Další nevýhodou fixativ obsahujících rtuť je pomalá penetrační rychlost, k fixaci však dochází rychle. Jejich velkou předností je naopak schopnost skvělého zachování jaderných detailů, pro kterou jsou používána při prezervaci hematopoetických tkání, jako například kostní dřeně nebo vzorků lymfatických uzlin (McDonough a Southard, 2017). Fixativa by neměla přijít do styku s kovy a při jejich přípravě je vhodné použít destilovanou vodu, aby nedošlo ke srážení solí rtuti. Neopomenutelnou nevýhodou je toxicita a negativní dopad rtuti na životní prostředí, kvůli kterým je ve snaze o substituci chloridu rtuťnatého někdy používán síran zinečnatý (Grizzle a kol., 2008).

#### **2.3.1.5. Fixativa s kyselinou pikrovou**

Kyselina pikrová (též trinitrofenol) je jasně žlutá krystalická látka málo rozpustná ve vodě. Její krystaly je nutno skladovat a přepravovat s 30 – 40 % vody kvůli potenciálnímu nebezpečí výbuchu, ke kterému může dojít v důsledku otřesů nebo zahřátí látky v suchém stavu. Měla by být přechovávána v dobře uzavřené nádobě, obsah vody nesmí z bezpečnostních důvodů klesnout pod 10 % (Lach–Ner, 2011).

Jedná se o koagulační fixativum, které mění náboj ionizovatelných bočních řetězců proteinů a způsobuje disrupci elektrostatických a vodíkových vazeb. V reakcích vytváří své soli se základními funkčními skupinami proteinů, čímž způsobuje proteinovou koagulaci. Nízké pH jejích roztoků však může vést k hydrolýze a ztrátě nukleových kyselin (Grizzle a kol., 2008). S lipidy specificky nereaguje a rovněž nefixuje sacharidy s výjimkou glykogenu (Locquin a Langeron, 1983). Srážecí reakce, které kyselina pikrová iniciuje, nejsou doprovázeny nadměrným tvrdnutím tkáně (Pilgrim, 1957), ta je však po jejím použití obarvena do žluta (Ganjali a Ganjali, 2013). Uplatňuje se tedy nejen jako fixativum biologických vzorků, ale i jako součást různých barviv (například van Giesenovo barvivo pro diferenční barvení kolagenu a jiných pojivových tkání, například hladkých svalů) (Shariff a Kaler, 2016). Je vhodná pro fixaci ve speciálních histologických studiích (Kuhlmann, 2009) a bývá používána výhradně ve směsích s jinými chemikáliemi, přičemž nejznámější je Bouinův roztok, který se skládá z 10% formaldehydu, 0,9M kyseliny octové a 0,04M kyseliny pikrové ve vodě (Nowacek a Kiernan, 2010). Během fixace s použitím Bouinova roztoku proniká kyselina pikrová pomalu do tkáně za současné koagulace proteinů, kyselina octová tkáň naopak rychle penetruje a zabraňuje kyselině pikrové ve srážení tkáně a formaldehyd utváří ve tkáni příčné vazby (Baker, 1958). Komplementární efekty složek Bouinova roztoku vedou ke skvělému zachování morfologie fixované tkáně (Nowacek a Kiernan, 2010).

### **2.3.2. Fyzikální fixace – přehled používaných metod**

#### **2.3.2.1. Sušení**

Sušení se běžně využívá jako fyzikální fixační metoda pro přípravu krevních nátěrů. V tomto případě je jeho cílem odstranění vody ze vzorku a přichycení buněk k podložnímu sklíčku (Houwen, 2002). Pro přípravu kvalitního preparátu je nezbytné zajistit kompletní dokončení tohoto procesu před barvením, neboť v opačném případě může vést denaturace některých struktur k jejich vážným deformacím a tím negativně ovlivnit přesnost zkoumání (Undritz, 1973). Důležité je rovněž dokončit sušení co možná nejrychleji po zhotovení vzorku. Při dlouhotrvajícím sušení může docházet například k přesunům vody z erytrocytů do plasmy a tím i jejich smršťování. Schnutí vzorku je možno urychlit několika způsoby. Příkladem může být rychlé mávání sklíčkem ve vzduchu (Seiverd, 1972) nebo případně nad nízkým plamenem zapáleného

plynu (Schalm a kol., 1975). Jinou metodou je sušení vzorku proudem vzduchu ze stolního ventilátoru (Undritz, 1973) nebo fěnu (Fijan, 2002).

### **2.3.2.2. Fixace teplem**

Použití tepla je jednou z nejjednodušších metod fixování vzorku. Názorným příkladem je vaření vajíčka vedoucí k precipitaci proteinů (Grizzle a kol., 2008), v jejímž důsledku mění koloidní proteinový materiál svou strukturu v neprůhlednou pevnou látku. Materiál je pak skutečně fixován, nicméně jeho struktura je velmi výrazně pozměněna (Dykstra, 1992). Přímé použití vysokých teplot může navíc iniciovat pouze částečnou denaturaci proteinů kvůli špatnému vedení tepla biologickými materiály (Mayers, 1970). Z těchto důvodů nebývá příliš časté s výjimkou fixace nátěrů mikroorganismů (Rolls, 2012) nebo krve (Dykstra, 1992).

Zmíněné problémy je však možné do jisté míry překonat použitím mikrovlnného ohřevu. Fixační metody využívající mikrovlnnou iradiaci jsou od svého představení Mayersem (1970) stále běžnější. Mikrovlny indukují rychlou oscilaci vodních molekul a tím zvyšují teplotu tkáně rychle a zároveň uniformě (Katoh, 2016). Z buněk nebo tkání je možné vytvořit suspenzi s vhodnou tekutinou (například PBS) a fixovat je samotným působením mikrovln (Dykstra, 1992). Druhou možností, která je v praxi využívána mnohem častěji (Rolls, 2012), je několik sekund dlouhé ozařování objektů ve vhodném fixativu. V tomto případě dochází k lepší penetraci fixativa ve srovnání s inkubací vzorku při pokojové teplotě a tak i k redukci času potřebného pro fixaci (Dykstra, 1992). Zkrácením inkubační doby lze potlačit narušování buněčné nebo tkáňové morfologie a zároveň zachovat jejich imunoreaktivitu, což může být dobře uplatnitelné v histologii i buněčné biologii (Katoh, 2016). V minulých letech představovala určitou komplikaci vysoká produkce škodlivých výparů při působení mikrovlnného záření na běžná fixativa (například formalin), nyní jsou však komerčně dostupná glyoxalová fixativa, ze kterých se nebezpečné výpary neuvolňují ani při zahřátí na 55 °C (Grizzle a kol., 2008). Aplikaci metody nahrává i současná dostupnost moderních přístrojů vyrobených speciálně pro laboratorní použití a umožňujících přesnou kontrolu úrovně mikrovlnné iradiace a teploty vzorku. Běžné mikrovlnné trouby totiž nejsou pro tento účel vhodné z důvodu příliš vysoké iradiační síly a nemožnosti kontroly teploty vzorku (Katoh, 2016).

### 2.3.2.3. *Fixace chladem*

Mražení buněk nebo tkání je velmi efektivní metodou k prodloužení jejich uchovatelnosti (Dykstra, 1992). S jeho použitím se lze vyhnout mnoha problémům, které se vyskytují při chemické fixaci, jakými jsou například negativní ovlivňování struktury tkáně v důsledku jejího srážení nebo bobtnání, srážení buněčných organel a extrakce či redistribuce buněčných komponentů jako třeba lipidů, proteinů nebo DNA (Bullen a kol., 2014). Efektivita prodloužení uchovatelnosti materiálu je však do značné míry ovlivněna produkcí artefaktů, vznikajících při jeho zmrazování nebo rozmrazování (Rosene a kol., 1986). S klesající teplotou vzorku totiž dochází k formaci ledových krystalů, jež vzorky ovlivňují hned několika způsoby. Jejich rychlý nárůst může vést k fyzikálnímu narušování buněk. V důsledku změny skupenství vody dochází k nárůstu koncentrace rozpuštěných látek v okolí buňky (soli apod.). Uvnitř buněk se mohou rovněž utvářet drobné ledové krystaly způsobující disrupci jejich vnitřních struktur (Pappas, 2010). V extrémních případech může narušení materiálu ledovými krystaly zcela znemožnit jeho další použití, čemuž je zapotřebí zamezit optimalizací procesu mražení (Rosene a kol., 1986). Vhodné je například používat vzorky mnohem menší velikosti než v případě konvenční chemické fixace, což je dáno skutečností, že z drobnějších vzorků je možné rychleji odčerpát teplo, což je výhodné z hlediska snížení tvorby ledových krystalů. V bazálnějších vrstvách vzorku se však mohou i tak utvářet krystaly dost velké na to, aby jej nenávratně poškodily (Dykstra, 1992). Jiným principem eliminace tvorby krystalů během mražení je inkubace vzorků v tzv. kryoprotektantech. Ty se skládají z jednoduchých molekul o nízké molekulové hmotnosti a vysoké rozpustnosti ve vodě, se kterou interagují prostřednictvím vodíkových vazeb (Ashwood-Smith, 1987). Nejběžnějšími příklady těchto chemikálií jsou glycerol, etylenglykol, propylenglykol a dimetylsulfát (DMSO) (Wowk, 2007). V současné době je k dispozici velké množství studií zabývajících se použitím různých kryoprotektantů při různých metodách mražení, které lze podle jejich zaměření rozdělit do dvou hlavních skupin. V jednom případě vede mražení tkáně k zastavení veškeré metabolické aktivity, aniž by bylo použito chemického fixativa, přičemž však zůstávají zachovány normální strukturální a metabolické charakteristiky tkáně. Ten je nazýván kryofixací. Ve druhém případě je cílem umožnit chemicky nefixovaným živým buňkám zmrazení pro dlouhodobé uchování bez signifikantních ztrát jejich životaschopnosti ani



po následujícím rozmrazení (Rosene a kol., 1986). Tehdy se jedná o kryoprezervaci (Huebinger a kol., 2016).

Při kryofixaci se používá extrémně nízkých teplot (-190 až -196 °C), které jsou aplikovány nejčastěji na vzorky menší než 0,5 mm (Dykstra, 1992). Chladícím činidlem je tekutý dusík, s jehož pomocí lze dosáhnout velmi rychlého zmrazení vzorku inhibujícího nebo minimálně výrazně zpomalujícího vnitrobuněčný pohyb makromolekul a jiných substancí během pouhých několika milisekund. Kryoprotektanty sloužící k redukci formace ledových krystalů mohou, ale nemusí být použity. S kryofixací jsou velmi úzce spjaty další techniky, jako například kryoultramikrotomie, metody mražení za vysokého tlaku, vysoušení mrazem (freeze-drying), mrazová substituce (freeze-substitution) a více specializované techniky především pro zkoumání membrán, označované jako lámání mrazem (freeze-fracturing) a leptání mrazem (freeze-etching). Při všech těchto metodách je v průběhu skladování nutné uchovávat vzorky nepřetržitě v prostředí o dostatečně nízké teplotě, neboť jejich tání může znamenat znehodnocení (James, 1997). V případě kryoultramikrotomie jsou z kryofixovaného materiálu vytvořeny ultratenké zmrazené sekce především pro následné mikroanalýzy a imunoznačení (Dykstra a Reuss, 2003). Při mražení za vysokého tlaku je teplota vzorku snižována na teplotu tekutého dusíku během milisekund pod tlakem např. 210 MPa. V důsledku působení takového tlaku je snížen bod tuhnutí vody o 20 °C a rovněž je zpomalena nukleace a tvorba ledových krystalů. Dále je zvýšena viskozita vody v biologických vzorcích, díky čemuž zůstávají buněčné konstituenty zcela imobilizované (Vanhecke a kol., 2008). Preparáty mražené za vysokého tlaku bývají následně zpracovávány metodou mrazové substituce (Bobik a kol., 2014). Během té je vzorek po rychlém zmrazení dehydratován při vyšší teplotě (-80 °C) a následuje infiltrace chemického fixativa, které je inaktivní za teploty, při níž je vzorek skladován. Poté, co fixační roztok difunduje do vzorku, následuje kontrolované zvyšování teploty, v jehož důsledku se fixační komponenty stávají aktivními a stabilizují komponenty buněčné, se kterými simultánně reagují (simultánnost pochodů odlišuje způsob od klasické chemické fixace, během níž jsou různé oblasti vzorku fixovány v průběhu difuze fixativa, tudíž v odlišných časech) (Dykstra a Reuss, 2003). Jinou sofistikovanou metodou je sušení mrazem, během něhož je z tenkých sekcí tkáně po úvodním zmrazení realizovaném potápěním do tekutého dusíku odstraňována voda ve vakuové komůrce při -40 °C. Tkáň může být následně

fixována formaldehydovými parami (Grizzle a kol., 2008). Technika lámání mrazem pak sestává z fyzikální frakturace zmrazeného biologického vzorku, který je záhy použit k vytvoření extrémně tenkých kovových replik, jež jsou po svém vyjmutí studovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Roberts a kol., 1991). V případě metody mrazového leptání se ze zmrazených vzorků po frakturaci ještě před vytvořením repliky odstraňuje led pomocí sublimace (Chandler a Sharp, 2014).

Kryoprezervace představuje důležitou technologii dlouhodobého uchování buněk a tkání v mnoha odvětvích biologie a medicíny, přičemž nejvýznamnější jsou její aplikace na poli reprodukční medicíny (Gosden, 2014). Obdobně jako pro kryofixaci je pro ni typické použití velmi nízkých teplot. Cílem je zachovat buňky a tkáně strukturálně nedotčené (Pegg, 2007) a neovlivnit ani jejich životaschopnost a funkci během zmrazení ani rozmrazení (Pappas, 2010). „Nechráněné“ mrazení je obvykle letální, proto se při kryoprezervaci používají kryoprotektanty. Ty však musí být schopny nejen redukovat formaci ledových krystalů při jakékoliv teplotě, ale rovněž proniknout dovnitř buňky a neohrožovat ji svou toxicitou (Pegg, 2007). V současné době se používají dvě metody kryoprezervace – pomalé mrazení a vitrifikace. Pomalé mrazení je též známo jako rovnovážné mrazení a dochází při něm k výměně tekutin mezi extra a intracelulárním prostorem, čímž je zabráněno vážným osmotickým a deformačním efektům negativně ovlivňujícím buňky (Mazur, 1990). Používají se při něm nižší koncentrace kryoprotektantů, které jsou méně toxické a mohou být nedostatečné pro úplné zabránění tvorby ledových krystalů uvnitř buněk, pro úspěšnou realizaci je navíc nezbytné vlastnit drahý programovatelný mrazicí přístroj. Metoda je ve srovnání s vitrifikací časově náročnější (Choudhary a kol., 2015). Vitrifikace je ve své podstatě tuhnutí kapaliny nezpůsobené její krystalizací, ale extrémním nárůstem viskozity během ochlazování (Fahy a kol., 1984). Na rozdíl od pomalého mrazení je vitrifikace nerovnovážnou ultra rychlou kryoprezervační metodou, která se vyznačuje absencí tvorby ledových krystalů. Typická je pro ni krátkodobá expozice vysokým koncentracím kryoprotektantu s nízkým obsahem vody a možnost použití méně nákladného vybavení (Rall a Fahy, 1985). Pro tyto své přednosti se jeví jako velmi vhodná alternativa konvenční (pomalé) metody mrazení (Choudhary a kol., 2015).

## **2.4. Fixace vzorků pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií**

Z hlediska přesnosti a reprodukovatelnosti měření průtokovou cytometrií (nízké CV, správná úroveň emitované fluorescence – poloha píku) je ideální preferovat používání čerstvých vzorků (Filipiak a kol., 2012). Jejich včasná analýza zajišťující práci s živými buňkami je nejlepší způsob, jak se vyhnout vzniku artefaktů a jiným komplikacím měření, jimiž jsou např. shlukování, lýza nebo ztráta buněk (Rousselle a kol., 1998). Uskutečnit analýzu krátce po získání vzorků však nemusí být vždy možné. Často se například stává, že se jedinci, kteří jsou objektem zájmu, nacházejí v chovu nebo byli naloveni či nasbíráni v lokalitě značně vzdálené od laboratoře a nelze je jednoduše transportovat, ať už živé celé nebo jejich nativní vzorky do laboratoře a analyzovat. Někdy může být zase nutné zpracovat velké množství vzorků ve stejný čas (nebo vzorky jedinců ve stejném vývojovém stádiu), přestože není okamžitá a rychlá analýza zrovna z různých důvodů možná. Na vině může být v tomto případě vysoká pořizovací cena průtokového cytometru, v jejímž důsledku se o jeden přístroj často střídá velké množství uživatelů (Gold a kol., 1991). V určitých případech je zase zapotřebí opakovaně po několik dní získávat referenční buňky používané jako standard, což zabere velké množství času a navíc může zanést do výsledků určitou míru nejistoty. Ve zmíněných situacích může být východiskem prodloužení uchovatelnosti vzorků (Vindelov a kol., 1983a), kterého lze dosáhnout jejich fixací (Darzynkiewicz a kol., 2011). Nezastupitelné místo má fixace také při práci s materiály, které mohou představovat biologické riziko, její použití pro zabití HIV a jiných virů je dnes při práci s lidskými buňkami a tělními tekutinami běžnou praxí (Shapiro, 2003).

Navržení standardních podmínek fixace biologických vzorků, tedy podmínek optimálních z hlediska rychlosti a reprodukovatelnosti, pro následnou kvantifikaci DNA průtokovou cytometrií je hlavním cílem celé řady studií. V mnoha z nich byla naneštěstí demonstrována rozdílná úroveň akceptovatelnosti barviv DNA při použití rozdílných fixačních protokolů (Rousselle a kol., 1998). Zatímco totiž fixace na jedné straně umožňuje uchovávání tkání a buněčných suspenzí, zároveň v různém měřítku modifikuje strukturu chromatinu a přístupnost DNA pro fluorochromy (Esteban a kol., 1991). Morfologické změny ve struktuře chromozomů mohou způsobovat nehomogenní vázání barviva (Filipiak a kol., 2012) a v jeho důsledku i změny v intenzitě emitované fluorescence a posun interpretovaných píků spolu s nárůstem hodnot CV ve srovnání s nativními vzorky, což se negativně projevuje například snížením schopnosti odlišit od

sebe různé ploidní úrovně analyzovaných jedinců (Hedley a kol., 1983; MacIntire a kol., 1987). Ani prodloužení uchování vzorků za pomoci fyzikálních metod (především mražení) se nemusí obejít bez komplikací, kterými mohou být například narušování buněčných struktur v důsledku formace ledových krystalů (Van Dam a kol., 1992) a následný zisk histogramů o vyšším CV (Fisher a kol., 1995), nižší kvalitě a rozlišitelnosti a nadměrném šumu pocházejícím z debrisu (Doležel a kol., 2007). Nežádoucím zkreslením výsledků v důsledku použití fixace se lze vyhnout jen vhodným výběrem fixativa a fixační procedury, které jsou pro danou situaci zvoleny na základě výzkumníkových cílů, použitých biologických vzorků, buněčných složek, jež mají být zachovány, a znalosti sloučenin, které co možná nejlépe uchovávají buněčné složky a následně umožňují optimální obarvení fluorochromy (Rousselle a kol., 1998).

Pro chemickou fixaci vzorků za účelem následné analýzy obsahu DNA průtokovou cytometrií přichází v úvahu použití alkoholů, acetonu a aldehydů, vzorky je možné rovněž zalévat do parafínu (Darzynkiewicz a Juan, 1997). Uchovatelnost vzorků lze prodloužit rovněž s pomocí fyzikálních metod založených na mražení (Jakobsen, 1983; Vindelov a kol., 1983a; Pierrez a Ronot, 1991).

#### **2.4.1. Chemická fixace - koagulující fixativa**

Pro analýzu obsahu DNA průtokovou cytometrií bývají koagulující fixativa (alkoholy, aceton) preferována před nekoagulujícími (Darzynkiewicz a kol., 2010). Ačkoliv totiž hůře stabilizují a uchovávají buněčné konstituenty o nízké molekulární hmotnosti, jsou schopny adekvátní stabilizace nepoškozené DNA (Darzynkiewicz a Juan, 1997). Použití alkoholů (etanol, metanol) pro fixaci vede k perforaci buněčných membrán, uchovává však většinu materiálu cytoplasmy a závažně neovlivňuje vázání barviv na DNA (Roussele a kol., 1998). Darzynkiewicz a kol. (2010) uvádí, že absolutní alkoholy indukují nadměrné buněčné shlukování ve srovnání se 70% nebo 80% koncentracemi, které jsou například u etanolu v případě, že je analýza průtokovou cytometrií zaměřena výhradně na obsah DNA, preferovány. Roussele a kol. (1998) hodnotili ve své práci fixaci různými běžně používanými chemikáliemi a jejich směsmi pro stanovování obsahu DNA průtokovou cytometrií a zjistili, že užití 68% etanolu a 85% metanolu výrazně nezvyšovalo formaci agregátů a rovněž vedlo k dosažení nejnižších CV, označili tedy tato fixativa jako vhodná pro daný účel. Naproti tomu Holtfreter a Cohen (1990) se ve své práci zabývali fixací způsobenými kvantitativními

změnami DNA fluorescence hemopoiетických buněk adultních žab a jejich závěrem bylo, že pro analýzu obsahu DNA (nebo ploidie) je vhodné použít 50% etanol, nikoliv však 70% etanol nebo 66% metanol, které ovlivňovaly přístupnost chromatinu pro fluorescenční barviva. Je však vhodné rovněž vzpomenout, že byly dosud publikovány i práce, v nichž se fixace alkoholy nezdařila vůbec, Murphy a kol. (1997) například testovali etanolovou fixaci (koncentrace není v práci uvedena) krevních buněk vietnamských žab v terénních podmínkách, které byly uchovávány po dobu několika měsíců a až poté ošetřeny dle metody Holtfretera a Cohena (1990), obarveny a zkoumány. Ve většině případů byly buňky sražené a nebylo je možné vůbec analyzovat nebo vedla analýza k zisku histogramů o velmi vysokých CV (Murphy a kol., 1997).

Aceton se v protokolech pro průtokovou cytometrii příliš často neuplatňuje, ačkoliv se jedná o běžné fixativum v cytometrii statické (Carbonari a kol., 2008). Roussele a kol. (1998) jej testovali ve výše uvedené studii a výsledkem fixace absolutním acetonem o teplotě -20 °C bylo akceptovatelné CV, ale také výrazné srážení a změny morfologických parametrů buněk, jako například velikosti a granularity, a tvorba buněčných agregátů. Na základě těchto poznatků jej autoři neshledali jako vyhovující fixativum. Darzynkiewicz a kol. (2010) na některé z těchto důsledků v souvislosti s použitím absolutního acetonu rovněž upozorňovali. Carbonari a kol. (2008) však úspěšně optimalizovali protokol pro využití acetonu jakožto fixativa pro multiparametrickou průtokovou cytometrii, s nímž eliminovali buněčné srážení a dosáhli stechiometrického barvení, CV a produkce dublet srovnatelné s ošetřením buněk etanolem. Jeho hlavním rozdílem ve srovnání s jinými protokoly bylo použití 80% acetonu, který byl navíc naředěn suspenzí buněk v PBS, a inkubace vzorků v průběhu fixace při 8 °C (Carbonari a kol., 2008).

#### **2.4.2. Chemická fixace - nekoagulující fixativa**

Fixativa působící na principu tvorby příčných vazeb jsou schopna kvalitní prezervace fyzikálních parametrů buněk a povrchových i vnitřních antigenů (Carbonari a kol., 2008). Například aldehydy nadměrně nemodifikují velikost buněk a jejich morfologii ovlivňují méně než alkoholy (Rousselle a kol., 1998). Pro měření obsahu DNA mají však jednu velkou nevýhodu a to, že příčné vazby uvnitř chromatinových konstituentů zhoršují stechiometrii barvení DNA fluorochromy, což vede ke zhoršení

přesnosti měření (Darzynkiewicz a kol., 1984). Ve srovnání s alkoholy dochází k horší absorpci barviv a rovněž získaná CV bývají zvýšená (Rousselle a kol., 1998). Přesnost měření je negativně ovlivněna i v případě, že je fixace aditivními fixativy následována sekundárním ošetřením koagulujícími fixativy (Schimenti a Jacobberger, 1992; Telford a kol., 1994). Problematikou fixace s použitím aditivního fixativa se zabývali například Burns a kol. (1986), kteří zkoumali efekt fixace formalinem na měření obsahu DNA v jaderných krevních buňkách a jejich závěrem bylo, že fixace jaderných erytrocytů fosfátem pufovaným formalinem o finální koncentraci 1 – 2 % významně snížila množství buňkami vyzařované fluorescence, ať již proběhlo barvení DNA propidium jodidem před nebo po uskutečnění fixačního procesu. Pollice a kol. (1992) zase mimo jiné testovali fixaci vzorků paraformaldehydem pro multiparametrickou analýzu lidských leukocytů a rovněž potvrdili, že jeho užití ovlivňuje intenzitu DNA barvení. Při různých teplotách a koncentracích fixativa byl tento efekt různě významný a nejméně se projevoval při použití paraformaldehydu o koncentracích do 0,25 % a teplotách do 37 °C (Pollice a kol., 1992). Velmi zajímavý poznatek uvedli Rousselle a kol. (1998), kteří použili ve své studii koncentrace 1 a 4 % pro formaldehyd i paraformaldehyd – pokud byl jako barvivo pro fixované buňky zvolen propidium jodid, neproběhlo barvení stechiometricky a došlo ke snížení intenzity fluorescence emitované komplexem DNA–PI a zisku vysokých CV, která v některých případech nebylo možné ani definovat, a to i v případě aplikace látek zkvalitňujících permeabilizaci. Pokud byl však pro barvení použit fluorochrom Hoechst 33342, identický postup přípravy vzorků již vedl k dosažení akceptovatelných výsledků (stechiometrické barvení, CV pro formaldehyd pod 5 %). Při zdůvodnění tohoto jevu odkazují Rousselle a kol. (1998) na práci Larsena a kol. (1986): aldehydy indukovaná tvorba vazeb mezi guaninem a cytosinem ovlivňuje vstup PI, zatímco barvení bazických párů adenin – thymin Hoechstem 33342 není externími methylenovými můstky vzniklými aldehydovou fixací výrazně pozměněno. V rozporu s výše uvedenými skutečnostmi je práce Allena (1983), který úspěšně použil barvení PI pro erytrocyty lososa obecného (*Salmo salar*) a křížence amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) s tolstolobikem bílým (*Hypophthalmichthys molitrix*) fixované 1% formalinem. Úspěšnou fixaci embryí pstruha duhového a pstruha obecného popsali Lecommandeur a kol. (1994) při aplikaci jednoduché procedury zahrnující ošetření 1% paraformaldehydem, použitým fluorochromem bylo v tomto případě DAPI.

### **2.4.3. Zalévání vzorků do parafínu**

Jako efektivní metoda, která otevřela nové možnosti v oblasti retrospektivních studií obsahu DNA průtokovou cytometrií, se jeví zalévání vzorků do parafínu po provedení jejich fixace (Darzynkiewicz a Juan, 1997). Metoda byla představena Hedleyem a kol. (1983) a od svého vzniku byla různě modifikována pro různé druhy tkání, fixativa a další proměnné (Darzynkiewicz a Juan, 1997). Její předností je možnost nejprve prozkoumat části tkáně s pomocí mikroskopie a následně vybrat oblast, která bude podrobena analýze průtokovou cytometrií. Přesnost analýzy DNA obsahu jader získaných z parafinových bloků je však ve srovnání například s klasickou etanolovou fixací nebo detergenty popř. hypotonicky ošetřenou nativní tkání o něco nižší. Často totiž bývá negativně ovlivněna velkým množstvím debrisu v důsledku přítomnosti poškozených jader s neúplným obsahem DNA (Darzynkiewicz a kol., 2010) nebo naopak nadměrnou tvorbou jaderných shluků (Heiden a kol., 1991). Před zaléváním tkání do parafínu je rovněž běžnou praxí použití aldehydových fixativ (Hedley a kol., 1983; Hedley a kol., 1984; Herbert a kol., 1989; Esteban a kol., 1991; Overton a McCoy, 1994), jejichž efekt na stechiometrii barvení DNA byl diskutován výše. Zlepšit analýzu DNA obsahu eliminací přítomnosti debrisu a shluků se podařilo Heidenovi a kol. (1991), kteří představili modifikaci Hedleyeho protokolu vyznačující se absencí veškerých centrifugačních a vyplachovacích kroků. Negativní efekt přítomnosti příčných vazeb vzniklých v důsledku aldehydové fixace a ovlivňujících barvení DNA především PI zase eliminovali Overton a McCoy (1994). Ti ve své studii demonstrovali, že opětovné rozptýlení formalinem fixovaných buněk v PBS a následné zahřívání na 75 °C alespoň po dobu jedné hodiny před obarvením PI vedlo k obnovení barvení DNA a zisku přibližně stejné intenzity fluorescence jako v případě nefixovaných vzorků (Overton a McCoy, 1994). Jinou metodou prevence před nestechiometrickým barvením DNA může být volba správného barviva. Darzynkiewicz a kol. (1984) uvádí, že stechiometrie barvení DNA pomocí DAPI je ve srovnání s ostatními fluorochromy nejméně ovlivňována přítomností příčných vazeb a proto je DAPI pro barvení jader izolovaných z parafinových bloků preferováno (Darzynkiewicz a Juan, 1997).

### **2.4.4. Fyzikální fixace – mražení**

V oblasti dlouhodobého uchování vzorků pro průtokovou cytometrii bylo dobrých výsledků dosaženo rovněž s použitím různých protokolů založených na mražení (Gold a kol., 1991; Vindelov a kol., 1983a,b; Murphy a kol., 1997). Tkáně, jež byly objektem

zájmu, byly mraženy například v tekutém dusíku (Tiersch a kol., 1989, Lowcock a kol., 1996; Gold a kol., 1991; Lingenfelsler a kol., 1997a,b; Murphy a kol., 1997) ve směsi suchého ledu a etanolu o teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vindelov a kol., 1983a,b; Burns a kol., 1986) nebo v mrazáku na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Xavier a kol., 2017). S výjimkou poslední jmenované varianty je po iničiálním zmražení obvyklé skladovat vzorky v mrazáku při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Jakobsen, 1983; Vindelov a kol., 1983a,b; Gold a kol., 1991), což lze praktikovat po velmi dlouhý časový úsek – Vindelov a Christensen (1990) například uvádí, že s použitím jejich protokolu byly vzorky skladovány déle než pět let. Autoři zároveň udávají, že ani po této době nebyla při analýze zjištěna změna v DNA histogramech (Vindelov a Christensen, 1990). O minimálních změnách ve výstupech analýz vzorků skladovaných podle některých protokolů založených na mražení svědčí ostatně i to, že byly některé z těchto procedur použity i pro uchování standardů pro stanovování absolutního obsahu DNA (Tiersch a kol., 1989a, b; Tiersch a Chandler, 2011). Většina z procedur mražení vzorků má společné přidání kryoprotektantu, který napomáhá zachovat integritu buněk během uchování, zabraňuje jejich destrukci v průběhu mražení a brání tvorbě ledových krystalů, které buňky eventuálně ohrožují (Bhattacharya a Prajapati, 2016). Běžně je používáno DMSO, například v 5% (Vindelov a kol., 1983a,b; Lingenfelsler a kol., 1997a,b) nebo 8% koncentracích (Jakobsen, 1983; Tiersch a kol., 1989a,b). Xavier a kol. (2017) však ve svém protokolu pro mražení somatických buněk tetry saopaulské (*Astyanax altiparanae*) na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kryoprotektant nepoužili a přesto dosáhli dobré kvality píků a zachování buněčné koncentrace i po 60denním uchování vzorků.

## **2.5. Fixace rybích buněk a tkání pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií**

### **2.5.1. Chemická fixace – koagulující fixativa (alkoholy)**

Alkoholy byly v různých protokolech pro fixaci rybích vzorků několikrát použity. Úspěchů s nimi bylo dosaženo například v pracích Lamatsch a kol. (2000) nebo Chilmonczyka a Mongeho (1999). Lamatsch a kol. (2000) použili svou metodu pro fixaci vzorků rybích ploutví k následné determinaci velikosti genomu 14 různých rybích druhů a detekci triploidů u živorodky křížené (*Pocilia formosa*). Hodnota CV fixovaných vzorků se pohybovala od 1,23 % do 3,36 % a stanovené velikosti genomů souhlasily s údaji dostupnými v literatuře až na jediný rybí druh. Sofistikovaný



protokol, který autoři použili, obsahoval vytvoření buněčné suspenze ve směsi 2,1% kyseliny citronové a 0,5% Tween20, po 20 minutách bylo přistoupeno k fixaci v 70% etanolu, která trvala přes noc a následovalo ošetření buněk směsí 0,5% pepsinu a 0,1M HCl o délce 15 minut a přidání DAPI. Při přípravě vzorků se uplatnily celkem dva centrifugační kroky (Lamatsch a kol., 2000). V jiné práci, kterou publikovali Chilmonczyk a Monge (1999), byly úspěšně demonstrovány změny v proliferaci buněk pstruha duhového při napadení PKX, které byly determinovány analýzou buněčného cyklu prostřednictvím kvantifikace obsahu DNA průtokovou cytometrií. Fixovanými buňkami byly v tomto případě leukocyty, po jejichž fixaci metanolem (koncentraci autoři neuvádí) následovalo skladování v této chemikálii při -20 °C až do období před analýzou, kdy bylo fixativum odstraněno a buňky inkubovány po dobu 15 minut v PBS s RNAsou, následně opláchnuty v PBS a znovu rozpuštěny v PBS s propidium jodidem (Chilmonczyk a Monge, 1999).

V některých pracích však fixace rybích vzorků alkoholy nevedla k dosažení uspokojivých výsledků. Xavier a kol. (2017) se například pokoušeli vyvinout protokol, s jehož použitím by bylo možné prodloužit uchovatelnost vzorků ploutví z tetry saopaulské pro následnou analýzu obsahu DNA. Z rybích ploutví odebírali kousky tkáně, které fixovali v 70% etanolu a směsi kyseliny octové a metanolu (1:3) a přechovávali v inkubátoru při 25 °C. Analýza byla provedena po 30 a 60 dnech a předcházelo jí opláchnutí v PBS a následná lýza a obarvení DAPI. Stejným způsobem byla fixována a uchována izolovaná jádra z buněk ploutve, před analýzou po 30 a 60 dnech byla suspenze jader centrifugována, fixativum odstraněno a jádra rozpuštěna v DAPI a analyzována. Při analýze vzorků z etanolem fixované tkáně autoři v histogramech rozlišili píky (na rozdíl od vzorků v metanolu s kyselinou octovou), jejich poloha však odpovídala výrazně vyššímu obsahu DNA, než byl skutečně naměřen v nativních vzorcích. V případě uchování izolovaných jader byla analýza znemožněna nadměrným nárůstem šumu nebo velmi malým množstvím částic (Xavier a kol., 2017). Lecommandeur a kol. (1994) použili pro fixaci 70% etanol stejně jako výše zmínění autoři, snažili se však uchovat embrya pstruha duhového a pstruha obecného ve stádiu očních bodů. Po extrakci a barvení DAPI ukázala provedená analýza pouze nadměrný šum v histogramech a bylo evidentní, že se jádra z tkání embryí vůbec nepodařilo uvolnit (Lecommandeur a kol., 1994).

### 2.5.2. Chemická fixace – nekoagulující fixativa (aldehydy)

Obdobně jako v případě alkoholů bylo s ošetřením rybích vzorků aldehydovými fixativy dosaženo střídavých úspěchů. Brown a kol. (2000) například vyvinuli protokol pro terénní odběr a uchování vzorků krve amura bílého pro následnou analýzu ploidní úrovně průtokovou cytometrií, přičemž deklarují, že je metoda využitelná i pro vzorky jiných tkání (například jater, svalů, vaječníků nebo varlat). Krev z diploidních (2n) a triploidních (3n) jedinců v něm byla minimálně v poměru 1:20 naředěna fyziologickým roztokem s formalinem (FPSF), který se přesně skládal z roztoku 0,1M NaCl, 1mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,6mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1mM NaHCO<sub>3</sub>, jímž byl po úpravě pH na 8 naředěn formalin na konečnou koncentraci 5 %. Vzorky byly analyzovány po dni, týdnu a měsíci a testovány byly rovněž rozdílné teploty pro jejich přechovávání (-20, 4, 23 a 45 °C). Den před analýzou byly vzorky centrifugovány a FPSF odstraněno, následně byly buňky znovu rozpuštěny v samotném fyziologickém roztoku a opět centrifugovány, což se opakovalo ještě dvakrát. Následovalo barvení pomocí PI, několik filtračních kroků a po důkladném promíchání byly vzorky skladovány přes noc při 4 °C a druhý den analyzovány. Průměr hodnot CV všech fixovaných vzorků odpovídal 2,9 % a rozlišit od sebe vzorky 2n a 3n jedinců bylo možné při měření po dni, týdnu i měsíci a aplikaci všech teplotních profilů (3n buňky měly v průměru 1,46 krát vyšší fluorescenci než 2n). Pro všechny testované teploty nebyly rozdíly v úrovni fluorescence pro danou dobu realizace analýzy a ploidní úroveň statisticky významné. Je však důležité zdůraznit, že hodnoty fluorescence jednotlivých vzorků se s prodlužující se dobou jejich uchování neustále zvyšovaly, vždy tedy bylo nezbytné porovnávat mezi sebou stejně připravené vzorky totožného stáří, neboť jen za předpokladu, že byly 2n i 3n buňky skladovány po stejně dlouhou dobu, odpovídala fluorescence 3n buněk přibližně 1,5 násobku buněk 2n (Brown a kol., 2000).

Změny v úrovni naměřené fluorescence buněk po fixaci aldehydy pozorovali i Burns a kol. (1986), ti však ve své práci porovnávali fluorescenci erytrocytů pstruha duhového bez a s použitím fixativa (formalinu). Autoři použili dva fixační protokoly – v prvním obarvili jádra červených krvinek pstruha pomocí PI a následně je fixovali fosfátem pufovaným formalinem o finální koncentraci 1 – 2 %, před uskutečněním měření byly vzorky centrifugovány a znovu rozpuštěny v PI obarvených nativních erytrocytech stejné ryby. Následná analýza směsi fixovaných a čerstvých vzorků poukázala na přítomnost dvou vzdálených píků, ačkoliv byl původ buněk zcela totožný.

V druhém protokolu byly krevní vzorky pstruha uchovávané při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  s kryoprotektantem rozmrazeny a ředěny velkým množstvím Ringerova roztoku, následně byla část vzorků ponechána bez fixace a část byla fixována formalinem o konečné koncentraci 1 – 2 %. Poté byly obě skupiny centrifugovány a rozpuštěny v PI a zkoumány. Závěrem bylo, že fixace formalinem vedla ke snížení obsahu fluorescence stejně jako v případě prvního protokolu (Burns a kol., 1986).

Jinou prací, v níž byla uplatněna aldehydová fixace k uchování rybích vzorků, byla studie Lecommandeura a kol. (1994). Ti po fixaci embryí pstruha duhového a pstruha obecného 1% paraformaldehydem ve fyziologickém roztoku izolovali jádra buněk a po jejich obarvení DAPI a následné analýze došli k závěru, že je jejich protokol možné úspěšně použít. Ačkoliv totiž v histogramech vzrostlo množství pozorovaného šumu, pík obarvených jader byl od šumu dostatečně vzdálený a odlišitelný. Na místě je však podotknout, že autoři neuvádí mnoho podrobností ohledně fixačního protokolu, doby uchování vzorků ani provedení analýzy, a v neposlední řadě statisticky nevyhodnotili rozdíly v přesnosti měření a především v úrovni buňkami emitované fluorescence (Lecommandeur a kol., 1994).

Allen (1983) použil při přípravě krevních vzorků pro následnou determinaci ploidních úrovní ryb na základě relativního obsahu DNA protokol, v němž byl zahrnut i fixační krok – aplikace formalinu. Pro experiment zvolil krev 2n a 3n lososů obecných a hybridů amura bílého s tolstolobikem bílým, která byla rozpuštěna v rybím fyziologickém roztoku (FPS) s obsahem heparinu sodného a následně centrifugována. Supernatant byl odstraněn a erytrocyty dvakrát rozpouštěny ve studeném FPS a vždy následně centrifugovány, po druhé z těchto centrifugací byly buňky zality třemi mililitry 1% formalinu v FPS, zamíchány a skladovány přes noc při teplotě  $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byla část vzorků dvakrát propláchnuta FPS, centrifugována a barvena PI, zatímco jiné vzorky byly ponechány bez vypláchnutí fixativa při pokojové teplotě až do centrifugace před následným obarvením stejným fluorochromem. Analýza vedla k úspěšnému roztřídění 2n a 3n ryb na základě porovnání rozdílů v naměřených úrovních fluorescence fixovaných vzorků. Zajímavé bylo, že fluorescence vzorků, jež byly před závěrečnou centrifugací a barvením propláchnuty FPS, se vyznačovala mnohem nižší variací ve srovnání s fluorescencí vzorků ponechaných ve formalinu, autor tedy upozorňuje na důležitost tohoto kroku (Allen, 1983).

Xavier a kol. (2017) testovali ve své již zmiňované práci kromě fixace alkoholy i fixaci s použitím aldehydu. Procedury pro ploutevní tkáň a izolovaná jádra buněk ploutve byly totožné s výše popsány, jen autoři namísto alkoholů uplatnili 10% formalin. Histogramy získané analýzou takto připravených vzorků bohužel nebyly lepší než v případě již diskutovaného etanolu nebo směsi kyseliny octové a metanolu. Píky vzorků z fixované tkáně byly kontaminovány šumem nebo nebyly vůbec patrné a u izolovaných jader došlo rovněž k nárůstu šumu v histogramech nad únosnou mez a v neposlední řadě také ke značné redukci množství částic. U fixovaných vzorků navíc došlo ke snížení intenzity emitované fluorescence.

### 2.5.3. Fyzikální fixace – mražení

Mražení rybích vzorků je velmi frekventovanou a v případě správně zvoleného protokolu i efektivní metodou k prodloužení jejich uchovatelnosti (Jakobsen, 1983; Vindelov a kol., 1983b; Tiersch a kol., 1989a,b; Gold a kol., 1991; Pierrez a Ronot, 1991; Lingenfelter a kol., 1997a,b; Dawley a kol., 2014). V žádné z uvedených studií nevedlo použití této fyzikální metody k zisku dat, jejichž interpretace by byla problematická nebo nemožná. Stěžejními byly v tomto ohledu práce Vindelova a spoluautorů, kteří představili protokoly pro dlouhodobé uchování vzorků neobsahující žádné centrifugační kroky (Vindelov a kol., 1983a; b). V původní proceduře autoři nepracují s rybími buňkami (Vindelov a kol., 1983a), v její modifikaci je však již postup aplikován na erytrocyty pstruha duhového (Vindelov a kol., 1983b). Jiní autoři zmiňované protokoly pro rybí buňky rovněž s úspěchem využili, například Lingenfelter a kol. (1997b) pro vzorky krve pocházející z okounka pstruhového (*Micropterus salmoides*) a pstruha duhového, Lingenfelter a kol. (1997a) pro krev karase obecného (*Carassius carassius*) a okounka pstruhového, Burns a kol. (1986) pro krev pstruha duhového nebo Dawley a kol. (1997) pro vzorky krve živorodek rodu *Poeciliopsis*. Původní postup Vindelova a kol. (1983a) spočívá v suspendování buněk v citrátovém pufru (vzniklém rozpuštěním cukrózy a citronanu sodného v destilované vodě), do kterého bylo přidáno DMSO (finální koncentrace odpovídala 5 %) a jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,6. Poté byly vzorky rychle zmrazeny vložением do -80°C směsi suchého ledu a etanolu a přechovávány v mrazáku při -80 °C, odkud byly před plánovanou analýzou vyjmuty a rychle rozmrazeny potopením do 37°C lázně a následně obarveny PI. Na základě analýz vzorků zpracovaných uvedenou metodou došli autoři

k závěru, že je vzorky možné skladovat déle než jeden rok bez detekovatelných změn ve výsledcích DNA analýzy. Dále uvádějí, že metoda může být použita pro uchování buněčných suspenzí i kousků pevné tkáně (Vindelov a kol., 1983a). V její modifikaci pak autoři doplňují protokol o trypsinizaci nefixovaných buněčných jader a jejich stabilizaci sperminem, výhodou novější procedury byla např. absence buněčných ztrát v důsledku uchování nebo barvení a tedy i eliminace možných artefaktů (Vindelov a kol., 1983b). Původní proceduru modifikovali rovněž Gold a kol. (1991) speciálně pro přípravu a dlouhodobé uchování rybích buněk k cytometrické analýze velikosti genomu nebo obsahu DNA. Postup pro přípravu citrátového pufru s 5% DMSO byl převzat (Vindelov a kol., 1983a), buňky v něm byly rozpuštěny a následovalo mrazení v tekutém dusíku a uchovávání v mrazáku při -80 °C. Pro průtokovou cytometrii byly vzorky připraveny zahřátím na pokojovou teplotu, po kterém byly homogenizovány v 75% citrátu sodném, filtrovány a krátce centrifugovány, supernatant byl slit a pelety rozpuštěny ve speciálním roztoku PI k barvení s obsahem ribonukleasy. Centrifugace a opětovné rozpouštění byly dvakrát opakovány a finální suspenze ponechána při 4 °C po dobu 20 minut a analyzována. Autoři procedury uvádějí, že je ji možné použít na široký rozsah buněčných nebo tkáňových typů, včetně krve, měkkých orgánů a svaloviny. Ani přechovávání vzorků po více než 8 měsíců nevedlo ke změnám v odhadovaných velikostech genomu nebo CV, která se v průměru pohybovala od 2 do 5 % v závislosti na typu analyzované tkáně (Gold a kol., 1991).

Odlišný postup dlouhodobého uchování rybích vzorků byl navržen Xavierem a kol. (2017) na základě výsledků studie fixace ploutevnických vzorků tetry saopaulské pro následnou analýzu průtokovou cytometrií. Protokol obsahoval umístění vzorků tkáně do 0,9% NaCl a následné zmrazení na -20 °C v mrazáku. Před analýzou uskutečňovanou po 30 a 60 dnech uchování byla tkáň rozmrazena, vypírána v PBS a po dobu 30 minut ponechána ve speciálním autory optimalizovaném roztoku pro lýzu s občasným mixováním. Následovalo barvení roztokem DAPI s PBS bez vápníku a měření průtokovou cytometrií. Píky ve vzniklých histogramech působily velmi „čistě“ a byly obdobné těm, které byly získány analýzou kontrolní skupiny (nativních vzorků). Počty částic vzorků přechovávaných 30 a 60 dní byly ve srovnání s čerstvě odebranými tkáněmi redukovány, stále však byly plně dostačující k uskutečnění kvalitní analýzy. Podobná procedura byla zkoušena i pro přechování izolovaných buněčných jader z ploutve s tím rozdílem, že v tomto případě byla první provedena lýza a následovalo

mražení, před uskutečněním měření byly pak vzorky rozmrazeny, centrifugovány a vzniklé pelety jader rozpouštěny v barvicím roztoku. V tomto případě se však analýzou nepodařilo získat žádné smysluplné výsledky.

## **2.6. Fixace rybích buněk a tkání v terénních a provozních podmínkách pro měření obsahu DNA průtokovou cytometrií**

Průtoková cytometrie může být použita k jednoduché analýze obsahu DNA velkého množství buněk ve velmi krátkém čase a i přesto s ní lze dosáhnout vyšší přesnosti než v případě ostatních metod (Callis a Hoehn, 1976). Z těchto důvodů se její aplikace pro daný účel jeví jako jeden z nejatraktivnějších přístupů (Ciudad a kol., 2002). Aby však proběhlo měření průtokovou cytometrií úspěšně, je nejprve nutné připravit kvalitní buněčnou suspenzi. Pro její zhotovení je ideální použít nativní vzorky, to však nemusí být z různých důvodů vždy možné (Rousselle a kol., 1998). Fixace vzorků je v tomto případě adekvátní alternativou, jejíž optimalizace může v některých případech umožnit získat natolik kvalitních výstupů cytometrické analýzy, že jsou v podstatě srovnatelné s měřením čerstvých vzorků (Lamatsch a kol., 2000). V minulých letech byla pro fixaci rybích buněk a tkání představena celá řada protokolů, jejichž účinnost byla autory experimentálně ověřena a potvrzena (Allen, 1983; Vindelov a kol., 1983b; Gold a kol., 1991; Brown a kol., 2000; Lamatsch a kol., 2000; Xavier a kol., 2017). Řada z nich má však naneštěstí určitá specifika, která mohou komplikovat využití těchto protokolů v praxi. Brown a kol. (2000) například pozorovali, že úroveň fluorescence emitované obarvenými buňkami se v případě jimi použité metodiky v čase mění, její aplikace je tudíž omezena na odlišení ploidních úrovní porovnáváním vzorků fixovaných stejným způsobem a přechovávaných při totožných podmínkách po přibližně stejně dlouhou dobu. Jiným úskalím existujících protokolů může být časová náročnost přípravy vzorku, kterou lze jednoduše demonstrovat například počtem centrifugačních kroků (Burns a kol., 1986). Allen (1983) využil před analýzou vzorků celkem pět centrifugačních kroků, Gold a kol. (1991) tři, Brown a kol. (2000) čtyři, Lamatsch a kol. (2000) dva. V některých případech jsou navíc centrifugace realizovány v rámci kroků prodlužujících uchovatelnost biologického materiálu, tedy krátce po odběru vzorků a před jejich skladováním (během něhož s nimi není manipulováno). S tím se lze setkat například u protokolu Allena (1983) a Lamatsch a kol. (2000), v neposlední řadě však také u mnoha fixačních protokolů, s nimiž bylo dosaženo dobrých výsledků při fixaci

jiných buněk než rybích (např. Overton a McCoy, 1994; Darzynkiewicz a Juan, 1997; Rousselle a kol., 1998). Všechny tyto komplikace mohou v relativně běžných situacích vést k tomu, že je aplikace daného protokolu složitá nebo zcela vyloučena.

Jednou z takových situací může být odběr vzorků v terénních podmínkách, během něhož je použití procedury k prodloužení uchovatelnosti vzorků často nevyhnutelné, nároky na její jednoduchost jsou však vyšší než kdy jindy. K jejich maximalizaci pak dochází, pokud je zapotřebí odebírat a zpracovávat velká množství vzorků, s čímž se lze v praxi setkat relativně často (Xavier a kol., 2017). Při stanovování absolutního obsahu DNA konkrétního druhu je například zpracování většího množství vzorků výhodné z důvodu zisku relevantních statistických výstupů (Ciudad a kol., 2002). Jiným příkladem může být terénní odběr vzorků z velkého množství jedinců za účelem determinace jejich ploidní úrovně (Brown a kol., 2000), například při zkoumání hybridních diploidně – polyploidních druhových komplexů třeba u rodů *Cobitis*, *Squalius* a *Carassius* (Flajšhans a kol., 2013) nebo spontánní triploidie, jež byla pozorována u celé řady rybích druhů (Benfey, 1989). Flajšhans a kol. (2013) dokonce uvádí, že v zásadě záleží pouze na dostatečné velikosti analyzovaného vzorku dané populace, aby byl spontánně vzniklý  $3n$  jedinec nalezen. V současné době je vyvíjeno velké úsilí pro odhalování spontánních triploidů například u jeseterovitých ryb, u nichž  $3n$  stav nevylučuje plodnost jedinců (Pšenička a kol., 2011; Havelka a kol., 2014).

Použití průtokové cytometrie je velmi významné také při hodnocení úspěšnosti indukce polyploidie, která může mít experimentální charakter, lze ji však využívat rovněž ve šlechtitelské a chovatelské praxi. V posledních dvou případech může být polyploidizace u ryb prováděna masově (Flajšhans a kol., 2013) a tehdy je pro ověření její efektivity zapotřebí odebrat velké množství vzorků v provozních podmínkách (Havelka a kol., 2012). V rybí akvakultuře je nejběžnější cílené vyvolávání  $3n$  stavu (Flajšhans a kol., 2013), za účelem tržní produkce ryb o vyšší hmotnosti, či pro produkci sterilních ryb vyšších hmotnostních kategorií pro vysazování do volných vod (Piferrer a kol., 2009). Ověřování  $3n$  původu vysazovaných ryb s předpokladem jejich sterility je obzvlášť důležité, pokud jsou jedinci nasazováni do míst, kde se vyskytují fragmenty původních populací autochtonních druhů, a to z důvodu zabránění genetickému impaktu na tyto populace (Glover a kol., 2016).

Jednoduchá a spolehlivá metoda k prodloužení uchovatelnosti vzorků by mohla v celé řadě případů usnadnit aplikaci průtokové cytometrie jakožto nástroje k měření

obsahu DNA (Vindelov a kol., 1983a). Aby fixační metoda splnila v uvedených situacích svůj účel, musí umožňovat uchování vzorků bez ztráty jejich kvality minimálně po dobu několika dní, dále by se měla vyznačovat snadnou proveditelností s použitím běžně dostupného vybavení (Lanier a Warner, 1981) a především pak časovou nenáročností, tedy například i absencí vyššího počtu centrifugačních kroků, které mohou navíc vést k buněčným ztrátám. Při splnění všech těchto požadavků by měla být metoda dostatečně robustní a spolehlivá a umožňovat získání výsledků, které by se svou přesností blížily výsledkům získaným analýzou nativních vzorků (Vindelov a kol., 1983a). Všechny výše zmíněné nároky splňuje pouze protokol Vindelova a kol. (1983a), který nebyl původně navržen pro prodloužení uchovatelnosti rybích buněk, ale byl k tomuto účelu různými autory mnohokrát úspěšně použit (Burns a kol., 1986; Dawley a kol., 1997; Lingenfelter a kol., 1997a,b), a protokol Xaviera a kol. (2017) pro prodloužení uchovatelnosti ploutevních vzorků tetry saopaulské.



### 3. Materiál a metodika

V práci byly použity dva modelové rybí druhy: jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) jako zástupce ryb chrupavčitých a lín obecný (*Tinca tinca*) reprezentující ryby kostnaté. Od obou druhů byly získávány tři typy vzorků – krev, ploutevní tkáň a ocasní tkáň plůdku. Vzorky krví a ploutví byly odebírány z diploidních (předem otestovaných) jedinců jesetera malého o stáří 1 – 2 roky a línů obecných 5 – 8 let starých. Plůdek byl vzorkován před obdobím přechodu na exogenní výživu a od obou modelových druhů byl získán z umělého výtěru, při kterém bylo postupováno dle metodik Gely a kol. (2008) a Kouřila a Podhorce (2011). Na všechny odebrané vzorky byly uplatňovány různé procedury k jejich fixaci a uchování.

1., 5. a 10. den od zafixování vzorků byla prováděna analýza na průtokovém cytometru. Těsně před jejím uskutečněním byl do každého připraveného vzorku přidáván standard. Podle metodiky Bytyutskyy a kol. (2014) byly pro analýzu všech použitých vzorků z jesetera jako standard zvoleny nativní somatické buňky lína, které pocházely z ploutevní tkáně. Pro měření všech typů vzorků pocházejících z lína obecného byly jako standard přidávány komerčně dodávané fixované a fluorescenčně značené erytrocyty pstruha duhového (DNA Control UV, Sysmex Partec GmbH, Německo).

Odběry a fixace vzorků probíhaly v akvarijní místnosti Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech a v Genetickém rybářském centru Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (FROV JU). Skladování a analýza vzorků byly uskutečněny v laboratořích Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického. Pokus byl prováděn v souladu s projektem pokusů „Studium biodiverzity, genetiky, fyziologické a reprodukční variability a užitkovosti vybraných druhů sladkovodních ryb“ schváleným Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat FROV JU a schváleným MŠMT ČR. S rybami bylo manipulováno podle principů založených na EU harmonizované legislativě o ochraně zvířat v České republice a podmínek péče o pokusná zvířata stanovených národním Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.).

#### 3.1. Zvolené fixační metody

Na všechny typy vzorků obou pokusných druhů byly uplatněny následující fixační metody: fixace v 1% paraformaldehydu ve fyziologickém roztoku (0,9 % vodný roztok

NaCl), fixace v 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolu ve fyz. roztoku, mražení na -80 °C v samotném fyz. roztoku, mražení na -80 °C v 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolu ve fyz. roztoku a mražení vzorků v přítomnosti kryoprotektantu podle metodiky Vindelova a kol. (1982). Design experimentu je shrnut v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Design experimentu.

Druh	Typ vzorku	Roztok pro fixaci	Teplota při fixaci a uchování	Druh	Typ vzorku	Roztok pro fixaci	Teplota při fixaci a uchování
<b>Jeseter malý</b>	krev	1% paraformaldehyd ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	<b>Lín obecný</b>	krev	1% paraformaldehyd ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		1% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C			1% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		5% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C			5% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		10% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C			10% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		15% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C			15% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		20% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C			20% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C
		fyz. roztok	-80 °C			fyz. roztok	-80 °C
		1% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			1% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C
		5% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			5% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C
		10% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			10% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C
		15% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			15% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C
		20% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			20% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C
		DMSO-citrátový pufr	-80 °C			DMSO-citrátový pufr	-80 °C
		ploutevní tkáň	1% paraformaldehyd ve fyz. roztoku			0 – 4 °C	ploutevní tkáň
	1% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C		1% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	
	5% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C		5% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	
	10% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C		10% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	
	15% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C		15% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	
	20% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C		20% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C	
	fyz. roztok		-80 °C		fyz. roztok	-80 °C	
	1% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C		1% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C	
	5% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C		5% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C	
	10% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C		10% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C	
	15% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C		15% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C	
	20% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C		20% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C	
	DMSO-citrátový pufr		-80 °C		DMSO-citrátový pufr	-80 °C	
	ocasní tkáň plůdku		1% paraformaldehyd ve fyz. roztoku		0 – 4 °C	ocasní tkáň plůdku	
		1% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C		1% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C
		5% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C		5% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C
		10% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C		10% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C
		15% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C		15% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C
		20% EtOH ve fyz. roztoku	0 – 4 °C		20% EtOH ve fyz. roztoku		0 – 4 °C
		fyz. roztok	-80 °C		fyz. roztok		-80 °C
		1% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C		1% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C
		5% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C		5% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C
		10% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C		10% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C
15% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C	15% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			
20% EtOH ve fyz. roztoku		-80 °C	20% EtOH ve fyz. roztoku	-80 °C			
DMSO-citrátový pufr		-80 °C	DMSO-citrátový pufr	-80 °C			

### **3.2. Odběr vzorků**

Krev byla odebírána z ocasní žíly pokusných jedinců obou druhů pomocí inzulinových stříkaček a jejímu srážení bylo předcházeno použitím heparinu podle metodiky Svobodové a kol. (2012). Z každého pokusného jedince byl získán přibližně 1 ml krve, která byla okamžitě dávkována do mikrozkušavek typu Eppendorf naplněných roztoky, v nichž probíhala fixace. Do každé mikrozkušavky bylo aplikováno po jedné kapce krve (přibližně 50  $\mu$ l) a její obsah byl poté okamžitě protřepán.

Vzorky ploutevní tkáně byly u obou rybích druhů odstřihávány z ocasních ploutví pomocí chirurgických nůžek a pinzety. Z ploutve každé ryby byl nejprve odebrán ústřížek o velikosti přibližně 0,5  $\text{cm}^2$ . Ten byl následně rozstřiháván na menší části, které byly vkládány do mikrozkušavek naplněných roztoky, v nichž probíhala fixace. Do každé mikrozkušavky, jejíž obsah měl být mražen na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , byly umísťovány kousky tkáně o velikosti menší než 0,5  $\text{mm}^2$ , do všech ostatních kousky přibližně 1  $\text{mm}^2$  velké.

Plůdek byl odebírán z odchovného žlabu a před další manipulací byl usmrcen předávkováním  $\text{CO}_2$  a umísťován na Petriho misku pomocí kapátka. Do všech mikrozkušavek s roztoky, v nichž byla uskutečňována fixace, bylo poté kapátkem vkládáno po jednom kusu plůdku.

### **3.3. Protokoly pro fixaci a uchování vzorků**

#### **3.3.1. Fixace 1% paraformaldehydem a 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolem ve fyz. roztoku**

Pro každý modelový druh bylo připraveno celkem 15 mikrozkušavek typu Eppendorf naplněných 1 ml čerstvě namíchaného 1% paraformaldehydu ve fyz. roztoku, které byly umístěny na led. 5 jich bylo určeno pro vzorky krve, dalších 5 pro vzorky ploutevní tkáně a posledních 5 pro plůdek. Následoval odběr vzorků (kapitola 3.2), po kterém byly vzorky na ledu přenášeny do laboratoře a přendány do lednice. Následující den z ní byly na okamžik vyjmuty a opět umístěny na led, aby se zamezilo jejich ohřívání během manipulace při pokojové teplotě. Poté bylo z vzorků odebráno množství potřebné k uskutečnění cytometrické analýzy a následovalo jejich neprodlené vrácení zpět do lednice. Tento postup byl znovu opakován 5 a 10 dní po iniciálním vzorkování.

Pro fixaci vzorků každou zvolenou koncentrací etanolu byl opakován zcela totožný postup jako pro 1% paraformaldehyd, jen byly mikrozkuhavky naplněny vždy 1 ml daného testovaného roztoku (1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanol ve fyz. roztoku).

### **3.3.2. Mražení vzorků ve fyz. roztoku a 1%, 5%, 10%, 15% a 20% etanolu ve fyz. roztoku**

Pro fixaci vzorků ve fyz. roztoku mrazem bylo nejprve nutné pro každý modelový druh připravit 45 mikrozkuhovek typu Eppendorf naplněných 1 ml fyz. roztoku a umístit je na led. Následoval odběr vzorků (kapitola 3.2) – 15 mikrozkuhovek bylo určeno vzorkům krve, 15 vzorkům ploutevní tkáně a 15 plůdku. Poté byly vzorky neprodleně přepraveny do laboratoře a umístěny do mrazáku udržujícího teplotu -80 °C. Následující den bylo 5 vzorků zmražené ploutevní tkáně, 5 vzorků plůdku a 5 vzorků krve vyjmuty z mrazáku a přeneseno do vodní lázně, která vznikla napuštěním 1 litru teplé pitné vody do kádinky odpovídající velikosti. Po rozmrazení bylo možné začít vzorky připravovat na cytometrickou analýzu. Rozmrazení a analýza probíhaly stejným způsobem 5 a 10 dní po iniciálním vzorkování.

Pro mražení vzorků v každé ze zvolených koncentrací etanolu byl opakován zcela totožný postup jako při mražení ve fyz. roztoku, jen bylo 45 mikrozkuhovek na začátku určeno každé testované koncentraci etanolu ve fyz. roztoku (1 %, 5 %, 10 %, 15 % a 20 %)

### **3.3.3. Mražení vzorků s kryoprotektantem**

Pro mražení vzorků s kryoprotektantem bylo pro každý modelový druh připraveno 45 mikrozkuhovek obsahujících po 1 ml DMSO–citrátového pufru (Vindelov a kol., 1982a). Odběr vzorků proběhl stejně jako při mražení ve fyz. roztoku, poté byly však mikrozkuhavky se vzorky okamžitě umístěny na suchý led (viz Příloha č. 1). Odtud byly po dokonalém zmrazení vyjmuty a uloženy do mrazáku (-80 °C). Rozmrazování po 1, 5 a 10 dnech od iniciálního vzorkování probíhaly stejně jako při proceduře mražení ve fyz. roztoku.

## **3.4. Kontrolní (nativní) vzorky**

Pokaždé, když byly z konkrétního jedince odebírány vzorky krve nebo ploutevní tkáně pro zpracování různými způsoby k prodloužení uchovatelnosti, odebraný materiál byl zároveň připravován také k okamžité analýze v nativním stavu. 5 mikrozkuhovek

naplněných 1 ml fyz. roztoku bylo určeno vždy pro krev a dalších 5 pro ploutevní tkáň vzorkované ryby. Nativní vzorky byly připravovány také z ocasní tkáně plůdku, i pro něj bylo nachystáno 5 mikrozkušavek s 1 ml fyz. roztoku. Při odběru všech vzorků, které měly být měřeny v nativním stavu, byla použita stejná metodika jako při odběrech vzorků pro uplatnění fixačních procedur (kapitola 3.2). Následoval neprodlený transport do laboratoře, kde proběhla okamžitá analýza.

### **3.5. Příprava vzorků na analýzu průtokovou cytometrií**

#### **3.5.1. Krev**

Z každé mikrozkušavky obsahující krevní vzorek byly nezávisle na použité fixační proceduře mikropipetou odebírány 2  $\mu$ l, které byly následně aplikovány do 1,5 ml jednodušového fluorescenčního barviva 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) s excitačním/emisním maximem 358 / 461 nm (Cystain DNA 1 step – Staining Solution, Partec GmbH, Německo), jež bylo předem napipetováno do zkumavek. Obsah zkumavek byl důkladně homogenizován pomocí minitřepačky (Minishaker MS2, IKA, Německo) a následně inkubován po dobu minimálně 10 minut. Po jejich uplynutí byly vzorky připraveny k filtraci přes 30 $\mu$ m filtry (CellTrics, Partec GmbH, Německo) do kyvet (viz Příloha č. 2) a po přidání standardu také k cytometrické analýze.

#### **3.5.2. Ploutevní tkáň**

Vzorky ploutevních tkání byly nejprve pinzetou vyjmuty z roztoků, v nichž byly fixovány, a umístěny do mikrozkušavek, které byly dopředu mikropipetou naplněny 200  $\mu$ l pufru pro extrakci buněčných jader (Nuclei Extraction Buffer + Extraction buffer reagent, Genetrac, ČR). V případě metod založených na mražení byly do pufru vkládány celé fixované kousky ploutevních tkání, u ostatních metod byly pro umístění do pufru z kousků tkání odstřihávány vždy přibližně třetinové části (zbytek tkáně byl rychle vrácen zpět do svého fixačního roztoku a zanedlouho také do lednice). Efektivnějšího uvolňování buněk do pufru bylo dosaženo pomocí ručního homogenizátoru (Pellet pestles cordless motor, Kimble, USA), kterým byl každý připravovaný vzorek zpracováván přibližně 5 s. Po použití homogenizátoru byly všechny vzorky ponechány bez další manipulace po dobu minimálně 10 min. Po uplynutí inkubační doby bylo z každého připravovaného vzorku za účelem snížení množství buněk v připravované suspenzi odebráno 100  $\mu$ l. Do zbylých 100  $\mu$ l suspenze

buněk v pufru byl mikropipetou přidán 1 ml DAPI (Staining Buffer; DAPI, Genetrac, ČR). Následovala homogenizace pomocí minitřepačky a poté byla suspenze přefiltrována přes 30 $\mu$ m nylonový filtr do kyvety pro průtokovou cytometrii a připravena k přidání standardu a měření.

### **3.5.3. Ocasní tkáň plůdku**

Plůdek byl pomocí kapátka přendáván z roztoku, v němž byl fixován, na hodinové sklíčko. Odběr vzorku tkáně pro cytometrickou analýzu probíhal za použití skalpelu, kterým byla oddělena část ocásku o velikosti menší než 0,5 mm<sup>2</sup>. Části odebrané tkáně byly umisťovány do mikrozkušavek naplněných 200  $\mu$ l pufru pro extrakci buněčných jader a po dobu 5 s mělněny v pufru tyčinkou ručního homogenizátoru. Výsledná suspenze byla 10 min inkubována a poté bylo do každé mikrozkušavky mikropipetou přidáno po 1 ml barviva DAPI. Po promíchání za použití minitřepačky byly finální suspenze buněk filtrovány přes 30 $\mu$ m filtry do kyvet a po přidání standardu připraveny k měření.

### **3.5.4. Standard a jeho přidávání**

Komerčně dostupná suspenze fixovaných pstružích erytrocytů byla připravena k okamžitému použití. Suspenzi nativních buněk lína obecného bylo však před každým měřením nutno připravit. Příprava spočívala v odběru kousku ploutve vždy stejného jedince lína obecného do fyz. roztoku, nastřihání na zhruba 1 mm<sup>2</sup> velké části a jejich vkládání do mikrozkušavek s 200  $\mu$ l pufru pro extrakci buněčných jader. Následovalo 5s mělnění za použití ručního homogenizátoru, 10 min dlouhá inkubace a na závěr přidání 1 ml fluorescenčního barviva DAPI a filtrace do kyvet přes 30 $\mu$ m nylonové filtry.

Jelikož se od sebe jednotlivé připravené vzorky lišily v počtu obsažených buněk, bylo pro ně množství přidávaného standardu vždy optimalizováno tak, aby při cytometrické analýze směsi standardu se zkoumaným vzorkem vznikaly dva snadno detekovatelné píky. Do každého vzorku bylo nejprve pipetováno 200  $\mu$ l suspenze standardu, což bylo optimální množství pro naprostou většinu vzorků. Pokud se při následném měření v histogramech objevily dva dobře patrné píky, analýza pokračovala. V případech, kdy byl pík vzniklý analýzou buněk standardu špatně rozpoznatelný vedle píku pocházejícího ze zkoumaného vzorku, bylo měření pozastaveno, množství standardu zvýšeno a měření opakováno. Pokud byl naopak detekovatelný pouze pík

standardu, celý vzorek byl pro analýzu na průtokovém cytometru připraven znovu a tentokrát bylo přidáváno řádově nižší množství standardu až do doby, než byl poměr mezi množstvím vzorku a standardu optimalizován. Jiným případem však bylo, když byl pík standardu dobře patrný, ale namísto druhého píku bylo možné rozpoznat jen velké množství buněčného šumu. V této situaci nebyl poměr mezi vzorkem a standardem dále upravován.

### **3.6. Měření na průtokovém cytometru**

Veškerá měření byla realizována na průtokovém cytometru Partec CCA I (Partec GmbH, Německo) (viz Příloha č. 3). Gain byl nastaven na 440,5. Rychlost průtoku suspenze buněčných jader komůrkou cytometru byla volena podle koncentrace částic v suspenzi. Nejprve byla nastavena taková rychlost, aby komůrkou procházelo více než 100 buněk. První vznikající histogramy byly několikrát vymazány a byl pozorován vznik dvou píků. Potřebná přesnost měření byla dosažena následným snížením rychlosti na takovou úroveň, aby komůrkou cytometru procházelo po celou dobu vzniku finálního histogramu přibližně do 20 buněk za sekundu v případě suspenze erytrocytů a do 30 buněk za sekundu u suspenzí buněk z ploutevní tkáně a ocasní tkáně plůdku. Každý finální histogram vznikl analýzou minimálně 1000 buněk. Histogramy byly důsledně ukládány a naměřené hodnoty zapisovány do programu Excel. Po analýze jednoho vzorku byla komůrka průtokového cytometru vždy několikrát propláchnuta, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku následujícího.

### **3.7. Hodnocení výsledků**

Výsledky měření byly zpracovávány v tabulkovém procesoru MS Excel a programu Statistica. Hlavními parametry, od nichž se odvíjelo hodnocení účinnosti jednotlivých fixačních metod, byly hodnoty změřených variačních koeficientů a úrovní fluorescencí. Efektivita testovaných fixačních metod byla samostatně hodnocena vždy v rámci konkrétního typu vzorku (krev, ploutevní tkáň, ocasní tkáň plůdku) konkrétního rybiho druhu (lín obecný, jeseter malý).

#### **3.7.1. Variační koeficienty (CV)**

Nejprve byly vyhodnocovány průměrné CV z hodnot naměřených pro nativní vzorky a vzorky fixované po dobu 1, 5 a 10 dní různými testovanými metodami.

Vzorky, jejichž analýzou nevznikl detekovatelný pík odlišitelný od píku standardu nebo vzorky s hodnotou CV vyšší než 10 %, byly označeny za neměřitelné a nebyly do hodnocení průměrných CV zahrnuty. Ve formě tabulky pak byly průměrné CV pro jednotlivé metody a délky uchování shrnuty a zároveň bylo uvedeno, kolik procent ze všech měřených vzorků se na sestavování průměrných hodnot CV podílelo (tzn. podíl počtu měřitelných vzorků na celkovém počtu analyzovaných vzorků pro danou metodu a den analýzy) (Tabulka č. 2, 4, 6, 8, 10, 12). Metody, s jejichž použitím bylo možné měřit 100 % vzorků 1., 5. i 10. den, byly vybrány pro sestavení grafu ilustrujícího průměrné hodnoty CV (Graf č. 1, 5, 7, 11). Z těchto metod byly do závěrečného shrnutí vybrány ty, jejichž průměrné CV po 1, 5 ani 10 dnech fixace nepřekročily zvolenou hranici 3 %.

V případě některých typů vzorků nebyla zjištěna žádná nebo byla zjištěna pouze jediná metoda, která umožňovala analyzovat 100 % vzorků 1., 5. i 10. den a současně její průměrné CV žádný den nepřekročily úroveň 3 %. Tehdy byly k sestavení grafu kromě metod umožňujících analýzu 100 % vzorků 1., 5. i 10. den vybrány i metody, s nimiž bylo 100 % vzorků úspěšně změřeno jen 1. a 5. den (Graf č. 3, 9).

### 3.7.2. Fluorescence

Pro zjišťování změn ve fluorescenci vzorků, ke kterým docházelo při použití různých fixačních metod, byly nejprve vypočítány hodnoty poměrů naměřené fluorescence standardu/naměřené fluorescence vzorků (dále už jen  $F_{st.}/F_{vz.}$ ), které byly dále hodnoceny. Hodnoty poměrů fluorescence standardu/fluorescence nativních vzorků (dále už jen  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ ) a poměrů fluorescence standardu/fluorescence fixovaných vzorků (dále už jen  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$ ) byly pro každou metodu a den analýzy zprůměrovány. Do hodnocení průměrných  $F_{st.}/F_{vz.}$  jednotlivých metod nebyly zařazeny vzorky, které byly při sestavování výsledků CV shledány neměřitelnými. Výsledné průměrné hodnoty  $F_{st.}/F_{vz.}$  byly pro jednotlivé metody a délky uchování shrnuty ve formě tabulky, v níž byl zároveň uveden procentuální podíl počtu měřitelných vzorků na celkovém počtu analyzovaných vzorků pro danou metodu a dobu analýzy (Tabulka č. 3, 5, 7, 9, 11, 13). Poté byl sestaven graf průměrných  $F_{st.}/F_{vz.}$ , do kterého byly vybrány stejné fixační metody jako do grafu průměrných hodnot CV (Graf č. 2, 4, 6, 8, 10, 12). Pro tyto metody byly do grafu indexy vyznačeny statistické rozdíly  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  a  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  uchovávaných po 1, 5 a 10 dní. Hodnocení významnosti



rozdílů  $F_{st.}/F_{vz.}$  bylo uskutečněno v programu Statistica. Analýzou homogenity variací pomocí Cochran C, Hartley, Bartlett testů bylo prokázáno, že data neměla normální rozdělení. Na základě této skutečnosti byly rozdíly  $F_{st.}/F_{vz.}$  hodnoceny pomocí neparametrického Kruskal–Wallisova testu.

### 3.7.3. Závěrečná shrnutí

Do závěrečného shrnutí byly vybrány metody, které splňovaly podmínku měřitelnosti 100 % vzorků po 1, 5 i 10 dnech a současně vykazovaly průměrné CV nižší než 3 %. Pro každou vybranou metodu bylo následně na základě výsledků statistického porovnání shrnuto, zda se s jejím použitím změnil poměr  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  oproti  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ , či nikoliv. V nejideálnějších případech nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  a  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  naměřených po 1, 5 ani 10 dnech. V některých případech se jeden nebo více  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  významně lišilo od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ . Tehdy byly uvedeny průměrné  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  a  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  a bylo vypočítáno, o kolik procent se musely samotné průměrné fluorescence fixovaných vzorků změnit oproti průměrným fluorescencím vzorků nativních, aby došlo k daným změnám v hodnocených poměrech.

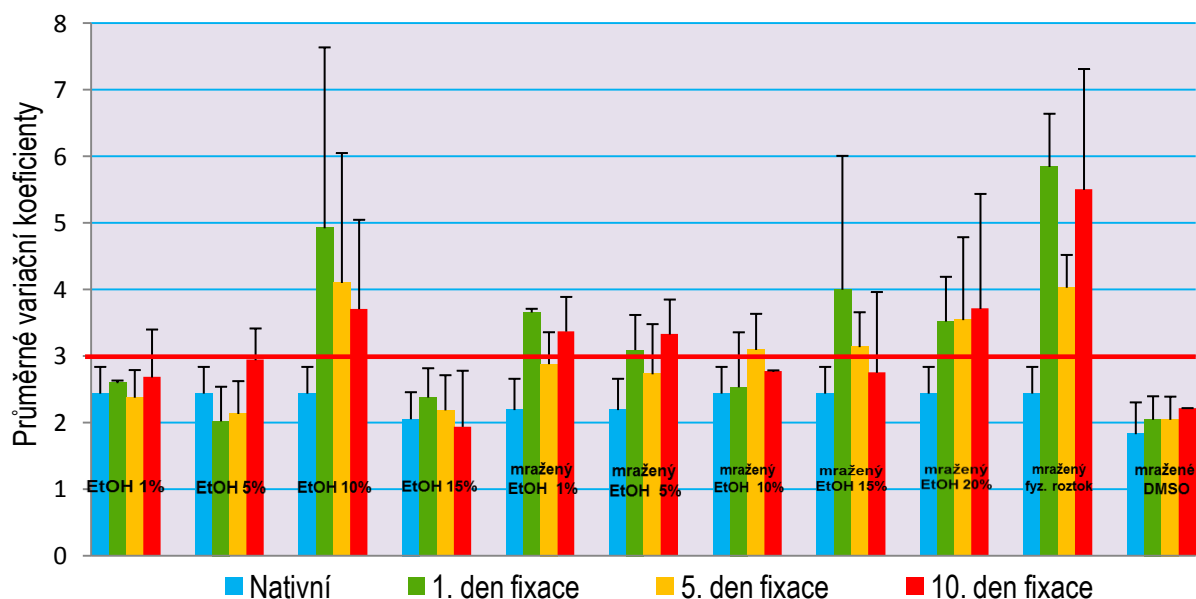
## 4. Výsledky

### 4.1. Jeseter malý – krev

#### 4.1.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 2: Průměrné CV získané analýzou nativních krevních vzorků jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	2,44 ± 0,401 (100 %)	2,596 ± 0,04 (100 %)	2,378 ± 0,416 (100 %)	2,682 ± 0,721 (100 %)
EtOH 5%	2,44 ± 0,401 (100 %)	2,022 ± 0,521 (100 %)	2,134 ± 0,494 (100 %)	2,942 ± 0,477 (100 %)
EtOH 10%	2,44 ± 0,401 (100 %)	4,924 ± 2,718 (100 %)	4,102 ± 1,953 (100 %)	3,708 ± 1,343 (100 %)
EtOH 15%	2,054 ± 0,407 (100 %)	2,38 ± 0,441 (100 %)	2,188 ± 0,528 (100 %)	1,94 ± 0,844 (100 %)
EtOH 20%	2,054 ± 0,407 (100 %)	2,158 ± 0,895 (100 %)	2,13 ± 0,592 (80 %)	2,188 ± 0,799 (80 %)
mraž. EtOH 1%	2,192 ± 0,47 (100 %)	3,658 ± 0,056 (100 %)	2,882 ± 0,48 (100 %)	3,372 ± 0,52 (100 %)
mraž. EtOH 5%	2,192 ± 0,47 (100 %)	3,094 ± 0,528 (100 %)	2,73 ± 0,754 (100 %)	3,328 ± 0,525 (100 %)
mraž. EtOH 10%	2,44 ± 0,401 (100 %)	2,534 ± 0,827 (100 %)	3,096 ± 0,542 (100 %)	2,77 ± 0,019 (100 %)
mraž. EtOH 15%	2,44 ± 0,401 (100 %)	4 ± 2,012 (100 %)	3,138 ± 0,524 (100 %)	2,752 ± 1,214 (100 %)
mraž. EtOH 20%	2,44 ± 0,401 (100 %)	3,522 ± 0,673 (100 %)	3,544 ± 1,246 (100 %)	3,712 ± 1,728 (100 %)
mraž. fyz. roztok	2,44 ± 0,401 (100 %)	5,846 ± 0,799 (100 %)	4,03 ± 0,494 (100 %)	5,5 ± 1,817 (100 %)
mraž. DMSO	1,83 ± 0,478 (100 %)	2,046 ± 0,354 (100 %)	2,046 ± 0,348 (100 %)	2,218 ± 0,004 (100 %)
paraformaldehyd 1%	2,054 ± 0,407 (100 %)	3,945 ± 0,005 (40 %)	2,5 ± 0,04 (40 %)	2,445 ± 0,005 (40 %)



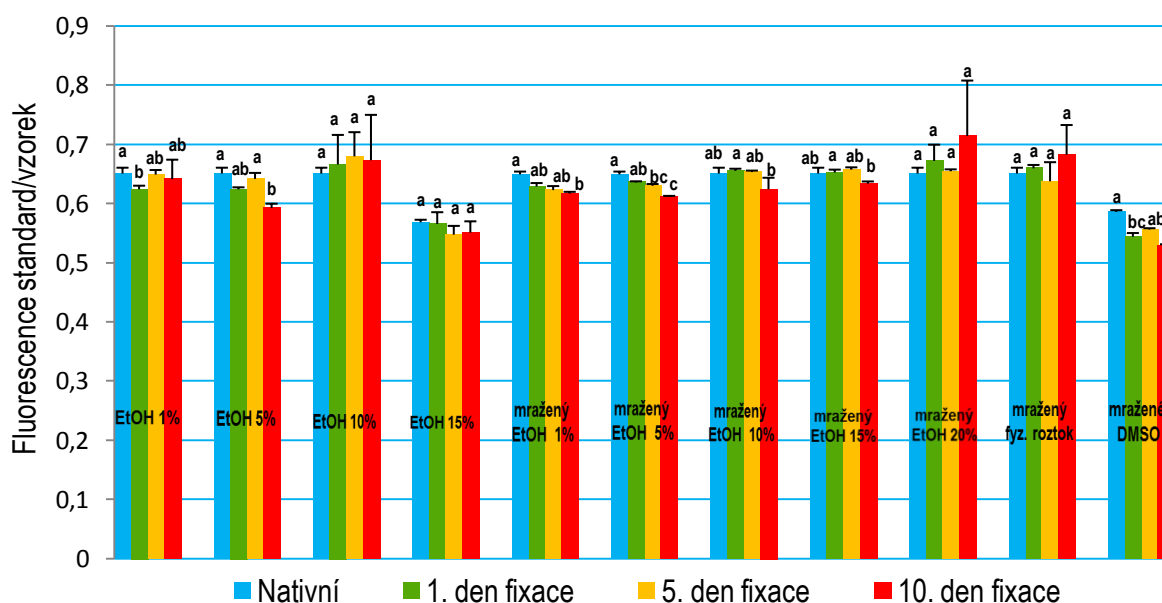
Graf č. 1: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních krevních vzorků jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.

#### 4.1.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 3: Průměrné  $F_{st}/F_{vz}$  pro nativní krevní vzorky z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z těchto ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den	5. den	10. den
EtOH 1%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,624 ± 0,006 (100 %)	0,649 ± 0,008 (100 %)	0,641 ± 0,033 (100 %)
EtOH 5%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,624 ± 0,003 (100 %)	0,642 ± 0,01 (100 %)	0,593 ± 0,007 (100 %)
EtOH 10%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,666 ± 0,05 (100 %)	0,68 ± 0,041 (100 %)	0,673 ± 0,077 (100 %)
EtOH 15%	0,569 ± 0,004 (100 %)	0,566 ± 0,02 (100 %)	0,548 ± 0,015 (100 %)	0,551 ± 0,019 (100 %)
EtOH 20%	0,569 ± 0,004 (100 %)	0,541 ± 0,014 (100 %)	0,539 ± 0,009 (80 %)	0,539 ± 0,008 (80 %)
mraž. EtOH 1%	0,649 ± 0,005 (100 %)	0,629 ± 0,006 (100 %)	0,623 ± 0,007 (100 %)	0,617 ± 0,003 (100 %)

	Nativní	1. den	5. den	10. den
mraž. EtOH 5%	0,649 ± 0,005 (100 %)	0,636 ± 0,002 (100 %)	0,63 ± 0,003 (100 %)	0,611 ± 0,002 (100 %)
mraž. EtOH 10%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,655 ± 0,004 (100 %)	0,653 ± 0,003 (100 %)	0,624 ± 0,02 (100 %)
mraž. EtOH 15%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,653 ± 0,005 (100 %)	0,657 ± 0,004 (100 %)	0,634 ± 0,004 (100 %)
mraž. EtOH 20%	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,672 ± 0,027 (100 %)	0,655 ± 0,003 (100 %)	0,714 ± 0,094 (100 %)
mraž. fyz. roztok	0,651 ± 0,01 (100 %)	0,66 ± 0,006 (100 %)	0,638 ± 0,032 (100 %)	0,683 ± 0,05 (100 %)
mraž. DMSO	0,586 ± 0,003 (100 %)	0,544 ± 0,006 (100 %)	0,557 ± 0,002 (100 %)	0,529 ± 0,002 (100 %)
paraformaldehyd 1%	0,569 ± 0,004 (100 %)	0,823 ± 0,005 (40 %)	0,822 ± 0,003 (40 %)	0,769 ± 0,001 (40 %)



Graf č. 2: Průměrné  $F_{st}/F_{vz}$  pro nativní krevní vzorky z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa.

#### 4.1.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků krve jesetera pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných krevních vzorků jesetera malého jsou součástí příloh (Příloha č. 4 a Příloha č. 5). Při použití 4 metod se podařilo změřit všechny fixované vzorky a současně nepřekročit žádný den měření průměrnou 3% úroveň CV. Těmito metodami byla fixace 1%, 5% a 15% etanolem a mražení vzorků v přítomnosti kryoprotektantu.

Použití 15% etanolu současně vedlo při realizaci analýzy po 1, 5 i 10 dnech fixace k zisku hodnot  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$ , které se statisticky neodlišovaly od  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ .

Při fixaci 1% etanolem byla zjištěna statistická odlišnost pouze mezi  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  změřenými po 1. dni fixace a poměry  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ .  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  odpovídal v průměru  $0,624 \pm 0,006$ , zatímco  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$   $0,651 \pm 0,01$ . Aby došlo k této změně v poměrech fluorescence, musela fixace způsobit zvýšení průměrné fluorescence vzorků o 4,33 %.

Rovněž při fixaci 5% etanolem byla zjištěna jedna statistická odlišnost mezi  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  a  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ , tentokrát byl však rozdíl od hodnot nativních vzorků zjištěn po 10 dnech fixace. Tehdy  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  činil průměrně  $0,593 \pm 0,007$ , zatímco  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$   $0,651 \pm 0,01$ . Aby se tak mohlo stát, musela fluorescence fixovaných vzorků vzrůst v průměru o 9,78 % oproti fluorescenci vzorků nativních.

Při analýze vzorků mražených v kryoprotektantu byly zjištěny dvě statistické odlišnosti  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  oproti  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ , a to když byly vzorky rozmrazovány a analyzovány 1. a 10. den po svém zmrazení. Tehdy průměrné hodnoty  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  odpovídaly  $0,544 \pm 0,006$  a  $0,529 \pm 0,002$  ve srovnání s  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$   $0,586 \pm 0,003$ . Průměrná úroveň fluorescence fixovaných vzorků musela být tudíž zvýšena o 7,72 % a 10,76 %.

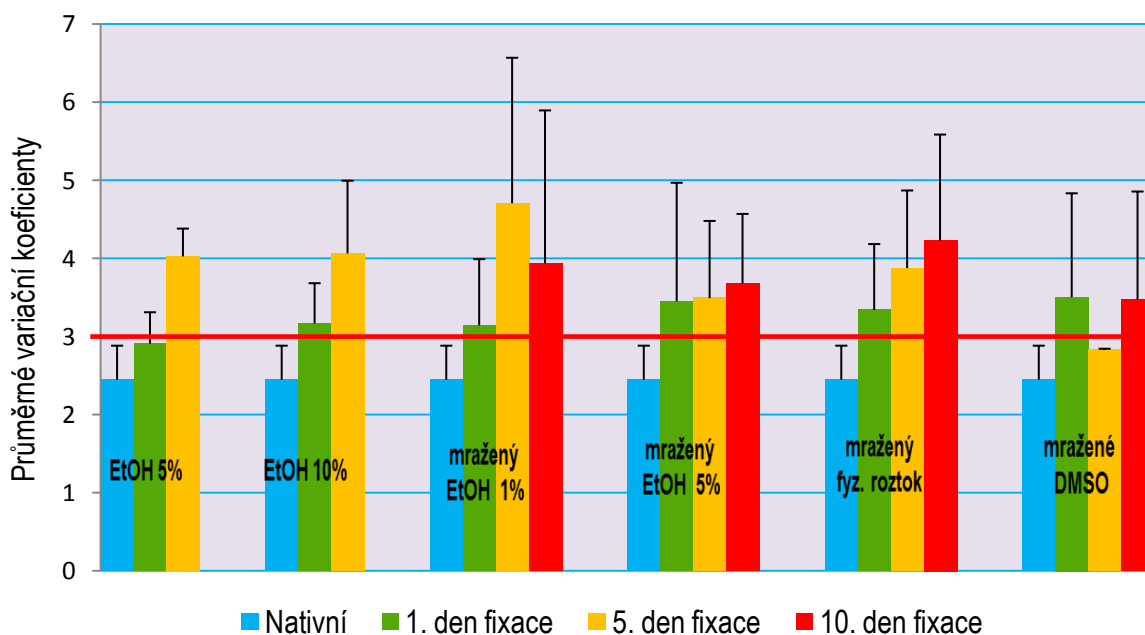
## 4.2. Jeseter malý – ploutevní tkáň

### 4.2.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 4: Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ploutevních tkání jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházející z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznik detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den	5. den	10. den
EtOH 1%	2,448 ± 0,435 (100 %)	2,5 ± 0,681 (100 %)	4,535 ± 0,511 (80 %)	0 (0 %)
EtOH 5%	2,448 ± 0,435 (100 %)	2,91 ± 0,401 (100 %)	4,026 ± 0,356 (100 %)	0 (0 %)
EtOH 10%	2,448 ± 0,435 (100 %)	3,168 ± 0,515 (100 %)	4,064 ± 0,931 (100 %)	7,65 ± 0,28 (40 %)
EtOH 15%	2,448 ± 0,435 (100 %)	2,692 ± 0,665 (100 %)	3,4 ± 1,349 (60 %)	6,45 (20 %)

	Nativní	1. den	5. den	10. den
EtOH 20%	2,448 ± 0,435 (100 %)	2,692 ± 0,496 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
mraž. EtOH 1%	2,448 ± 0,435 (100 %)	3,144 ± 0,847 (100 %)	4,706 ± 1,863 (100 %)	3,938 ± 1,957 (100 %)
mraž. EtOH 5%	2,448 ± 0,435 (100 %)	3,45 ± 1,519 (100 %)	3,492 ± 0,988 (100 %)	3,678 ± 0,892 (100 %)
mraž. EtOH 10%	2,448 ± 0,435 (100 %)	5,05 ± 2,936 (60 %)	5,498 ± 1,894 (80 %)	4,888 ± 1,725 (100 %)
mraž. EtOH 15%	2,448 ± 0,435 (100 %)	5,323 ± 2,704 (80 %)	6,762 ± 0,961 (100 %)	6,66 ± 1,992 (80 %)
mraž. EtOH 20%	2,448 ± 0,435 (100 %)	6,003 ± 1,636 (80 %)	4,922 ± 0,539 (100 %)	7,115 ± 1,55 (80 %)
mraž. fyz. roztok	2,448 ± 0,435 (100 %)	3,34 ± 0,844 (100 %)	3,876 ± 0,994 (100 %)	4,23 ± 1,356 (100 %)
mraž. DMSO	2,448 ± 0,435 (100 %)	3,504 ± 1,33 (100 %)	2,828 ± 0,016 (100 %)	3,474 ± 1,383 (100 %)
paraformaldehyd 1%	2,752 ± 0,235 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

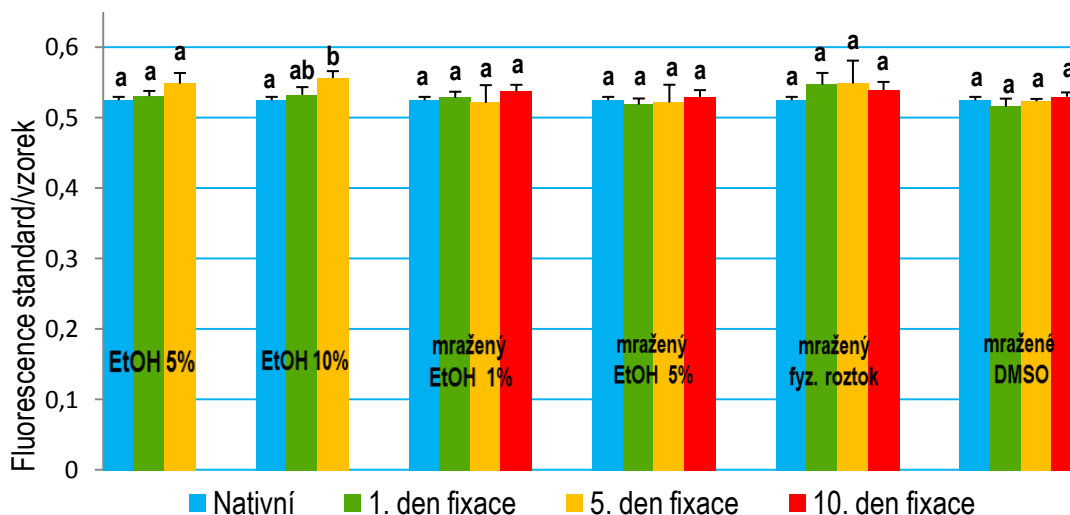


Graf č. 3: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání jeseterů malých odebraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházející z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.

#### 4.2.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevní tkáně jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 5: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevních tkání z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,532 ± 0,004 (100 %)	0,537 ± 0,006 (80 %)	0 (0 %)
EtOH 5%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,53 ± 0,007 (100 %)	0,548 ± 0,015 (100 %)	0 (0 %)
EtOH 10%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,532 ± 0,011 (100 %)	0,556 ± 0,01 (100 %)	0,558 ± 0,016 (40 %)
EtOH 15%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,526 ± 0,013 (100 %)	0,555 ± 0,009 (60 %)	0,536 (20 %)
EtOH 20%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,516 ± 0,006 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
mraž. EtOH 1%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,528 ± 0,009 (100 %)	0,521 ± 0,025 (100 %)	0,537 ± 0,01 (100 %)
mraž. EtOH 5%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,519 ± 0,009 (100 %)	0,521 ± 0,025 (100 %)	0,529 ± 0,01 (100 %)
mraž. EtOH 10%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,524 ± 0,007 (60 %)	0,515 ± 0,012 (80 %)	0,505 ± 0,03 (100 %)
mraž. EtOH 15%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,496 ± 0,005 (80 %)	0,494 ± 0,024 (100 %)	0,555 ± 0,027 (80 %)
mraž. EtOH 20%	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,495 ± 0,004 (80 %)	0,506 ± 0,014 (100 %)	0,529 ± 0,016 (80 %)
mraž. fyz. roztok	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,547 ± 0,017 (100 %)	0,548 ± 0,033 (100 %)	0,539 ± 0,012 (100 %)
mraž. DMSO	0,524 ± 0,005 (100 %)	0,515 ± 0,012 (100 %)	0,523 ± 0,004 (100 %)	0,53 ± 0,006 (100 %)
paraformaldehyd 1%	0,545 ± 0,004 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)



Graf č. 4: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevních tkání z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z těchto ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa.

#### 4.2.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ploutevních tkání jesetera pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných vzorků ploutevních tkání jesetera malého jsou součástí příloh (Příloha č. 6 a Příloha č. 7). Při hodnocení výsledků analýzy fixovaných ploutevních tkání jesetera malého bylo zjištěno, že podmínky měřitelnosti všech vzorků a zároveň průměrných CV nižších než 3 % po 1, 5 a 10 dnech fixace nebyly současně splněny při použití žádné fixační metody. Nejlepší průměrné CV byly získány při mražení ploutevních vzorků v kryoprotektantu –  $3,504 \pm 1,33$ ;  $2,828 \pm 0,016$  a  $3,474 \pm 1,383$  %. Tato metoda zároveň umožnila úspěšně analyzovat všechny vzorky a její aplikace nevedla k zisku žádného statisticky významného rozdílu mezi  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  a  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ .

### 4.3. Jeseter malý – ocasní tkáň plůdku

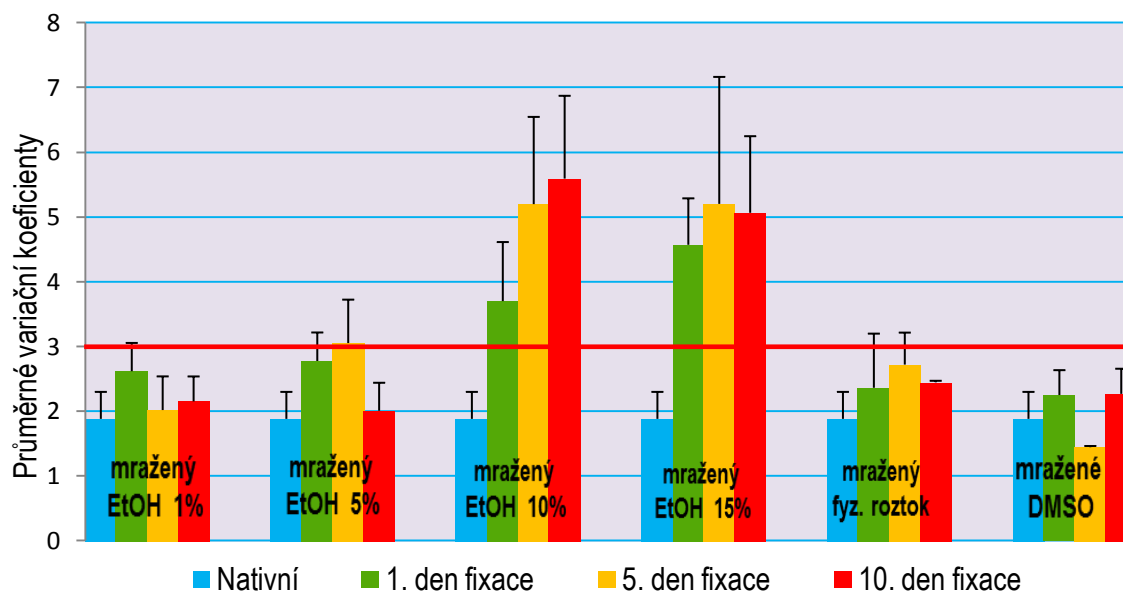
#### 4.3.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 6: Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera malého odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování



možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den	5. den	10. den
EtOH 1%	2,614 ± 0,622 (100 %)	2,2 ± 0,85 (100 %)	2,396 ± 0,749 (100 %)	4,72 (20 %)
EtOH 5%	2,614 ± 0,622 (100 %)	2,358 ± 0,419 (100 %)	5,494 ± 1,224 (100 %)	2,527 ± 0,845 (60 %)
EtOH 10%	2,614 ± 0,622 (100 %)	3,004 ± 0,518 (100 %)	3,908 ± 0,476 (80 %)	0 (0 %)
EtOH 15%	2,614 ± 0,622 (100 %)	2,6 (20 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
EtOH 20%	2,614 ± 0,622 (100 %)	4,84 ± 0,23 (40 %)	4,59 ± 0,48 (40 %)	0 (0 %)
mraž. EtOH 1%	1,88 ± 0,417 (100 %)	2,616 ± 0,437 (100 %)	2,016 ± 0,52 (100 %)	2,15 ± 0,385 (100 %)
mraž. EtOH 5%	1,88 ± 0,417 (100 %)	2,774 ± 0,44 (100 %)	3,05 ± 0,671 (100 %)	2,006 ± 0,431 (100 %)
mraž. EtOH 10%	1,88 ± 0,417 (100 %)	3,698 ± 0,912 (100 %)	5,196 ± 1,347 (100 %)	5,59 ± 1,279 (100 %)
mraž. EtOH 15%	1,88 ± 0,417 (100 %)	4,568 ± 0,717 (100 %)	5,2 ± 1,961 (100 %)	5,062 ± 1,183 (100 %)
mraž. EtOH 20%	1,88 ± 0,417 (100 %)	6,436 ± 0,988 (100 %)	6,08 ± 1,303 (80 %)	5,73 ± 1,147 (80 %)
mraž. fyz. roztok	1,88 ± 0,417 (100 %)	2,36 ± 0,836 (100 %)	2,718 ± 0,494 (100 %)	2,444 ± 0,024 (100 %)
mraž. DMSO	1,88 ± 0,417 (100 %)	2,248 ± 0,384 (100 %)	1,442 ± 0,019 (100 %)	2,266 ± 0,388 (100 %)
paraformaldehyd 1%	2,614 ± 0,622 (100 %)	3,12 (20 %)	0 (0 %)	0 (0 %)



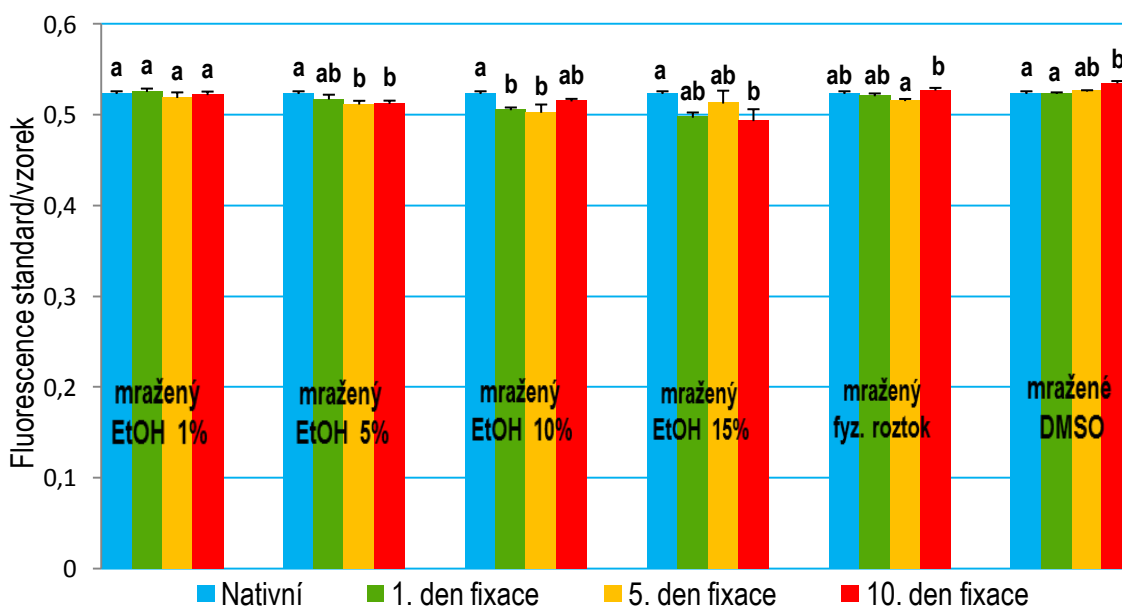
Graf č. 5: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera malého odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož

druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.

#### 4.3.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 7: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku jesetera malého odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,49 ± 0,004 (100 %)	0,512 ± 0,008 (100 %)	0,544 (20 %)
EtOH 5%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,498 ± 0,005 (100 %)	0,528 ± 0,019 (100 %)	0,52 ± 0,004 (60 %)
EtOH 10%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,507 ± 0,007 (100 %)	0,515 ± 0,005 (80 %)	0 (0 %)
EtOH 15%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,507 (20 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
EtOH 20%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,574 ± 0,039 (40 %)	0,569 ± 0,007 (40 %)	0 (0 %)
mraž. EtOH 1%	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,526 ± 0,004 (100 %)	0,519 ± 0,006 (100 %)	0,522 ± 0,004 (100 %)
mraž. EtOH 5%	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,517 ± 0,005 (100 %)	0,512 ± 0,004 (100 %)	0,513 ± 0,004 (100 %)
mraž. EtOH 10%	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,506 ± 0,003 (100 %)	0,503 ± 0,009 (100 %)	0,515 ± 0,003 (100 %)
mraž. EtOH 15%	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,497 ± 0,006 (100 %)	0,513 ± 0,014 (100 %)	0,494 ± 0,013 (100 %)
mraž. EtOH 20%	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,488 ± 0,008 (100 %)	0,474 ± 0,013 (80 %)	0,488 ± 0,011 (80 %)
mraž. fyz. roztok	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,521 ± 0,003 (100 %)	0,516 ± 0,002 (100 %)	0,527 ± 0,003 (100 %)
mraž. DMSO	0,524 ± 0,003 (100 %)	0,524 ± 0,001 (100 %)	0,526 ± 0,001 (100 %)	0,535 ± 0,003 (100 %)
paraformaldehyd 1%	0,514 ± 0,01 (100 %)	0,515 (20 %)	0 (0 %)	0 (0 %)



Graf č. 6: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku jesetera malého odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa.

#### 4.3.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ocasních tkání plůdku jesetera pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných vzorků ocasních tkání plůdku jesetera malého jsou součástí příloh (Příloha č. 8 a Příloha č. 9). Úspěšná analýza všech vzorků ocasních tkání jeseteřího plůdku vedoucí k získu průměrných CV nižších než 3 % po všechny stanovené časové úseky (1., 5., a 10. den) byla realizována za použití 3 fixačních metod založených na mražení: mražení v 1% etanolu, fyziologickém roztoku a DMSO.

$F_{st}/F_{fixovaných vz.}$  pro mražení vzorků v 1% etanolu a fyz. roztoku se od  $F_{st}/F_{nativních vz.}$  statisticky neodlišovaly.

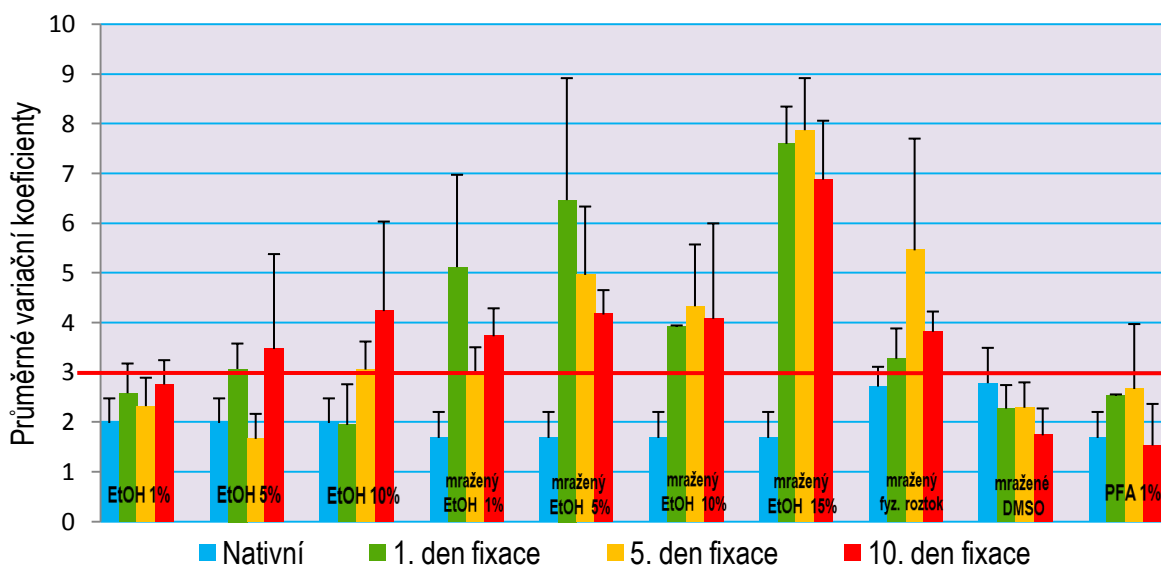
V případě mražení v DMSO byly  $F_{st}/F_{fixovaných vz.}$  odlišné od  $F_{st}/F_{nativních vz.}$  v jednom případě – při měření po desetidenním uchování. Zatímco  $F_{st}/F_{nativních vz.}$  odpovídal  $0,524 \pm 0,003$ ,  $F_{st}/F_{fixovaných vz.}$  činil po deseti dnech uchování  $0,535 \pm 0,003$ . Průměrná úroveň fluorescence fixovaných vzorků tedy byla o pouhých 2,06 % nižší než u nativních vzorků.

#### 4.4. Lín obecný – krev

##### 4.4.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 8: Průměrné CV získané analýzou nativních krevních vzorků línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 %, na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	1,984 ± 0,495 (100 %)	2,582 ± 0,598 (100 %)	2,322 ± 0,572 (100 %)	2,758 ± 0,489 (100 %)
EtOH 5%	1,984 ± 0,495 (100 %)	3,070 ± 0,511 (100 %)	1,664 ± 0,503 (100 %)	3,472 ± 1,909 (100 %)
EtOH 10%	1,984 ± 0,495 (100 %)	1,944 ± 0,819 (100 %)	3,058 ± 0,564 (100 %)	4,234 ± 1,801 (100 %)
EtOH 15%	1,984 ± 0,495 (100 %)	1,902 ± 0,023 (100 %)	3,27 ± 1,682 (100 %)	3,807 ± 1,263 (60 %)
EtOH 20%	1,984 ± 0,495 (100 %)	2,128 ± 0,932 (100 %)	4,250 ± 1,689 (80 %)	3 (20 %)
mraž. EtOH 1%	1,684 ± 0,522 (100 %)	5,118 ± 1,857 (100 %)	2,994 ± 0,513 (100 %)	3,728 ± 0,562 (100 %)
mraž. EtOH 5%	1,684 ± 0,522 (100 %)	6,466 ± 2,453 (100 %)	4,962 ± 1,375 (100 %)	4,166 ± 0,49 (100 %)
mraž. EtOH 10%	1,684 ± 0,522 (100 %)	3,914 ± 0,032 (100 %)	4,33 ± 1,244 (100 %)	4,08 ± 1,919 (100 %)
mraž. EtOH 15%	1,684 ± 0,522 (100 %)	7,598 ± 0,749 (100 %)	7,872 ± 1,048 (100 %)	6,878 ± 1,185 (100 %)
mraž. EtOH 20%	1,684 ± 0,522 (100 %)	4,488 ± 1,367 (100 %)	3,032 ± 0,525 (100 %)	2,978 ± 0,637 (80 %)
mraž. fyz. roztok	2,716 ± 0,398 (100 %)	3,276 ± 0,609 (100 %)	5,456 ± 2,247 (100 %)	3,818 ± 0,407 (100 %)
mraž. DMSO	2,784 ± 0,711 (100 %)	2,272 ± 0,475 (100 %)	2,290 ± 0,511 (100 %)	1,736 ± 0,54 (100 %)
paraformaldehyd 1%	1,684 ± 0,522 (100 %)	2,532 ± 0,026 (100 %)	2,668 ± 1,306 (100 %)	1,532 ± 0,835 (100 %)



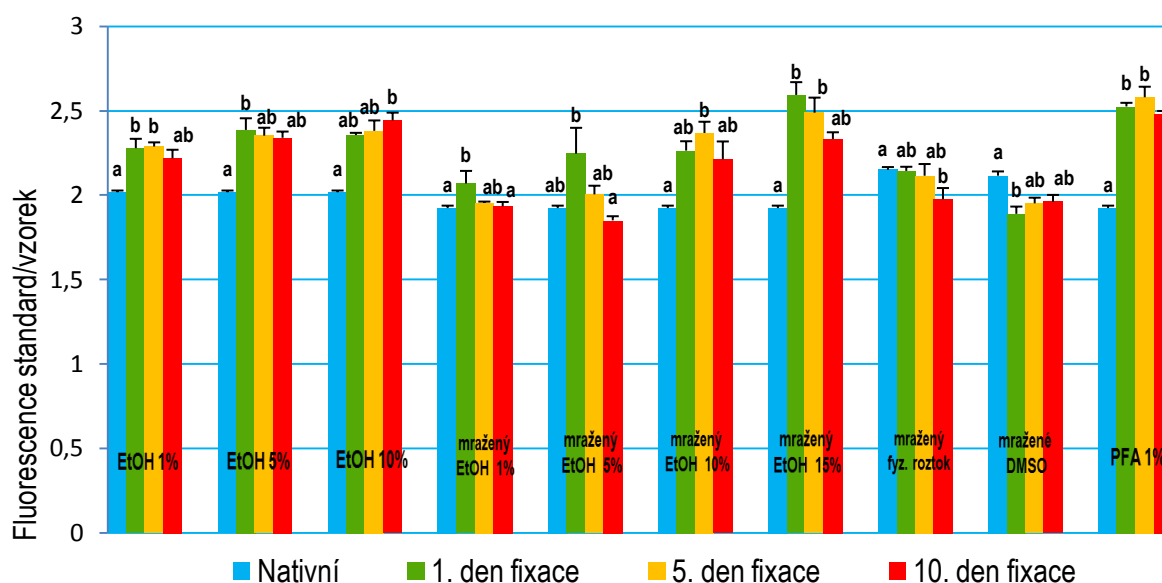
Graf č. 7: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních krevních vzorků línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.

#### 4.4.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků krve lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 9: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní krevní vzorky z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z těchto ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	2,016 ± 0,010 (100 %)	2,277 ± 0,056 (100 %)	2,288 ± 0,025 (100 %)	2,218 ± 0,050 (100 %)
EtOH 5%	2,016 ± 0,010 (100 %)	2,386 ± 0,069 (100 %)	2,352 ± 0,047 (100 %)	2,339 ± 0,037 (100 %)
EtOH 10%	2,016 ± 0,010 (100 %)	2,355 ± 0,014 (100 %)	2,380 ± 0,062 (100 %)	2,442 ± 0,046 (100 %)
EtOH 15%	2,016 ± 0,010 (100 %)	2,353 ± 0,037 (100 %)	2,354 ± 0,057 (100 %)	2,413 ± 0,023 (60 %)
EtOH 20%	2,016 ± 0,010 (100 %)	2,055 ± 0,069 (100 %)	2,247 ± 0,117 (80 %)	2,162 (20 %)
mraž. EtOH 1%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,069 ± 0,074 (100 %)	1,953 ± 0,008 (100 %)	1,934 ± 0,025 (100 %)
mraž. EtOH 5%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,245 ± 0,153 (100 %)	2,004 ± 0,051 (100 %)	1,850 ± 0,025 (100 %)
mraž. EtOH 10%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,263 ± 0,056 (100 %)	2,368 ± 0,067 (100 %)	2,212 ± 0,105 (100 %)
mraž. EtOH 15%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,593 ± 0,076 (100 %)	2,488 ± 0,089 (100 %)	2,332 ± 0,040 (100 %)

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
mraž. EtOH 20%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,113 ± 0,068 (100 %)	1,946 ± 0,057 (100 %)	1,961 ± 0,083 (80 %)
mraž. fyz. roztok	2,150 ± 0,016 (100 %)	2,143 ± 0,024 (100 %)	2,114 ± 0,069 (100 %)	1,976 ± 0,066 (100 %)
mraž. DMSO	2,115 ± 0,025 (100 %)	1,889 ± 0,043 (100 %)	1,951 ± 0,034 (100 %)	1,961 ± 0,04 (100 %)
paraformaldehyd 1%	1,923 ± 0,014 (100 %)	2,525 ± 0,022 (100 %)	2,579 ± 0,062 (100 %)	2,483 ± 0,015 (100 %)



Graf č. 8: Průměrné  $F_{st}/F_{vz}$  pro nativní krevní vzorky z línů obecných odebrané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z těchto ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa

#### 4.4.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků krve lína pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných krevních vzorků lína obecného jsou součástí příloh (Příloha č. 10 a Příloha č. 11). S použitím třech fixačních metod bylo možné změřit všechny vzorky a současně dosáhnout průměrných CV nižších než 3 % po všechny stanovené časové úseky analýzy (1, 5 a 10 dní). Byly jimi fixace 1% etanolem ve fyz. roztoku, mražení v přítomnosti kryoprotektantu a fixace 1% paraformaldehydem.

Z těchto metod byly  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  statisticky nejpodobnější  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  při použití mražení vzorků v kryoprotektantu – statistický rozdíl mezi uvedenými poměry byl zjištěn pouze, když byly vzorky analyzovány 1. den po zmrazení. Průměrný  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  činil  $2,115 \pm 0,025$ , v případě vzorků měřených 1. den po zmrazení  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  odpovídal  $1,889 \pm 0,043$ . Aby došlo k této změně, musela být tedy fluorescence fixovaných vzorků navýšena v průměru o 11,96 % oproti fluorescenci vzorků nativních.

Při použití 1% etanolu ve fyziologickém roztoku byly hodnoty  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  statisticky odlišné od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  když byla analýza provedena 1. a 5. den fixace. Průměrný  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  odpovídal  $2,016 \pm 0,010$ , průměrný  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  po 1 dni fixace  $2,277 \pm 0,056$  a stejný poměr po 5 dnech fixace  $2,288 \pm 0,025$ . Průměrná fluorescence samotných fixovaných vzorků musela být tudíž oproti fluorescenci nativních vzorků snížena o 11,46 % v prvním a 11,89 % v druhém případě.

Při použití 1% paraformaldehydu ve fyz. roztoku se poměry  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  statisticky lišily od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  když byla analýza provedena 1., 5. i 10. den fixace. Průměrný  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  odpovídal  $1,923 \pm 0,014$ , poměr  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  po 1 dni pak  $2,525 \pm 0,022$ , po 5 dnech  $2,579 \pm 0,062$  a po 10 dnech  $2,483 \pm 0,015$ . Aby mohlo dojít k takové změně v poměrech mezi fluorescencemi standardů a měřených vzorků, musela být průměrná fluorescence fixovaných vzorků oproti fluorescenci vzorků nativních snížena o 23,84 % v případě jednodenního, 25,44 % v případě pětidenního a 22,55 % v případě desetidenního uchování.

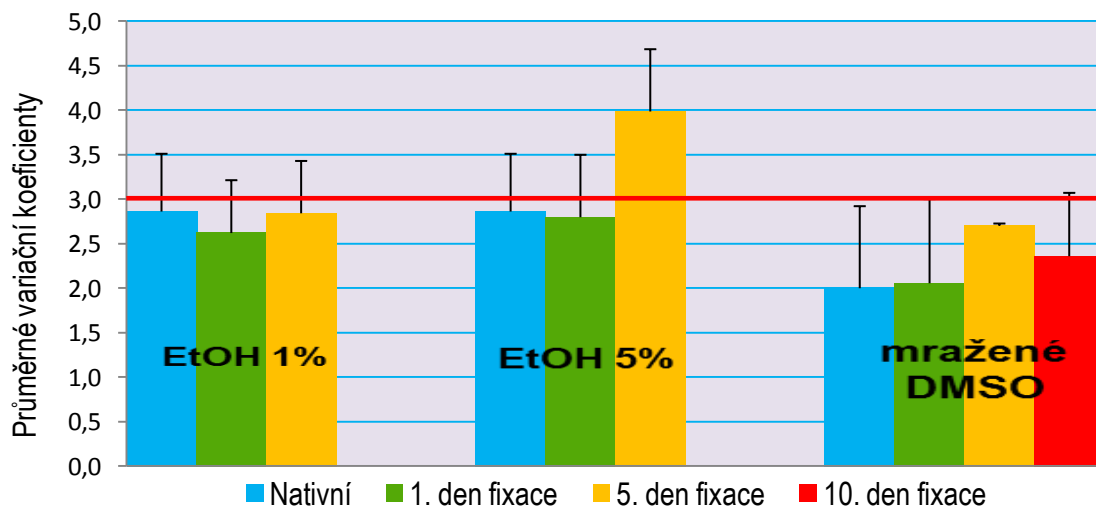
## 4.5. Lín obecný – ploutevní tkáň

### 4.5.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 10: Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ploutevních tkání línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznik detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	$2,864 \pm 0,649$ (100%)	$2,622 \pm 0,594$ (100%)	$2,844 \pm 0,588$ (100%)	$5,64 \pm 1,33$ (60%)
EtOH 5%	$2,864 \pm 0,649$ (100%)	$2,8 \pm 0,701$ (100%)	$3,988 \pm 0,7$ (100%)	$5,85$ (20%)

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 10%	2,312±0,029 (100%)	6,34 ± 2,342 (60%)	6,59 ± 1,147 (40%)	4,37 (20%)
EtOH 15%	2,312±0,029 (100%)	3,555 ± 1,125 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
EtOH 20%	2,312±0,029 (100%)	3,793 ± 0,822 (80%)	3,743 ± 0,959 (80%)	4,455 ± 0,025 (40%)
mraž. EtOH 1%	1,61 ± 0,882 (100%)	3,97 ± 0,721 (100%)	8,02 (20%)	6,625 ± 1,537 (80%)
mraž. EtOH 5%	1,61 ± 0,882 (100%)	5,034 ± 1,82 (100%)	3,54 ± 0,938 (80%)	0 (0%)
mraž. EtOH 10%	1,61 ± 0,882 (100%)	0 (0%)	4,518 ± 0,191 (100%)	5,69 ± 2,177 (100%)
mraž. EtOH 15%	1,61 ± 0,882 (100%)	6,775 ± 0,015 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
mraž. EtOH 20%	1,61 ± 0,882 (100%)	5,644 ± 1,585 (100%)	8,373 ± 1,02 (60%)	5,785 ± 2,281 (80%)
mraž. fyz. roztok	2,26 ± 0,582 (100%)	4,96 ± 2,746 (80%)	2,686 ± 0,826 (100%)	3,006 ± 1,072 (100%)
mraž. DMSO	2,002 ± 0,922 (100%)	2,058 ± 0,946 (100%)	2,702 ± 0,027 (100%)	2,362 ± 0,711 (100%)
paraformaldehyd 1%	2,002 ± 0,922 (100%)	4,580 (20%)	0 (0%)	0 (0%)



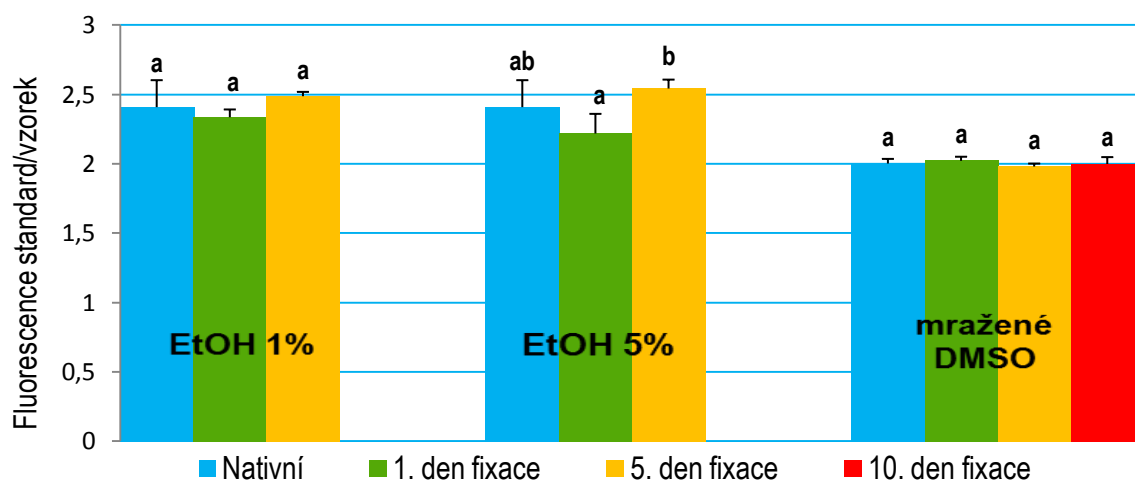
Graf č. 9: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházejících z těchto ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.



#### 4.5.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevní tkáně lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 11: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevních tkání z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pik s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	2,41 ± 0,194 (100%)	2,337 ± 0,056 (100%)	2,489 ± 0,031 (100%)	4,95 ± 2,468 (60%)
EtOH 5%	2,41 ± 0,194 (100%)	2,22 ± 0,142 (100%)	2,544 ± 0,064 (100%)	2,59 (20%)
EtOH 10%	2,344 ± 0,063 (100%)	2,664 ± 0,094 (60%)	2,524 ± 0,044 (40%)	2,625 (20%)
EtOH 15%	2,344 ± 0,063 (100%)	2,622 ± 0,111 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
EtOH 20%	2,344 ± 0,063 (100%)	2,529 ± 0,125 (80%)	2,573 ± 0,082 (80%)	2,545 ± 0,022 (40%)
mraž. EtOH 1%	1,972 ± 0,061 (100%)	2,003 ± 0,031 (100%)	2,159 (20%)	2,065 ± 0,067 (80%)
mraž. EtOH 5%	1,972 ± 0,061 (100%)	1,94 ± 0,024 (100%)	2,037 ± 0,082 (80%)	0 (0%)
mraž. EtOH 10%	1,972 ± 0,061 (100%)	0 (0%)	2,065 ± 0,081 (100%)	2,068 ± 0,064 (100%)
mraž. EtOH 15%	1,972 ± 0,061 (100%)	1,975 ± 0,009 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
mraž. EtOH 20%	1,972 ± 0,061 (100%)	1,993 ± 0,052 (100%)	2,097 ± 0,055 (60%)	1,982 ± 0,079 (80%)
mraž. fyz. roztok	2,016 ± 0,026 (100%)	2,001 ± 0,032 (80%)	1,99 ± 0,063 (100%)	2,014 ± 0,028 (100%)
mraž. DMSO	2,004 ± 0,033 (100%)	2,023 ± 0,03 (100%)	1,982 ± 0,021 (100%)	2 ± 0,05 (100%)
paraformaldehyd 1%	2,004 ± 0,033 (100%)	3,456 (20%)	0 (0%)	0 (0%)



Graf č. 10: Průměrné  $F_{st.}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevnických tkání z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevnických tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa.

#### 4.5.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ploutevnických tkání lína pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných vzorků ploutevnických tkání lína obecného jsou součástí příloh (Příloha č. 12 a Příloha č. 13). Při sumarizaci výsledků fixace tohoto typu vzorků bylo zjištěno, že metodou splňující podmínku měřitelnosti všech vzorků po 1, 5 a 10 dnech a zároveň vykazující průměrné CV nižší než 3 % bylo pouze mražení vzorků v přítomnosti kryoprotektantu. Jelikož se jednalo o jedinou metodu, byla do výše uvedeného hodnocení zahrnuta i fixativa, s jejichž použitím bylo možno analyzovat všechny vzorky pouze po 1 a 5 dnech.

Mražení ploutevnických vzorků v kryoprotektantu zároveň neovlivnilo v žádném z případů hodnoty  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  natolik, aby byly statisticky odlišné od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ .

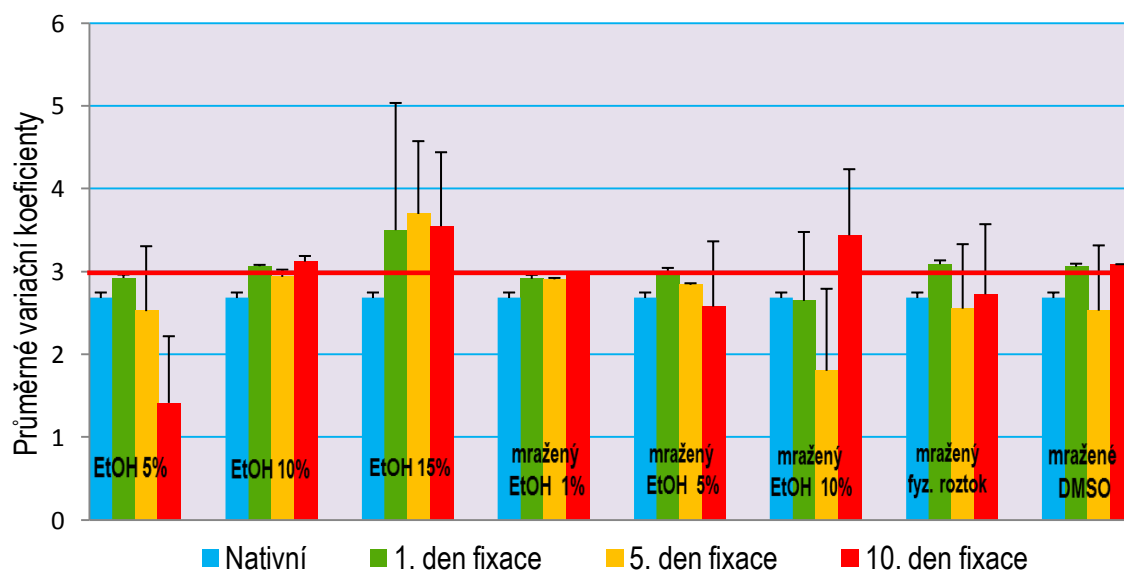
Při fixaci vzorků 1% etanolem ve fyz. roztoku sice nebylo možné vzorky 10. den fixace již analyzovat, 1. a 5. den fixace však byly vzorky měřitelné a vykazovaly průměrné hodnoty CV pod 3 %. Hodnoty  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  se pro 1. ani 5. den fixace statisticky nelišily od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ .

## 4.6. Lín obecný – ocasní tkáň plůdku

### 4.6.1. Hodnoty variačního koeficientu (CV) při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 12: Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl počtu vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pík s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,752 ± 0,065 (100 %)	2,152 ± 0,948 (100 %)	4,515 ± 1,631 (80 %)
EtOH 5%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,928 ± 0,042 (100 %)	2,528 ± 0,784 (100 %)	1,42 ± 0,805 (100 %)
EtOH 10%	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,07 ± 0,017 (100 %)	2,942 ± 0,087 (100 %)	3,126 ± 0,068 (100 %)
EtOH 15%	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,506 ± 1,536 (100 %)	3,702 ± 0,879 (100 %)	3,554 ± 0,893 (100 %)
EtOH 20%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,918 ± 1,753 (100 %)	6,745 ± 2,325 (40 %)	3,08 (20 %)
mraž. EtOH 1%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,918 ± 0,048 (100 %)	2,912 ± 0,017 (100%)	2,97 ± 0,019 (100 %)
mraž. EtOH 5%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,98 ± 0,07 (100%)	2,848 ± 0,017 (100 %)	2,584 ± 0,787 (100%)
mraž. EtOH 10%	2,686 ± 0,067 (100 %)	2,652 ± 0,832 (100%)	1,808 ± 0,99 (100%)	3,444 ± 0,798 (100 %)
mraž. EtOH 15%	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,968 ± 1,2 (100%)	2,568 ± 1,791 (80%)	3,734 ± 2,4 (100 %)
mraž. EtOH 20%	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,01 ± 0,04 (40 %)	3,97 ± 2,196 (60 %)	3,614 ± 1,174 (100 %)
mraž. fyz. roztok	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,094 ± 0,047 (100 %)	2,558 ± 0,779 (100 %)	2,732 ± 0,846 (100 %)
mraž. DMSO	2,686 ± 0,067 (100 %)	3,066 ± 0,035 (100 %)	2,534 ± 0,788 (100 %)	3,088 ± 0,007 (100 %)
paraformaldehyd 1%	2,686 ± 0,067 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)



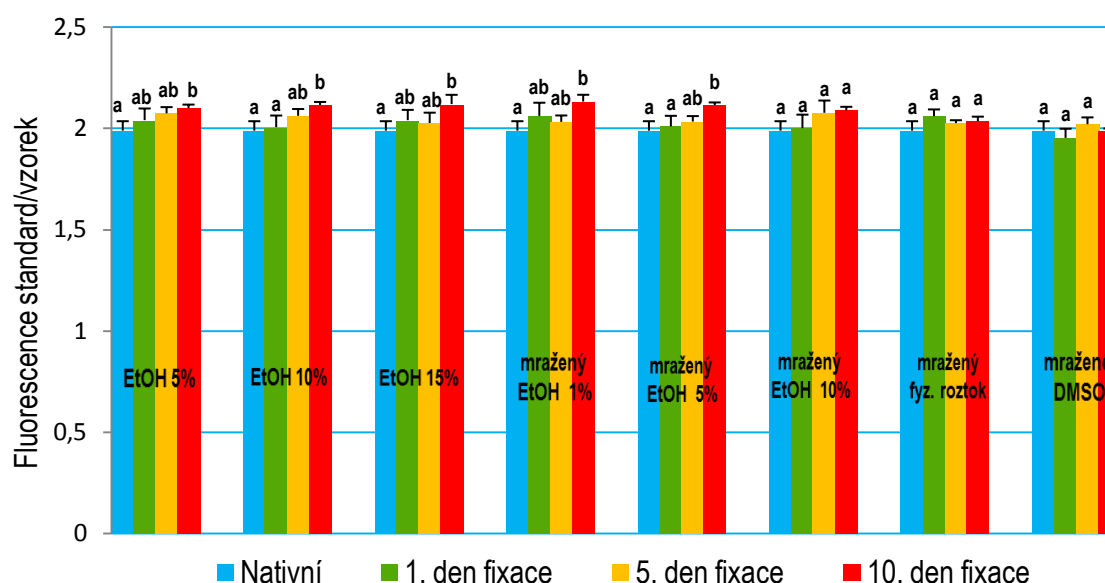
Graf č. 11: Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). 3% úroveň CV pro vyhodnocování účinnosti jednotlivých fixačních metod je zvýrazněna červeně.

#### 4.6.2. Fluorescence při měření relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína, a vzorků fixovaných uvedenými postupy

Tabulka č. 13: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku lína obecného odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Červené procentuální hodnoty v závorkách informují o tom, kolik procent vzorků bylo pro danou metodu a délku uchování možné analyzovat (podíl vzorků, jejichž analýzou na průtokovém cytometru vznikl detekovatelný pik s CV menším než 10 % na celkovém počtu měřených vzorků).

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
EtOH 1%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,051 ± 0,046 (100 %)	2,017 ± 0,047 (100 %)	2,10 ± 0,067 (80 %)
EtOH 5%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,039 ± 0,058 (100 %)	2,073 ± 0,031 (100 %)	2,098 ± 0,018 (100 %)
EtOH 10%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,004 ± 0,058 (100 %)	2,06 ± 0,033 (100 %)	2,114 ± 0,015 (100 %)
EtOH 15%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,039 ± 0,051 (100 %)	2,025 ± 0,051 (100 %)	2,118 ± 0,046 (100 %)
EtOH 20%	1,987 ± 0,047 (100 %)	1,98 ± 0,079 (100 %)	2,006 ± 0,058 (40 %)	2,012 (20 %)
mraž. EtOH 1%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,06 ± 0,065 (100 %)	2,03 ± 0,032 (100%)	2,131 ± 0,033 (100 %)
mraž. EtOH 5%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,008 ± 0,052 (100%)	2,032 ± 0,027 (100 %)	2,113 ± 0,013 (100%)
mraž. EtOH 10%	1,987 ± 0,047 (100 %)	1,999 ± 0,067 (100%)	2,075 ± 0,061 (100%)	2,088 ± 0,017 (100 %)

	Nativní	1. den fixace	5. den fixace	10. den fixace
mraž. EtOH 15%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,082 ± 0,15 (100%)	2,056 ± 0,073 (80%)	2,172 ± 0,113 (100 %)
mraž. EtOH 20%	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,017 ± 0,007 (40 %)	2,016 ± 0,034 (60 %)	2,026 ± 0,032 (100 %)
mraž. fyz. roztok	1,987 ± 0,047 (100 %)	2,058 ± 0,033 (100 %)	2,024 ± 0,014 (100 %)	2,033 ± 0,023 (100 %)
mraž. DMSO	1,987 ± 0,047 (100 %)	1,951 ± 0,045 (100 %)	2,019 ± 0,034 (100 %)	1,989 ± 0,009 (100 %)
paraformaldehyd 1%	1,987 ± 0,047 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)



Graf č. 12: Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku lína obecného odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). Statistické rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou vyznačeny indexy nad jednotlivými sloupci a byly hodnoceny vždy v rámci jednoho typu fixativa.

#### 4.6.3. Shrnutí výsledků fixace vzorků ocasních tkání plůdku lína pro měření relativního obsahu DNA

Příklady histogramů z cytometrické analýzy obsahu DNA fixovaných vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného jsou součástí příloh (Příloha č. 14 a Příloha č. 15). Úspěšně změřit všechny vzorky a současně dosáhnout průměrných CV nižších než 3 % po všechny stanovené časové úseky analýzy (1., 5., a 10. den) se podařilo za použití třech fixačních metod, kterými byly fixace 5% etanolem a mražení v 1% a 5% etanolu.

U všech třech metod bylo shodně zjištěno, že hodnoty  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  se v 1. a 5. dni statisticky nelišily od hodnot  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$ . Při použití všech třech metod byly však

$F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  statisticky odlišné od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  když byly vzorky analyzovány po desetidenním uchování ve fixativu. Průměrný  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  odpovídal  $1,987 \pm 0,047$ , průměrný  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  po desetidenním uchování pak  $2,098 \pm 0,018$  pro 5% etanol,  $2,131 \pm 0,033$  pro 1% mražený etanol a  $2,113 \pm 0,013$  pro 5% mražený etanol. Z toho vyplývá, že fluorescence fixovaných vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného byla ve srovnání s fluorescencí nativních vzorků po desetidenním uchování redukována v průměru o 5,29 % u 5% etanolu, 6,77 % u mraženého 1% etanolu a 5,96 % u mraženého 5% etanolu.

Za zmínku však stojí, že 2 metody překračovaly stanovenou úroveň průměrných CV (3 %) o méně než 0,1 %, umožňovaly analyzovat všechny vzorky a  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  se při jejich použití v žádném z případů statisticky nelišily od  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$ . Těmito metodami byly mražení ocasní tkáně plůdku lína obecného v samotném fyziologickém roztoku a v přítomnosti kryoprotektantu.

## 5. Diskuze

### 5.1. Zvolené typy vzorků

Zvolené fixační metody byly testovány na třech typech rybích vzorků: krvi, ploutevní tkáni a ocasní tkáni plůdku. Tyto typy vzorků jsou pro stanovování obsahu DNA rybích buněk pomocí průtokové cytometrie běžně využívány. Erytrocyty jsou pro daný účel využívány nejčastěji především pro jednoduchost jejich odběru a možnost realizace velmi přesných měření (Maxime, 2008; Filipiak a kol., 2012). Odběr ploutevních tkání je rovněž velmi snadno a rychle proveditelný a je velmi vhodný pro uplatnění v terénních podmínkách a to i u jedinců drobné velikosti, které by mohl odběr jiných typů tkání snadno zahubit (Lamatsch a kol., 2000). V případě analýzy tkání plůdku je naproti tomu jedince nutné usmrtit, je však velmi výhodná pro hodnocení experimentů, v nichž by mohl odchov plůdku do větších velikostí znamenat např. změny v procentuálním zastoupení jedinců různých ploidních úrovní a negativně tak ovlivnit objektivitu vyhodnocování pokusu (Ewing a kol., 1991; Havelka a kol., 2012).

Pro ilustraci referenčního („správného“) stavu bylo před měřením různými metodami fixovaných vzorků po 1, 5 a 10 dnech uskutečněno i měření vzorků ve stavu nativním. Za tímto účelem byly odebírány do fyziologického roztoku stejně jako v pracích Thorgaarda (1982) nebo Morgana a kol. (1993) a co možná nejrychleji analyzovány. Pokud by byla analýza za účelem zjištění referenčního stavu uskutečněna byť krátce po aplikaci fixační procedury, mohly by být výstupy cytometrické analýzy již zkresleny, jelikož fixace už ze své podstaty mění původní chemické a fyzikální složení buněk či tkání (Nowacek a Kiernan, 2010) a může vést ke vzniku artefaktů a shlukování, ztrátě nebo lýze buněk. Analýza nativních vzorků je naproti tomu nejlepším způsobem, jak se daným komplikacím vyhnout, což je pádným důvodem pro to, aby byla, pokud je možno vzorky měřit krátce po jejich odběru, upřednostňována (Rousselle a kol., 1998).

### 5.2. Volba standardu

Při kvantifikaci obsahu DNA průtokovou cytometrií (ať už je obsah DNA stanovován absolutně za účelem zjištění velikosti genomu, nebo relativně pro determinaci ploidie) je nezbytné použití standardu. Stanovení poměru intenzity fluorescence zkoumaného materiálu a známého standardu totiž umožňuje usuzovat na vlastnosti neznámého vzorku. Suda (2005) uvádí, že se v současnosti doporučuje

používat tzv. interní standardizaci, při níž je ze standardu a analyzovaného materiálu vytvářen směsný vzorek, který je následně homogenizován, barven a měřen. Tento postup je z důvodu přesnosti následně prováděné analýzy mnohem vhodnější než tzv. externí standardizace, která se nezdá objevovat ve starších studiích. Při té byly totiž neznámý vzorek a standard připraveny a měřeny nezávisle a porovnávání zjištěných intenzit fluorescence probíhalo až následně, což mohlo znamenat chyby při interpretaci výsledků např. v důsledku přístrojové odchylky mezi oběma analýzami (Suda, 2005). V průběhu času totiž může docházet ke změně intenzit fluorescencí změřených přístrojem, ačkoliv se ve skutečnosti měnit vůbec nemusí (Alvarez, 2010). Z těchto důvodů nebyla v práci prováděna nezávislá oddělená měření standardu a zkoumaných vzorků, nýbrž simultánní analýzy směsných vzorků.

V jednoparametrových histogramech bývají intenzity fluorescencí měřených vzorků vyjádřeny polohami píků na ose x (Roubalová, 2012). Jelikož je při simultánní analýze standardu a zkoumaného vzorku žádoucí získat dvě odlišitelné píky, je nezbytné zvolit standard, který má odlišný obsah DNA než předpokládaný měřený vzorek (Tiersch a kol., 1989a). Pro všechny typy vzorků pocházející z lína obecného byly jako standard zvoleny fixované erythrocyty ze pstruha duhového. Obsah jaderné DNA odpovídá u diploidních erythrocytů pstruha duhového  $5,50 \text{ pgDNA} \times \text{jádro}^{-1}$  (Tiersch a kol., 1989a), v případě diploidních erythrocytů lína pak  $2,04 \text{ pgDNA} \times \text{jádro}^{-1}$  (Bytyutskyy a kol., 2014). Ohledně obsahu jaderné DNA buněk pocházejících z ploutevní tkáně nebo ocasní tkáně plůdku lína obecného však není v dostupné literatuře dostatek informací. Jelikož se mohou obsahy jaderné DNA v různých typech tkání pocházejících ze stejného živočišného druhu lišit, jak demonstruje například studie Filipiak a kol. (2012), bylo před realizací pokusu nejprve experimentálně potvrzeno, že analýzou směsného vzorku fixovaných pstružích erythrocytů s nativními buňkami z různých typů tkání lína obecného vznikají dva detekovatelné a snadno odlišitelné píky.

Obdobně bylo postupováno při volbě standardu pro různé typy vzorků pocházející z jesetera malého, jehož diploidní erythrocyty (paleo  $4n$ ) obsahují přibližně  $3,74 \text{ pgDNA} \times \text{jádro}^{-1}$  (Bytyutskyy a kol., 2014). Na základě provedených měření bylo potvrzeno, že je jako standard pro všechny typy vzorků z jesetera malého možné použít nativní buňky pocházející z ploutevní tkáně lína obecného, kterou bylo možno



opakovaně odebírat ze stejných jedinců, aniž by odběr způsobil jejich úhyn popř. změny v pohybových schopnostech, přesně jak uvádí Lamatsch a kol. (2000).

### **5.3. Volba fixačních metod**

Ačkoliv byla v minulých letech navržena celá řada protokolů pro fixaci rybích buněk k následné analýze obsahu DNA průtokovou cytometrií (Allen, 1983; Vindelov a kol., 1983b; Gold a kol., 1991; Lecommandeur a kol., 1994; Brown a kol., 2000; Lamatsch a kol., 2000; Xavier a kol., 2017), většina z nich se vyznačuje vysokou časovou náročností na přípravu vzorků, potřebou speciálního vybavení a dalšími vlastnostmi, které komplikují nebo znemožňují jejich využití v terénních nebo provozních podmínkách. Navíc byly často navrhovány pro jediný typ vzorků (např. pouze pro ploutevní tkáň – Lamatsch a kol., 2000; Xavier a kol., 2017) a tak lze jejich efektivitu v případě použití na jiné typy vzorků jen těžko odhadovat. Z těchto důvodů bylo v práci fixováno hned několik běžně používaných typů vzorků z ryb a při volbě fixačních metod byl kladen zvýšený důraz na jejich snadnou proveditelnost v praxi, například při výjezdu k chovateli nebo v terénu, bez možnosti okamžitého přístupu do laboratoře. Vkládání vzorků do lednice lze např. v terénních nebo provozních podmínkách nahradit jejich umístěním na led, mražení ve speciálním mrazáku na teploty okolo  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zase použitím suchého ledu, jehož teplota je velmi podobná, neboť k přechodu  $\text{CO}_2$  z plynné do pevné fáze dochází za atmosferického tlaku při  $-78,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Häring, 2008). Dále byla při výběru fixačních metod brána v potaz jejich časová náročnost. Některé protokoly pro fixaci rybích vzorků za účelem měření obsahu DNA průtokovou cytometrií obsahují centrifugační kroky k odstraňování fixativa z jemu exponovaných buněk a tkání (Allen, 1983; Gold a kol., 1991; Brown a kol., 2000; Lamatsch a kol., 2000). Fixační metody použité v práci tyto kroky z důvodu minimalizace času potřebného na přípravu vzorků neobsahují.

### **5.4. Hodnocené parametry**

Efektivita testovaných fixačních metod byla hodnocena na základě naměřených hodnot CV a intenzit fluorescencí, tedy běžných parametrů zjišťovaných při analýze obsahu DNA průtokovou cytometrií (Ormerod, 2000).

Suda (2005) uvádí, že by pro kritické analýzy měly být preferovány CV nepřesahující 3% hranici. Shapiro (2003) rovněž udává, že by při analýzách DNA

průtokovou cytometrií CV neměly přesahovat 3 %. Proto byla pro vyhodnocování přesnosti prováděných analýz zvolena 3% úroveň CV, která nesměla být při výběru optimálních fixačních metod pro daný typ vzorku pocházející z konkrétního rybího druhu překročena, ať už bylo měření prováděno 1., 5. nebo 10. den fixace.

Výstupem cytometrické analýzy je obvykle histogram relativní intenzity fluorescence, reprezentující relativní obsah DNA. Na základě poměru naměřených intenzit fluorescencí zkoumaného objektu a známého standardu zobrazovaných formou píků lze odhadovat vlastnosti zkoumaného objektu. Jelikož může v průběhu uskutečňování analýz docházet k náhodným posunům píků a tudíž i změnám v hodnotách naměřených fluorescencí i při nezměněném nastavení přístroje (Doležel a Bartoš, 2005), byly pro porovnávání výsledků analýz nativních a fixovaných vzorků s jejich příslušnými standardy v této práci namísto absolutních hodnot naměřených fluorescencí použity poměry  $F_{st.}/F_{vz.}$ .

## **5.5. Zhodnocení efektivity fixace**

### **5.5.1. Fixace různými koncentracemi etanolu ve fyz. roztoku**

V případech, kdy je měření průtokovou cytometrií prováděno výhradně za účelem analýzy obsahu DNA fixovaných buněk, bývají buňky obecně nejčastěji fixovány pomocí etanolu. Spolu s dalšími koagulujícími fixativy totiž etanol dobře stabilizuje nepoškozenou DNA (Darzynkiewicz a Juan, 1997) a zároveň závažně neovlivňuje vázání fluorochromů na DNA (Roussele a kol., 1998). Etanolovou fixací rybích vzorků pro následnou analýzu obsahu DNA úspěšně realizovali Lamatsch a kol. (2000), kteří fixovali ploutevní tkáň 14 různých rybích druhů. Neuspěli s ní však Xavier a kol. (2017) při použití na ploutevní tkáň tetry saopaulské, ani Lecommandeur a kol. (1994) u embryí pstruha duhového a pstruha obecného.

V této práci byla fixace etanolem v několika případech úspěšná. U vzorků z jesetera nebyla průměrná 3% hranice CV překročena 1., 5., ani 10. den, když byly krevní vzorky fixovány 15% etanolem. V případě lína byly průměrné CV nižší než 3 % 1., 5. i 10. den analýzy krevních vzorků fixovaných 1% etanolem a vzorků ocasní tkáň plůdku fixovaných etanolem 5%, 1. a 5. den fixace průměrné CV splňovaly limit i při analýze vzorků ploutevní tkáň umístěných do 1% etanolu.

Při 10denní fixaci krve jesetera malého 15% etanolem a 5denní fixaci ploutevní tkáň lína obecného 1% etanolem nebyly zároveň zjištěny žádné statisticky významné

rozdíly mezi  $F_{st.}/F_{vz. \text{ nativních}}$  a  $F_{st.}/F_{vz. \text{ fixovaných}}$ , na základě čehož lze tyto postupy doporučit. To bohužel neplatilo u 10 denní fixace krevních vzorků lína 1% etanolem ani vzorků ocasní tkáně plůdku lína etanolem 5%. Z naměřených hodnot bylo vypočítáno, že fixace v některých případech způsobila změny v průměrné fluorescenci vzorků, přičemž největší z nich dosahovaly 11,89 %. Na druhou stranu se však lze domnívat, že pokud by byla analýza vzorků s takto pozměněnou fluorescencí prováděna výhradně za účelem stanovení ploidie, nemusela by ještě vést k chybnému závěru, což lze demonstrovat na příkladu. Pokud by byla uskutečněna analýza 2n a 3n vzorků téhož rybího druhu, byla by hodnota naměřené fluorescence 3n vzorku přibližně 1,5× vyšší než hodnota fluorescence 2n vzorku (Harrell a kol., 1998). V případě analýzy 1n vzorku a 2n vzorku by měla průměrná fluorescence 1n odpovídat přibližně 0,5 fluorescence 2n (Lebeda a kol., 2013). Z těchto skutečností vyplývá, že se změnou ploidní úrovně vzorků o 1n se mění hodnota fluorescence o celých 50 % ve srovnání s fluorescencí 2n vzorku. Když by byl tedy v praxi měřen neznámý vzorek, jehož fluorescence by byla o pouhých 11,89 % vyšší nebo nižší než fluorescence známého 2n vzorku, byl by s největší pravděpodobností správně klasifikován jako 2n.

Jedním z hlavních rozdílů mezi metodami etanolové fixace použitými k prodloužení uchovatelnosti rybích buněk v této práci a jiných pracích (Lecommandeur a kol., 1994; Lamatsch a kol., 2000; Xavier a kol., 2017) byla koncentrace použitého fixativa. Nejvyšší použitá koncentrace etanolu v této práci byla 20 % a nejvyšší koncentrace, s níž bylo dosaženo dobrých výsledků 15 %, úspěšné byly v řadě případů však i podstatně nižší koncentrace. Xavier a kol. (2017) i Lecommandeur a kol. (1994) naproti tomu ve svých pracích uplatnili fixaci 70% etanolem, která se jevila jako neefektivní. Lamatsch a kol. (2000) sice se stejnou koncentrací uspěli, jimi navržený protokol je však relativně složitý a nelze opomenout, že jsou jeho součástí i dva 8minutové centrifugační kroky. Komplikovanější protokoly obsahující větší množství centrifugačních kroků byly úspěšně použity i pro buňky, které z ryb nepocházely, například při fixaci 50% (Holtfreter a Cohen, 1990) nebo 68% etanolem (Roussele a kol., 1998). Odstraňování přebytečného fixativa centrifugacími ale může znemožnit aplikaci těchto protokolů v terénu nebo z časových důvodů komplikovat rutinní zpracování většího množství vzorků, případně způsobovat problémy se shlukováním buněk, jak uvádí například Vindelov a kol. (1983a) nebo Burns a kol. (1986). Na základě výsledků předkládané práce bylo však dokázáno, že centrifugace

nemusí být nutnou součástí přípravy některých typů vzorků, pokud jsou pro fixaci použity nízké koncentrace etanolu. Tato skutečnost může přípravu vzorků značně ulehčit. Důležité je však samozřejmě připomenout, že vzorky byly v této práci měřeny nejdéle 10 dní po umístění do fixativa.

### **5.5.2. Fixace 1% paraformaldehydem ve fyz. roztoku**

Aldehydová fixativa jsou při fixaci buněk pro analýzu průtokovou cytometrií preferována, pokud je zapotřebí uchovat membránové antigeny (Rousselle a kol., 1998). Pokud je však cytometrická analýza zaměřena na obsah DNA, bývají aldehydová fixativa méně vhodná než alkoholová, především kvůli svému negativnímu vlivu na stechiometrii barvení DNA (Darzynkiewicz a kol., 2011). Se změnami fluorescence v důsledku aldehydové fixace se při analýzách DNA rybích buněk setkali např. Burns a kol. (1986) nebo Brown a kol. (2000). V obou těchto pracích bylo jako fluorescenční barvivo použito PI, a jak uvádí Rousselle a kol. (1998), aldehydy prokazatelně snižují intenzitu fluorescence komplexu tohoto barviva s DNA.

V této práci byla však značná redukce fluorescence u paraformaldehydem fixovaných vzorků zjištěna, i když nebylo jako barvivo použito PI, ale DAPI. Ačkoliv Darzynkiewicz a kol. (1984) uvádí, že je stechiometrie barvení DNA pomocí DAPI ve srovnání s ostatními fluorochromy nejméně ovlivňována aldehydy indukovanými příčnými vazbami, byla průměrná fluorescence zjištěná analýzou krevních vzorků lina v některých případech snížena až o 25,44 %. Tato změna by při cytometrické analýze obsahu DNA mohla vést k chybným závěrům nejen při stanovování velikosti genomu, ale i při určování ploidie, proto nelze použitý postup pro fixaci vzorků krve lina doporučit, ačkoliv bylo při jeho testování dosaženo přijatelných CV. Použitý postup nebyl vhodný ani pro jiné typy rybích vzorků, jelikož při jejich analýze často vznikaly histogramy s velkým množstvím buněčného šumu a nerozlišitelnými píky. K obdobným závěrům dospěli při aldehydové fixaci (10% formalinem) vzorků ploutevní tkáně a jader z buněk ploutevní tkáně i Xavier a kol. (2017) u tetry saopaulské, kteří použili jako fluorescenční barvivo rovněž DAPI a v případě jader navíc uplatnili i centrifugační krok k odstranění fixativa před uskutečněním analýzy.

Lecommandeur a kol. (1994) naproti tomu úspěšně fixovali embrya pstruha duhového a pstruha potočního a jimi použitá fixační metoda se nelišila od metody testované v této práci (odběr do 1% paraformaldehydu ve fyz. roztoku bez následného

odstraňování fixativa z tkáně) a shodný byl i použitý fluorochrom – DAPI. Autoři však neuvádí celou řadu neopomenutelných skutečností, včetně počtu testovaných vzorků, doby uchování ve fixativu atd. Jiná práce, v níž byla úspěšně použita aldehydová fixace (1% formalin) pro prodloužení uchovatelnosti rybích vzorků (krevní vzorky pocházející z lososů obecných a hybridů amura bílého s tolstolobikem bílým) za účelem cytometrické analýzy obsahu DNA, byla publikována Allenem (1983). Příprava vzorků podle Allena je však relativně náročná, zahrnuje pět centrifugačních kroků a není vhodná do terénních podmínek. Z uvedených důvodů nebyla v této práci testována.

### **5.5.3. Mražení bez kryoprotektantu**

Mražení bez kryoprotektantu bylo doposud za účelem prodloužení uchovatelnosti vzorků pro analýzu obsahu DNA průtokovou cytometrií použito jen velmi ojediněle, nejspíš protože při něm v důsledku tvorby ledových krystalů hrozí buňkám mechanické poškození a rovněž poškození v důsledku chemických a osmotických změn (Wowk, 2007). Navzdory této skutečnosti však Xavier a kol. (2017) úspěšně optimalizovali protokol pro dlouhodobé uchování vzorků ploutevní tkáně tetry saopaulské, které byly jednoduše umístěny do fyz. roztoku a zmrazeny na -20 °C, přičemž rozmrazování a příprava na cytometrickou analýzu proběhly až po 30 nebo 60 dnech. Výsledkem měření byly v tomto případě zcela minimální změny v úrovních fluorescence ve srovnání s nativními vzorky, které v průměru odpovídaly 1 – 2 %, a získání histogramů nekontaminovaných buněčným šumem. Jelikož není v současné době k dispozici žádná jiná studie, v níž by byly vzorky pocházející z ryb mraženy bez přidání kryoprotektantu pro analýzu DNA průtokovou cytometrií, tedy ani práce, která by potvrdila, že tento postup není efektivní, bylo v této práci přistoupeno k testování hned několika takových fixačních metod. Vzorky byly na rozdíl od postupu Xaviera a kol. (2017) mraženy nejen ve fyz. roztoku, ale i v etanolu o různých koncentracích (1, 5, 10, 15 a 20 %).

Mražení bez kryoprotektantu nebylo shledáno jako ideální postup pro fixaci vzorků krve ani ploutevních tkání. V některých případech se však ukázalo jako efektivní metoda fixace ocasní tkáně plůdku, a to dokonce pro oba testované rybí druhy. Plůdek jesetera se osvědčilo mrazit v 1% etanolu i samotném fyz. roztoku, kdy byla splněna všechna stanovená kritéria ohledně měřitelnosti, CV i fluorescence. Pro fixaci ocasní tkáně plůdku lína obecného se dobře osvědčilo mražení v 1% a 5% etanolu. S jeho použitím byly všechny vzorky měřitelné a v průměru dosahovaly 1., 5., i 10. den hodnot

CV pod stanovenou hranicí 3 %. Dle statistického vyhodnocení se  $F_{st.}/F_{nativních\ vz.}$  od  $F_{st.}/F_{fixovaných\ vz.}$  lišily pouze 10. den analýzy, kdy byly fluorescence fixovaných vzorků oproti nativním v průměru redukovány o 6,77 % a 5,96 %.

Metoda fixace navržená Xavierem a kol (2017) se od metod použitých v této práci lišila mimo jiné teplotou, na kterou byly vzorky mrazeny. V této práci bylo mražení a uchování vzorků realizováno v mrazáku při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , neboť je tento postup možné v terénních podmínkách simulovat za použití suchého ledu. S použitím suchého ledu v terénu odpadá nutnost vzorky okamžitě po odběru transportovat do laboratoře, kde Xavier a kol. (2017) mražení uskutečňovali.

Ačkoliv byla nejdelší doba uchování fixovaných vzorků v této práci 10 dní, lze odhadovat, že vzorky bude možné díky použití nízké teploty analyzovat i po delším časovém úseku bez výrazných změn ve výstupech cytometrické analýzy, obdobně jako v případě práce Xaviera a kol. (2017). Obecně totiž k nejvýznamnějšímu poškození biologického materiálu dochází během jeho zmrazování a rozmrazování (Livesey a kol., 1994). Z téhož důvodu se nedoporučuje jednou rozmrazené vzorky opětovně mrazit (Murphy a kol., 1997), na což bylo dbáno i při návrhu experimentu v této práci.

#### **5.5.4. Mražení s kryoprotektantem**

Na rozdíl od výše uvedené metody je mražení v přítomnosti kryoprotektantu pro prodloužení uchovatelnosti vzorků za účelem jejich DNA analýzy na průtokovém cytometru zcela běžně využíváno a to i pro vzorky pocházející z ryb (Jakobsen, 1983; Vindelov a kol., 1983b; Tiersch a kol., 1989a,b; Gold a kol., 1991; Pierrez a Ronot, 1991; Lingenfelter a kol., 1997a,b; Dawley a kol., 2014). Zásadní byla v tomto ohledu práce Vindelova a kol. (1983a), již představili jednoduchý protokol neobsahující žádné centrifugační kroky, který bylo dle zkušeností autorů údajně možné použít pro buněčné suspenze i vzorky pevných tkání. V případě vzorků pocházejících z ryb byl však doposud využíván výhradně k prodloužení uchovatelnosti krve (Burns a kol., 1986; Tiersch a kol., 1989a,b; Dawley a kol., 1997; Lingenfelter a kol., 1997a,b; Tiersch a Chandler, 2011). Na základě uvedených skutečností byla procedura vybrána pro testování v této práci, aby bylo zjištěno, zda je vhodná i pro prodloužení uchovatelnosti rybích vzorků pevných tkání a zda je pro krevní vzorky efektivní natolik, jak je autory zmíněných prací deklarováno.

Všechny vzorky, které byly připraveny podle protokolu Vindelova a kol. (1983a), bylo možné analyzovat. Jedinými typy vzorků, u nichž CV překročily 3 % hranici, byly ploutevní tkáň jesetera, kde nejvyšší průměrné CV odpovídaly 3,504 %, a ocasní tkáň plůdku lína, kde byly nejvyšší průměrné CV 3,088 %. U krevních vzorků jesetera byl  $F_{st}/F_{vz}$  statisticky významně ovlivněn ve dvou případech, u krve lína v jednom a největší změna v průměrné fluorescenci, kterou mražení v kryoprotektantu indukovalo, bylo navýšení její úrovně o 11,96 % oproti nativním vzorkům (krev lína, analýza 1. den po zmrazení). Pro ploutevní tkáň jesetera i lína se jednalo o nejlepší použitou metodu, která zároveň neovlivnila  $F_{st}/F_{vz}$  na úrovni statistické významnosti. Ke statisticky významným změnám fluorescence nedošlo ani při měření ocasní tkáně plůdku lína. U plůdku jesetera se  $F_{st}/F_{nativních\ vz.}$  od  $F_{st}/F_{fixovaných\ vz.}$  významně lišil v jediném případě, kdy průměrná fluorescence mražených vzorků poklesla o pouhých 2,06 % oproti vzorkům nativním.

Na základě uvedených skutečností lze konstatovat, že pro prodloužení uchovatelnosti vzorků za účelem cytometrické analýzy DNA je použití protokolu Vindelova a spoluautorů skutečně efektivním, robustním a univerzálním přístupem, jehož aplikace neznemožnila v této práci analýzu ani u jediného z 90 vzorků, na které byl uplatněn. Na druhou stranu je však nutné dodat, že pro některé typy vzorků se v této práci více osvědčily jiné testované metody.

Jako paradoxní se může jevit fakt, že byly při testování protokolu v této práci největší změny v úrovních fluorescence zjištěny právě při analýze krevních vzorků, pro které bývá aplikace protokolu u ryb vůbec nejčastější (Burns a kol., 1986; Tiersch a kol., 1989a,b; Dawley a kol., 1997; Lingensfelser a kol., 1997a,b; Tiersch a Chandler, 2011). Pokud vede prodlužování uchovatelnosti krevních vzorků podle Vindelova a spoluautorů ke změnám v jejich fluorescenci, mohlo zároveň dojít k drobným chybám ve vyhodnocování absolutního obsahu DNA v pracích, kde byl daný protokol uplatněn k přípravě interního standardu – např. krve sumečka tečkovaného *Ictalurus punctatus* ve studii Tiersche a kol. (1989a). Pokud by však byla analýza průtokovou cytometrií zaměřena jen na stanovení ploidie, zaznamenané změny v úrovních fluorescence by její vyhodnocení neměly ovlivnit z důvodů diskutovaných u fixace etanolem.

## 6. Závěr

Cílem této práce je zhodnotit možnost využití různých biologických fixativ k prodloužení uchovatelnosti vzorků rybích buněk a tkání pro pozdější měření obsahu DNA průtokovou cytometrií. Na základě výsledků cytometrických analýz, které byly prováděny 1., 5. a 10. den po fixaci vzorků, jsou s přihlédnutím k naměřeným variačním koeficientům a úrovním fluorescence navrženy postupy pro fixaci krve, ploutevní tkáně a ocasní tkáně plůdku jesetera malého a lína obecného, které je možné uplatnit v terénních a provozních podmínkách.

Pro fixaci krevních vzorků jesetera malého se nejvíce osvědčilo použití 15% etanolu, se kterým byly získány průměrné variační koeficienty nižší než 3 % a intenzita fluorescence nebyla použitou metodou ovlivněna na úrovni statistické významnosti.

Při prodlužování uchovatelnosti vzorků ploutevní tkáně jesetera malého bylo nejlepších výsledků dosaženo za použití mražení na suchém ledu v 5% DMSO, kdy byly průměrné CV při analýze 1. a 10. den vyšší než 3 %, nejvíce však o pouhých 0,504 %, a fluorescence vzorků nebyla ovlivněna na statisticky významné úrovni.

V případě fixace vzorků ocasní tkáně plůdku jesetera malého se jako nejefektivnější jeví postupy založené na mražení v 1% etanolu a fyz. roztoku při -80 °C. Použití těchto metod vedlo k zisku průměrných CV nižších než 3 % a zároveň významně neovlivnilo fluorescenci vzorků.

Pro prodloužení uchovatelnosti vzorků krve lína obecného se nejlépe osvědčilo mražení na suchém ledu v 5% DMSO, které vedlo k zisku průměrných CV do 3 % a ke statisticky významným změnám v úrovních naměřené fluorescence pouze 1. den po fixaci, kdy způsobilo její navýšení v průměru o 11,96 % ve srovnání s nativním stavem.

S použitím stejné metody byla úspěšně prodloužena i uchovatelnost vzorků ploutevní tkáně lína obecného. V tomto případě CV nepřesahovaly 3% hranici a nebyl zjištěn ani statisticky významný rozdíl v úrovních naměřené fluorescence ve srovnání s nativními vzorky.

Fixace ocasní tkáně plůdku lína obecného byla nejúspěšněji realizována s použitím 5% etanolu, kdy naměřené variační koeficienty nepřesahovaly 3 % a statisticky významný rozdíl v intenzitě fluorescence byl zjištěn pouze, když byla analýza prováděna 10. den po odběru vzorků. Tehdy byla průměrná fluorescence redukována v průměru o 5,29 % ve srovnání s průměrnou fluorescencí nativních vzorků.



V případě metod založených na mražení byly vzorky uchovávány ve speciálním mrazáku udržujícím teplotu okolo  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u ostatních metod byly umístovány do lednice. Uvedený způsob mražení lze nahradit použitím suchého ledu, vkládání vzorků do lednice zase jejich umístěním na led. Všechny navržené fixační metody jsou jednoduše a rychle proveditelné bez nutnosti odstraňování fixativ z jim exponovaných buněk nebo tkání. Na základě těchto skutečností lze nyní pro běžné typy vzorků z lína obecného nebo jesetera malého zvolit fixační metodu uplatnitelnou v celé řadě situací, kdy není možné odebrat materiál z různých důvodů okamžitě transportovat do laboratoře a podrobit analýze obsahu DNA na průtokovém cytometru v nativním stavu. Rovněž se lze domnívat, že metody použité pro vzorky z jesetera malého lze úspěšně využít i pro jiné druhy chrupavčitých ryb, a ty, jež byly uplatněny pro vzorky pocházející z lína obecného, zase pro další druhy ryb kostnatých. Ověření této hypotézy by mohlo být předmětem dalšího zkoumání.

## 7. Seznam použité literatury

- Achilles, J., Müller, S., Bley, T., Babel, W., 2004. Affinity of single *S. cerevisiae* cells to 2-NBDglucose under changing substrate concentrations. *Cytometry A* 61(1), 88–98.
- Allen, S.K., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquac. Int.* 33(1–4), 317–328.
- Alvarez, D.F., Helm, K., DeGregori, J., Roederer, M., Majka, S., 2009. Publishing flow cytometry data. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 298(2), L127–L130.
- Ashwood-Smith, M.J., 1987. Mechanisms of cryoprotectant action. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41, 395–406.
- Bacallao, R., Kiai, K., Jesaitis, L., 1995. Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy. In: Pawley, J.P. (Ed.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, Boston, pp. 311–325
- Baker, J.R., 1958. Principles of biological microtechnique; a study of fixation and dyeing. John Wiley & Sons, New York, 357 s.
- Baker, J.R., 1966. Cytological technice. 6th edn. Chapman & Hall, London, 149 s.
- Benfey, T. J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1682, 33.
- Benfey, T.J., Solar, I.I., De Jong, G., Donaldson, E.M., 1986. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115(6), 838–840.
- Bhattacharya, M.S., Prajapati, B.G., 2016. A Review on Cryoprotectant and its Modern Implication in Cryonics. *Asian J Pharm* 10(3), 154–159.
- Bickham, J.W., Hanks, B.G., Smolen, M.J., Lamb, T., Gibbons, J.W., 1988. Flow cytometric analysis of the effects of low-level radiation exposure on natural populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17(6), 837–841.
- Blecha, M., Flajšhans, M., Lebeda, I., Krišťan, J., Svačina, P., Polícar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. *Aquac. Int.* 462, 115–117.

- Bobik, K., Dunlap, J.R., and Burch-Smith, T.M., 2014. Tandem high-pressure freezing and quick freeze substitution of plant tissues for transmission electron microscopy. *J Vis Exp* e51844.
- Bostwick, D.G., Choi, C., 1994. Establishment of the formalin-free surgical pathology laboratory. Utility of an alcohol-based fixative. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118(3), 298–302.
- Bradbury, S., Evennett, P.J., 1996. Contrast techniques in light microscopy. 1st edn., Bios Scientific Publishers, Oxford, 136 s.
- Brown, B.L., Schultz, S.L., White, F.K., 2000. A convenient field method of tissue preservation for flow cytometric ploidy assessment of grass carp. *Trans. Am. Fish. Soc.* 129(6), 1354–1359.
- Bullen, A., Taylor, R.R., Kachar, B., Moores, C., Fleck, R.A., Forge, A., 2014. Inner ear tissue preservation by rapid freezing: improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods. *Hear Res.* 315, 49–60.
- Burns, E.R., Anson, J.F., Hinson, W.G., Pipkin, J.L., Kleve, M.G., Goetz, R.C., 1986. Effect of fixation with formalin on flow cytometric measurement of DNA in nucleated blood cells. *Aquac. Int.* 55(2), 149–155.
- Burry, R.W. 2010. Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research. Springer, New York, 223 s.
- Bytyutskyy, D., Kholodnyy, V., Flajšhans, M., 2014. 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish. *Cell Biol Int* 38(6), 708–715.
- Callis, J., Hoehn, H., 1976. Flow-fluorimetric diagnosis of euploid and aneuploid human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 28, 577–584.
- Carbonari, M., Mancaniello, D., Tedesco, T., Fiorilli, M., 2008. Flow acetone-staining technique: A highly efficient procedure for the simultaneous analysis of DNA content, cell morphology, and immunophenotype by flow cytometry. *Cytometry A* 73(2), 168–174.
- Carter, N.P., Ormerod, M.G., 2000. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod, M.G. (Ed.), *Flow cytometry: a practical approach*. 3rd edn., Oxford University Press, Oxford, pp. 1–22.

- Ciudad, J., Cid, E., Velasco, A., Lara, J.M., Aijón, J., Orfao, A., 2002. Flow cytometry measurement of the DNA contents of G0/G1 diploid cells from three different teleost fish species. *Cytometry A* 48(1), 20–25.
- Cogliano, V.J., Grosse, Y., Baan, R.A., Straif, K., Secretan, M.B., El Ghissassi, F., 2005. Meeting report: summary of IARC monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxy-2-propanol. *Environmental health perspectives*, 113(9), 1205–1208.
- Culling, C.F.A., Allison, R.T., Barr, W.T., 1985. *Cellular pathology techniques*. 4th edn., Butterwords, London, 650 s.
- Dallas, C.E., Evans, D.L., 1990. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* 345, 557–558.
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H.D., Zhao, H., 2010. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. In: Poon, R.Y.C. (Ed.), *Polyplodization and Cancer*. Springer, New York, pp. 137–147.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., 1997. DNA Content Measurement for DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis. In: Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Dean, P., Orfao, A., Rabinovitch, P., Stewart, C.C., Tanke, H., Wheelless, L., *Current protocols in cytometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 7.5.1–7.5.24
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Kapuscinski, J., Staiano-Coico, L., Melamed, M.R., 1984. Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry A* 5(4), 355–363.
- Dawley, R.M., Rupprecht, J.D., Schultz, R.J., 1997. Genome size of bisexual and unisexual *Poeciliopsis*. *J. Hered.* 88(3), 249–252.
- Dawson, I.M.P., 1973. Fixation: What should the pathologist do? In: Stoward, P.J, *Fixation in Histochemistry*. Springer, Boston, pp. 193–197.
- Del Campo, M.V.M., Strang, P., Stendahl, U., Stenkvis, B., 1989. DNA determination in endometrial carcinoma by flow and image cytometry. *Acta Oncol* 28(4), 607–609.
- Doležel, J., Bartoš, J., 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 95(1), 99–110.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2(9), 2233–2244.

- Dykstra, M., J., 1992. Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. In: Dykstra, M., J., Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. 1st edn., Springer US, New York, pp. 5–78.
- Dykstra, M.J., Reuss, L.E., 2003. Specimen Preparation for Electron Microscopy. In: Dykstra, M.J., Reuss, L.E. (Eds.), Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. 2nd edn., Springer US, New York, pp. 1–73.
- Elbers, P.F., Ververgaert, P.T., Demel, R., 1965. Tricomplex fixation of phospholipids. *J. Cell Biol.* 24(1), 23–30.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., Grizzle, W.E., 2001. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J. Histotechnol* 24(3), 173–190.
- Esteban, J.M., Sheibani, K., Owens, M., Joyce, J., Bailey, A., Battifora, H., 1991. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis: a need for strict internal DNA standards. *Am. J. Clin. Pathol.* 95(4), 460–466.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Tiss. Res.* 293(1), 133–141.
- Ewing, R.R., Scalet, C.G., Evenson, D.P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. *The Progressive Fish-Culturist* 53(3), 177–180.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D R., Angell, C.A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21(4), 407–426.
- Fijan, N., 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish Biol.* 60(4), 999–1014.
- Filipiak, M., Tylko, G., Kilarski, W., 2012. Flow cytometric determination of genome size in European sunbleak *Leucaspisus delineatus* (Heckel, 1843). *Fish Physiol. Biochem.* 38(2), 355–362.
- Fisher, S.K., Lingenfelter, J.T., Jagoe, C.H., Dallas, C.E., 1995. Evaluation of the effects of cryopreservation of isolated erythrocytes and leukocytes of largemouth bass by flow cytometry. *J. Fish Biol.* 46(3), 432–441.

- Flajšhans, M., 2006. Spontaneous and induced polyploidy in selected species of freshwater fish. Ph.D. dissertation. Universität zu Berlin. Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt.
- Flajšhans, M., 2008. Studie využití polyploidie v akvakultuře na modelovém druhu lína obecného, *Tinca tinca* L. Habilitační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 2013. Polyploidie a genomové manipulac u ryb. In: Flajšhans, M. (Ed.), Genetika a šlechtění ryb. 2. vyd., FROV JU Vodňany, pp. 151–195.
- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P., 1985. Formaldehyde fixation. J. Histochem. Cytochem. 33(8), 845–853.
- Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson, Paris, 1113 s. Wisse, E., Braet, F., Duimel, H., Vreuls, C., Koek, G., Damink, S.W.O., Frederik, P., 2010. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. World J Gastroentero. 16(23), 2851–2866.
- Ganjali, H., Ganjali, M., 2013. Fixation in tissue processing. Intl J Farm & Alli Sci 68, 686–689.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 78, 24 s.
- Gezer İnce, N. , Pazvant, G., Gürsel, F.E., Onar, V., Kahvecioglu, K.O., 2016. Effects of Different Fixative Solutions on Kidney Volume. Kafkas Univ Vet Fak Derg 22(6), 859–864.
- Givan, A.L., 2004. Flow cytometry: An introduction. In: Hawley, T.S., Hawley, R.G. (Eds.), Flow cytometry protocols. 2nd edn., Humana press, Totowa, pp. 1–32.
- Glauert, A.M., Lewis, P.R., 2014. Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. Princeton University Press, Princeton, 350 s.
- Glover, K. A., Bos, J. B., Urdal, K., Madhun, A. S., Sorvik, A. G. E., Unneland, L., Seliussen, B.B., Skaala, O., Skilbrei, O.T., Tang, Y., Wennevik, V., 2016. Genetic screening of farmed Atlantic salmon escapees demonstrates that triploid fish display reduced migration to freshwater. Biological invasions 18(5), 1287–1294.
- Gold, J.R., Ragland, C.J., Birkner, M.C., Garrett, G.P., 1991. Technical notes: A simple procedure for long-term storage and preparation of fish cells for DNA content analysis using flow cytometry. The Progressive Fish-Culturist 53(2), 108–110.

- Gold, J.R., Ragland, C.J., Birkner, M.C., Garrett, G.P., 1991. Technical Notes: A Simple Procedure for Long-Term Storage and Preparation of Fish Cells for DNA Content Analysis Using Flow Cytometry. *The Progressive Fish-Culturist* 53(2), 108–110.
- Gosden, R.G., 2014. General principles of cryopreservation. In: Rosenwaks, Z., Wassarman, P.M. (Eds.), *Human Fertility: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, pp. 261–268.
- Gregory, T.R., 2001. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells Mol. Dis.* 27(5), 830–843.
- Grizzle, W.E., Fredenburgh, J.L., Myers, R.B., 2008. Fixation of tissues. In: Bancroft, J.D., Gamble, M. (Eds.), *Theory and practice of histological techniques*. 6th edn., Churchill Livingstone, London, pp. 53–74.
- Hardie, D.C., Gregory, T.R., Hebert, P.D., 2002. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Histochem. Cytochem* 50(6), 735–749.
- Häring, H.W., 2008. *Industrial gases processing*. Wiley VCH, Weinheim, 310 s.
- Harrell, R.M., Van Heukelem, W., Kerby, J.H., 1998. A comparison of triploid induction validation techniques. *N Am J Aquac* 60(3), 221–226.
- Havelka, M., Hulák, M., Ráb, P., Rábová, M., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Rodina, M., Gela, D., Pšenička, M., Bytyutskyy, D., Flajšhans, M., 2014. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *BMC Genet.* 15, 5.
- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2012. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách. *Edice Metodik, FROV JU Vodňany*, č. 121, 21 s.
- Hayat, M. A., 1986. *Basic Techniques For Transmission Electron Microscopy*. Academic Press Inc., London, 410 s.
- Hayat, M.A., 1981. *Fixation for electron microscopy*. Academic Press, New York, 521 s.
- Hayat, M.A., 1986. *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Academic Press, California, 411 s.

- Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A., Musgrove, E.A., 1984. DNA flow cytometry of paraffin-embedded tissue. *Cytometry A* 5(6), 660–660.
- Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, CA., Musgrove, E.A., 1983. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 31(11), 1333–1335.
- Heiden, T., Wang, N., Tribukait, B., 1991. An improved Hedley method for preparation of paraffin-embedded tissues for flow cytometric analysis of ploidy and S-phase. *Cytometry A* 12(7), 614–621.
- Held, P., 2015. Sample Preparation for Fluorescence Microscopy: An Introduction [online]. BioTek Instruments, Inc., Winooski [cit.2018-4-21]. Dostupné na WWW: <[https://www.biotek.jp/assets/tech\\_resources/Cell%20Fixation%20White%20Paper.pdf](https://www.biotek.jp/assets/tech_resources/Cell%20Fixation%20White%20Paper.pdf)>.
- Herbert, D.J., Nishiyama, R.H., Bagwell, C.B., Munson, M.E., Hitchcox, S.A., Lovett, E.J., 1989. Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analysis by flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 91(5), 535–541.
- Holtfreter, H.B., Cohen, N., 1990. Fixation-Associated quantitative variations of DNA fluorescence observed in flow cytometric analysis of hemopoietic cells from adult diploid frogs. *Cytometry A* 11(6), 676–685.
- Hopwood, D., 1967. Some aspects of fixation with glutaraldehyde. *J. Anat.* 101(1), 83–92.
- Hopwood, D., 1969. Fixation of proteins by osmium tetroxide potassium dichromate and potassium permanganate. *Histochemie* 18(3), 250–260.
- Hopwood, D., 1985. Cell and tissue fixation, 1972–1982. *Histochem. J.* 17(4), 389–442.
- Houwen, B., 2002. Blood film preparation and staining procedures. *Clin. Lab. Med.* 22(1), 1–14.
- Howat, W.J., Wilson, B.A., 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70(1), 12–19.
- Hrušák, O., 2011. Průtoková cytometrie. In: Bartůňková, J., Paulík, M. (Eds.), *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd., Grada, Praha, pp. 60–66.
- Huang, B., Yeung, E., 2015. Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. In: Yeung, E., Stasolla, C., Sumner, M., Huang, B. (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols*. Springer, Cham, pp. 23–43.



- Huebinger, J., Han, H.M., Grabenbauer, M., 2016. Reversible Cryopreservation of Living Cells Using an Electron Microscopy Cryo-Fixation Method. *PLoS ONE* 11(10), PMID:27711254.
- Hutter, K.J., Eipel, H.E., 1978. DNA determination of yeast by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* 3(1), 35–38.
- Chandler, D.E., Sharp, W.P., 2014. Freeze Fracture and Freeze Etching. In: Kuo, J. (Ed.), *Electron microscopy: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp. 95–132.
- Chilmonczyk, S., Monge, D. 1999. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 9(4), 319–333.
- Choudhary, M., Soni, R., Swarankar, M.L., Garg, S., 2015. Comparison of vitrification and slow freezing for cryopreservation of cleavage stage embryos (day 3) and its impact on clinical outcome. *Int J Res Med Sci.* 3(10), 2751–2756.
- Inoue, T., Moritomo, T., Tamura, Y., Mamiya, S., Fujino, H., Nakanishi, T., 2002. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol.* 13(5), 379–390.
- Jakobsen, A., 1983. The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry. *Cytometry A* 4(2), 161-165.
- James, N., 1997. Electron microscopy of organelles. In: Graham, J.M., Rickwood, D. (Eds.), *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, pp. 303–328.
- Jenkins, J.A., Thomas, R.G., 2007. Use of eyeballs for establishing ploidy of Asian carp. *N Am J Fish Manag* 27(4), 1195–1202.
- Jenkins, L.L., Burg, K.J., 2003. Tissue harvesting and fixation. In: An, Y.H., Martin, K.L. (Eds.), *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Humana Press, Totowa, pp. 143–157.
- Kaern, J., Wetteland, J., Tropé, C.G., Farrants, G.W., Juhng, S.W., Pettersen, E.O., Danielsen, H.E., 1992. Comparison between flow cytometry and image cytometry in ploidy distribution assessments in gynecologic cancer. *Cytometry A* 13(3), 314–321.
- Katoh, K., 2016. Microwave-assisted tissue preparation for rapid fixation, decalcification, antigen retrieval, cryosectioning, and immunostaining. *Int J Cell Biol* 2016, 1–9.

- Khanna, G., 2017. Pathology for Dental Students. 2nd edn., Elsevier India, New Delhi, 450 s.
- Kiernan, J.A., 1999. Histological and histochemical methods: theory and practice. 3rd edn., Butterworth-Heinemann, Oxford, 502 s.
- Koss, L.G., Wersto, R.P., Simmons, D.A., Deitch, D., Herz, F., Freed, S.Z., 1989. Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, image cytophotometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors. *Cancer J* 64(4), 916–924
- Kouřil, J., Podhorec, P., 2011. Umělý výtěr lina obecného. Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 113, 24 s.
- Kuhlmann, W.D., 2009. Fixation of biological specimens [online]. Laboratory–diagnostics–consulting: experimental medicine, imunology, clinical laboratory [cit.2018-4-21]. Dostupné na WWW: <[http://www.immunologie-labor.com/cellmarker\\_files/IET\\_tissue\\_02.pdf](http://www.immunologie-labor.com/cellmarker_files/IET_tissue_02.pdf)>.
- Lach-Ner, 2011. Bezpečnostní list: kyselina pikrová [online]. Lach-Ner, s.r.o., Netarovice [cit.2018-4-21]. Dostupné na WWW: <[http://www.lach-ner.com/files/88-89-1\\_Kyselina\\_pikrova\\_CZ.pdf](http://www.lach-ner.com/files/88-89-1_Kyselina_pikrova_CZ.pdf)>.
- Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Schmid, M., Scharl, M., 2000. Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry A* 39(2), 91–95.
- Lanier, L.L., Warner, N.L., 1981. Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J. Immunol. Methods* 47(1), 25–30.
- Larsen, J.K., Munch-Petersen, B., Christiansen, J., Jørgensen, K., 1986. Flow cytometric discrimination of mitotic cells: resolution of M, as well as G1, S, and G2 phase nuclei with mithramycin, propidium iodide, and ethidium bromide after fixation with formaldehyde. *Cytometry A* 7(1), 54–63.
- Lebeda, I., Flajšhans, M., Rodina, M., Havelka, M., Gela, D., 2015. Produkce gynogenetických populací jesetera malého. Edice Metodik č. 149, FROV JU Vodňany, 32 s.
- Lebeda, I., Gazo, I., Flajšhans, M., 2014. Chemical induction of haploid gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus*. *Czech J Anim Sci* 59(7), 310–318.

- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquacul. Fish. Manag.* 25(3), 345–350.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquac. Res.* 25(3), 345–350.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13(3), 237–246.
- Lester, R.J.G., Budd, J., 1979. Some changes in the blood cells of diseased coho salmon. *Can. J. Zool.* 57(7), 1458–1464.
- Li, W.K.W., Dickie, P.M., 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry A* 44(3), 236–246.
- Lin, F., Dabrowski, K., Luczynski, M.J., Luczynski, M., 2001. Mosaic individuals found in genetically manipulated northern pike (*Esox lucius*) using flow cytometry. *J. Appl. Ichthyol.* 17(2), 85–88.
- Lingenfelter, S.F., Dallas, C.E., Jagoe, C.H., Chesser, R.K., Smith, M.H., Lomakin, M., 1997a. Variation in blood cell DNA in *Carassius carassius* from ponds near Chernobyl, Ukraine. *Ecotoxicology* 6(4), 187–203.
- Lingenfelter, S.F., Dallas, C.E., Jagoe, C.H., Smith, M.H., Brisbin, I.L., Chesser, R.K., 1997b. Variation in DNA content of blood cells of largemouth bass from contaminated and uncontaminated waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10), 2136–2143.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Mavrodiev, N., Nebesarova, J., Gela, D., Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquac. Int.* 14(1–2), 9–25.
- Livesey, S.A., Del Campo, A.A., Nag, A., 1994. Method of cryopreserving a suspension of biological material. U.S. Patent No. 5364756, Patent and Trademark Office, Washington.
- Locquin, M., Langeron, M., 1983. Handbook of microscopy. Butterwords, London, 322 s.
- Lowcock, L.A., Sharbel, T.F., Bonin, J., Ouellet, M., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., 1997. Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in green frogs (*Rana clamitans*). *Aquat. Toxicol.* 38(4), 241–255.

- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish (Oxf)* 9(1), 67–78.
- Mayall, B.H., 1988. Current capabilities and clinical applications of image cytometry. *Cytometry A*, 9(3), 78–84.
- Mayers, C.P., 1970. Histological fixation by microwave heating. *J. Clin. Pathol.* 23(3), 273.
- Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 17(1), 53–92.
- McDonough, S.P., Southard, T., 2017. Histopathology. In: McDonough, S.P., Southard, T. (Eds.), *Necropsy Guide for Dogs, Cats, and Small Mammals*. John Wiley & Sons, Ames, pp. 165–170.
- McIntire, T.L., Goldey, S.H., Benson, N.A., Braylan, R.C., 1987. Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin-fixed lymphoid tissues. *Cytometry A* 8(5), 474–478.
- Morgan, J.A.W., Pottinger, T.G., Rippon, P., 1993. Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fish. *J. Fish Biol.* 42(1), 131–141.
- Motherby, H., Pomjanski, N., Kube, M., Boros, A., Heiden, T., Tribukait, B., Böcking, A., 2002. Diagnostic DNA-flow-vs.-image-cytometry in effusion cytology. *Anal Cell Pathol* 24(1), 5–15.
- Murphy, R.W., Lowcock, L.A., Smith, C., Darevsky, I.S., Orlov, N., MacCulloch, R.D., Upton, D.E. 1997. Flow cytometry in biodiversity surveys: methods, utility, and constraints. *Amphib-reptil.* 18(1), 1–13.
- Noguchi, M., Furuya, J.S., Takeuchi, T., Hirohashi, S., 1997. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol. Int.* 47(10), 685–691.
- Novák, J., Basařová, G., Fiala, J., Dostálek, P., 2008. Průtoková cytometrie ve výzkumu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a její aplikace v praxi. *Chem. listy* 102, 183–187.
- Nowacek, J.M., Kiernan, J.A., 2010. Fixation and tissue processing. In: Kumar, G.L., Kiernan, J.A. (Eds.), *Special stains and H & E*. 2nd edn., Dako North America, Carpinteria, pp. 141–152.

- O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcarphi, Melbourne, 358 s.
- Ormerod, M.G., 1994. Flow cytometry. Bios Scientific Publishers, Oxford, 77 s.
- Ormerod, M.G., 2000. Flow cytometry: a practical approach. 3rd edn., Oxford University Press, Oxford, 276 s.
- Ormerod, M.G., 2008. Flow cytometry: A basic introduction. De Novo, 116 s.
- Overton, W.R., McCoy, J.P., 1994. Reversing the effect of formalin on the binding of propidium iodide to DNA. *Cytometry A* 16(4), 351-356.
- Pappas, D., 2010. Practical Cell Analysis. John Wiley & Sons, New York, 314 s.
- Park, C.H., Kim, H.W., Uhm, C.S., 2016. How to Get Well-Preserved Samples for Transmission Electron Microscopy. *Appl Microsc* 46(4), 188–192.
- Pearse, A.G.E., 1980. Histochemistry, Theoretical and Applied. 4th edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1055 s.
- Pegg, D.E., 2007. Principles of cryopreservation. In: Day, J.G., Stacey, G.N. (Eds.), Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press, Totowa, pp. 39–57.
- Pekarčíková, L., Knopfová, L., Ondroušková, E., Šmarda, J., 2014. Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. *Klin Onkol* 27(3), 15–21.
- Petrie, T.A., Strand, N.S., Tsung-Yang, C., Rabinowitz, J.S., Moon, R.T., 2014. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 141(13), 2581–2591.
- Pierrez, J., Ronot, X., 1991. Use of diploid and triploid trout erythrocytes as internal standards in flow cytometry. *Cytometry A*, 12(3), 275–278.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquac. Int.* 29(3–4), 125–156.
- Pilgrim, R.L.C., 1957. Precautions in the use of Picric Acid in the Laboratory. *Tuatara* 6(3), 96–97.
- Pollice, A.A., Philip McCoy, J., Shackney, S.E., Smith, C.A., Agarwal, J., Burnolt, D.R., Janocko, L.E., Hornicek, F.J., Singh, S.S., Hartsock, R.J., 1992. Sequential

- paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry A* 13(4), 432–444.
- Pottinger, T. G., Pickering, A.D., 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.* 41(3), 435–447.
- Pšenička, M., Kašpar, V., Rodina, M., Gela, D., Hulák, M., Flajšhans, M., 2011. Comparative study on ultrastructure and motility parameters of spermatozoa of tetraploid and hexaploid Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 683–686.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Enfield, pp. 215–241.
- Radbruch, A., 2000. *Flow cytometry and cell sorting*. 2nd edn., Springer, Berlin, 355 s.
- Rall, W.F., Fahy, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 313,573–575.
- Roberts, R.L., Kessel, R.G., Tung, H.N., 1991. *Freeze fracture images of cells and tissues*. 1st edn., Oxford University Press, Oxford, 416 s.
- Robinson, J.P., Grégori, G., 2007. Principles of flow cytometry. In: Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J., (Eds.), *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 19–40.
- Rolls, G., 2012. Fixation and Fixatives (5) – Practical procedures to optimise quality, the effects of heat and microwaves [online]. Leica Biosystems, Wetzlar [cit.2018-4-21]. Dostupné na WWW: <<https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-5-practical-procedures-to-optimise-quality-the-effects-of-heat-and-microwaves/>>.
- Ronne, M., Andersen, O., Erlandsen, M., 1979. Effect of colcemid exposure and methanol acetic acid fixation on human metaphase chromosome structure. *Hereditas* 90(2), 195–201.
- Rosene, D.L., Roy, N.J., Davis, B.J., 1986. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J. Histochem. Cytochem.* 34(10), 1301–1315.
- Roubalová, L., 2012. Průtoková cytometrie. *FONS* 22 (2), 5–9.

- Rousselle, C., Robert-Nicoud, M., Ronot, X., 1998. Flow cytometric analysis of DNA content of living and fixed cells: A comparative study using various fixatives. *Histochem. J.* 30(11), 773–781.
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York, 322 s.
- Sabatini, D.D., Bensch, K., Barnett, R.J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17(1), 19–58.
- Seamer, L.C., Bagwell, C.B., Barden, L., Redelman, D., Salzman, G.C., Wood, J.C.S., Murphy, R.F., 1997. Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0. *Cytometry* 28(2), 118–122.
- Seiverd, C.E., 1972. *Hematology for Medical Technologists*. 4th edn., Philadelphia, Lea & Febiger, 840 s.
- Shao, Q., Fan, Y., Yang, L., Gao, Y.Q., 2012. From protein denaturant to protectant: comparative molecular dynamics study of alcohol/protein interactions. *J Chem Phys* 136, 115101-1–9.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical flow cytometry*. 4th edn., John Wiley & Sons, Hoboken, 681 s.
- Shariff, S., Kaler, A.K., 2016. *Principles & interpretation of laboratory practices in surgical pathology*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 340 s.
- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J., 1972. *Vererinary Hematology*. 3th edn., Philadelphia, Lea & Febiger, 807 s.
- Schimenti, K.J., Jacobberger, J.W., 1992. Fixation of mammalian cells for flow cytometric evaluation of DNA content and nuclear immunofluorescence. *Cytometry A* 13(1), 48–59.
- Suda, J., 2005. Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* 53(1), 46–48.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 122, 38 s.
- Šinkorová, Z., Zárybnická, L., 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojen Zdrav Listy* 77(3), 98–103.

- Tahmisian, T.N., Devine, R.L., Wright, B.J., Christiansen, C., 1964. The effect of P-ions and fixing agents upon intracellular components as seen with the electron microscope. *Annu Rep Div Biol Med Res Argonne Natl Lab*, 75–81.
- Tanaka, M., Kimura, S., Fujimoto, T., Sakao, S., Yamaha, E., Arai, K., 2003. Spontaneous mosaicism occurred in normally fertilized and gynogenetically induced progeny of the kokanee salmon *Oncorhynchus nerka*. *Fish Sci* 69(1), 176–180.
- Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J., 1994. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 172(1), 1–16.
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K., Ranganathan, K., 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 16(3), 400–405.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A., Propp, J., Utter, F.M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquac. Int.* 29(3–4), 305–309.
- Thornthwaite, J.T., Sugarbaker, E.V., Temple, W.J., 1980. Preparation of tissues for DNA flow cytometric analysis. *Cytometry A* 1(3), 229–237.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., 1989. Chicken erythrocytes as an internal reference for analysis of DNA content by flow cytometry in grass carp. *Trans. Am. Fish. Soc.* 118(6), 713–717.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Kallman, K. D., Wachtel, S.S., 1989a. Estimation of nuclear DNA content by flow cytometry in fishes of the genus *Xiphophorus*. *Comp. Biochem. Physiol., B* 94(3), 465–468.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S., Elias, S., 1989b. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry A* 10(6), 706–710.
- Undritz, E., 1973. *Sandoz Atlas of Haematology*. 2nd edn, Sandoz, Basel, 234 s.
- Vacek, Z., 1990. *Histológia a histologická technika*. Osvěta, Martin, 97 s.
- Van Dam, P.A., Watson, J.V., Lowe, D.G., Chard, T., Shepherd, J.H., 1992. Comparative evaluation of fresh, fixed, and cryopreserved solid tumor cells for reliable flow cytometry of DNA and tumor associated antigen. *Cytometry A* 13(7), 722–729.



- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquac. Int.* 147(3–4), 177–189.
- Vanhecke, D., Graber, W., Studer, D., 2008. Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing. *Methods Cell Biol.* 88, 151–164.
- Vindelov, L.L., Christensen, I.J., 1990. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry A* 11(7), 753–770.
- Vindelov, L.L., Christensen, I. J., Keiding, N., Spang-Thomsen, M., Nissen, N.I., 1983a. Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry A* 3(5), 317–322.
- Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I., 1983b. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry A* 3(5), 323–327.
- Vinogradov, A.E., 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. *Cytometry A* 31(2), 100–109.
- Walker, M.G., 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley, Dundee, 362 s.
- Weaver, J.L., Stetler-Stevenson, M., 2008. Biomedical Uses of Flow Cytometry. In: Walker J.M., Rapley, R. (Eds.), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, Totowa, pp. 1039–1062.
- Wowk, B., 2007. How cryoprotectants work. *Cryonics* 28, 3–7.
- Xavier, P.L., Senhorini, J.A., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Shimoda, E., Silva, L.A., dos Santos, S.A., Yasui, G.S., 2017. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. *Front Genet* 8, 131.

## 8. Seznam tabulek, grafů a příloh

### Tabulky:

<b>Tabulka č. 1:</b> Design experimentu.....	50
<b>Tabulka č. 2:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních krevních vzorků jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	58
<b>Tabulka č. 3:</b> Průměrné $F_{st}/F_{vz.}$ pro nativní krevní vzorky z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	59
<b>Tabulka č. 4:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ploutevních tkání jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní).....	61
<b>Tabulka č. 5:</b> Průměrné $F_{st}/F_{vz.}$ pro nativní vzorky ploutevních tkání z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	63
<b>Tabulka č. 6:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera malého odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	64
<b>Tabulka č. 7:</b> Průměrné $F_{st}/F_{vz.}$ pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku jesetera malého odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	66
<b>Tabulka č. 8:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních krevních vzorků línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	68
<b>Tabulka č. 9:</b> Průměrné $F_{st}/F_{vz.}$ pro nativní krevní vzorky z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	69
<b>Tabulka č. 10:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ploutevních tkání línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	71
<b>Tabulka č. 11:</b> Průměrné $F_{st}/F_{vz.}$ pro nativní vzorky ploutevních tkání z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	73
<b>Tabulka č. 12:</b> Průměrné CV získané analýzou nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). ....	75

**Tabulka č. 13:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku lína obecného odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....76

## **Grafy:**

**Graf č. 1:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních krevních vzorků jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....59

**Graf č. 2:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní krevní vzorky z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....60

**Graf č. 3:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání jeseterů malých odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....62

**Graf č. 4:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevních tkání z jeseterů malých odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....64

**Graf č. 5:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku jesetera malého odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....65

**Graf č. 6:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku jesetera malého odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....67

**Graf č. 7:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních krevních vzorků línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a krevních vzorků pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....69

**Graf č. 8:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní krevní vzorky z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a krevní vzorky pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....70

**Graf č. 9:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ploutevních tkání línů obecných odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ploutevních tkání pocházejících z týchž ryb a fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....72

**Graf č. 10:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ploutevních tkání z línů obecných odebírané do fyz. roztoku a vzorky ploutevních tkání pocházející z týchž ryb a fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....74

**Graf č. 11:** Průměrné CV získané analýzou relativního obsahu DNA nativních vzorků ocasních tkání plůdku lína obecného odebíraných do fyz. roztoku a vzorků ocasních tkání plůdku téhož druhu fixovaných různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní). .....76

**Graf č. 12:** Průměrné  $F_{st}/F_{vz.}$  pro nativní vzorky ocasních tkání plůdku lína obecného odebírané do fyz. roztoku a vzorky ocasních tkání plůdku téhož druhu fixované různými metodami po zvolené časové úseky (1, 5 a 10 dní).....77

## **Přílohy:**

**Příloha č. 1:** Mražení vzorků krve a ploutevní tkáně lína obecného v 5% DMSO na suchém ledě.....110

**Příloha č. 2:** Příprava vzorků na analýzu na průtokovém cytometru – filtrace vzorků do kyvet přes 30µm nylonové filtry.....110

**Příloha č. 3:** Měření relativního obsahu DNA na průtokovém cytometru Partec CCA I.....111

**Příloha č. 4:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného krevního vzorku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....112

**Příloha č. 5:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného krevního vzorku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....113

**Příloha č. 6:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ploutevní tkáně jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....114

**Příloha č. 7:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ploutevní tkáně jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....115

**Příloha č. 8:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....116

**Příloha č. 9:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). .....117

**Příloha č. 10:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného krevního vzorku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....118

**Příloha č. 11:** Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného krevního vzorku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....119

<b>Příloha č. 12:</b> Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ploutevní tkáně lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....	120
<b>Příloha č. 13:</b> Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ploutevní tkáně lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....	121
<b>Příloha č. 14:</b> Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....	122
<b>Příloha č. 15:</b> Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). .....	123

## 9. Přílohy



Příloha č. 1: Mražení vzorků krve a ploutevní tkáň lina obecného v 5% DMSO na suchém ledě.

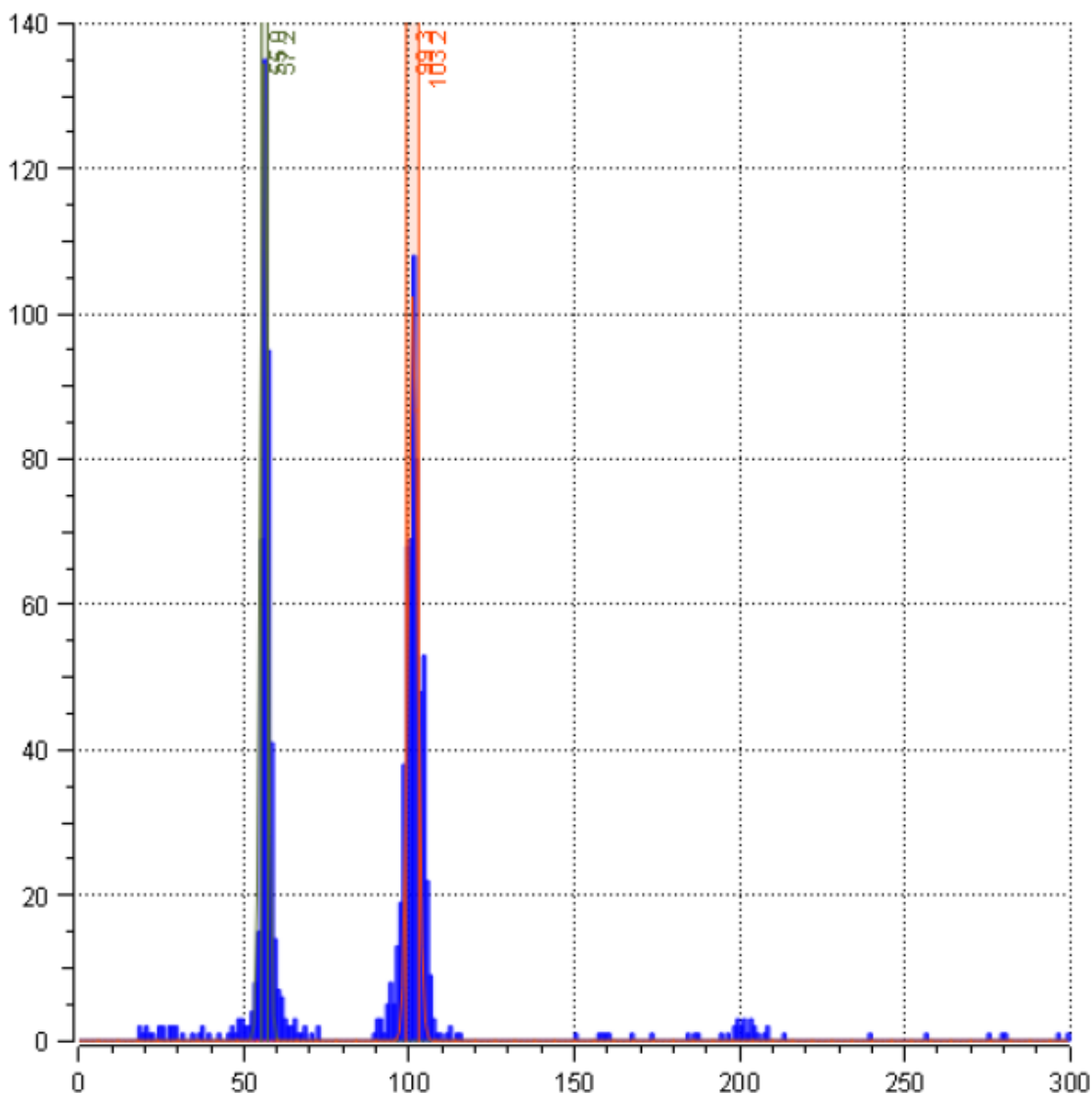


Příloha č. 2: Příprava vzorků na analýzu na průtokovém cytometru – filtrace vzorků do kyvet přes 30 $\mu$ m nylonové filtry.



Příloha č. 3: Měření relativního obsahu DNA na průtokovém cytometru Partec CCA I.

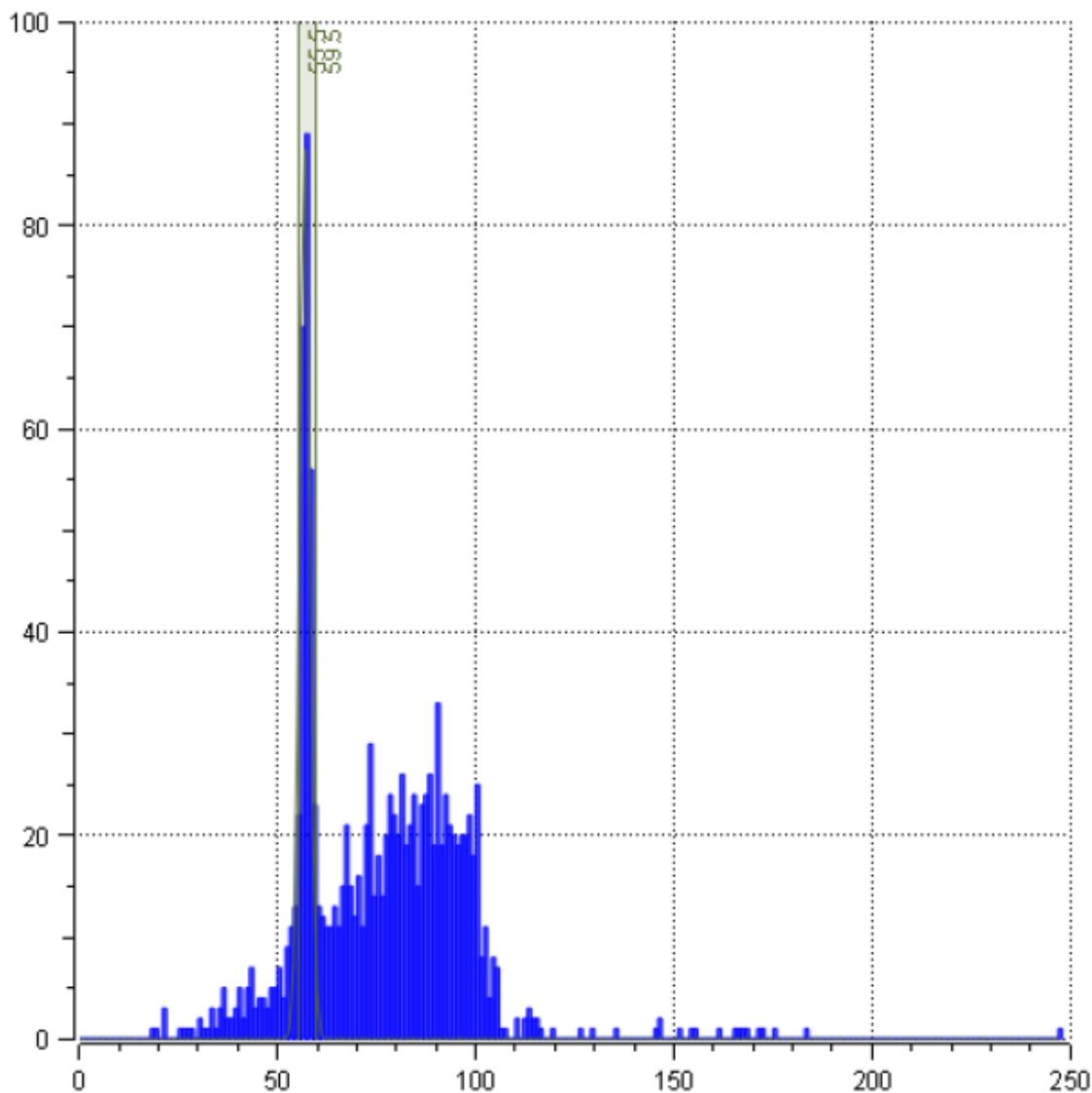
Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
56,0981	1	1	Green	1,91539	71,7757	384	230	19,7914
101,182	1,80366	2	Red	1,36803	96,0748	514	305	19,7914



Příloha č. 4: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného krevního vzorku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 15% etanolem, analýza byla realizována po 5denním uchování. Relativní obsah DNA jader erytrocytů jesetera se nachází přibližně na kanále 101, relativní obsah DNA jader buněk ploutevní tkáně lína je patrný přibližně na kanále 56. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Daniel, ČR).

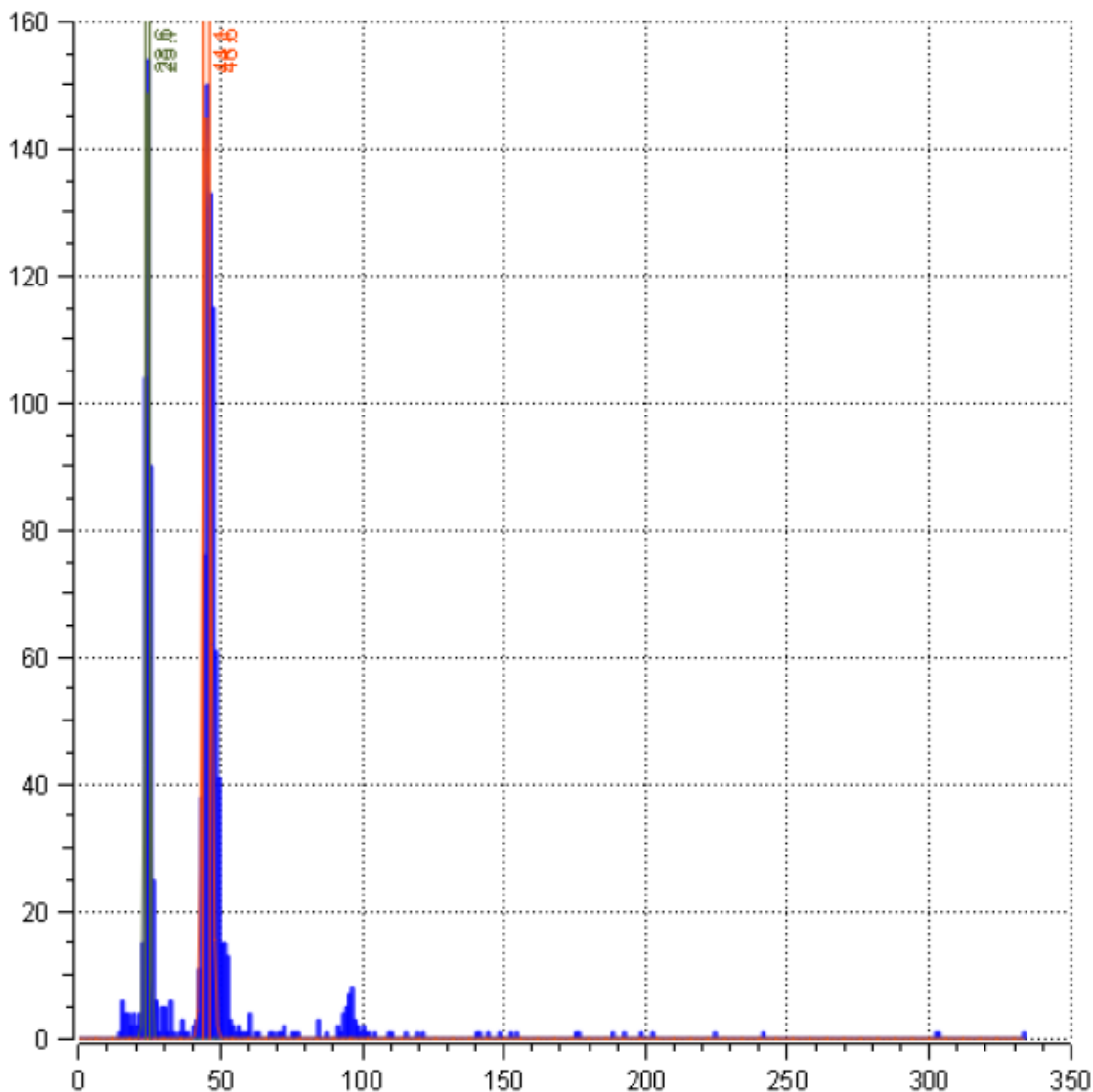


Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
56,8451	1	1		2,23373	129,832	309	238	68,2085



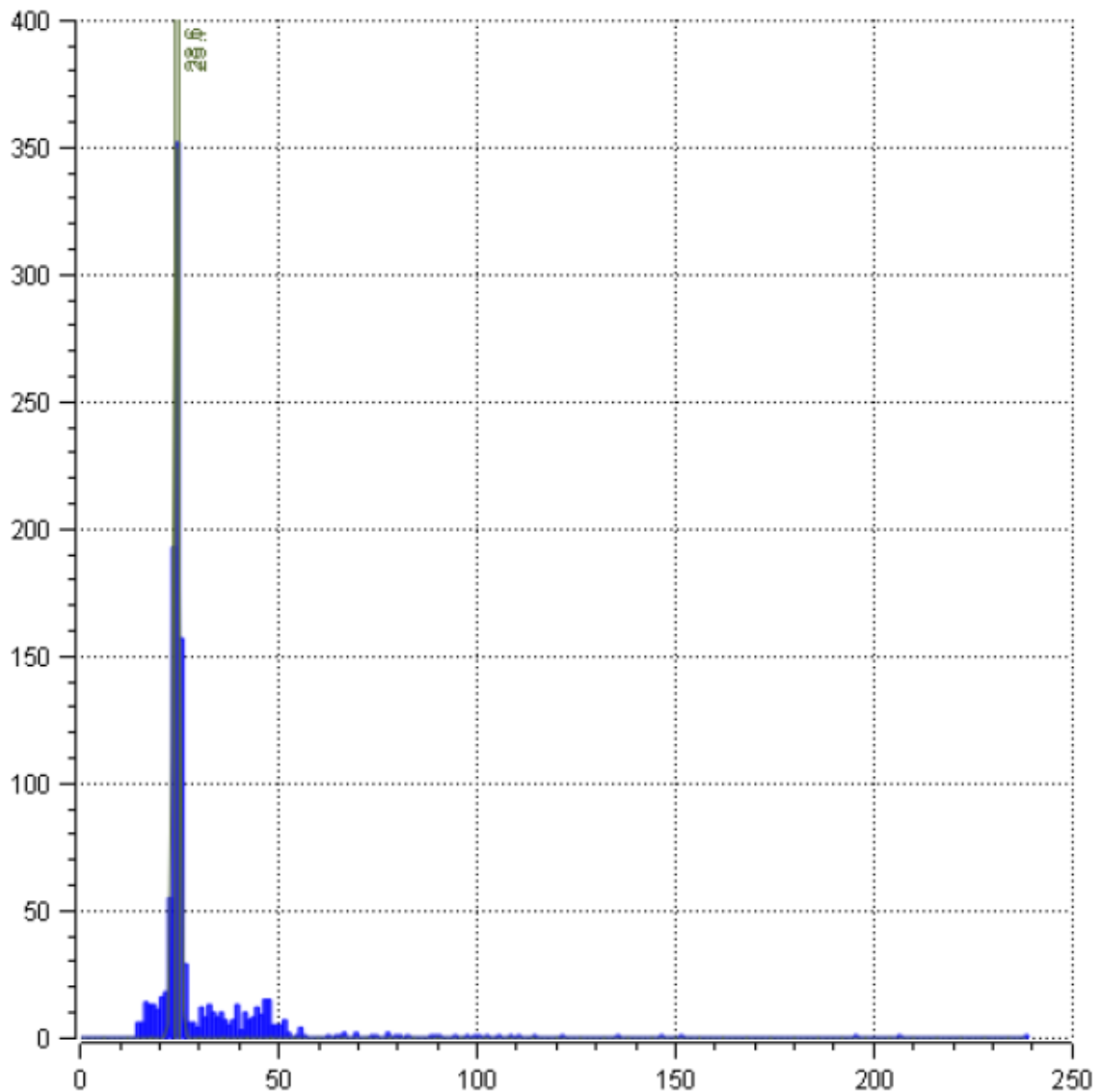
Příloha č. 5: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného krevního vzorku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 20% etanolem, měření bylo realizováno po 5denním uchování. Analýzou relativního obsahu DNA jader erytrocytů jesetera nevznikl rozpoznatelný pík, relativní obsah DNA jader buněk ploutevní tkáně lína je patrný přibližně na kanále 57. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
24,2016	1	1	Green	3,10784	74,7628	394	244	35,9622
45,3319	1,87309	2	Red	2,76534	122,011	643	283	35,9622



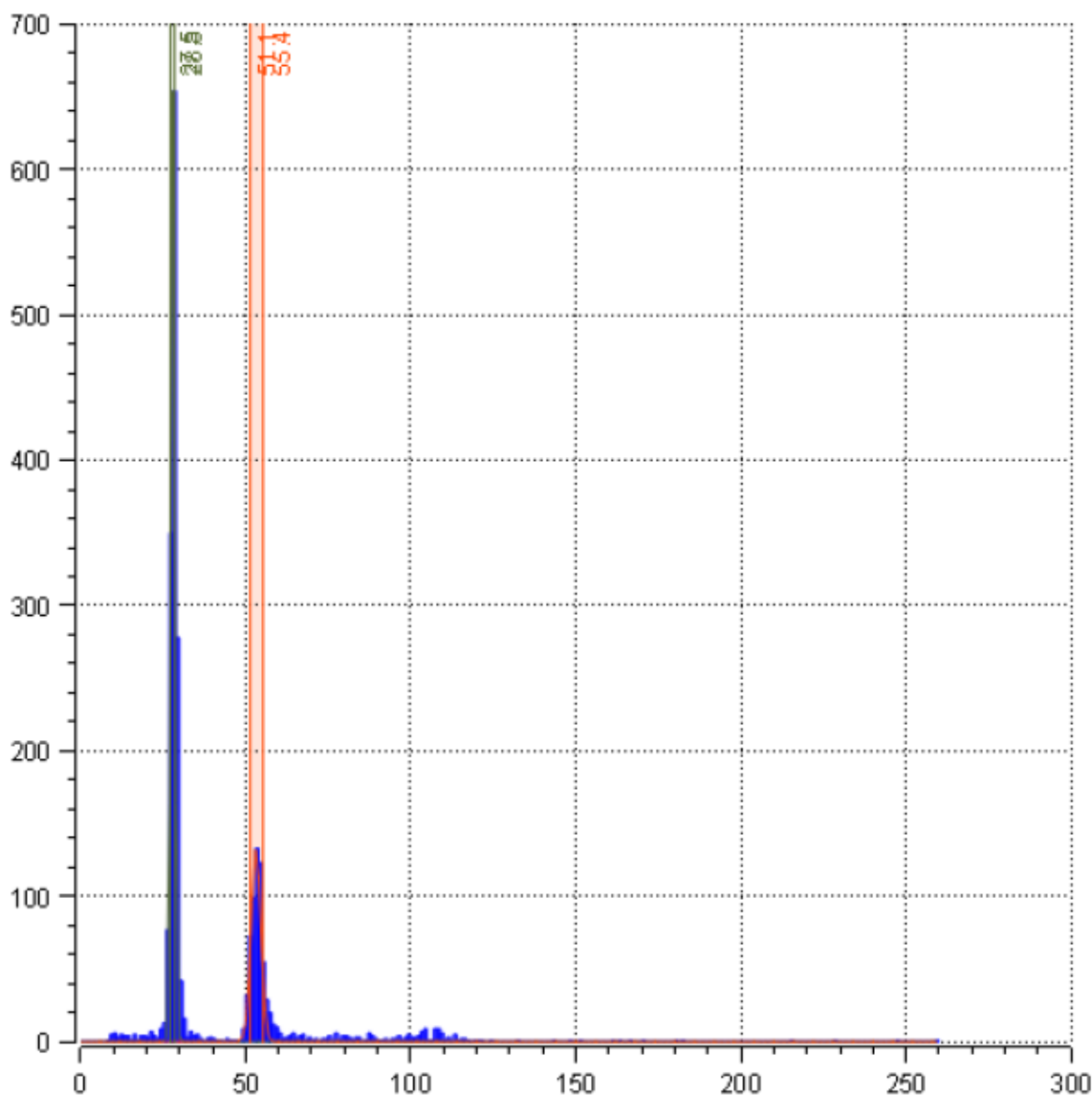
Příloha č. 6: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ploutevní tkáně jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 5% DMSO, analýza byla realizována po 1denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně jesetera se nachází přibližně na kanále 45, relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lína je patrný přibližně na kanále 24. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
24,0877	1	1		2,97385	154,42	786	509	54,284



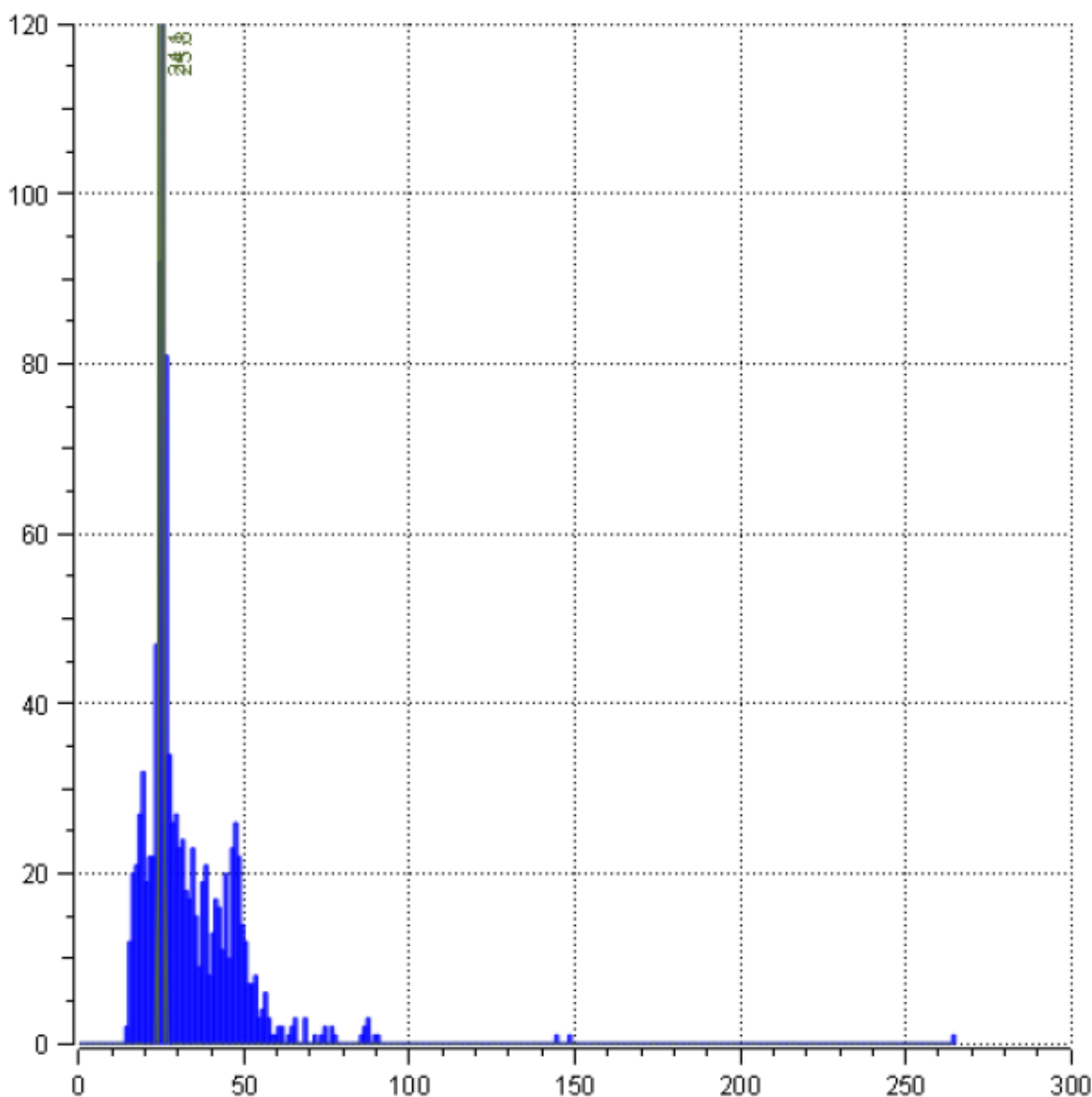
Příloha č. 7: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ploutevní tkáně jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lina obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 1% paraformaldehydem, měření bylo realizováno po 1denním uchování. Analýzou relativního obsahu DNA jader buněk z ploutevní tkáně jesetera nevznikl rozpoznatelný pík, relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lina je patrný přibližně na kanále 24. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
28	1	1	Green	2,15016	131,673	1401	654	223,065
53,1703	1,89894	2	Red	2,74238	55,0752	586	410	223,065



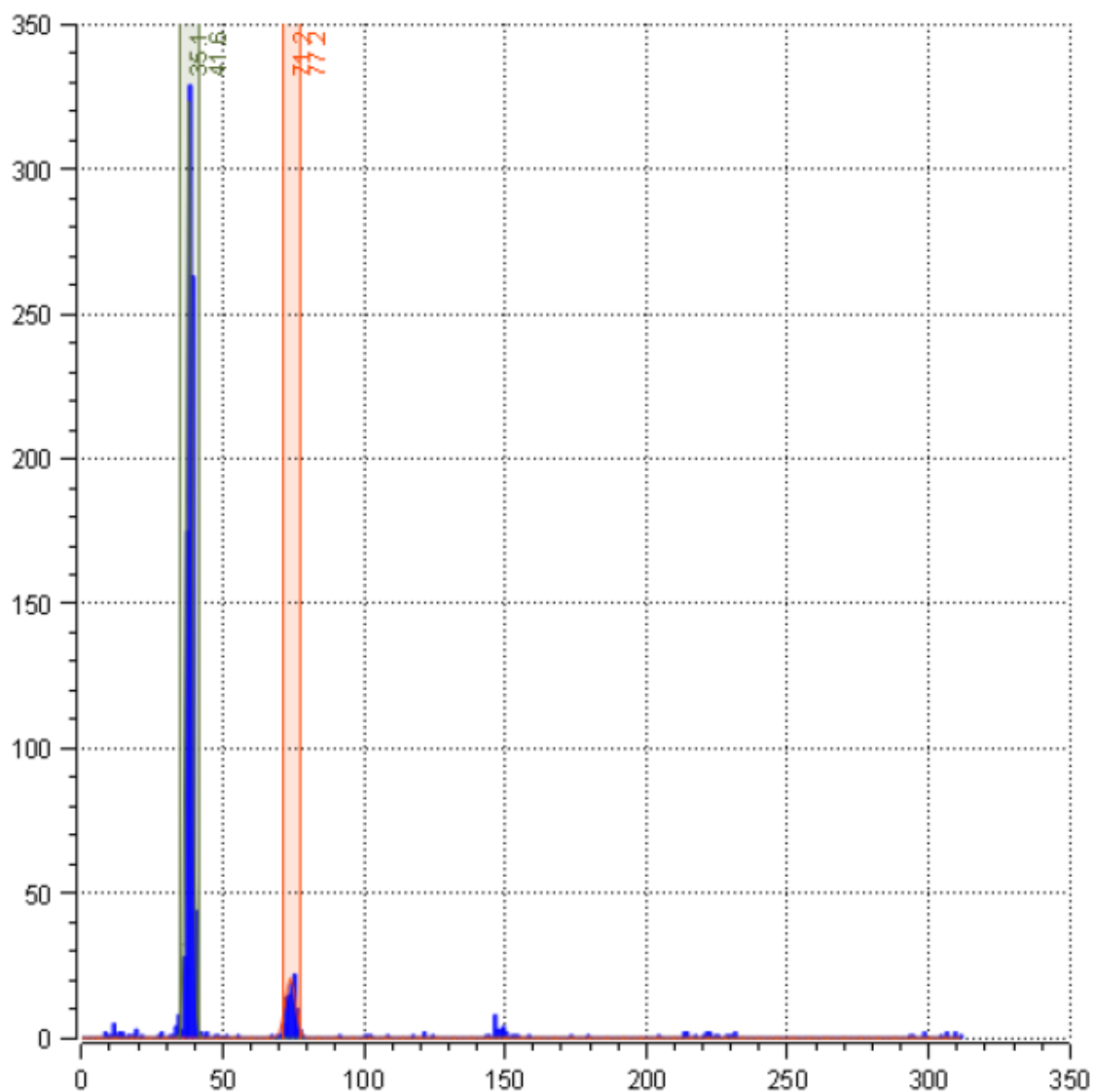
Příloha č. 8: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 1% etanolu, analýza byla realizována po 10denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ocasní tkáně plůdku jesetera se nachází přibližně na kanále 53, relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lína je patrný na kanále 28. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
25	1	1		2,14831	311,667	374	120	92,4082



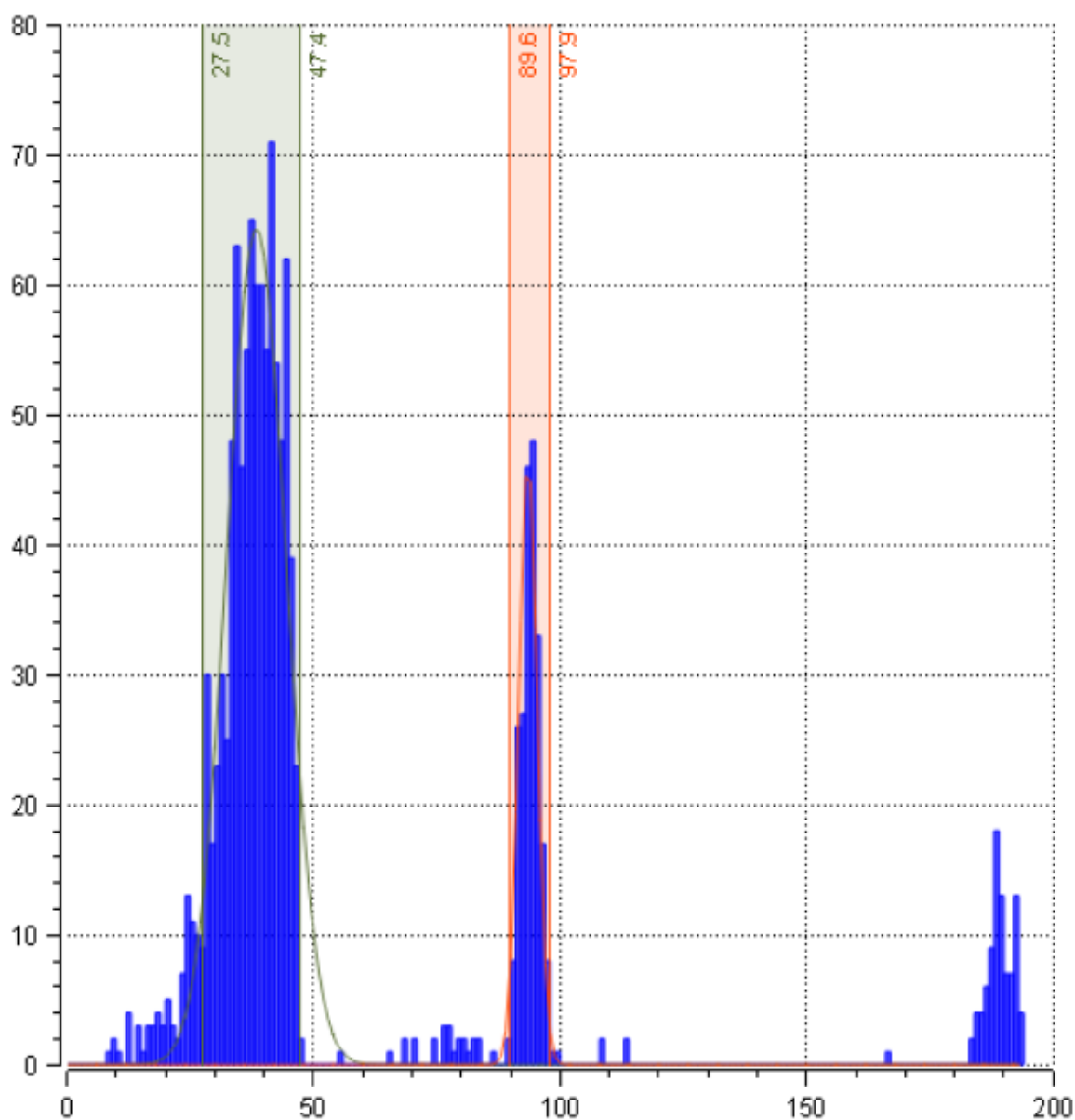
Příloha č. 9: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku jesetera malého, a příslušného standardu (nativních buněk z ploutevní tkáně lína obecného). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 15% etanolu, měření bylo realizováno po 1denním uchování. Analýzou relativního obsah DNA jader buněk z ocasní tkáně plůdku jesetera nevznikl rozpoznatelný pík, relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lína je patrný na kanále 25. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
38,1874	1	1		2,65789	91,5493	845	840	5,2356
74,0019	1,93786	2		2,43479	9,85915	91	83	5,2356



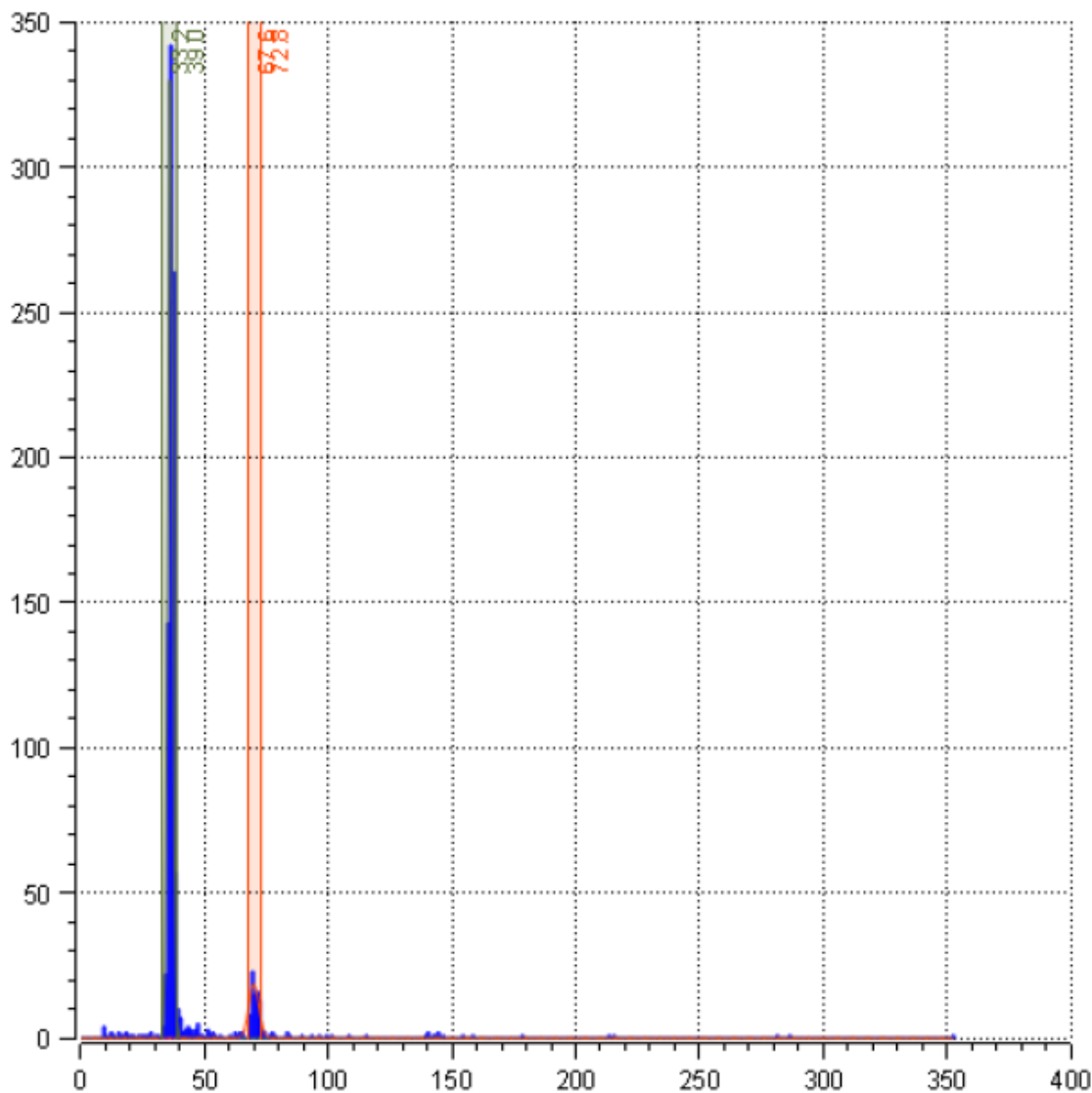
Příloha č. 10: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného krevního vzorku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení v 5% DMSO na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , analýza byla realizována po 10denním uchování. Relativní obsah DNA jader erytrocytů lína se nachází přibližně na kanále 38, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 74. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Daniel, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
38,4115	1	1	Dark Green	15,7248	86,9605	947	876	20,164
93,4771	2,43357	2	Red	2,00257	19,9265	217	213	20,164



Příloha č. 11: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného krevního vzorku lina obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 20% etanolem, analýza byla realizována po 5denním uchování. Relativní obsah DNA jader erytrocytů lina se nachází přibližně na kanále 38, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 93. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

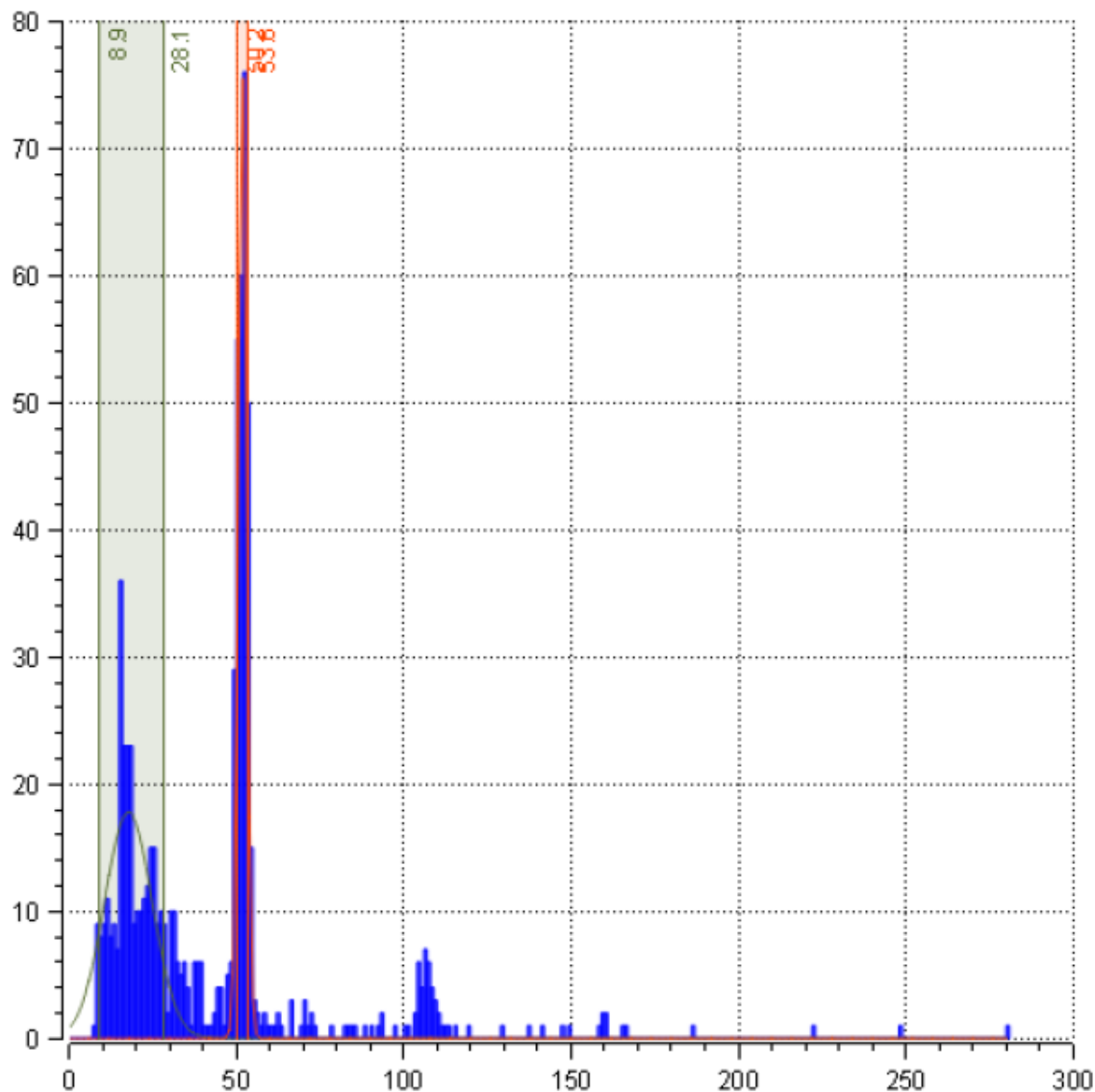
Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
36,2601	1	1		2,63861	94,0199	849	828	2,04492
69,997	1,93042	2		2,88911	9,41307	85	75	2,04492



Příloha č. 12: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ploutevní tkáně lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 5% DMSO, analýza byla realizována po 1denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lína se nachází přibližně na kanále 36, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 70. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Daniel, ČR).

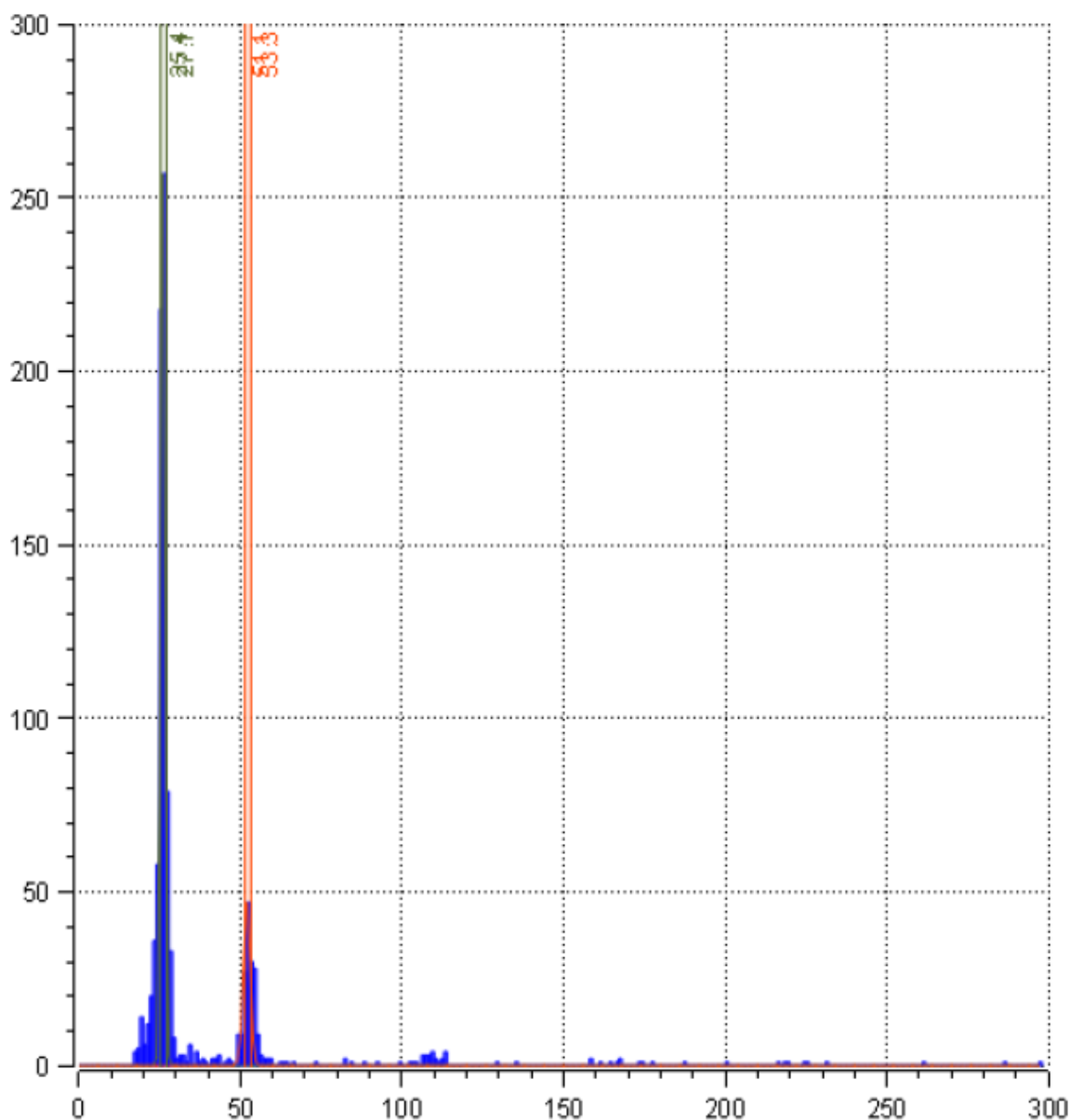


Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
17,7404	1	1	Dark Green	40,0751	75,0552	340	267	10,4144
51,8594	2,92324	2	Red	2,40598	65,3422	296	186	10,4144



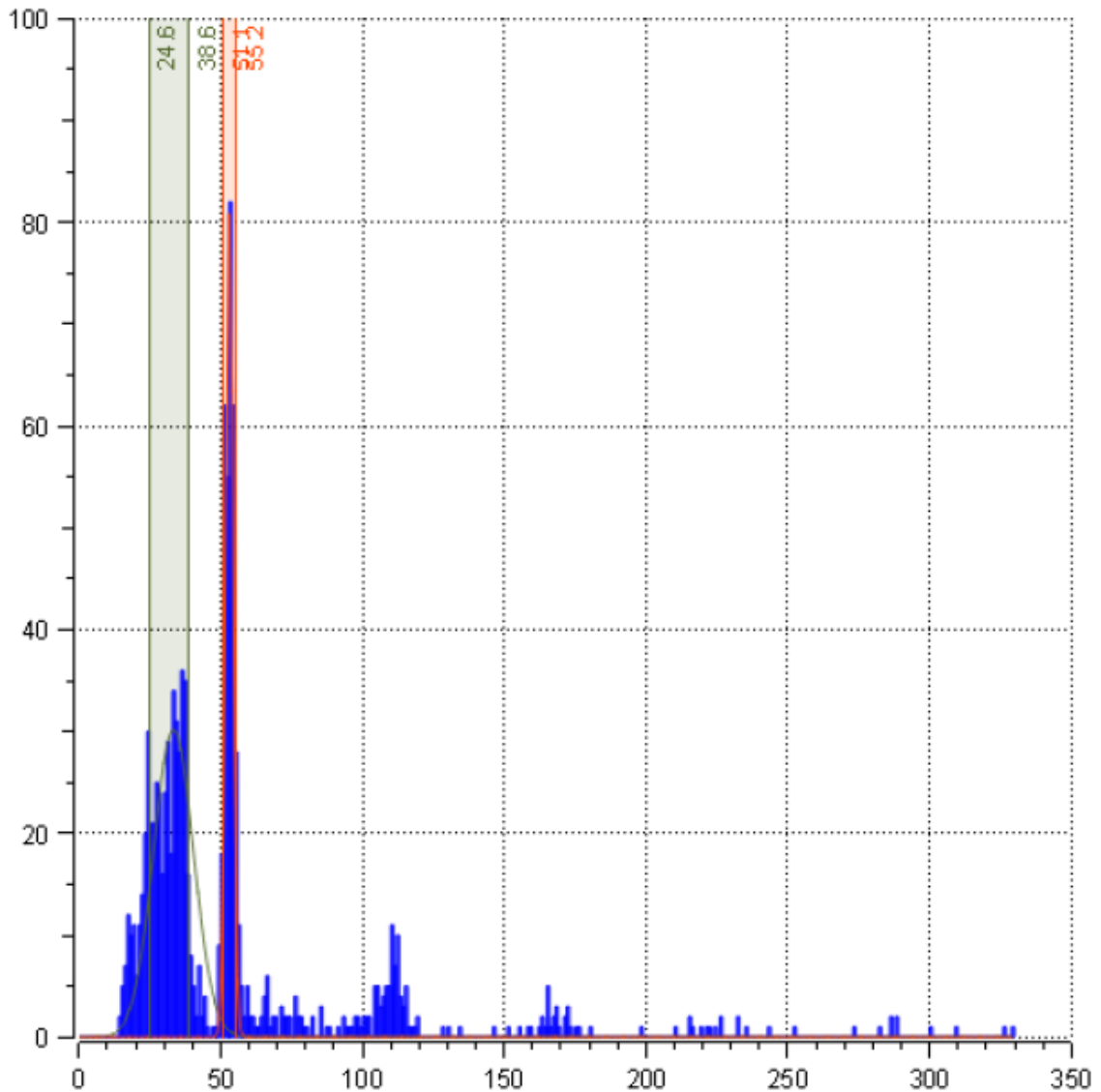
Příloha č. 13: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ploutevní tkáně lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 1% paraformaldehydem, analýza byla realizována po 1denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ploutevní tkáně lína se nachází přibližně na kanále 18, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 52. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Daniel, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
26	1	1	Green	2,50397	156,174	645	336	88,3682
52,0002	2,00001	2	Red	2,02898	38,4988	159	77	88,3682



Příloha č. 14: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z efektivně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti byla fixace 5% etanolem, analýza byla realizována po 5denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ocasní tkáně plůdku lína se nachází na kanále 26, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 52. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Daniel, ČR).

Mean	Index	Id	Color	CV%	Area%	Area	Area gate	ChiSqu.
33,3763	1	1		21,0331	145,128	849	358	14,3336
53,1077	1,59118	2		2,39592	56,7521	332	227	14,3336



Příloha č. 15: Příklad histogramu relativního obsahu DNA jader buněk, které byly získány z neúspěšně fixovaného vzorku ocasní tkáně plůdku lína obecného, a příslušného standardu (fixovaných erytrocytů pstruha duhového). Použitou metodou k prodloužení uchovatelnosti bylo mražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 20% etanolu, analýza byla realizována po 5denním uchování. Relativní obsah DNA jader buněk z ocasní tkáně plůdku lína se nachází přibližně na kanále 33, relativní obsah DNA jader erytrocytů pstruha je patrný přibližně na kanále 53. Histogramy byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR).

## 10. Abstrakt

Tato práce si klade za cíl zhodnotit možnost využití různých biologických fixativ k prodloužení uchovatelnosti vzorků rybích buněk a tkání pro pozdější měření obsahu DNA průtokovou cytometrií. Jako modelové druhy byly vybrány jeseter malý a lín obecný, od kterých byly získávány tři typy vzorků: krev a ploutevní tkáň subadultních / adultních jedinců a ocasní tkáň vykuleného plůdka. Na každý typ vzorku každého modelového druhu bylo testováno 13 fixačních metod, při jejichž výběru byl kladen zvýšený důraz na snadnou proveditelnost a časovou nenáročnost. Na průtokovém cytometru byly vzorky měřeny v nativním stavu neprodleně po odběru do fyziologického roztoku a dále po 1, 5 a 10denní fixaci, během níž byly uchovávány v lednici nebo mrazáku při -80 °C. Jejich analýza probíhala simultánně se standardy – nativními buňkami z ploutevní tkáně lína v případě zkoumání vzorků z jesetera malého a komerčně dodávanými fixovanými pstružními erytrocyty pro vzorky z lína obecného. Použitým fluorochromem byl 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI s excitačním/emisním maximem 358 / 461 nm). Na základě zjištěných hodnot variačního koeficientu (CV) fixovaných vzorků a změn v úrovních jejich fluorescence ve srovnání s nativním stavem jsou navrženy optimální postupy pro prodloužení uchovatelnosti všech typů vzorků obou modelových druhů.

Při fixaci krevních vzorků jesetera malého bylo nejlepších výsledků dosaženo s použitím 15% etanolu, fixace vzorků ocasní tkáně plůdka téhož rybiho druhu proběhla nejlépe v případě mražení v 1% etanolu a fyz. roztoku při -80 °C. Žádný z těchto postupů nezpůsobil statisticky významnou změnu intenzity fluorescence a všechny vedly k zisku průměrných CV do 3 %. Ploutevní tkáň jesetera malého se osvědčilo mrazit na suchém ledu v 5% DMSO, kdy byly sice průměrné CV v některých případech vyšší než 3 %, fluorescence vzorků však nebyla ovlivněna na statisticky významné úrovni.

Nejlépe použitou metodou pro prodloužení uchovatelnosti vzorků krve lína obecného bylo mražení na suchém ledu v 5% DMSO, které vedlo k zisku průměrných CV do 3 % a statisticky významné změně v úrovni naměřené fluorescence ve srovnání s nativními vzorky v jediném případě (1. den analýzy). Stejná metoda se osvědčila pro ploutevní tkáň lína obecného, kdy neindukovala statisticky významné změny intenzit fluorescence, a průměrné CV se pohybovaly pod 3% hranicí. Ocasní tkáň plůdka lína obecného byla nejlépe fixována při použití 5% etanolu, tehdy byly průměrné CV nižší

než 3 % a fluorescence byla ve srovnání s nativními vzorky statisticky odlišná pouze v jediném případě (10. den analýzy).

Jelikož lze vkládání vzorků do lednice nahradit jejich umístěním na led a uchování ve speciálním mrazáku při -80 °C simulovat použitím suchého ledu, jsou všechny uvedené metody jednoduše proveditelné i v terénních nebo provozních podmínkách. Rozsah možných aplikací by se mohl ještě rozšířit, pokud by bylo experimentálně prokázáno, že jsou metody navrženy pro fixaci vzorků z jesetera malého efektivní i pro vzorky z jiných chrupavčitých ryb, a ty, jež se osvědčily pro fixaci vzorků z lína obecného, zase pro vzorky pocházející z dalších druhů kostnatých ryb.

Klíčová slova: prodloužení uchovatelnosti, jeseter malý, lín obecný, krev, ploutevní tkáň, ocasní tkáň plůdku, CV, intenzita fluorescence

## 11. Abstract

This thesis aims to assess the possibility of the usage of various biological fixatives for fish cell and tissues samples in order to extend its storage for later flow cytometric measurement of DNA content. The model species chosen were sterlet and tench, from which three types of samples were obtained: blood and fin tissue of subadult / adult individuals and tail tissue of hatched larvae. Altogether 13 fixation methods were tested for each type of sample of both model species. Methods were chosen based upon their easy feasibility and low time-consumption. The samples were measured on flow cytometer in native state immediately after sampling and placing in physiological saline and after 1, 5 and 10 days of fixation during which they were stored in a fridge or in a freezer at -80 °C. Their analysis was carried out simultaneously with standards – native cells from tench fin tissue when investigating sterlet samples, and commercially available fixed trout erythrocytes for tench samples. A fluorochrome used was 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; with excitation/emission maxima 358 / 461 nm). Based on the evaluation of coefficients of variation (CV) of fixed samples and the changes in their fluorescence levels in comparison with native state, optimal procedures for extended storage of all types of samples from both model species are suggested.

The best results of sturgeon blood sample fixation were achieved using 15 % ethanol, the fixation of larval tail tissue of the same species was most successful in the case of freezing in 1 % ethanol and physiological saline at -80 °C. None of these procedures caused any significant change of fluorescence intensity and with all of them CVs lower than 3 % were obtained. For sterlet fin tissue, freezing on dry ice in 5 % DMSO has proven successful, the average CVs were higher than 3 % in some cases but the fluorescence of samples was not affected significantly.

The best method used for extended storage of tench blood samples was freezing on dry ice in 5 % DMSO, which led to average CV below 3 % and statistically significant change in the fluorescence level measured in comparison with the native samples was found only in a single case (1st. day of analysis). For fin tissue of tench the same method has proven successful, it did not induce statistically significant changes of fluorescence intensity and average CVs were lower than 3 %. For fixation of larval tail tissue it was the best to use 5 % ethanol, in this case average CV were lower than 3 %

and the fluorescence was statistically different only in a single case in comparison with the native samples (10th. day of analysis).

Since it is possible to substitute placing the samples into fridge with putting them on ice and storage in a special freezer can be simulated with using dry ice, all the methods presented are easy feasible in field or under operating conditions. The range of possible applications will get larger, if it is experimentally proved, that the methods proposed for sterlet samples fixation are effective also for samples of other chondrostean, and the methods approved for tench samples fixation work also for the samples of other teleosts.

Keywords: storage extension, sterlet, tench, blood, fin tissue, larval tail tissue, CV, fluorescence intensity