

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury a ochrany vod

Diplomová práce
STUDIUM ZÁKLADNÍCH MECHANISMŮ
PERITONEÁLNÍHO ZÁNĚTU U
CANDÁTA OBECNÉHO
(*Sander lucioperca*)

Autor: Bc. Jan Chábera

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Korytář, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Vlastimil Stejskal, Ph.D.

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

Forma studia: Kombinovaná

Ročník: 2.

České Budějovice, 2019

PROHLÁŠENÍ

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

3.5.2019

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomohli při zpracování mé diplomové práce. Děkuji vedoucímu práce, Dr. Tomáši Korytářovi, za trpělivost, pomoc, podporu, ochotu a inspiraci. Poděkování za pomoc při sepisování práce patří i Ing. Vlastimilu Stejskalovi, Ph.D. a mé dceři Karolíně za pomoc při tvorbě mé diplomové práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jan CHÁBERA
Osobní číslo: V17N003K
Studijní program: N4106 Zemědělská specializace
Studijní obor: Rybnářství a ochrana vod
Téma práce: Studium základních mechanismů peritoneálního zánětu u candáta obecného (*Sander lucioperca*)
Zadávající katedra: Ústav akvakultury a ochrany vod

Zásady pro vypracování

Chov candáta obecného (*Sander lucioperca*) v recirkulačních systémech patří mezi perspektivní směry evropské sladkovodní akvakultury. Vzhledem k omezeným možnostem zvyšování produkce extenzivním chovem v rybnících, resp. exploataci volných vod (zejména jezer a údolních nádrží) představuje intenzivní chov reálnou možnost zvýšení produkce tohoto druhu. Podmínky intenzivního chovu však často vyvolávají stres, který v důsledku může vést k snížené obranyschopnosti a ekonomickým ztrátám v důsledku mortality či redukce růstu. Na rozdíl od tradičních akvakulturních druhů, jejichž imunitní systém je předmětem zkoumání již několik dekad, jsou znalosti mechanismu imunitní odpovědi u candáta značně omezené.

Hlavním cílem diplomové práce je studium mechanismu indukovaného akutního zánětu v peritoneální dutině candáta obecného. Prvním dílčím cílem je popis složení populací bílých krvinek v peritoneální dutině, ve vybraných lymfatických orgánech a v krvi jedinců candáta obecného pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie. Výsledky první části poslouží jako kostra pro druhou část práce, ve které budou testovány dvě hypotézy. První testovanou hypotézou je absence rozdílů v mechanismech peritoneálního zánětu u candáta a ostatních druhů ryb. Druhá hypotéza se vztahuje k vlivu nasycení vody kyslíkem na imunitní systém ryb a tedy k nalezení rozdílů v průběhu peritoneálního zánětu u ryb chovaných v normoxii a hypoxii.

K testování zmíněných hypotéz budou ryby rozděleny do dvou skupin a vystaveny normoxii a 40% hypoxii. Po uplynutí 7 dní budou obě skupiny dále rozděleny na kontrolní skupinu, injektovanou sterilním fyziologickým roztokem, a experimentální skupinu, která bude injektována inaktivovanou *A. hydrophila*, představující modelový antigen. V následujících třech dnech bude mikroskopickými, cytometrickými a molekulárními metodami sledována inicializace a průběh peritoneálního zánětu. Hlavními zkoumanými parametry budou celkový počet buněk v peritoneální dutině a poměr hlavních populací leukocytů. Dále bude studován vliv peritoneálního zánětu na složení krve a zúčastněných lymfatických orgánů. Pro přehlednost bude nejdříve popsán mechanismus akutního zánětu v podmínkách normoxie a vliv hypoxie bude vyhodnocen následně.

Vlastní experimenty budou probíhat v prostředí experimentálního recirkulačního systému. Podmínky prostředí a chemismus vody budou ve všech nádržích pravidelně monitorovány a upravovány na předem stanovené hodnoty. Vlastní experimentální části bude předcházet zpracování literární rešerše k danému tématu.

Rozsah pracovní zprávy: 50-70 stran
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Barreda, D R, N F Neumann, and M Belosevic. 2000. „Flow Cytometric Analysis of PKH26-Labeled Goldfish Kidney-Derived Macrophages.“ *Dev. Comp. Immunol.* 24 (4): 395-406.
- Berberich, Simon, Reinhold Förster, and Oliver Pabst. 2007. „The Peritoneal Micromilieu Commits B Cells to Home to Body Cavities and the Small Intestine.“ *Blood* 109 (11): 4627-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064345>.
- Bodammer, J. E. 1986. „Ultrastructural Observations on Peritoneal Exudate Cells from the Striped Bass.“ *Veterinary Immunology and Immunopathology*

- 12 (1-4): 127-40. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(86\)90117-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(86)90117-0).
- Butler, GW. 1889. „On the Subdivision of the Body-Cavity in Lizards, Crocodiles, and Birds.“ In Proceedings of the Zoological Society of London, 57:452-74. Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7998.1889.tb06788.x/abstract>.
- Castro, Rosario, Beatriz Abós, Lucía González, Aitor G. Granja, and Carolina Tafalla. 2017. „Expansion and Differentiation of IgM+ B Cells in the Rainbow Trout Peritoneal Cavity in Response to Different Antigens.“ *Developmental & Comparative Immunology* 70 (May): 119-27. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.012>.
- Chadzinska, Magdalena, Paweł Baginski, Elzbieta Kolaczowska, H. F. J. Savelkoul, and B. M. Lidy Verburg-Van Kemenade. 2008. „Expression Profiles of Matrix Metalloproteinase 9 in Teleost Fish Provide Evidence for Its Active Role in Initiation and Resolution of Inflammation.“ *Immunology* 125 (4): 601-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02874.x>.
- Cuesta, Alberto, Alejandro Rodríguez, Irene Salinas, José Meseguer, and M. Ángeles Esteban. 2007. „Early Local and Systemic Innate Immune Responses in the Teleost Gilthead Seabream after Intraperitoneal Injection of Whole Yeast Cells.“ *Fish and Shellfish Immunology* 22 (3): 242-51. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.05.005>.
- Dobbie, J.W. 1988. „From Philosopher to Fish: The Comparative Anatomy of the Peritoneal Cavity as an Excretory Organ and Its Significance for Peritoneal Dialysis in Man.“ *Perit. Dial. Int.*
- Folgueira, I., M. Noia, V. Blanco-Abad, N. Mallo, J. Leiro, and J. Lamas. 2015. „Particle Size and Traffic of Phagocytes between the Turbot Peritoneal Cavity and Lymphoid Organs.“ *Fish & Shellfish Immunology* 44 (2): 652-61. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.034>.
- Garduno, R.A., J.C. Thornton, and W.W. Kay. 1993. „Fate of the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida* in the Peritoneal Cavity of Rainbow Trout.“ *Canadian Journal of Microbiology/Revue Canadienne de Microbiologie* 39 (11): 1051-58.
- Granja, Aitor G. 2019. „Different IgM+ B Cell Subpopulations Residing within the Peritoneal Cavity of Vaccinated Rainbow Trout Are Differently Regulated by BAFF.“ *Fish & Shellfish Immunology* 85 (February): 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.003>.
- Havixbeck, Jeffrey J., Aja M. Rieger, Michael E. Wong, Jordan W. Hodgkinson, and Daniel R. Barreda. 2016. „Neutrophil Contributions to the Induction and Regulation of the Acute Inflammatory Response in Teleost Fish.“ *Journal of Leukocyte Biology* 99 (2): 241-52. <https://doi.org/10.1189/jlb.3H0215-064R>.
- Höpken, Uta E, Susann Winter, Ariel H Achtman, Kerstin Krüger, and Martin Lipp. 2010. „CCR7 Regulates Lymphocyte Egress and Recirculation through Body Cavities.“ *Journal of Leukocyte Biology* 87 (4): 671-82. <https://doi.org/10.1189/jlb.0709505>.
- Korytář, T., J. Jaros, M. Verleih, A. Rebl, G. Kotterba, C. Kühn, T. Goldammer, and B. Köllner. 2013. „Novel Insights into the Peritoneal Inflammation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).“ *Fish and Shellfish Immunology* 35 (4). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.032>.
- Parra, D., Aja M. Rieger, J. Li, Yong An Zhang, L. M. Randall, C. Hunter, D. R. Barreda, and J. O. Sunyer. 2012. „Pivotal Advance: Peritoneal Cavity B-1 B Cells Have Phagocytic and Microbicidal Capacities and Present Phagocytosed Antigen to CD4+ T Cells.“ *Journal of Leukocyte Biology* 91 (April): 525-36. <https://doi.org/10.1002/jlb.10031112.0001>.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Tomáš Korytář, Ph.D.**
Ústav akvakultury a ochrany vod


Konzultant diplomové práce: **MSc. Hung Tran Quang**
Ústav akvakultury a ochrany vod


Datum zadání diplomové práce: **21. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 738/II
389 25 Vodňany (2)


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan


doc. Ing. Jan Mráz, Ph.D.
ředitel

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce.....	10
3. Literární přehled	11
3.1 Biologická charakteristika candáta obecného	11
3.1.1 Význam candáta obecného na trhu	12
3.1.2 Potravní nároky	13
3.1.3 Růst	13
3.1.4 Rozmnožování candáta obecného.....	13
3.1.5 Morfologie a fyziologie dýchání.....	14
3.1.6 Intenzivní chov candáta obecného v recirkulačních systémech	15
3.1.6.1 Recirkulační systémy.....	15
3.1.6.2 Výhody a nevýhody chovu v recirkulačních systémech, faktory způsobující stres ryb a nepříznivé podmínky pro chov	16
3.1.7 Klíčové parametry kvality vody monitorované intenzivního chovu v RAS	17
3.1.7.1 Obsah kyslíku ve vodě.....	17
3.1.7.2 Dusík.....	18
3.1.7.3 Teplota.....	18
3.1.7.4 Intenzita světla v intenzivním chovu	19
3.2 Imunitní systém.....	20
3.2.1 Základní lymfatické orgány candáta a jejich funkce	21
3.2.1.1 Slezina	21
3.2.1.2 Hlavová ledvina.....	21
3.2.1.3 Thymus – brzlík.....	22
3.2.1.4 Peritoneální dutina.....	22
3.3 Charakterizace hlavních populací bílých krvinek a jejich efektorové funkce .	23
3.3.1 Myeloidní buňky	23
3.3.1.1 Agranulocyty	24
3.3.1.2 Granulocyty	26
3.3.2 Lymfocyty.....	28
3.4 Bakteriální onemocnění candáta obecného způsobené bakterií <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
3.4.1 Patogenita pro ryby	29
3.4.1.1 Erythrodermatitida.....	30

3.4.1.2	Skvrnitost ryb	30
3.4.1.3	Bakteriální rozpad ploutví	30
3.5	Model peritoneálního zánětu u ryb	31
4.	Materiál a metodika	33
4.1	Materiál pro testování	33
4.1.1	Získání a původ ryb pro experimenty	33
4.1.2	Podmínky uchování ryb pro testování	33
4.1.3	Testovaná skupina ryb-kontrolní skupina.....	33
4.1.4	Anestezie ryb	34
4.1.5	Testovaná skupina ryb – s peritoneální stimulací inaktivované bakterie <i>A. hydrophila</i>	34
4.2	Základní metodika.....	35
4.2.1	Eutanazie ryb	35
4.2.2	Odběr krve	35
4.2.3	Odběr orgánů-pitva ryb.....	36
4.2.4	Příprava buněčných suspenzí pomocí gradientové centrifugace	37
4.2.5	Příprava preparátů pro mikroskopické stanovení složení hlavních populací bílých krvinek	40
4.3	Vyhodnocení složení hlavních imunologických orgánů	42
4.3.1	Průtoková cytometrie	42
4.3.2	Světelná mikroskopie.....	43
4.3.3	Metoda vyhodnocení výsledků experimentu	43
5.	Výsledky	44
5.1	Poměr lymfocytů a myeloidních buněk ve zkoumaných orgánech	44
5.2	Popis dynamiky peritoneálního zánětu	45
5.2.1	Peritoneální dutina	45
5.2.2	Krev	50
5.2.3	Slezina.....	51
5.2.4	Hlavová ledvina	52
5.3	Vliv hypoxie na průběh akutního zánětu v peritoneu a ostatních lymfatických orgánech.....	53
5.3.1	Peritoneální dutina	53
5.3.2	Krev	57
5.3.3	Slezina.....	59
5.3.4	Hlavová ledvina	60
6.	Diskuze	61

7. Závěr	64
8. Použitá literatura	65
9. Seznam grafů, obrázků, tabulek.....	71
10. Abstrakt.....	73
11. Abstract.....	74

1. ÚVOD

Candát obecný je druhem ryby, u kterého intenzivní chov nemá dlouholetou tradici, ale její chov má v Evropě v budoucích letech velkou perspektivu. Jelikož jsou možnosti na zvýšení produkce candáta extenzivním způsobem v jezerech a rybnících značně omezeny, je jednou z velkých možností zvýšení produkce intenzivní chov v recirkulačních rybochovných zařízeních. Podmínky v těchto intenzivních chovech často způsobují stres, který v konečném důsledku může vést ke snížené obranyschopnosti ryb. To je způsobeno zejména působením negativních faktorů jako vysoká koncentrace ryb na daný objem (hustota obsádky), vysoká koncentrace metabolitů ve vodě, nedostatečná koncentrace kyslíku ve vodě. Chronický stres a snížená obranyschopnost vede k vyšší pravděpodobnosti výskytu nemocí a významným ekonomickým ztrátám v důsledku vysoké mortality. Po zákazu užívání antibiotik v chovech zvířat zůstává vakcinace ryb atraktivním způsobem prevence onemocnění chránící proti širokému spektru patogenů. Pro úspěšný vývoj preventivních opatření je však klíčová znalost imunitního systému daného druhu, včetně základního složení lymfatických orgánů a průběhu zánětlivé reakce. Imunitní systém u tradičních druhů ryb je předmětem výzkumu již několik desetiletí, ale informace o mechanismu imunitní odpovědi candáta jsou značně omezené.

Peritoneální zánět patří k základním imunologickým modelům, které umožňují studium různých aspektů imunitní odpovědi. V rámci této práce bude tento model využit ke studiu základních mechanismů imunitní odpovědi u candáta a k pochopení vlivu snížené hladiny kyslíku na průběh a rozsah imunitní odpovědi.

2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit dostupné informace o imunitním systému candáta obecného a usnadnit tak vývoj preventivních opatření pro jeho chov v akvakulturách. Za tímto účelem byla analyzováno složení jednotlivých populací bílých krvinek ve vybraných lymfatických orgánech, v břišní dutině a v krvi testovaných jedinců pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie. Analýza byla provedena jak u zdravých jedinců v klidovém stavu, tak v průběhu akutního zánětu vyvolaného peritoneální injekcí modelového antigenu, *Aeromonas hydrophila* do peritoneální dutiny.

V první části diplomové práce bude popsáno složení základních lymfatických orgánů, rezidentní populace peritoneálních lymfocytů a krve u zdravých ryb. Následně bude po indukci experimentálního zánětu sledován průběh akutní fáze imunitní reakce v prvních třech dnech po injekci modelového antigenu *Aeromonas hydrophila* s cílem otestovat, zda imunitní reakce probíhá stejně jako u ostatních druhů ryb. Ověřují se buněčné poměry lymfoidních a myeloidních populací leukocytů v základních lymfatických orgánech, slezině a hlavové ledvině, stejně jako složení krve.

V druhé části práce bude testována hypotéza, že hypoxie (snížená koncentrace kyslíku) má vliv na průběh zánětlivé imunitní reakce v peritoneální dutině candáta obecného. To znamená, že bude porovnán průběh rozdílnosti imunitní reakce ve stavu normoxie a hypoxie.

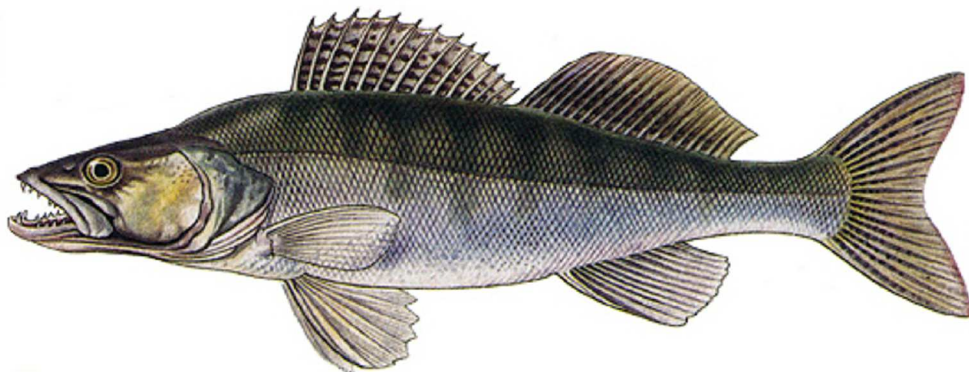
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 BIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA CANDÁTA OBECNÉHO

Candát obecný je jedna z nejnámějších sladkovodních dravých ryb nejen v České republice, ale v Evropě vůbec. Candát patří do čeledě okounovitých. Hlava je štíhlá, protáhlá a přechází v lehce vyklenutý hřbet. Obývá dolní části řek, větší jezera se šterkopískovým dnem. Jedná se o poměrně choulostivou rybu, která má vysoké nároky na kvalitu vody a obsah rozpuštěného kyslíku. Tento faktor se projevuje při úhynech obsádky, kdy právě tato ryba kyslíkovému deficitu podléhá jako jedna z prvních, je také velmi citlivá na nešetrné zacházení, především díky ktenoidním šupinám a kostěným paprskům hřbetní ploutve (Saulamo et al., 2005).

Candát je masožravá (karnivorní) ryba s dvoufázovou denní aktivitou. Nejčastější vyhledávání a příjem potravy je pozorován za soumraku a v ranních hodinách. Potravu vyhledává pomocí zrakového ústrojí, které je adaptováno pro viditelnost za nižší světelné intenzity. Adaptace zrakového ústrojí je způsobena přítomností velkého počtu jemných buněk – tyčinek, které jsou světločivné. Oko candáta na vnitřní straně obsahuje barvivo guanin, to způsobuje intenzivnější odraz světla, které dopadá na oko. Tímto dochází k většímu dráždění světločivných buněk. Na venek se to u candáta projeví světloujícím okem (Saulamo et al., 2005).

Candát žije většinou v hejnech, kde se vyskytují jedinci podobné velikosti a stejného věku. Velcí jedinci žijí samotářsky (Saulamo et al., 2005).

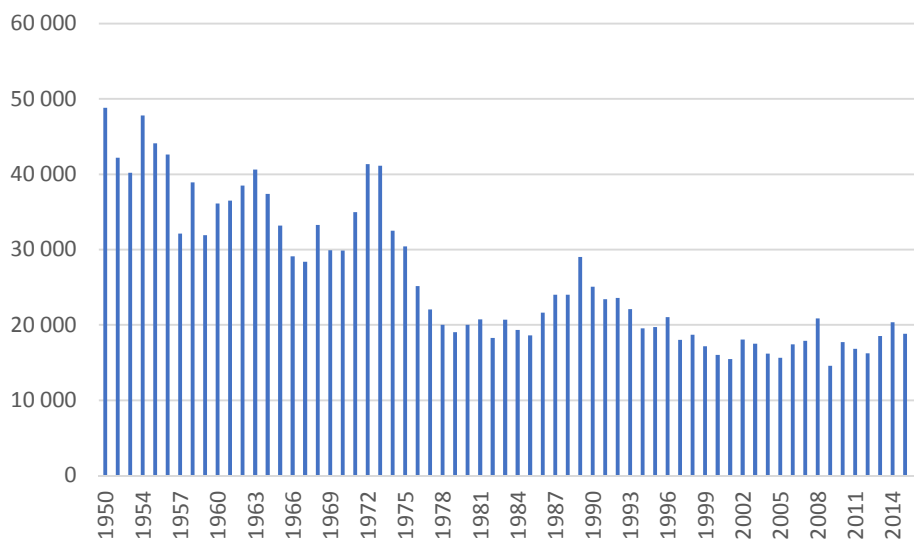


Obrázek 1: Candát obecný

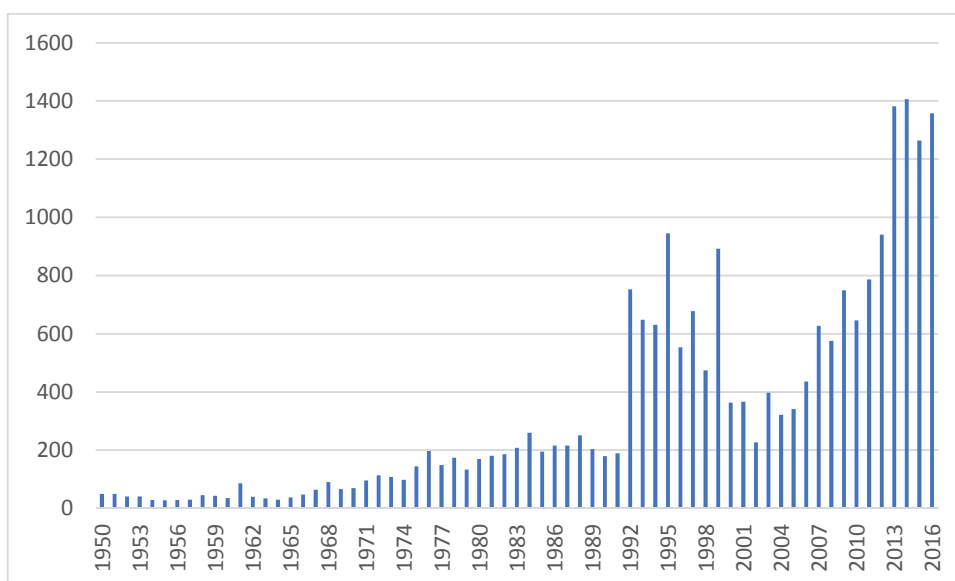
(Zdroj:(Skupina rybářů Odry, 2019))

3.1.1 Význam candáta obecného na trhu

Candát obecný (*Sander lucioperca*) je hospodářsky významná dravá ryba a patří mezi nejvýznamnější druhy ryb v České republice, co do potřeb sportovního rybolovu, avšak v dnešní době je oblíbený i pro jeho atraktivitu v oblasti gastronomie a potravinářství. V gastronomii je oblíben pro kvalitu svého masa. Candát nemá mezisvalové kosti, což zvyšuje jeho atraktivitu u spotřebitelů. Maso candáta není příliš tučné (0,2 až 0,6 % tuku), tuk se ukládá v hojném množství zejména kolem jeho střev (Frisk et al., 2012).



Graf 1: Světová produkce candáta obecného (t) (Zdroj: (Fao, 2009))



Graf 2: Světová akvakulturní produkce candáta obecného (Zdroj: (Fao, 2009))

3.1.2 Potravní nároky

Potravní nároky se mění v souvislosti s růstem a vývojem candátů. Plůdek do stáří přibližně jednoho roku se v extenzivním chovu živí výhradně živočišnou potravou-zooplanktonem, jehož součástí jsou například perloočky, buchanky a vířníci. U candátů se poměrně brzy vyskytuje kanibalismus, a to již při dosažení velikosti cca 12 mm (Balík et al., 2011). Větší jedinci požírají larvy hmyzu: komárovití (*Culicidae*), pakomárovití (*Chironomidae*), jepice (*Ephemeroptera*), chrostíky (*Trichoptera*) a rybí plůdek až postupně přechází na lov větších ryb, a to úměrně s rostoucí délkou candáta se zvětšuje jejich kořist (Harnisz a Tucholski, 2010).

V intenzivních chovech se k výkrmu juvenilních ryb až do tržní hmotnosti nejčastěji využívá granulované krmivo.

3.1.3 Růst

Candát obecný se většinou v našich zeměpisných podmínkách dožívá věku cca 10 let.

Tabulka 1: Růst candáta v rybničním prostředí

Věk ryby	Délka	Hmotnost
1.rok	80-150 mm	10-15 g
2.rok	200-300 mm	250-500 g
3.rok	300-350 mm	500-1000 g

Aby candát přirostl o 1 kg své hmotnosti, musí zkonzumovat 3-6 kg jiných ryb. V přírodních podmínkách ročně přijme candát množství potravy ekvivalentní 200-250 % vlastní hmotnosti těla) (Lusk et al., 2004; Peňáz et al., 1996).

Průměrná hmotnost tržních ryb se pohybuje v rozmezí 0,8-3 kg.

3.1.4 Rozmnožování candáta obecného

Pohlavní dospělost candáta v ČR je ve věku 3-4 let. Samci, mlíčáci, dospívají i o rok dříve než jikernačky. Přirozený výtěr probíhá nejčastěji v období do konce dubna až května, kdy teplota vody dosahuje 12-16 °C. V nádržích vyhledává vhodné trdliště, jako vegetací porostlá místa a kořeny vodních rostlin.

Samec vyčistí část dna od nánosů pro naklazení jiker. Po naklazení a oplodnění jiker samec hlídá výtěrové hnízdo a přihání na jikry čerstvou vodu. Péče candáta o oplodněné jikry se využívá při poloumělém výtěru (Šustova metoda). Rybám se předkládají umělé

vytvořená hnízda z větviček, tato hnízda s jikrami jsou v pokročilém stádiu vývoje přenášena do chovných rybníků. Množství jiker je u candáta od 40 000 do 900 000 kusů a u jikernaček nad 10 kg, může být počet ještě vyšší (Kucharczyk et al., 2007).

Relativní průměrná plodnost jikernačky se pohybuje 150 000–200 000 jiker na kilogram hmotnosti ryby. Velikost jiker dosahuje 0,84–1,08 mm. Barvu mají špinavě zelenou (Peňáz et al., 1996). Inkubační doba jiker bývá 120-150 °D (Tolonen et al., 2003).

Umělý výtěr je metoda zcela závislá na provedených krocích chovatele. Generační ryby jsou odděleny v manipulačních rybnících, kde je sledována teplota a připravenost ryb k výtěru. Výtěr generačních ryb je synchronizován pomocí hormonálních preparátů (kapří hypofýza, Ovopel aj.). Jikry se vytírají do misek. Následně je provedeno osemenění a oplodnění, dále se tyto jikry nasazují do inkubačních zařízení.

3.1.5 Morfologie a fyziologie dýchání

Dýchání u ryb zajišťuje aparát, zvaný vnitřní žábry, které jsou umístěny v žaberní dutině. Ochranu žaberního aparátu zabezpečuje speciální kryt, neboli skřelová víčka. Vnitřní žábry se skládají ze čtyř žaberních oblouků, kde každý oblouk má dvě řady žaberních lístků, které jsou tvořeny žaberními destičkami. Pátý žaberní oblouk je zakrnělý. Počet žaberních destiček je v řádu desítek tisíc a tím tvoří velký dýchací prostor. U dravých ryb obecně tento počet žaberních destiček je vyšší. Ke čtyřem žaberním obloukům je vždy samostatně přivedena tepna, která zabezpečuje přívod okysličené krve ze srdce. K žaberním lístkům vedou vždy 2 cévy – první tepna slouží jako přívod krve do každého lístku, po okysličení krve je krev sbírána do druhé odvodné tepny. Z tohoto místa je krev rozváděna po celém těle. V žábrách dochází pomocí dýchání k okysličení krvinek pomocí kyslíku, který je rozpuštěn ve vodě. Kyslík přechází do krve pasivní difúzí (transport plynu z míst s vyšší koncentrací do míst s nižší koncentrací). Při výměně kyslíku a oxidu uhličitého, se oxid uhličitý vyloučí. Žábra se musí pravidelně proplachovat čerstvou vodou. Ryba nasává ústy čerstvou vodu, která je bočním tlakem transportována přes žábry a skřelovými víčky je vylučována ven z těla. Při zvýšené teplotě vody se dýchací procesy zrychlují, při nízké zpomalují (Peňáz et al., 1996).

3.1.6 Intenzivní chov candáta obecného v recirkulačních systémech

3.1.6.1 Recirkulační systémy

Jak již bylo uvedeno v úvodní kapitole, jednou z možností zvýšení produkce candáta obecného je intenzivní chov v recirkulačních systémech.

Recirkulační systémy jsou speciální produkční systémy pro chov ryb, případně i dalších druhů vodních živočichů, ve kterých je voda z odchovných nádrží po mechanickém čištění a snížení obsahu amoniaku znovu využita. Recirkulační akvakulturní systémy charakterizuje vysoká produkce z jednotky plochy, nízké požadavky na množství přítokové vody a omezený objem vypouštěných znečišťujících látek z RAS. Chov v recirkulačních systémech je založen na výživě chovaných ryb pomocí dodávaných krmných směsí o komplexním složení, kde jsou zohledněny nutriční a jiné požadavky pro jednotlivé druhy a velikosti ryb.

Intenzivně chované a zároveň krmené ryby spotřebovávají dýcháním kyslík a do vody vylučují nestrávené zbytky krmiv ve formě exkrementů a produktů látkové výměny. Tyto produkty tvoří zejména amoniak a oxid uhličitý, v malém množství pak močovina. Pokud chovatel nevhodně zvolí techniku krmení, může dojít i v recirkulačním systému i ke znečištění zbytky nezkonsumovaných krmiv.

Čištění vody v RAS je založeno v odstraňování nerozpuštěných látek exkrementů a zbytků krmiv pomocí mechanické filtrace nebo sedimentace případně flotace. Druhá část čištění vody je založena na přeměně amoniaku rozpuštěného ve vodě prostřednictvím biologických nitrifikačních filtrů na dusičnany přes dusitany. V některých případech u vysoce sofistikovaných systémů další krok biologické filtrace, který se nazývá denitrifikace. Při denitrifikaci se dusičnany v anaerobním prostředí přeměňují na plynný dusík, který se uvolňuje do atmosféry. Úprava vody zahrnuje i proces odplynění, čímž se sníží obsah rozpuštěného oxidu uhličitého (případně přebytečného elementárního dusíku) ve vodě, úpravu pH, zvýšení obsahu ve vodě rozpuštěného kyslíku pomocí aerace nebo oxygenace. Může být zařazena i desinfekce vody pomocí ozonizace nebo UV záření a v neposlední řadě je třeba regulovat úprava teploty vody. Chlazení vody v systému pro chov candáta je využíváno jen výjimečně (Lawson, 2013).

Cirkulace vody je zabezpečována čerpáním pomocí klasických oběžných čerpadel (u vertikálních RAS) nebo tzv. airliftů (u horizontálních RAS). Objem přítoku vody do systému se pohybuje v rozmezí 1-5 (10) % celkového aktuálního průtoku v systému.

Voda se do RAS doplňuje z důvodu odparu, náhradě ztrát vody způsobených technologickými zákroky (odkalení chovných nádrží, sedimentačních zařízení, mechanických a biologických filtrů aj.). Doplnování vody může být využíváno i k naředění a tím i snížení obsahu dusičnanů, pokud by kapacita filtrů byla nedostatečná, nebo v případě, že by RAS systém nebyl součástí systému denitrifikace. Pro doplnění vody je vhodná voda podzemní, případně i z vodovodního systému. Použití povrchové vody zpravidla není vhodné.

Nejvýznamnější rozvoj a využití recirkulačních akvakulturních systémů je v USA, Izraeli, Holandsku a Dánsku. Intenzivní RAS různých typů jsou hojně využívány v zejména v Evropě a v Severní Americe, a to nejen pro lososovité ryby (Rasmussen et al., 2007), ale i pro dravé ryby.

Odhadovaná roční produkční roční kapacita v ČR ve zprovozněných RAS v současnosti nepřesahuje 500 tun. V budoucnosti je možné využití recirkulačních systému v ČR nejen pro produkci studenomilných druhů, tzn. násadových i tržních lososovitých ryb, tak celé řady dalších druhů ryb. Patří mezi ně jeseterovité i dravé druhy ryb, zejména candát aj.

Vysoké vstupní investice při výstavbě RAS může v současnosti významně kompenzovat současná dotační politika v sektoru zemědělství a rybářství (Martins et al., 2010).

3.1.6.2 Výhody a nevýhody chovu v recirkulačních systémech, faktory způsobující stres ryb a nepříznivé podmínky pro chov

Recirkulační akvakulturní systémy pro chov ryb jsou charakteristické vysokou hustotou obsádky ryb v relativně malém množství vody v systému. Udržení vhodných podmínek v celém recirkulačním rybochovném zařízení je velice náročné. Zásahy, které se v systému provedou, mohou způsobit rychlou odezvu v projevu změn fyzikálně-chemických parametrů. Těmito změnami může dojít k ohrožení obsádky ryb.

Tabulka 2: Výhody a nevýhody chovu v recirkulačních systémech (Zdroj: (Buřič et al., 2016)

Výhody RAS	Poznámky
Rozšiřování druhové pestrosti ryb	Zajištění celoročních dodávek tržních ryb
Chov okrasných ryb	
Eliminace negativního vlivu rybožravých predátorů	V případě zastřešených objektů
Produkce malého množství odpadní vody	
Relativně malá závislost na vnějším prostředí	
Lepší možnosti léčení při vzniku onemocnění	
Minimalizace rizika úniku chovaných ryb (možnost chovu nových exotických druhů)	Možnost chovu nových exotických druhů
Vysoký stupeň tzv. bezpečnosti potravin	
Využitelné ve všech klimatických podmínkách	
Nevýhody RAS	Poznámky
Sociální stres	Vysoká koncentrace ryb na daný objem
Chemický stres	Vysoká koncentrace metabolitů ve vodě, popř. nedostatečná koncentrace kyslíku ve vodě
Rychlé šíření infekce v RAS	Možné rozšíření nemocí prostřednictvím cirkulující vody
Stálý odběr elektrické energie	Nutný záložní zdroj elektrické energie v případě výpadku
Vysoké vstupní investice	
Odborné nároky na personál	

3.1.7 Klíčové parametry kvality vody monitorované intenzivního chovu v RAS

3.1.7.1 Obsah kyslíku ve vodě

Jak již bylo zmíněno, candát obecný patří do skupiny ryb s velkou citlivostí na kvalitu vody a na obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě. Koncentrace kyslíku ve vodě je závislá na teplotě vody, organickém znečištění vody, intenzitě světla a množství organismů, které jsou schopné procesu fotosyntézy. V přirozeném chovu v přírodě se kyslík do vody dostává fotosyntézou, difúzí z atmosféry nebo prokysličováním vody na přítoku. V akvakulturním chovu se obsah rozpuštěného kyslíku upravuje technologickou úpravou např. využitím různých filtrů, airliftů apod. Při intenzivním chovu je aktuální zvýšená spotřeba kyslíku z důvodu vysoké obsádky, zvýšeného metabolismu ryb, intenzivním kmením a s tím souvisejícími rozkladnými procesy krmiva a výkalů. Z tohoto důvodu se do systému dodává čistý kyslík z tlakových lahví či zásobníku procesem oxygenace. Druhým způsobem je transport atmosférického vzduchu do vody pomocí kompresorů či dmychadel pomocí aerace (Pihu et al., 2004). Optimální koncentrace kyslíku pro candáta se pohybuje v rozmezí 8 až 10 mg · l⁻¹. Při teplotě vody 21-22 ° C, což znamená 80-95 % nasycení. Kritická koncentrace je při poklesu kyslíku pod 3 mg · l⁻¹ (pod 60 % mg · l⁻¹ kyslíku při teplotě 21-22 ° C), kdy dochází k dušení až úmrtí ryb (Steinberg et al., 2018).

3.1.7.2 Dusík

Důležitý parametr zejména u intenzivního chovu. Formy dusíku, které při chovu ryb sledujeme je amoniak, nedisociovaný (NH_3 , toxická forma) a disociovaný (NH_4^+ , netoxická forma). Stěna živočišných buněk je pro ionty NH_4^+ jsou téměř nepropustné, NH_3 proniká přes buněčnou stěnu snadno, z tohoto důvodu je pro ryby toxický. To, jaký je obsah disociovaného amoniaku a nedisociovanou formou amoniaku, závisí na teplotě vody a hodnotě pH (Rongved, 2016).

Amoniak je odpadní produkt metabolismu dusíku a z těla ryby se vylučuje přes žábra do vody koncentračním spádem. Proto se v akvakulturách typu RAS používá pro redukcí toxické formy amoniaku tzv. biologická filtrace (přítomnost nitrifikačních bakterií a přeměna toxické formy amoniaku na dusitany a dále na dusičnany) (Schram et al., 2014).

Dále je v akvakulturách monitorována přítomnost dusitanů a dusičnanů. Dusitany jsou pro ryby toxické, neboť se navazují na hemoglobin. Tímto dochází ke vzniku methemoglobinu a tím se snižuje transportní kapacita krve pro kyslík. V intenzivních chovech může vyšší obsah NO_2^- působit letálně (např. při nedostatečné kapacitě biologického filtru), v přírodě se otrava dusitany téměř nevyskytuje, jelikož dochází ke snadné oxidaci dusitanů pomocí nitrifikačních organismů. Nebezpečí otravy dusitany je možné redukovat přidávkem NaCl ($0,3 - 3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) do vody. Dusičnany nejsou pro ryby toxické (Endut et al., 2014).

3.1.7.3 Teplota

Parametr teploty patří mezi významné fyzikální vlastnosti vody. Teplota ovlivňuje životní děje, příjem potravy, rozmnožování, dále rychlost biochemických procesů a reakcí života ryb a vodních organismů. Teplota má souvislost i s koloběhem látek ve vodě, velký význam má v souvislosti s rozpustností kyslíku ve vodě. Při vyšších teplotách dochází u ryb i k vyšší pohybové a trávicí aktivitě, a to se odráží i na zvýšené spotřebě kyslíku (Lawson, 2013). Optimální teplota pro chov candáta obecného je 21-24 °C v RAS 23-28 °C.

3.1.7.4 Intenzita světla v intenzivních chovu

Candáta obecný se vyznačuje dvoufázovou soumráchnou nebo noční aktivitou (Peňáz et al., 1996). V intenzivních chovech doporučuje se kompletní zastínění nádrže kromě krmných míst (Luchiari et al., 2006).

Tabulka 3: Kvalitativní parametry vody a produktivita systému při produkci candáta obecného v RAS

Parametr	Hodnota
Teplota	23-28 °C
Požadavek na obsah kyslíku (na odtoku) %	min 60-70 % (na odtoku)
Amoniak	11,2 mM · l ⁻¹
Oxid dusitý	3,4 mM · l ⁻¹
Oxid uhličitý	< 15 mg · l ⁻¹
Intenzita světla	20-50 Lx
Růst	12 měsíců 10-700 g
Biomasa	60 kg · m ⁻³
Produktivita systému	0-60 kg · m ⁻³ za rok
Přežití	50-80 %
Krmný koeficient	1 (u ryb do 1 kg), 1,3 (u větších)

3.2 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je souhrn mechanismů zajišťující celistvost organismu rozeznáváním a likvidací vlastních, cizích či potenciálně škodlivých buněk. (Murphy a Weaver, 2016).

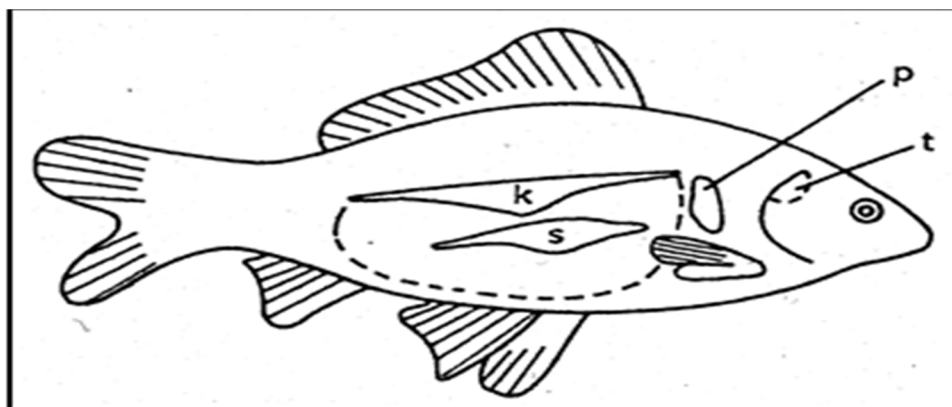
Základní rozdělení imunity je na imunitu vrozenou a získanou. Vrozená imunita zahrnuje jak buněčnou, tak humorální složku a představuje první obranu linii proti infekci (Hansen a Zapata, 1998; Zapata et al., 2006). Principem vrozené imunity je, že její buňky svými receptory rozeznávají molekuly na povrchu patogenů. Reakce vrozené imunity je okamžitá a velice dynamická. Reakce vrozené imunity se účastní zejména buňky schopny pohltit (fagocytovat) cizorodé částice, jako jsou makrofágy a neutrofilie (Murphy a Weaver, 2016).

Získaná imunita vstupuje do hry v pozdější fázi infekce, kdy antigeny aktivují přes specifické antigenní imunoreceptory příslušné klony T a B lymfocytů. Klony T-lymfocytů se začnou dělit a během tří až sedmi dnů dochází k zahájení účinné imunitní odpovědi. Získaná imunita má tu výhodu, imunitní paměti. To znamená, že při opakované infekci stejným patogenem je imunitní odpověď tím silnější a rychlejší. Získanou imunitu, jako známe u člověka, poprvé sledujeme u ryb (Parra et al., 2013; Sunyer, 2013) Hlavními buňkami jsou B-lymfocyty, které produkují protilátky, a T-lymfocyty, představující složku buněčné imunity (Murphy a Weaver, 2016).

3.2.1 Základní lymfatické orgány candáta a jejich funkce

Orgány imunitního systému

Hlavními lymfatickými orgány jsou u kostnatých ryb slezina, hlavová ledvina a thymus. Ryby na rozdíl od savců nemají kostní dřeň a lymfatické uzliny, velké množství lymfatických buněk se také nachází ve sliznici střeva.



Obrázek 2: Lymfatické orgány ryby (k-ledvina, p-hlavová ledvina, s-slezina, t-thymus)

(Zdroj: (Hyršl, 2017))

3.2.1.1 Slezina

Slezina je orgán, ve kterém dochází k vychytávání a destrukci opotřebovaných červených krvinek. Má klíčovou roli pro vývoj adaptivní imunitní odpovědi., zejména jako hlavní místo, kde se shromažďují buňky celého imunitního systému (Magnadottir, 2006).

Slezinná tkáň je rozdělena na červenou pulpu, v jejíž okách retikula se vyskytují fixní a volné makrofágy, monocyty, lymfocyty, plasmatické buňky a krevní elementy, a na bílou pulpu, tvořící pochvy okolo tepen, které obsahují T a B-lymfocyty.

V průběhu imunitní odpovědi dochází ve slezině ke zvýšení počtu dělících se lymfocytů, zvýšení počtu mladých plasmatických buněk (Manning a Nakanishi, 2008).

3.2.1.2 Hlavová ledvina

Ledviny ryb začínají téměř u srdce a táhnou se až do koncové části tělní dutiny, nacházející se v dorzální části pod páteří. Ledviny, většiny kostnatých ryb, jsou rozděleny na dvě části – na přední (hlavovou) část a na střední (trupovou) část.

Histologická struktura těchto orgánů je analogická kostní dřeni. Hlavová část ledvin není místem sekrece, ale její hlavní funkce spočívá v hematopoéze. Jedná se tedy o orgán s analogickou funkcí jako kostní dřev u savců. Lymfatickou tkáň najdeme v přední i zadní části ledvin, ve které dochází k zachytávání, zpracování, prezentaci antigenu v melanomakrofágových centrech a hraje velmi důležitou roli v produkci protilátek (Press, 1999; Zwollo et al., 2010). Přední část, nacházející se nad úrovní srdce, obsahuje krvetvornou tkáň a také je i tkání s endokrinní funkcí, jelikož ryby postrádají nadledviny. Střední část, probíhající pod páteří, je tvořena exkretční tkání.

3.2.1.3 Thymus – brzlík

Thymus ryb je lymfatickým orgánem, který je založen jako jeden z prvních. Vyvíjí se z žaberních štěrbin a není kompaktním orgánem, ale má podobu párových váčků, které jsou roztroušeny v žaberní dutině. Tyto váčky se u některých ryb spojují v celistvý útvar. Brzlík je složen z kůry a dřevě, avšak tyto dvě složky jsou od sebe téměř nerozeznatelné (Laing a Hansen, 2011; Press a Evensen, 1999). Thymocyty (lymfocyty) se nacházejí v síti epiteliálních a retikulárních buněk. Větší množství thymocytů se nalézá v oblasti kůry. Brzlík je jako první osidlován lymfocyty, v průběhu stáří zaniká. Jeho funkce je založena ve tvorbě, vyzrání a transportu zralých T lymfocytů do krevního oběhu a do dalších orgánů lymfatického systému. Je hlavním řídicím orgánem transplantační imunity a humorální odpovědi vůči antigenům závislých na T-buňkách. Brzlík je citlivý na přítomnost stresu a bylo prokázáno jeho zanikání při odchytu a transportu ryb (Manning a Nakanishi, 2008).

3.2.1.4 Peritoneální dutina

Peritoneální dutina obsahuje rezidentní leukocyty, které v sobě zahrnují jedinečnou směs makrofágů, monocytů, neutrofilů a lymfocytů, které brání tělesnou dutinu. Poměr mezi lymfocyty a myeloidními buňkami je druhově specifický a informace o jejich složení, zastoupení jednotlivých buněk a funkční odezvě na patogeny u některých druhů zcela chybí (Korytář et al., 2013; Murphy a Weaver, 2016).

Přestože důsledky různého složení rezidentních leukocytů zůstávají nejasné, stimulace (např. inaktivovanými bakteriemi) indukují rychlou reakci a u všech druhů rekrutují během několika hodin velký počet buněk myeloidního původu (Afonso

et al., 1997). Myeloidní buňky jsou velmi důležitým prvkem peritoneální dutiny, jelikož disponují prostředky nezbytnými k eliminaci patogenů, včetně fagocytózy, produkce reaktivního kyslíku či cytotoxické aktivity. Jakmile je stimulát vyčištěn, počet myeloidních buněk klesá, a tyto buňky jsou nahrazeny lymfocyty, které iniciují adaptivní imunitní odpověď (Korytar et al., 2013).

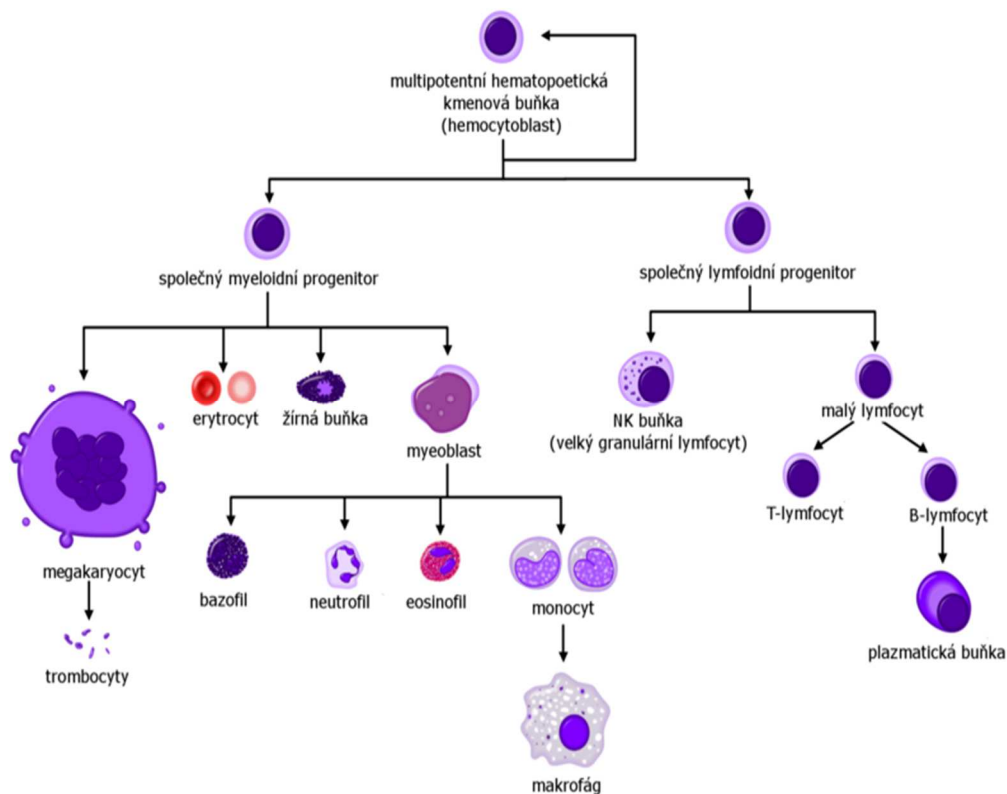
3.3 CHARAKTERIZACE HLAVNÍCH POPULACÍ BÍLÝCH KRVINEK A JEJICH EFEKTOROVÉ FUNKCE

Buňky, jež se nachází v krevním řečišti, vykonávající imunitní reakce, označujeme jako leukocyty-bílé krvinky. Jejich název je odvozen od bílé vrstvy, které formují během centrifugace krve. Jedná se o buňky se schopností pronikat do okolních tkání, kde chrání organismus před napadením mikroorganismy tak, že vyvolávají imunitní reakci a pohlcují pevné částice z okolního prostředí (Amler et al., 1986).

Počet bílých krvinek kolísá v průběhu dne. Za fyziologických podmínek nastává pouze mírná diference v počtu leukocytů, větší úbytek nebo zhoršení počtu jen za chorobných stavů. Počty imunitních buněk jsou závislé na prostředí, ve kterém se daný živočich pohybuje. Leukocyty rozdělujeme na dvě hlavní skupiny, myeloidní buňky a lymfocyty.

3.3.1 Myeloidní buňky

Multipotentní hematopoetická kmenová buňka vytváří dva typy progenitorů – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního progenitoru vznikají buňky myeloidní řady zahrnující skupiny agranulocytů, mezi něž řadíme monocyty, makrofágy, dendritické buňky, trombocyty a endoteliální buňky, a směs granulocytů, zahrnující neutrofilů, eozinofilů, bazofilů a žírné buňky (Akashi et al., 2000).



Obrázek 3: Schéma hematopoézy (Zdroj: (Koichi Akashi, 2000))

3.3.1.1 Agranulocyty

Agranulocyty jsou skupinou bílých krvinek, které neobsahují specifická barvitelná granula, ale azurofilní granula. Mezi agranulocyty řadíme monocyty, makrofágy, trombocyty, dendritické buňky a endoteliální buňky. Jedná se o buňky, které mají nezaměnitelnou roli prvních fází imunitní odpovědi, díky své schopnosti fagocytózy a produkce antibakteriálních proteinů. (Amler et al., 1986).

Monocyty a makrofágy

Monocyty jsou největší buňky periferní krve, které často obsahují jádro s ledvinovitým výkrojem. Cytoplasma obsahuje jemná, azurofilní granula, která lze rozlišit světelným mikroskopem. Jedná se o buňky schopny fagocytovat, resp. pohlcovat a zpracovat cizí, nefunkční, mrtvé či nemocné buňky (Magnadottir et al., 2005).

Prostupují cévní stěnou do nejrůznějších tkání, kde dochází k jejich metamorfóze na makrofágy, které zabezpečují imunitní reakci, jsou schopny fagocytózy, řídí hemopoézu, hemostázu, hojení ran, regulují zánět a eliminují mikroorganismy. Makrofágy jsou typické svým jedním, nesegmentovaným jádrem. Podle toho, v jakých tkáních se

nacházejí, je jinak nazýváme (Masarykova Univerzita, 2016). Mezi tkáňové makrofágy řadíme např. Kupfferovy buňky, histiocyty, mikroglie či osteoklasty. K metamorfóze monocyту na makrofága dochází v několika krocích – dojde ke zvětšení velikosti buňky, zvýší se počet lyzozomů, receptorů pro imunoglobulin a nakonec se zvýší jeho schopnost fagocytózy (Amler et al., 1986).

Trombocyty

Trombocyty, neboli krevní destičky, jsou bezjaderné formované krevní elementy, které mají nezastupitelnou úlohu při zástavě krvácení. Krevní destička savců je bezjaderné tělíčko se schopností přilnavosti (adhezivity) a shlukování se (agregaci), které se podílí na procesu zástavy krvácení a srážení krve. U ostatních obratlovců jde o jadernou buňku (koagulocyt) (Masarykova Univerzita, 2016). U ryb přítomnost jádra pravděpodobně souvisí s tím, že jsou schopny se aktivně podílet na imunitní odpovědi. Účastní se pohlcování (fagocytózy) a jsou schopny prezentovat antigen (Nagasawa et al., 2014).

Dendritické buňky

Tyto buňky jsou typické svými membránovými výběžky (dendrity), které umožňují kontakt s ostatními buňkami. V periferním oběhu je jejich zastoupení malé, menší než výskyt bazofilů, obvykle do 1 %. Mají nepravidelné jádro, jež obsahuje malá jádérka. V cytoplasmě se vyskytuje velké množství mitochondrií, na druhou stranu obsahují menší množství lyzozomů, ribozomů a endoplazmatické retikulum také není příliš vyvinuté (Lugo-Villarino et al., 2010).

Nezralé dendritické buňky jsou vybaveny receptory, které usnadňují kontakt s bakteriálními agens. Membránové receptory umožňují fagocytózu, dále makropinocytózu.

Dendritické buňky jsou nejdůležitější antigen prezentující buňky, které mají schopnost stimulovat nativní T a B buňky a regulovat tak imunitní odpověď organismu. Jsou rozmístěny téměř ve všech tkáních organismu, nejvíce v kůži. Pohlcují antigeny a následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde zpracovaný antigen prezentují T buňkám, čímž je umožněn rozvoj účinné imunitní odpovědi (Masarykova Univerzita, 2016), (Lugo-Villarino et al., 2010).

3.3.1.2 Granulocyty

Granulocyty jsou druhy bílých krvinek, které ve své cytoplasmě obsahují granula, jež jsou barvitelná kyselými či bazickými komponenty barvicí směsí dle Pappenheima. Jedná se o buňky, které mají velmi proměnlivé (polymorfní) jádro, často bývají označovány jako polymorfonukleární leukocyty, které je většinou třísegmentové (výjimka je u eozinofilů). Jejich schopností je tvorba proteolytických enzymů a pohlcování (fagocytóza). Granulocyty jsou rozděleny do tří skupin-neutrofilů, eozinofilů a bazofilů (Magnadottir, 2006).

Neutrofilů

Buňky, u nichž jsou barvitelná granula v cytoplasmě z jedné třetiny zastoupena jako azurofilní granula, ze dvou třetin jako granula specifická. Specifická granula jsou barvitelná jen slabě kyselými a bazickými barvivy. Absence drsného endoplasmatického retikula a jadérek naznačuje nízkou úroveň proteosyntézy. V cytoplasmě se vyskytuje glykogen-látka umožňující přežití neutrofilů i za anaerobních podmínek a vykonávat tak své imunologické funkce.

Jedná se o terminální stádia buněk, které žijí v oběhu jen 6-7 hodin. V tkáních přežijí i 1-4 dny bez ohledu na to, zda fagocytují či nikoliv. Hlavním úkolem neutrofilů je fagocytóza částic bez následné prezentace antigenu, probíhající v několika krocích: Prvním krokem je adherence a chemotaxe a průnik neutrofilů do tkání v gradientu chemotaxických faktorů jako anafylatoxiny C5a, C3a, C4a, IL-8, platelet activating factor, složky bakteriálních povrchů aj. Druhým krokem je fagocytóza, která představuje pohlcování pevných částic z okolního prostředí. Třetím krokem je degranulace, která spočívá v likvidaci pohlcené částice zprostředkované na základě vylití obsahu granul do fagolysosomu. Za určitých podmínek dochází k vylití obsahu granul do extracelulárního prostředí, je-li proces masivní, často vede k významnému poškození tkání v průběhu infekce. V důsledku nízké proteosyntézy se nová granula tvořit nemohou (Hansen a Zapata, 1998; Magnadottir, 2006; Uribe et al., 2011).

Eozinofily

Eozinofily jsou terminální stádia buněk, u nichž jsou, jako u neutrofilů, mitochondrie, endoplasmatické retikulum a Golgiho komplex, málo vyvinuty. Tyto buňky jsou větší než neutrofilů. Jejich typickým znakem je dvousegmentové jádro.

Granula v cytoplasmě jsou větší než u neutrofilů, a jejich velikost je hlavním rozpoznávacím znakem. Barví se eozinem cihlově červené. Granula obsahují bílkovinu s výrazným zastoupením argininu, což je hlavní bazický protein.

Jedná se o buňky s typickým výskytem ve tkáních, v periferním krevním oběhu se vyskytují méně. Jejich životnost je v rádech hodin je cca 6-12 hodin, v pojivové tkáni přežijí i několik dní. Jsou schopny fagocytovat, ale v menší míře, než jsou toho schopny neutrofilů.

Hlavními receptory eozinofilů jsou receptory pro imunoglobuliny IgE a IgG, z nichž z funkčního hlediska je nejdůležitější receptor pro IgE. Dále se na eozinofilech vyskytují receptory pro komplement, které jsou přítomny jen u některých buněk.

Hlavní funkcí eozinofilů je boj s endoparazity, zejména s mnohobuněčnými helminty, které parazitují ve tkáních. V průběhu imunitní reakce dochází ve tkáni ke kontaktu většího zastoupení eozinofilů s parazitem. Látky uvolněné z granul eozinofilů do extracelulárního prostředí přímo narušují tkáň parazita (Masarykova Univerzita, 2016).

Bazofily

Buňky, které se v periferní krvi vyskytují jen velmi málo. Jádro je méně kondenzované narozdíl od jiných granulocytů, bývá esovitého tvaru, které je často překryto granulemi, jež se barví zásaditými složkami barvicí směsi.

Hlavním komponentem granul je histamin a heparin, takže se uplatňují při vazodilataci a koagulaci. Žijí několik dnů, maximálně týden.

Nejdůležitějším receptorem bazofilů je vysoko afinní FcεR receptor. Bazofily vykazují řadu podobností s žírnými buňkami, které se v minulosti označovaly jako tkáňové bazofily. Vyskytují se pouze v krevním oběhu (Masarykova Univerzita, 2016).

Žírné buňky

Žírné buňky se vyskytují v oblasti tzv. imunologických bariér – v místech, kde dochází ke kontaktu vnějšího a vnitřního prostředí – v kůži, na sliznicích dýchacího a trávicího traktu a v plicní tkáni. Nejedná se o jednotnou populaci buněk, protože se podle místa vyskytují odlišují svou enzymatickou a receptorovou výbavou. V cytoplasmě obsahují granula, která obsahují vysoký podíl AMK histaminu, jehož množství je vyšší než u bazofilů. Mají různý tvar – kulovitý, vřetenovitý.

3.3.2 Lymfocyty

Buňky, které rozlišujeme podle stupně diferenciaci na malé, střední a velké, z nichž v periferním oběhu převládají malé lymfocyty, jejichž průměr je řádově 6-8 μm . Jádro je kulovité, intenzivně se barví a vyplňuje téměř celou buňku. Hlavní funkcí lymfocytů je adaptivní/získaná imunita, která při opakovaném vystavení patogenu umožňuje jeho rychlejší a efektivnější eliminaci. Lymfocyty se rozdělují do dvou hlavních skupin.

B lymfocyty jsou buňky zajišťující protilátkovou odpověď proti patogenům. Konečným diferenciačním stádiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky proti bílkovinným a glykoproteinovým antigenům a toxinům. Některé B lymfocyty se po setkání s antigenem mění v paměťové B lymfocyty, které jsou součástí imunitní paměti a při opakovaném setkání s antigenem výrazně urychlují sekundární imunitní odpověď (Lebien a Tedder, 2008; Parra et al., 2016).

Další skupinou jsou T lymfocyty, které rozdělujeme do dvou základních skupin a to na T_H lymfocyty a T_C lymfocyty. T_H lymfocyty, také známé jako pomocné lymfocyty, nebo CD4 buňky, zastávají roli v adaptivním imunitním systému. Uvolňují cytokiny, které aktivují ostatní buňky imunitního systému a napomáhají regulovat imunitní odpověď. Na druhé straně T_C lymfocyty, neboli cytotoxické T lymfocyty, zprostředkovávají buněčnou imunitní odpověď. Prostřednictvím sekretovaných látek jsou schopny rozpoznat a likvidovat buňky napadené intracelulárními parazity, jako jsou například viry. Tento způsob boje je velmi účinný, avšak někdy dojde k většímu poškození buněk než samotným poškozením patogenem (Fabbri et al., 2003), (Murphy a Weaver, 2016).

T i B lymfocyty vyžívají buď v efektorová stádia, nebo paměťové buňky. Jejich životnost je v řádech měsíců, výjimkou jsou tzv. paměťové buňky, diferencované z T nebo B lymfocytů, schopny přežívat po celý život jedince.

NK buňky

Jedná se o buňky, které jsou morfologicky přechodným typem mezi lymfocyty a makrofágy. Vyskytují se převážně v periferní krvi. Jádro je kulatá nebo se zářezem, cytoplazma NK buněk obsahuje azurofilní granula.

3.4 BAKTERIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ CANDÁTA OBECNÉHO ZPŮSOBENÉ BAKTERIÍ *AEROMONAS HYDROPHILA*

Aeromonas hydrophila jsou heterotrofní, gramnegativní bakterie. Jedná se o tyčinky s polárně umístěným bičkem, tudíž se mohou pohybovat. Vyskytují se především v teplejších oblastech, ale můžeme ji najít v slané, sladké, brakické, mořské, chlorované i nechlorované vodě, ale hlavním místem výskytu jsou především sladkovodní řeky, jezera a nádrže. Jedná se o patogenní bakterie způsobující celou řadu onemocnění. Dalšími druhy *Aeromonas* jsou např. *A. sobria*, *A. caviae* (Joseph a Carnahan, 1994).

Všichni příslušníci rodu *Aeromonas* produkují cytotoxické enterotoxiny. Tyto endotoxiny byly izolovány z potravin, jako jsou ryby, maso, drůbež, syrové mléko, salátové zeleniny, ale i z vody. Schopnost přežívat nízké teploty má za následek jejich výskyt v chlazeném mase (Janda a Abbott, 1998).

Z antibiotik mohou být aplikovány např. fluorochinolony, cefalosporiny 3. generace, cotrimoxazol, tetracykliny, gama-proteobakterií.

3.4.1 Patogenita pro ryby

Bakterie skupiny *A. salmonicida* a *A. hydrophila* jsou považovány za významné patogeny ryb. Jsou původci např. furunkulózy u lososovitých ryb, aeromonádové septikémie, ulcerózní nemoci sladkovodních i mořských ryb (Joseph a Carnahan, 1994).

Aeromonas hydrophila je pravděpodobně nejčastější bakteriální patogen sladkovodních ryb. Způsobuje nemoc pohyblivých aeromonád. Jak již bylo zmíněno v úvodu, jedná se o patogenní bakterie, které napadají ryby s oslabenou obranyschopností. Mohou iniciovat výskyt petechií, hemoragie, vodnatelnosti, exoftalmus (vytlačení oka z očníce), dále olupující se kůže i šupiny. Systémové nákazy se

projevují jako hemoragická septikémie, která následně způsobuje záněty a nekrózy zažívacího traktu, ledvin, svalů a sleziny (Lewbart, 2008).

3.4.1.1 Erythrodermatitida

Nejčastěji postiženou rybou touto bakteriální nemocí způsobenou *Aeromonas hydrophila* je kapr obecný, cejn velký, karas obecný, dravé ryby, jako je candát. Nejčastější výskyt *A. hydrophila* je na jaře a v létě, resp. jakmile dojde ke zvýšení teploty vody.

Po propuknutí choroby jsou na těle ryby viditelná zánětlivá ložiska na kůži. Tyto léze přechází do hlubokých vředů, někdy dojde i k obnažení až svaloviny, a může dojít i k perforaci tělní dutiny. Uprostřed zánětlivých ložisek dochází také k nekrotickým procesům. Napadeným rybám také tmavne pokožka a přestávají přijímat potravu. Projev konečné fáze je takový, že ryba trpí celkovou vodnatelností, vyskytuje se zjevení šupin, je také pozorována anémie žaber a vypoulení očí (Janda a Abbott, 2010).

3.4.1.2 Skvrnitost ryb

Candát patří mezi vnímavé druhy na skvrnitost ryb, obecné příznaky jsou lokální ztráta šupin, kožní vředy. Mezi diagnostické symptomy patří zarudlé podélné kožní skvrny a krevní podlitiny, které se slévají do plochých hemoragických vředů. Možná je terapie antibiotiky (Janda a Abbott, 2010).

3.4.1.3 Bakteriální rozpad ploutví

Mezi obecné symptomy patří poruchy plavání a stažené ploutve. Mezi diagnostické symptomy patří rozpad ocasní, řitní a hřbetní ploutve, kdy může dojít až k jejich úplné ztrátě. Nejprve se objevuje bílý pruh na okraji ploutví, postupně dochází k rozšíření ke kořenům a úplné ztrátě ploutevních paprsků. Možná je léčebná terapie koupel v modré skalici (Janda a Abbott, 2010).

3.5 MODEL PERITONEÁLNÍHO ZÁNĚTU U RYB

Jako zánět je označována odpověď na porušení integrity organismu. Zánět mohou vyvolat infekční mikroorganismy (imunologický podnět), ale také poranění způsobená chemickými či fyzikálními vlivy nebo ischemií tkáně (neimunologický podnět). Odpověď organismu na poškození v závislosti na jeho rozsahu a délce trvání může být místní, anebo celková. Zánětlivá odpověď probíhá nejprve lokálně, která je často doprovázena projevy, jako je zčervenání, otok, bolestivost a zvýšení místní teploty (Shi a Pamer, 2011). Po lokální zánětlivé odpovědi následuje systémová odpověď, jejíž intenzita závisí na rozsahu poškození a délce trvání lokálního zánětu.

První signály k rozvoji zánětlivých reakcí zprostředkovávají degranulované tkáňové žírné buňky, fagocyty a látky uvolněné z poškozených buněk. V místě poškození jsou fagocyty uvolňovány cytokiny a jiné mediátory implikující zánětlivé děje. Antigeny z mikroorganismů jsou buňkami vrozené imunity (makrofágy, dendritické buňky) prezentovány specifickým T a B-lymfocytům, u nichž stimulují aktivaci a diferenciaci. Výsledkem celého procesu je maturace B lymfocytů v plasmatické buňky, sekretující protilátky, napomáhající opsonizaci mikroorganismů a aktivaci komplementu (Magnadottir, 2006).

Při větším rozsahu zánětlivé reakce se cytokiny produkované v místě zánětu dostávají do krevního oběhu a v játrech stimulují produkci sérových proteinů akutní fáze, mezi které patří CRP protein a komplementové složky C3 a C4, jež mají opsonizační funkci a účastní se aktivace komplementu (Uribe et al., 2011).

Během rozsáhlejší nebo chronické zánětlivé reakce, kdy do peritonea proniká masivní množství mikroorganismů, se uvolňují další cytokiny, které způsobují novotvorbu a vylití většího množství leukocytů, což vede k leukocytóze.

V průběhu uvolňování velkého množství různých mediátorů, jako jsou cytokiny, kininy a histaminy, dochází k vazodilataci, při níž může dojít k hypotenzi či oběhovému selhání.

Peritoneální zánět je jedním z nejčastěji využívaných imunologických modelů. Injekce cizorodých buněk (živých či inaktivovaných), stejně jako imunogenních látek (např. LPS, flagelin a podobně) indukuje dramatické změny, a to zejména kompozici myeloidních buněk a lymfocytů. V počáteční fázi reakce je reakce kontrolována buňkami myeloidní linie. Po eliminaci patogenu, jsou myeloidní buňky vystřídány lymfocyty (Korytář et al., 2013). Ačkoli je většina vakcín u ryb aplikována přímo do peritoneální

dutiny, složení a úkol jednotlivých populací bílých krvinek doposud nebyly prozkoumané do hloubky. Další výzkumy a vědecké práce zabývající se stimulovanou peritoneální dutinou by byly přínosem pro detailní popis imunitní reakce na lokální úrovni a jaké složení látek ve vakcínách by bylo prospěšnější a účinnější (Dahiya a Stevenson, 2010).

S využitím peritoneálního modelu zánětu byl cílem mé práce popis mechanismů řídících imunitní odpověď u candáta obecného s v průběhu prvních třech dní po injekci inaktivované bakterie *A. hydrophila* a vyhodnocení efektu hypoxie na tuto reakci.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 MATERIÁL PRO TESTOVÁNÍ

4.1.1 Získání a původ ryb pro experimenty

Při experimentu bylo využito ryb z hospodářství pana Miroslava Cakla z Jihlavy. Byl nakoupen rychlený plůdek (TL 40-60 mm), který byl následně podle postupu odchován v podmínkách intenzivního chovu až do námi testované velikosti cca 30 cm, viz. metodika (Blecha et al., 2016).

4.1.2 Podmínky uchování ryb pro testování

Testování candáti byli rozděleni primárně do dvou základních skupin, a to na skupinu kontrolní, kde byla provedena simulace peritonea candáta pouze fyziologickým roztokem, a testovanou skupinu s provedenou simulací infekce pomocí inaktivované bakterie *Aeromonas hydrophila*. Dále byly testované ryby rozděleny na podskupinu udržovanou v podmínkách normoxie (optimální množství kyslíku pro buněčný metabolismus) – hladina obsahu kyslíku byla udržována na hodnotě 90-100 % při teplotě 23-24 °C. Zbýlá část ryb byla udržována v podmínkách hypoxie (nedostatečný obsah kyslíku pro tělesný metabolismus, než na který je organismus navyklý) na hodnotě obsahu kyslíku 35-45 %.

Testovací podmínky normoxie a hypoxie byly simulovány pomocí směšovačů, a to jeden na dusík a druhý na kyslík. Pro podmínky hypoxie byly testované ryby adaptovány ve zhoršených kyslíkových podmínkách týden před zahájením vlastního testování simulace pomocí fyziologického roztoku a *Aeromonas hydrophila*.

4.1.3 Testovaná skupina ryb-kontrolní skupina

U kontrolní skupiny ryb byla provedena simulace infikace ryb pomocí 100 μ l fyziologického roztoku (fosfátový pufr PBS). Před podáním injekční dávky fyziologického roztoku do těla byly ryby anestetovány.

4.1.4 Anestezie ryb

K veškeré anestezii byl používán roztok hřebíčkového oleje v koncentraci 0,03 ml hřebíčkového oleje na jeden litr vody. Do vědra s vodou byl přidán hřebíčkový olej v uvedené koncentraci. Následně byly ryby určené pro anestézii umístěny do tohoto vědra. Po cca 5 minutách byla provedena kontrola účinnosti anestezie vizuálně, pokud nedocházelo k pohybu žaberního oblouku ryby, mohlo být přistoupeno k podání injekční dávky fyziologického roztoku.



Obrázek 4: Podání injekční dávky fyziologického roztoku po anestezii ryb

4.1.5 Testovaná skupina ryb – s peritoneální stimulací inaktivované bakterie *A. hydrophila*

Testovaná stimulovaná skupina ryb infikací inaktivovanou baktérií *Aeromonas hydrophila* byla provedena prostřednictvím injekční aplikace roztoku s inaktivovanou *Aeromonas hydrophila* (1 000 000 bakterií ve 100 μ l fyziologického roztoku). Před podáním injekční stimulované dávky infekce do těla byly ryby anestetovány.

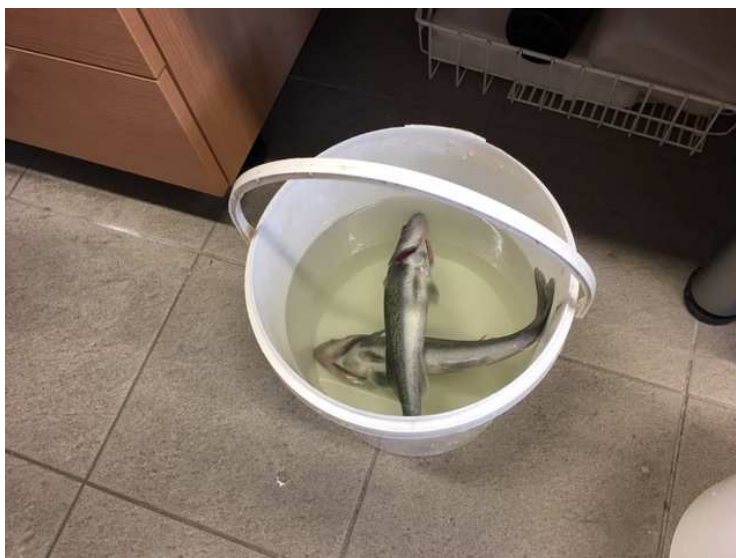
Anestezie ryb byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.4.

Po stimulaci byly ryby vráceny do odchovných nádrží.

4.2 ZÁKLADNÍ METODIKA

4.2.1 Eutanazie ryb

Pro eutanázii byla použita dávka 0,8-1 ml hřebíčkového oleje na 10 l vody. Po intenzivním působení větší koncentrace hřebíčkového oleje (7-10 min) byly ryby určené pro pitvu usmrceny úderem tupým předmětem do hlavy. Po odběru vzorků krve bylo provedeno měření délky těla a stanovení hmotnosti.



Obrázek 5: Eutanazie ryb

4.2.2 Odběr krve

Vhodnou metodou odběru krve u ryb s vyhovující hmotností byla punkce. Prováděna byla punkce ocasních cév injekční stříkačkou opatřenou jehlou do průměru 0,5 mm. Jehla musela být ošetřena heparinem, aby nedošlo ke sražení odebírané krve uvnitř jehly. Ryba byla po vylovení osušena a uchopena za hřbetní část těla. Osušení těla ryby bylo provedeno na vnitřní straně nedaleko od řitní ploutve. Po osušení místa odběru byl proveden asi cca 1 cm od řitní ploutve vpich heparizované injekční jehly pod úhlem cca 40-45 °. Poté, co jehla narazila a pronikla svalovinou, došlo k napíchnutí ocasní žíly (ve stříkačce se objeví krev), při dalším posunu jehly směrem dovnitř těla ryby bylo naraženo i na páteřní obratle. V místě kontaktu jehly a páteřních obratlů byla stříkačka mírně povytažena a krev byla odebrána přímo z tepny nebo žíly.

4.2.3 Odběr orgánů-pitva ryb

Dalším krokem po odběru vzorku krve byla pitva ryb. Pitva ryb byla prováděna za účelem odběru vzorků vnitřních lymfatických orgánů. Pro případ našeho experimentu byl nutný odběr sleziny (MI) a hlavové ledviny (KN).

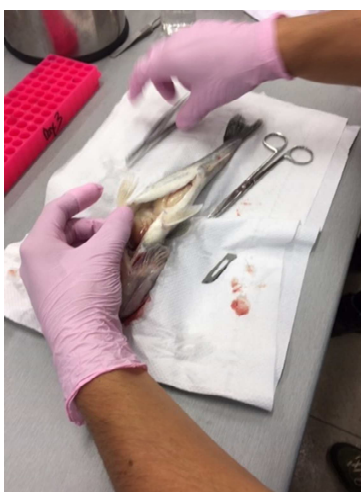
Pomůcky pro provedení pitvy: laboratorní nůžky, skalpel, laboratorní pinzeta, pean, popř. laboratorní nerezová lžička

Pracovní postup pitvy:

Ryba byla po usmrcení osušena a položena na podložku na laboratorním stole. Dále byl proveden podélný řez skalpelem nebo nůžkami na spodní části peritonea od řitního otvoru až mezi pár prsních ploutví. Řez byl prováděn se zvýšenou opatrností, aby nedošlo k porušení trávicího traktu a tím i k silnému znečištění peritonea. Po rozříznutí břišní dutiny byla nastříhnuta boční část trupu u žaber, tímto bylo snadnější otevřít celou břišní dutinu a vyjmout její celý obsah.

Pro izolaci peritoneálních leukocytů byly peritoneální dutina omyta 5ml chlazeného PBS. Získaná buněčná suspenze byla použita pro přípravu cytospinů a průtokovou cytometrii.

Z břišní dutiny byl vyjmut celý obsah trávicího systému a proveden odběr sleziny, která se nachází v břišní dutině mezi střevem a plynovým měchýřem a má výrazně tmavou barvu. Poté bylo přikročeno i k odběru dalšího pro nás důležitého lymfatického orgánu, kterým byla přední hlavová ledvina. Hlavová ledvina se nachází v přední části nad úrovní srdce. Odebrané lymfatické orgány byly umístěny do chladicího boxu, kde byly uchovány do dalšího zpracování pro účely provádění analýzy.



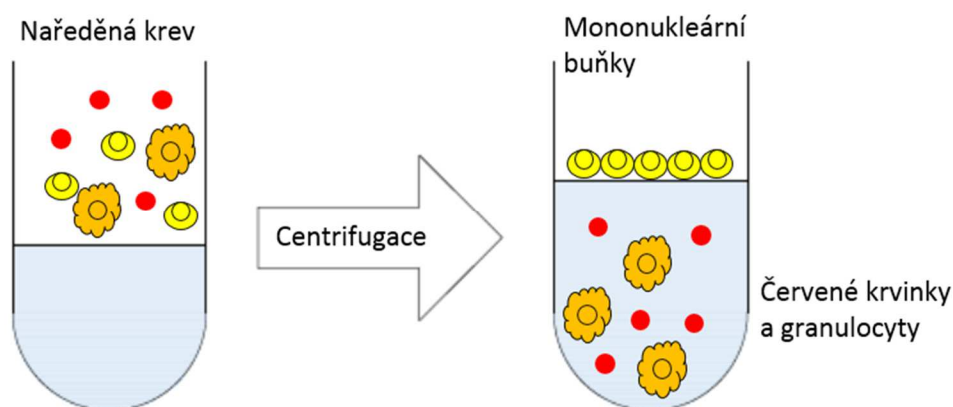
Obrázek 6: Pitva ryby

4.2.4 Příprava buněčných suspenzí pomocí gradientové centrifugace

Gradientová centrifugace

Cílem gradientové centrifugace buněčných suspenzí bylo izolovat lymfocyty z odebraných tkání.

Při gradientové centrifugaci byla směs látek dělena na hustotním gradientu roztoku v kyvetě. Byl použit preparativní typ centrifugy s chlazeným pracovním prostorem a s výkyvným typem kyvety a jde o tzv. zonální (gradientovou) centrifugaci.



Obrázek 7: Princip izolace bílých krvinek gradientovou centrifugací

Příprava roztoku na gradientovou centrifugaci:

Příprava 51% roztoku. Do označené plastové zkumavky bylo napipetováno uvedené množství Percollu, PBS a H₂O.

51% roztok:

5,1 ml Percoll (definovaná hustota potřebná k odizolování lymfocytů)

1ml PBS 10x

3,9 ml H₂O

Použité roztoky a pomůcky:

Percoll je speciální roztok, který umožňuje účinnější separaci médií o různé hustotě v biochemii. Používá se pro izolaci buněk, organel, anebo virů pomocí centrifugace v hustotě. Percoll byl složen z koloidních částic oxidu křemičitého o průměru 15–30 nm (23 % hmotnostních ve vodě), které byly potaženy polyvinylpyrrolidonem (PVP). Percoll je vhodný pro experimenty s hustotním gradientem, protože má nízkou viskozitu ve

srovnání s alternativami, nízkou osmolaritou a žádnou toxicitou vůči buňkám a jejich složkám.



Obrázek 8: Příprava roztoků pro gradientovou centrifugaci

Příprava 34% roztoku. Do označené plastové zkumavky bylo napipetováno uvedené množství Percollu a RPMI.

34% roztok:

3,4ml Percoll

6,6ml RPMI

Použité roztoky a pomůcky:

Percoll

RPMI obsahuje glukózu, pH indikátor červené barvy, soli, aminokyseliny, vitamíny –vhodné médium pro savčí buňky.

Zkumavky, mikropipety

Dle výše uvedeného postupu byla připravena zkumavka s 3 ml 34% roztoku a s 3 ml 51% roztoku.

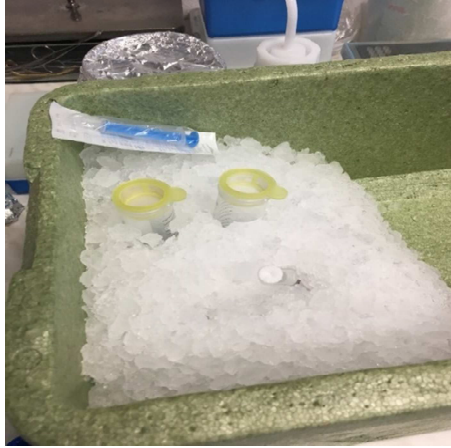
Poté byl proveden pomalý nástřik roztoku 51% mikropipetou do připraveného 34% roztoku. Tímto došlo k oddělení vrstev o různé hustotě.

Zpracování vzorků tkání lymfatických orgánů sleziny a hlavové ledviny

Odebraná slezina i hlavová ledvina byla umístěna na plastová zkumavková sítká. Následně bylo provedeno protlačení buněčné tkáně skrz sítko pomocí plastového pístu z injekční stříkačky. Jednotlivé rozmělněné buněčné tkáně sleziny i hlavové ledviny byly

zalily roztokem RPMI o objemu 4 ml, kdy byl zároveň proveden i oplach sítka po protlačení tkání.

Připravené vzorky tkání byly umístěny do termoboxů do ledu.

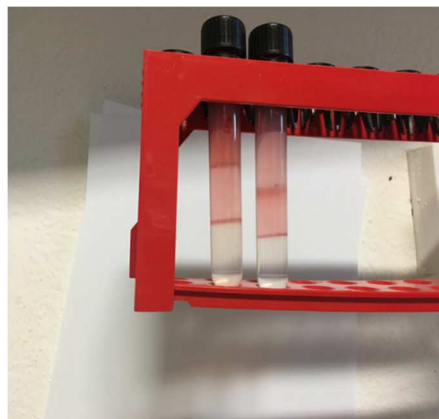


Obrázek 9: Chlazení připravených vzorků tkání v termoboxu

Připravené vzorky tkáňové kultury v roztoku RPMI byly poté napipetovány: z každé zkumavky 3 ml do 2 zkumavek s připravenou směsí roztoku 3ml 34% + 3ml 54% roztoku pro gradientovou centrifugaci. Přepipetování roztoku přefiltrované tkáňové kultury do připraveného roztoku pro gradientovou centrifugaci muselo probíhat pomalu, aby nedošlo k promíchání barevných frakcí. Následovala vlastní centrifugace 2 ks zkumavek s výše uvedenými roztoky s tkáňovou kulturou sleziny a hlavové ledviny za těchto nastavených parametrů centrifugy:

1. centrifugace: při 400 otáček, při teplotě 4 °C, po dobu 15 minut.

Po ukončení 1.centrifugace byly odpipetovány 2 barevné frakce z vrchní části zkumavek a byly provedeny sběry leukocytů, tj. první vrstva nad čirou frakcí ode dna zkumavky.



Obrázek 10: Barevné frakce a sběr leukocytů

Následně byla provedena **2. centrifugace** odebraných leukocytů ze sleziny i hlavové ledviny za těchto nastavených parametrů centrifugy: **při 400 otáčkách, při teplotě 4 °C, po dobu 5 minut.** Tímto dojde k vymytí Percollu. Pelet tvořený bílými krvinkami byl resuspendován v 1 ml kultivačního média RPMI.

4.2.5 Příprava preparátů pro mikroskopické stanovení složení hlavních populací bílých krvinek

Příprava boxů pro Cytospin – popis Mi sklíček a kompletace boxů pro Cytospin

Význam cytospinu – je to specifická příprava buněčných vzorků pro mikroskopii.

Příprava vzorků pro cytospin probíhala pomocí specializovaných boxů, které byly umístěny do centrifugy, a prostřednictvím odstředivé síly docházelo k odseparování a nanesení buněk na mikroskopická sklíčka. Přístroj pomocí odstředivé síly vytvořil na určeném místě na sklíčku jednoduchou vrstvu těchto nanesených buněk. Jednalo se o konzistentně jednotné preparáty se snadno barvitelnými a vyhodnotitelnými buňkami.



Obrázek 11: Boxy pro cytospin

Pomůcky: boxy pro cytospin, mikropipety, mikroskopická sklíčka, popisovač

Postup přípravy: označená mikroskopická sklíčka byla zafixována pomocí zámkového mechanismu na dno boxu. Box pro cytospin byl tvořen třemi tubusy, do kterých byl napipetován roztok tkáňové kultury o různé koncentraci a množství. Po přepipetování roztoků byl box uzavřen a byl připraven pro vlastní centrifugaci. Cytospin byl připraven pro peritoneální leukocyty, slezinu a hlavovou ledvinu.

Po naplnění a uzavření boxů bylo provedeno odstředování s těmito nastavenými parametry centrifugy– **při 700 otáčkách, při teplotě 10 °C, po dobu 3 minut.** Po ukončení centrifugace byla provedena demontáž odstředovacích boxů, zbytek roztoku z

jednotlivých cel byl odpipetován a mikroskopická sklíčka byla demontována z dann boxů. Následně byla provedena fixace mikroskopických sklíček ve fixačním roztoku po dobu 1 minuty. Poté bylo prováděno sušení sklíček, kdy byla sklíčka umístěna do skleněného stojanu.



Obrázek 12: Odstředivka

Příprava mikroskopických preparátů vzorků krve

Cílem mikroskopické kontroly bylo hodnocení morfologie krevních buněk v provedeném nátěru krve.

Pomůcky: mikropipeta, mikroskopická sklíčka, fixační roztok, popisovač

Postup přípravy:

Na podložní mikroskopické sklíčko byla nanášena mikropipetou kapka krve, která byla rozetřena dalším mikroskopickým sklíčkem rovnoměrně po celé ploše sklíčka, tímto byl proveden tzv. nátěr. Po zaschnutí rozetřené krve byla provedena fixace preparátů ve fixačním roztoku.

Mikroskopická sklíčka po fixačním roztoku se nechala uschnout pro další přípravu mikroskopických preparátů.



Obrázek 13: Mikroskopická sklíčka před aplikací fixačního roztoku

Hematologické barvení mikroskopických preparátů

Připravená mikroskopická sklíčka se vzorky rezidentních peritoneálních leukocytů, leukocytů z hlavové ledviny a sleziny, a roztěry krve byly před analýzou složení barveny pomocí hematologického barvení Kwik Diff Stain kit. Tento kit používá dvě složky, anionové barvivo eosin a kationové barvivo metylenové modře. Po fixaci se mikroskopická sklíčka máčí 30 vteřin v roztoku každého barviva a následně jsou omyta pod tekoucí vodou. Takto připravené vzorky byly použity pro světelnou mikroskopii.

4.3 VYHODNOCENÍ SLOŽENÍ HLAVNÍCH IMUNOLOGICKÝCH ORGÁNŮ

4.3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která určuje ve fenotyp a charakteristiku buněčných populací nebo částic. Pracuje na kombinovaném principu spektrofotometru, mikroskopu s vyšší rozlišovací schopností a metody analýzy obrazu. Průtoková cytometrie umožňuje měření a identifikaci jednotlivých fyzikálních a chemických znaků daných individuálních buněk anebo částic v heterogenní populaci. Využívá fluorescenčně značených protilátek, které se navážou na struktury na povrchu nebo uvnitř buněk. Tato metoda umožňuje kvalitativní i kvantitativní zpracování vzorků s vysokou analytickou rychlostí a citlivostí při měření. Získaná data byla převedena do počítače, zobrazena na grafech a uložena.



Obrázek 14: Průtokový cytometr

4.3.2 Světelná mikroskopie

Připravené a barvené mikroskopické preparáty byly analyzovány na světelném mikroskopu při 10 x 100 zvětšení. Při pozorování byly bílé krvinky analyzovány podle morfologie buněk a jádra, stejně jako podle barvení. Z preparátu každé tkáně byly vyfoceny snímky pro ilustraci buněčného složení.

4.3.3 Metoda vyhodnocení výsledků experimentu

Veškeré výsledky počtů buněk, jejich vzájemné poměry, procentuální zastoupení a jejich změny v čase, naměřené průtokovou cytometrií, byly vyhodnoceny formou jednotlivých grafů.

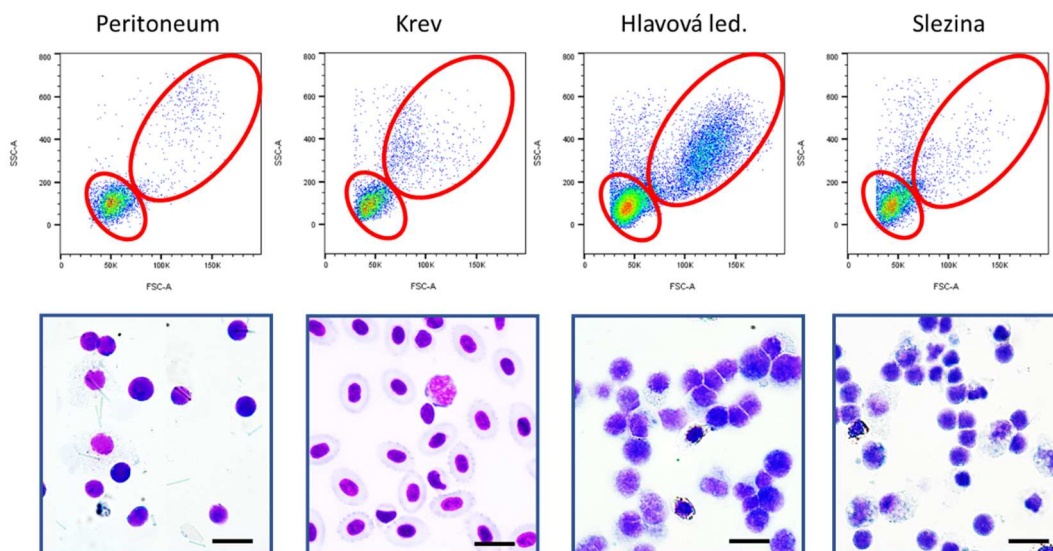
Data grafů zobrazující počty buněk a jejich procentuální vyjádření pro každý den jsou průměrem pěti naměřených hodnot toho dne. Pro všechna data byly zpracovány statistické údaje, jako je směrodatná odchylka (v grafech zobrazena chybovými úsečkami) a dále byla všechna data podrobena T-Testu, který udává významnost toho, jak se výsledky měření jednotlivých skupin liší vzájemně mezi sebou. Tato statistická významnost je v grafech označena příslušným počtem hvězdiček, kdy jedna hvězdička udává míru odlišnosti menší nebo rovnu 0,05. Dvě hvězdičky znamenají míru odlišnosti menší nebo rovnu 0,01 a třemi hvězdičkami je vyjádřena odlišnost menší nebo rovna 0,001.

5. VÝSLEDKY

5.1 POMĚR LYMFOCYTŮ A MYELOIDNÍCH BUNĚK VE ZKOUMANÝCH ORGÁNECH

Jak bylo předesláno v úvodu této práce, znalosti imunitního systému candáta obecného jsou velice omezené. V první části této práce bylo tedy mým cílem popsat složení a poměr lymfoidních a myeloidních populací v základních lymfatických orgánech, sleziny a hlavové ledviny, stejně jako složení krve a rezidentních populací v peritoneální dutině u zdravých ryb. Základní metodou pro vyhodnocení poměru lymfoidních a myeloidních buněk byla průtoková cytometrie. Jako základní kritéria byl použit poměr velikosti (FSC-A) a komplexity povrchu (SSC-A). Zatímco lymfocyty byly typické malou velikostí a hladkým povrchem ($FSC^{low}SSC^{low}$ (na obrázku v oválu v levé části dot plotu), buňky myeloidního původu byly zpravidla větší (FSC^{high}) a s členitějším povrchem (SSC^{high}) (na obrázku v pravé horní části dot plotu). Ze získaných dat je patrné, že každý z orgánů má unikátní složení bílých krvinek (Obrázek 16). V krvi bylo možné pozorovat dominantní populaci lymfocytů, která byla doplněna menší populací větších buněk myeloidního charakteru. Podobně i ve slezině byla většina buněk (96 %) lymfoidního charakteru jen s minimem buněk myeloidních. I populace rezidentních peritoneálních leukocytů byla dominována lymfocyty, zatímco populace myeloidních buněk byla zastoupena jen ve frakci (9 %). Nutno podotknout, že myeloidní buňky v peritoneu byly větší než v krvi či slezině s výrazně strukturovaným povrchem. Jediným orgánem s významným zastoupením myeloidních buněk byla hlavová ledvina. I zde bylo sledováno, že většina buněk byla lymfoidního rázu, ovšem populace myeloidních buněk byla významná a přesahuje u zdravých ryb 25 %.

Složení buněk bylo dále studováno pomocí mikroskopie na preparátech. Snímky jednotlivých preparátů ukazují shodné složení jako cytometrie. Ve většině tkání dominovaly malé lymfocyty s tmavým jádrem, které vyplňovaly takřka celou cytoplasmu. Ve vzorku hlavové ledviny byl patrný větší počet větších buněk s bledě modrou cytoplasmou a fazolovitým jádrem (monocyty), stejně jako větší buňky se segmentovaným jádrem - neutrofilů.



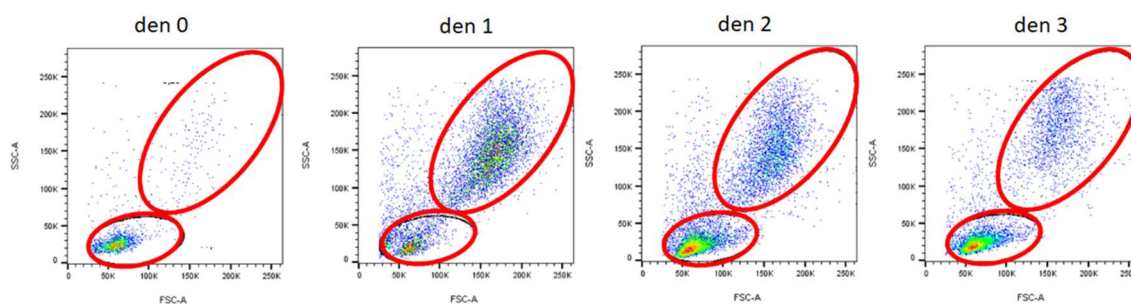
Obrázek 15: Poměr lymfocytů a myeloidních buněk v peritoneu, krvi, hlavové ledvině a slezině (měřítko 10 µm)

5.2 POPIS DYNAMIKY PERITONEÁLNÍHO ZÁNĚTU

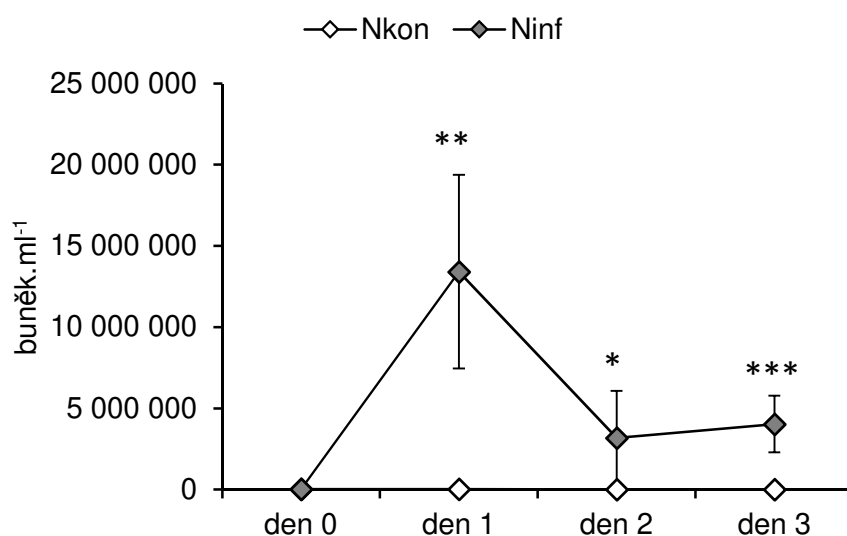
Tato část práce byla zaměřena na vyhodnocování výsledků počtu myeloidních a lymfatických buněk v peritoneální dutině, krvi, slezině a hlavové ledvině v průběhu prvních třech dní po indukci zánětu v peritoneální dutině ryb ve stavu normoxie. Prezentované výsledky byly prezentací dat získaných pomocí průtokové cytometrie, tak jak byly popsány výše.

5.2.1 Peritoneální dutina

Jak je patrné z Obrázku 17, stimulace vedla k dramatickým změnám ve složení peritoneálních lymfocytů. Zatímco u ryb kontrolní skupiny a nestimulovaných ryb byly hlavní populací v peritoneální dutině lymfocyty (ovál vlevo dole), stimulace inaktivovanou *A. hydrophila* vedla již v prvních 24 hodinách k dramatickým změnám složení. Patrné bylo množství velkých buněk myeloidního charakteru (ovál vpravo nahoře), které bylo v prvních dni nejvýznamnější populací buněk. V průběhu dalších dvou dní počet těchto buněk kleslo a dominantní populací se opět staly lymfocyty. Obrázek 17 ukazuje reprezentativní data pro každý jednotlivý den. Detailní analýzy počtu buněk a poměru lymfoidních a myeloidních buněk je uvedena níže.

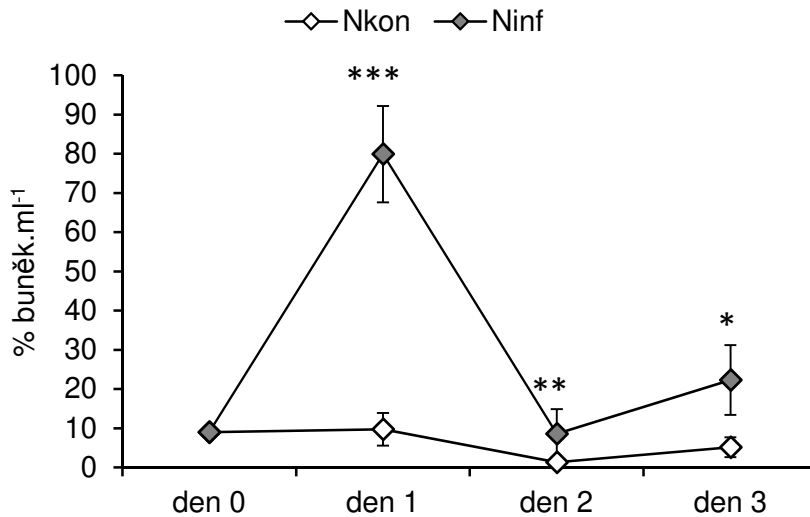


Obrázek 16: Poměr lymfoidních a myeloidních buněk v peritoneální dutině v průběhu zánětlivé reakce



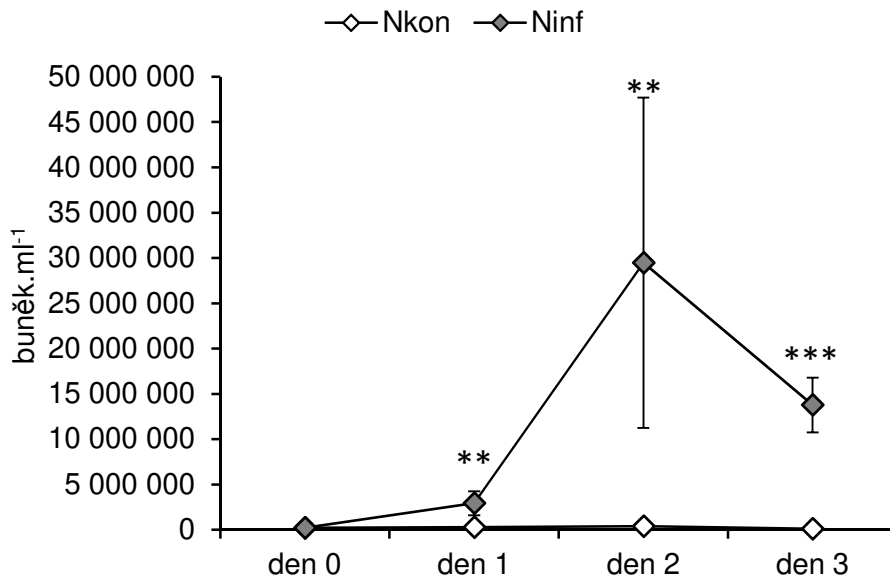
Graf 3: Počet myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie

Z grafu 3 je patrné, že po stimulaci *A. hydrophila* do peritoneální dutiny počet myeloidních buněk rapidně stoupl, a to až na 13 408 540 buněk 24 hodin po injekci. V druhý den reakce počet myeloidních buněk klesl na 3 172 920 buněk, a ve třetí den se počet mírně zvýšil na 4 035 840 myeloidních buněk. V kontrolní skupině nestimulované peritoneální dutiny bylo zastoupení myeloidních buněk nízké.



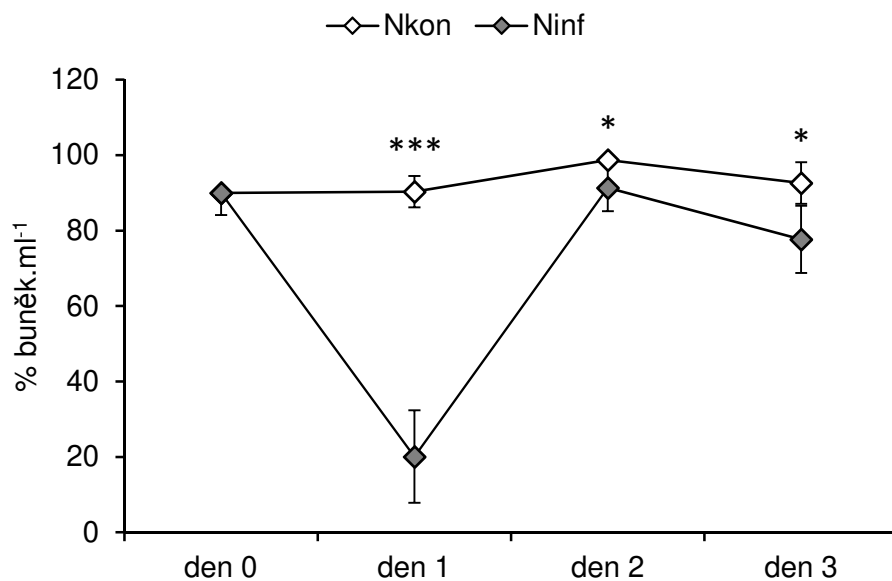
Graf 4: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie

Jak již bylo zmíněno u předchozího grafu, injekce modelového antigenu do peritoneální dutiny vedla k dramatickému zvýšení v počtu myeloidních buněk. To se odrazilo na procentuálním zastoupení myeloidních buněk, který se zvýšil z 9 % až na 79,9 % v průběhu prvních 24 hodinách imunitní reakce. V druhé fázi reakce došlo k poklesu z 79,9 % myeloidních buněk na 8,6 % myeloidních buněk. Ve třetí fázi reakce bylo jejich zastoupení mírně zvýšeno z 8,6 % na 22,2 %.



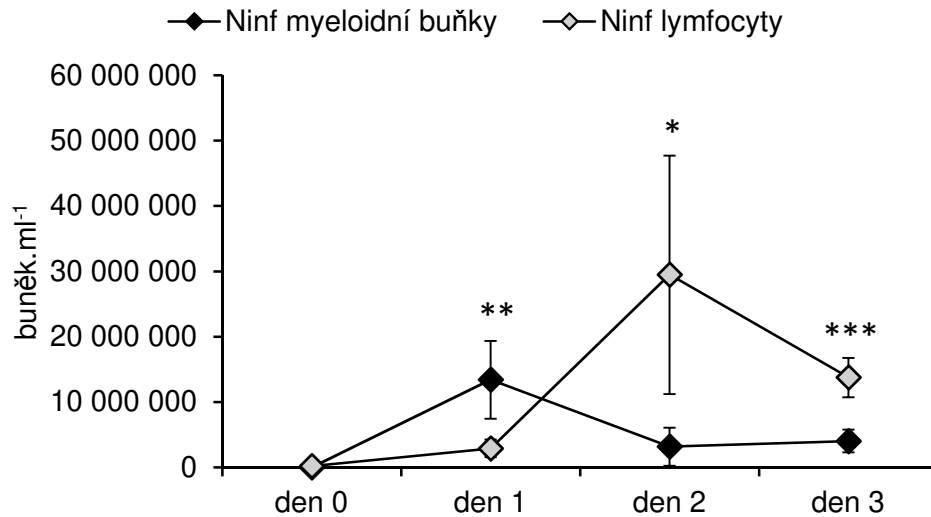
Graf 5: Počet lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie

Na rozdíl od myeloidních buněk byl v první fázi reakce počet lymfocytů ve stimulované peritoneální dutině nízký, obsahoval téměř 3 miliony lymfocytů. Snížení počtu myeloidních buněk ve druhé fázi (od druhého dne) bylo však kompenzováno masivní infiltrací lymfocytů, které byly dominantní skupinou buněk; jejich počet se ze 3 milionů zvýšil na 29 546 000 lymfocytů. Ve třetí fázi došlo k poklesu lymfocytů z 29 546 000 buněk na 13 765 800 buněk, viz. Graf 5.



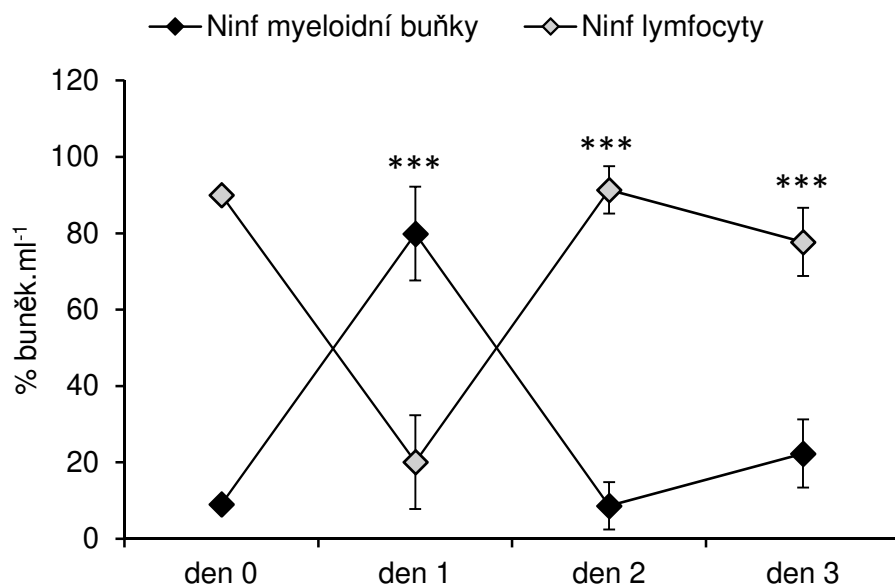
Graf 6: Procentuální zastoupení lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie

V první den reakce procento lymfocytů z 90 % v důsledku zvýšeného počtu infiltrace myeloidních buněk kleslo na 20,1 %. Do druhého dne bylo ale zastoupení lymfocytů rapidně zvýšeno, z 20,1 % na 91,3 %. Třetí den imunitní reakce byl pozorován pokles poměru lymfocytů z 91,3 % na 77,7 % lymfocytů. V nestimulované peritoneální dutině byl počet lymfocytů vysoký, v peritoneální dutině byly lymfocyty dominantní skupinou nad myeloidními buňkami; jejich procento přesáhlo 90 %.



Graf 7: Počet myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie

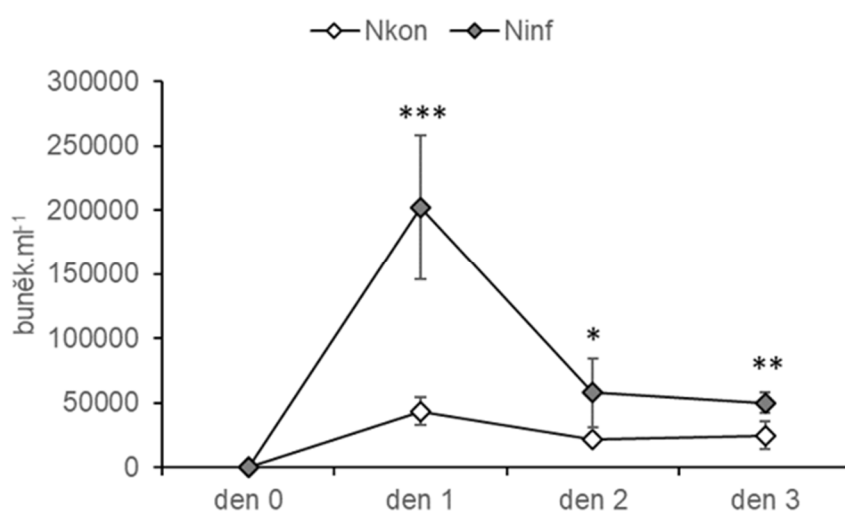
Ze srovnání zastoupení obou skupin buněk (myeloidních buněk a lymfocytů) je možné si v Grafu 7 povšimnout, že stimulací peritoneální dutiny se jednotlivá zastoupení myeloidních buněk a lymfocytů dramaticky měnila. V první den reakce byly dominantní skupinou myeloidní buňky, avšak od druhého dne přebraly roli lymfocyty, které jsou nezbytné pro aktivaci funkční adaptivní imunitní odpovědi.



Graf 8: Procentuální zastoupení myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie

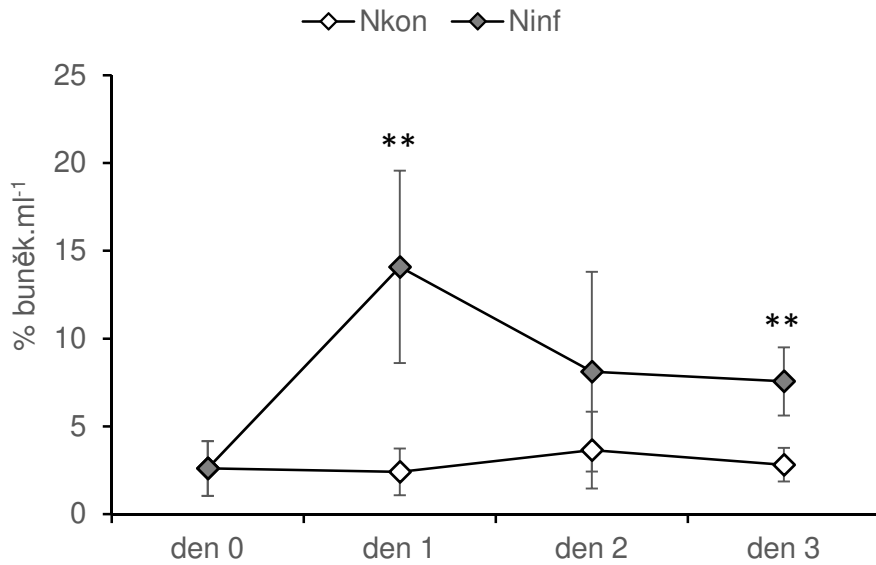
Pro lepší přehlednost a porozumění grafů je z Grafu 8 patrné, že v první den reakce počet myeloidních buněk vzrostl z 9 % na 79,9 %, od prvního dne do druhého dne se počet snížil na 8,6 %, ve třetím dnu počet opět vzrostl na 22,2 %. Co se týče lymfocytů, od nultého dne byl jejich počet vysoký, v peritoneu byly převládající skupinou buněk, a dosahovaly 90 %. V první den reakce ale jejich počet z 90 % klesl na 20,1 %, do druhého dne počet opět vzrostl na 91,3 %, avšak ve třetím dnu došlo k mírnému poklesu na 77,7 % lymfocytů.

5.2.2 Krev



Graf 9: Počet myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie

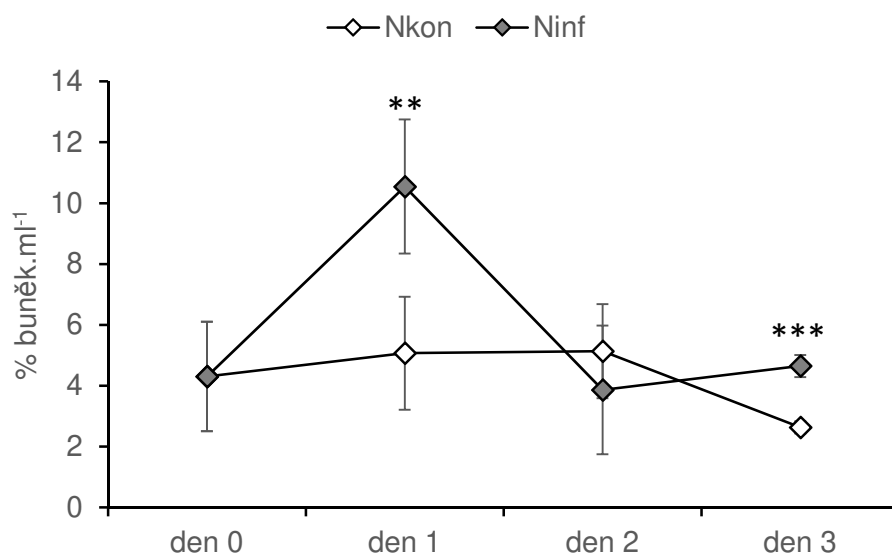
Vlivem peritoneální stimulace se v krvi v prvním dnu zánětu vyskytovalo vysoké množství myeloidních buněk, které se uvolnily z hlavové ledviny putující do místa zánětu v peritoneální dutině. Došlo tedy ke zvýšení počtu myeloidních buněk z 30 000 buněk na 202 200 buněk na mililitr, v druhém dni se počet myeloidních buněk snížil z 202 200 buněk na 57 800 buněk. Třetí den počet poklesl na 50 000 myeloidních buněk a byl blízký počtu myeloidních buněk pozorovaných u kontrolní skupiny injikované fyziologickým roztokem.



Graf 10: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie

Z Grafu 10 je patrné, že v prvním dnu reakce zastoupení myeloidních buněk vzrostlo z 2,6 % na 14 %. Do druhého dne reakce došlo k úbytku myeloidních buněk v krvi z 14 % na 8,1 %. Třetím dnem reakce došlo k dalšímu poklesu myeloidních buněk v krvi z 8,1 % na 7,5 %. U nestimulovaných ryb v prvním dni reakce procento myeloidních buněk kleslo z 2,6 % na 2,4 %. Do druhého dne reakce se jejich počet zvýšil z 2,4 % na 3,6 %, avšak do třetího dne zastoupení myeloidních buněk kleslo na 2,8 %.

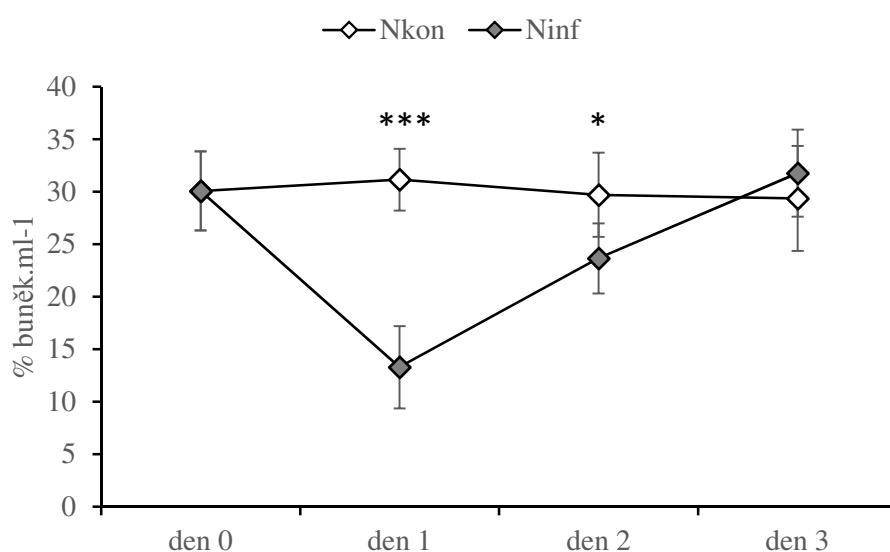
5.2.3 Slezina



Graf 11: Procentuální zastoupení myeloidních buněk ve slezině ve stavu normoxie

V krvi a peritoneální dutině bylo sledováno v průběhu prvního dne po stimulaci dramatické zvýšení počtu a procentuálního poměru myeloidních buněk. Podobné změny byly sledovány i ve slezině, která je hlavním sekundárním orgánem ryb. V prvním dni se procento myeloidních buněk ze 4,3 % zvýšilo na 10,6 %. Do druhého dne docházelo k poklesu myeloidních buněk z 10,6 % na 3,9 %. Ve třetím dni došlo ke zvýšení zastoupení myeloidních buněk na 4,7 %.

5.2.4 Hlavová ledvina



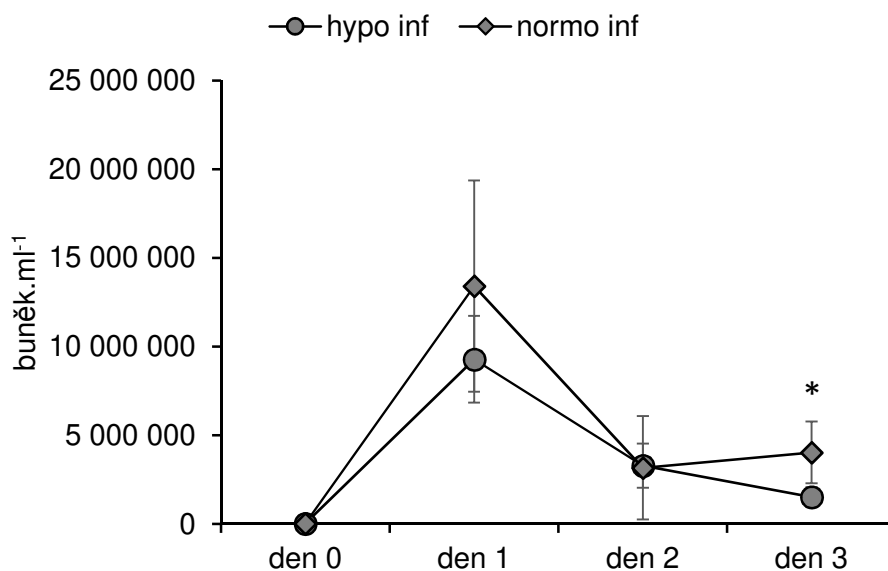
Graf 12: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v hlavové ledvině ve stavu normoxie

Z lymfatických orgánů je hlavová ledvina prvním místem, ze které se ihned uvolňuje velké množství myeloidních buněk putujících do místa zánětu. Od prvního dne stimulace se zastoupení myeloidních buněk ze 30,1 % snížilo na 13,3 % buněk. Ke druhému dni se zastoupení zvýšilo z 13,3 % na 23,6 % myeloidních buněk. Třetím dnem reakce se poměr myeloidních buněk v hlavové ledvině vrátil k hodnotě pozorované u kontrolní skupiny, obsahovala 31,8 % myeloidních buněk.

5.3 VLIV HYPOXIE NA PRŮBĚH AKUTNÍHO ZÁNĚTU V PERITONEU A OSTATNÍCH LYMFATICKÝCH ORGÁNECH

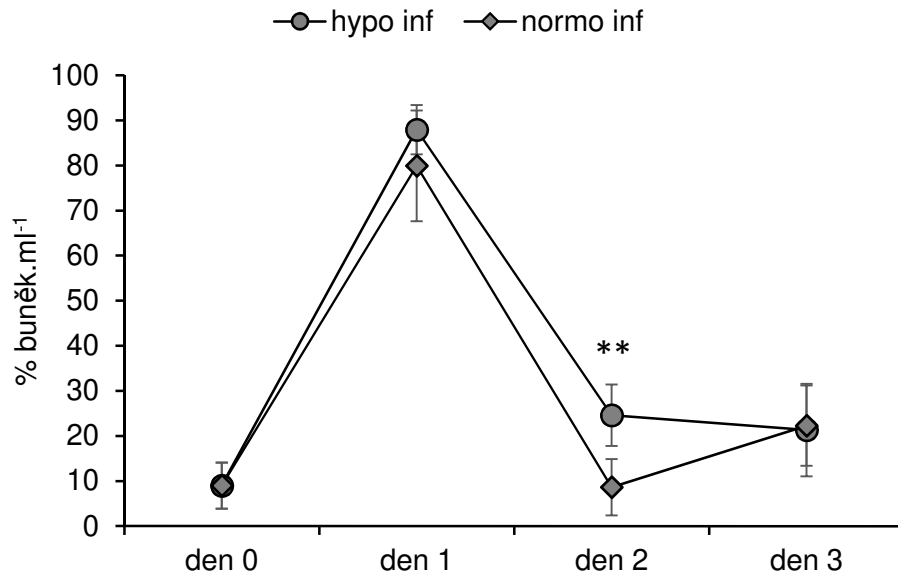
Po vyhodnocení imunitní reakce v podmínkách s přirozenou saturací kyslíkem bylo mým cílem zkoumat imunitní reakci v indukovaných hypoxických podmínkách. Pro ujasnění a lepší pochopení těchto stavů budou popisovány reakce jak ve stavu normoxie, tak i ve stavu hypoxie. Vyhodnocení vlivu hypoxie na průběh imunitní reakce je důležité nejen pro ověření třetí hypotézy, ale především nabízí unikátní data o povaze imunitní odpovědi u ryb.

5.3.1 Peritoneální dutina



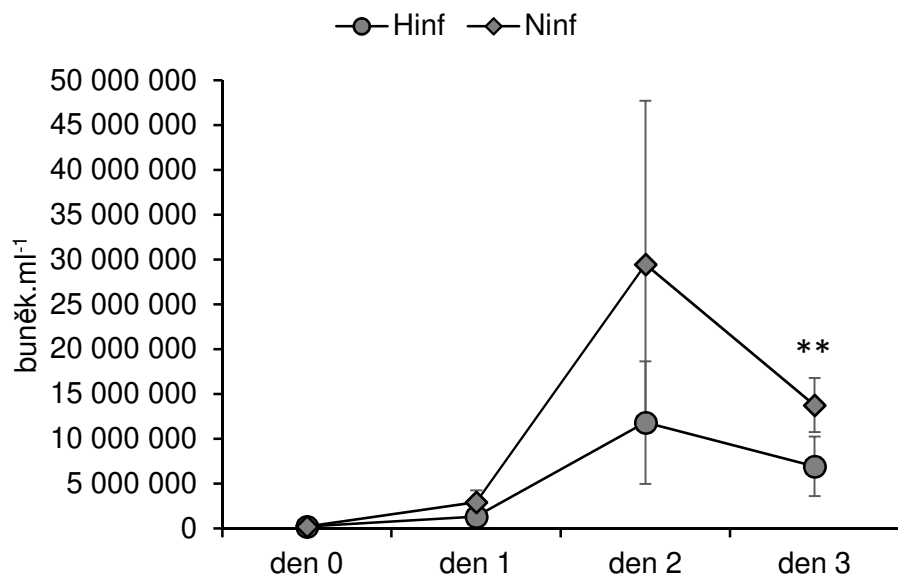
Graf 13: Počet myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie

Z Grafu 13 je patrné, že v důsledku hypoxie počet myeloidních buněk v peritoneální dutině byl nižší než za stavu normoxie. V první den reakce počet myeloidních buněk při normoxii byl 13 408 540, kdežto u hypoxických ryb byl počet myeloidních buněk výrazně nižší, představoval 9 286 260 myeloidních buněk. Druhý den u obou stavů došlo k poklesu na 3 172 920 myeloidních buněk. Ve třetí den reakce ve stavu normoxie byl počet myeloidních buněk zvýšen na 4 035 840, při hypoxii snížen na 1 529 520 buněk.



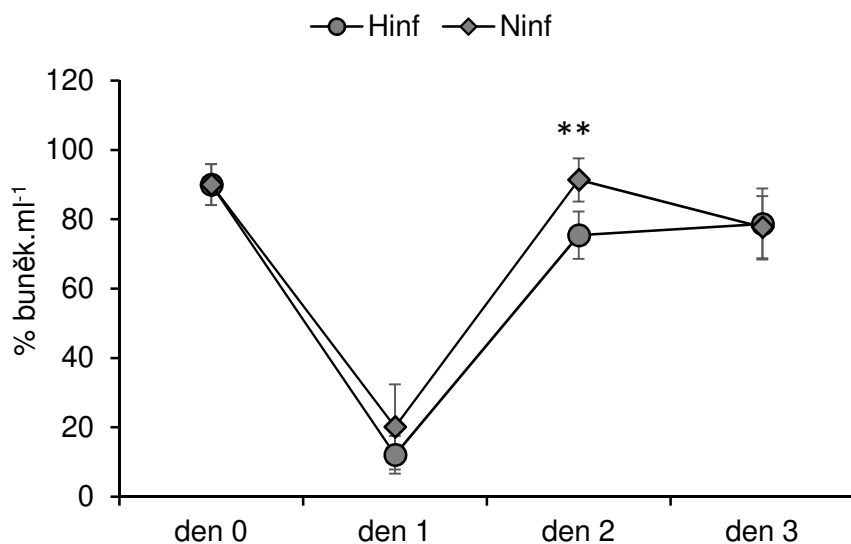
Graf 14: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie

Z Grafu 14 je možné pozorovat, že procentuální zastoupení myeloidních buněk u stimulovaných hypoxických ryb bylo vyšší než u stimulovaných ryb v normoxii. I přesto, že počtem buněk převažovaly myeloidní buňky v normoxii (viz Graf 13), poměrem lymfocytů ku myeloidním buňkám v celkovém součtu převažovaly myeloidní buňky v hypoxii.



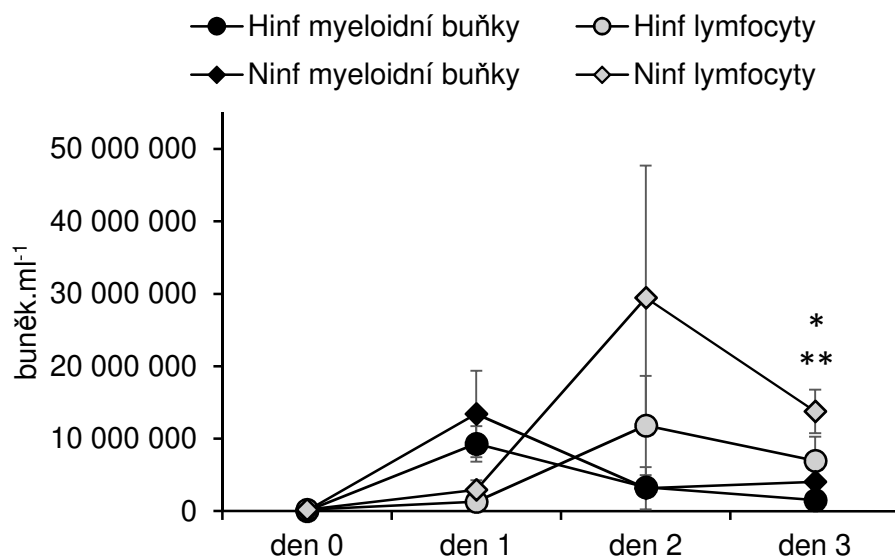
Graf 15: Počet lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie

Z grafu 15 je zřejmé, že u stimulovaných ryb v normoxii byl celkový počet lymfocytů od druhého dne pokusu vyšší než u stimulovaných hypoxických ryb. V prvním dnu reakce byly v peritoneu dominantní skupinou myeloidní buňky. Avšak rozdíl buněk ve stavu normoxie a hypoxie byl zhruba 10 milionů.



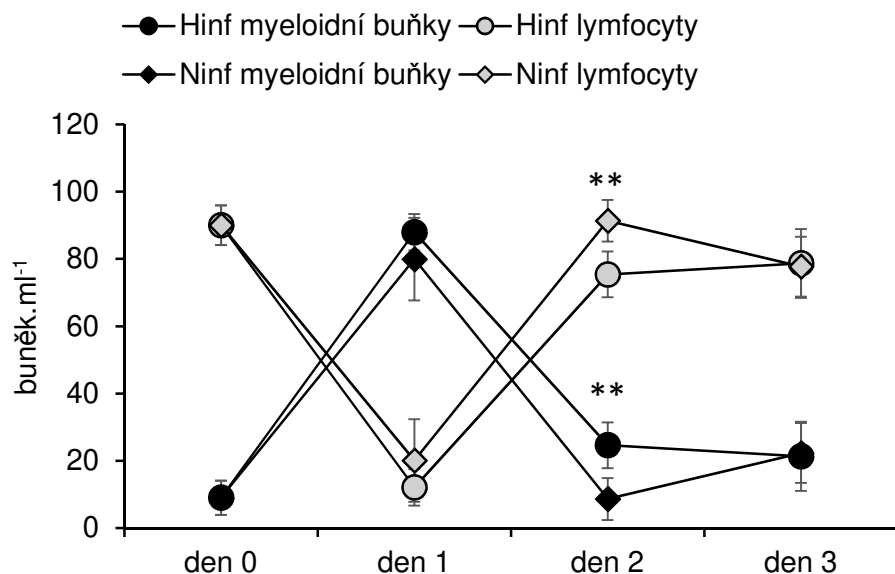
Graf 16: Procentuální zastoupení lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie

U stimulovaných ryb v normoxii se procento lymfocytů od prvního do druhého dne z 20 % vyšplhá na 91,4 %. U hypoxických ryb je zastoupení lymfocytů o 16 % nižší.



Graf 17: Počet myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie

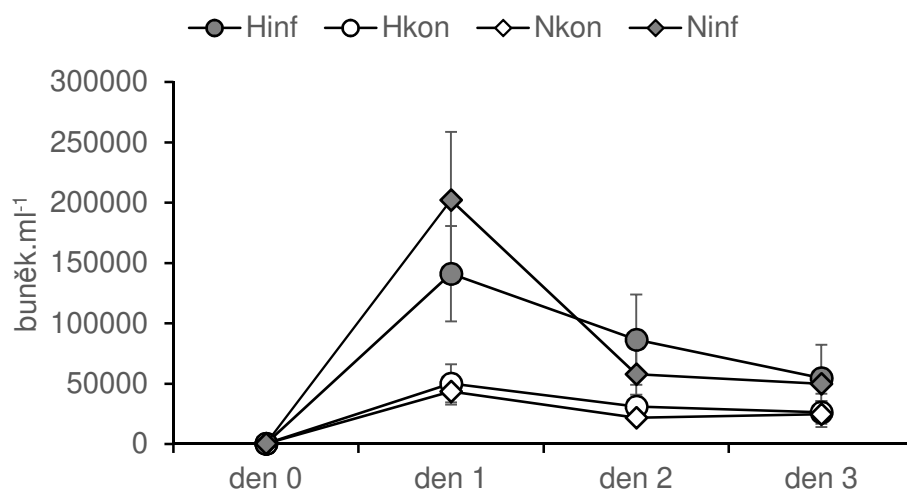
Pro ujasnění rozdílností počtu myeloidních buněk a lymfocytů ve stavu normoxie a hypoxie je možno z Grafu 17 pozorovat, že změny počtů myeloidních buněk v normoxii nebyly tak výrazné, jako byly změny lymfocytů, a to zejména v druhém a třetím dni imunitní reakce, kdy byl počet lymfocytů u hypoxických ryb významně nižší.



Graf 18: Procentuální zastoupení myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie

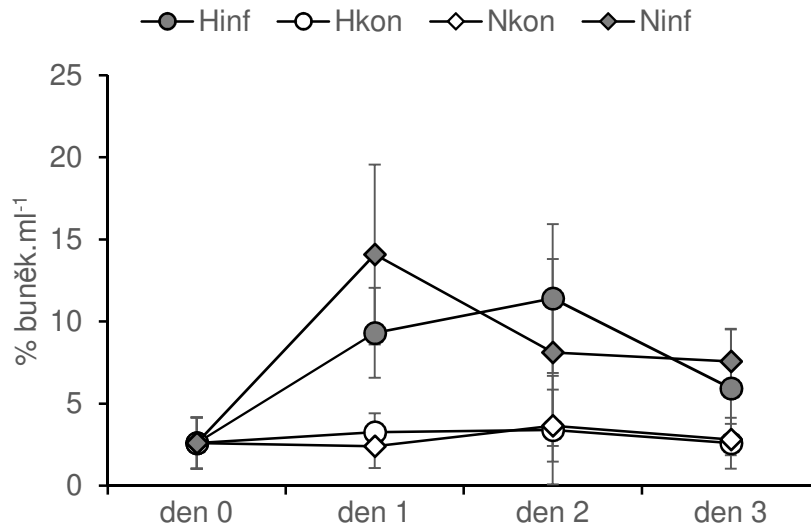
Z Grafu 18 je možné vyčíst, že při normoxii bylo procentuální zastoupení lymfocytů a myeloidních buněk vyšší než v hypoxii. Přesto byl však u obou skupin rozsah a průběh imunitní reakce velice podobný.

5.3.2 Krev



Graf 19: Počet myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie a hypoxie

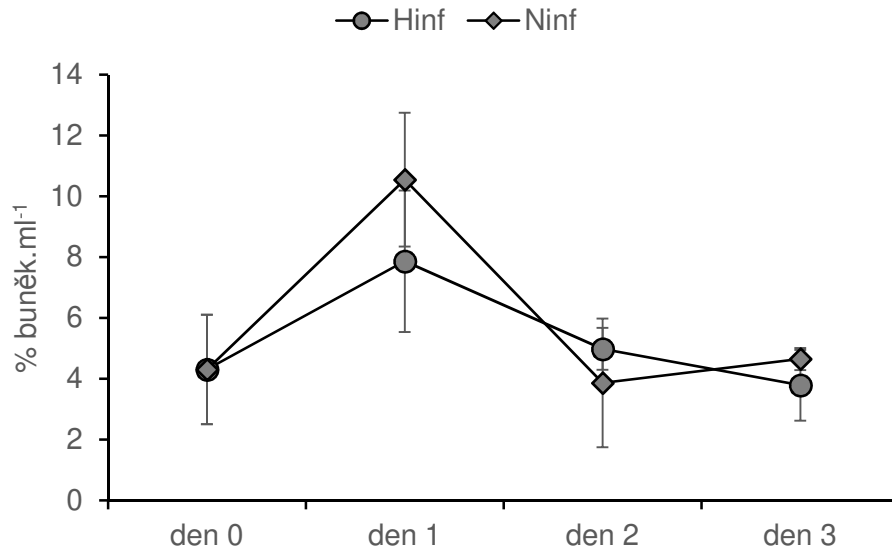
Z Grafu 19 je možné vyčíst, že u stimulovaných ryb v normoxii byl počet myeloidních buněk v prvním dnu imunitní reakce vyšší než u stimulovaných hypoxických ryb. Rozdíl činil 60000 buněk. Ve druhém dni imunitní reakce počet myeloidních buněk u stimulovaných ryb v normoxii klesl, to na 57800 buněk, kdežto počet buněk u stimulovaných hypoxických ryb byl vyšší o 30000 buněk. U kontrolní skupiny hypoxických ryb byl počet buněk srovnatelný s počtem buněk kontrolní skupiny ryb v normoxii.



Graf 20: procentuální zastoupení myeloidních buněk ve stavu normoxie a hypoxie

Pro srovnání stavů normoxie a hypoxie v krvi bylo v prvním dni imunitní reakce možné si povšimnout, že procento myeloidních buněk u stimulovaných ryb v normoxii bylo o 5 % vyšší než u stimulovaných hypoxických ryb. Do druhého dne reakce ale procento buněk stimulované skupiny ryb v normoxii pokleslo, ze 14,1 % na 8,1 %, kdežto procento myeloidních buněk u stimulované hypoxické skupiny ryb vzrostlo z 9,3 % na 11,4 %. Procenta myeloidních buněk u kontrolních skupin v normoxii i hypoxii byla srovnatelná.

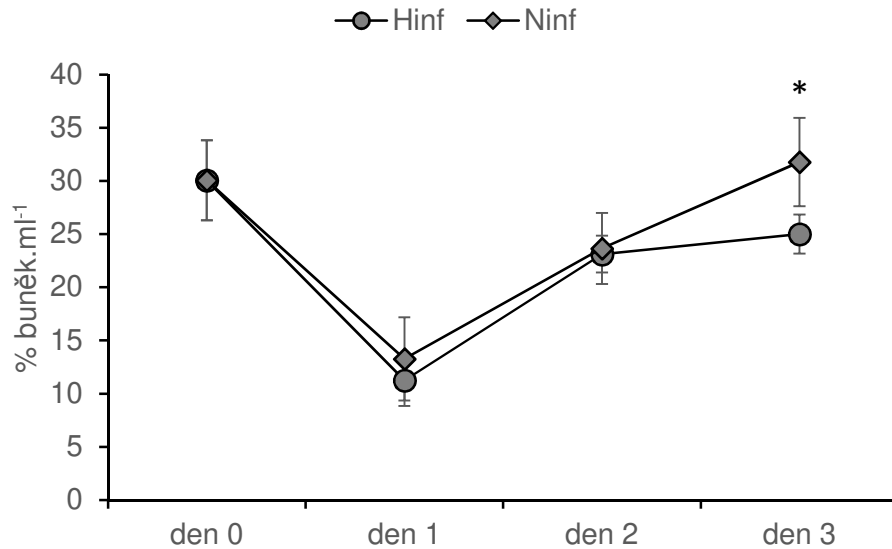
5.3.3 Slezina



Graf 21: Procentuální zastoupení myeloidních buněk ve slezině ve stavu normoxie a hypoxie

V prvním dni imunitní reakce ve slezině procento myeloidních buněk stimulované skupiny ryb v normoxii převažovalo procento myeloidních buněk stimulované skupiny ryb v hypoxii, rozdíl byl necelá 3 %. Ve druhém dni imunitní reakce došlo k poklesu myeloidních buněk u stimulovaných skupin ryb jak v normoxii, z 10,5 % na 3,9 %, tak hypoxii, z 7,9 % na 5,1 %. U kontrolních skupin od prvního do druhého dne reakce převažovalo procento myeloidních buněk v normoxii, ve třetím dni reakce bylo procento myeloidních buněk srovnatelné s procentuálním zastoupením buněk v hypoxii.

5.3.4 Hlavová ledvina



Graf 22: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v hlavové ledvině ve stavu normoxie a hypoxie

Graf 22 poukazuje na fakt, že v prvním dni reakce byla procenta myeloidních buněk stimulovaných skupin ryb v normoxii a hypoxii, oproti procentům buněk kontrolních skupin ryb v normoxii a hypoxii, nízká. Procento buněk stimulovaných hypoxických ryb činilo 11,2 %, oproti tomu procento kontrolní skupiny hypoxických ryb činilo 24,5 %. Na druhé straně procento buněk stimulovaných ryb v normoxii bylo vyšší, jeho hodnota byla 13,3 %, kdežto procento buněk u kontrolní skupiny ryb v normoxii dosahovalo až k 31,1 %. Ke druhému dni imunitní reakce došlo k procentuálnímu zvýšení všech stimulovaných skupin a kontrolní skupiny ryb v hypoxii, ale k poklesu procentuálního zastoupení buněk došlo u kontrolní skupiny ryb v normoxii. Ke třetímu dni reakce došlo k dalšímu procentuálnímu nárůstu obou stimulovaných skupin, procenta kontrolních skupin ryb klesala.

6. DISKUZE

Poptávka po rybím mase v posledních dekáдах zaznamenává trvalý růst. Bohužel zásoby rybích populací v mořích, oceánech a ostatních vodních plochách jsou limitovány a velké procento konzumních druhů je v současnosti rybolovem ohroženo. Chov ryb v akvakulturách se nabízí jako vhodné řešení tohoto problému a jako potenciální udržitelný zdroj rybího masa. Ani intenzifikace akvakulturních chovů však není bezproblémová a často naráží na limity prostředí či chovaných ryb. Z ekonomického hlediska je cílem chovatelů produkovat co nejvyšší množství rybích produktů s nejnižšími náklady. To často vede k zvyšování hustoty rybích obsádek a k zhoršování životního prostředí chovaných ryb. To v důsledku vede k zvyšování stresového zatížení ryb a častým infekcím, které mohou mít negativní dopady na ekonomiku celého provozu. Cílem současného imunologického výzkumu je poznání dopadů akvakulturního chovu na ryby, porozumění vlivu různých biotických a abiotických faktorů ovlivňujících obranyschopnost ryb, stejně jako pochopení základních mechanismů imunitní odpovědi u nových akvakulturních druhů s cílem vývoje účinných preventivních a terapeutických opatření. Právě tyto cíle byly hlavní motivací předkládané diplomové práce, ve které bylo mým cílem přispět k popisu imunitního systému candáta obecného a mechanismu jeho imunitní reakce.

Růst spotřeby rybího masa byl jedním z hlavních hnacích motorů rybí imunologie v posledních dekáдах. U hlavních akvakulturních druhů vedl k detailnímu porozumění různých aspektů imunitní reakce a objevům, které evolučně předcházely imunitnímu systému, jak jej známe u savců. Jelikož patří candát obecný mezi nové akvakulturní druhy, je množství dostupných informací o jeho imunitním systému zatím značně omezené. V první části práce bylo proto mým cílem analyzovat složení leukocytů v hlavních lymfatických orgánech. Z našich výsledků vyplývá, že lymfocyty jsou dominantní složkou hlavních lymfatických orgánů candáta obecného. Zvýšené množství myeloidních buněk bylo sledováno jen v hlavové ledvině, u které je známá funkce krvetvorby a jakéhosi zásobníku myeloidních buněk, které mohou být uvolněny do oběhu v případě potřeby. Toto složení odpovídá složení lymfatických orgánů, tak jak bylo dříve popsáno i u jiných druhů ryb (Korytář et al., 2013; Uribe et al., 2011; Zapata et al., 2006).

Naše data naznačují, že lymfocyty, jako převládající skupina buněk, hrají důležitou roli ve vytváření adaptivní imunitní odpovědi. Naproti tomu myeloidní buňky mají nenahraditelnou roli při inicializaci imunitní odpovědi a při fagocytóze, aktivně se podílí

na tvorbě a regulaci imunitní odpovědi, jsou schopny prezentovat antigen, a představují důležitý typ buněk, který je okamžitě schopen bojovat proti patogenu. Toto odpovídá výsledkům sledovaným u ostatních druhů ryb.

Peritoneální nika představuje unikátní niku s vlastní populací rezidentních leukocytů, které zajišťují první linii obrany v případě infekce (Brietzke et al., 2015; Korytar et al., 2013). Peritoneální nika je taky hojně využívána pro injekci vakcín, neboť poskytuje nejlepší výsledky s ohledem na produkci protilátek a prevenci onemocnění. U candáta se v peritoneální dutině vyskytovaly dva typy buněk – myeloidní buňky a lymfocyty, přičemž druhá skupina představovala převládající buněčný typ. Poměr mezi lymfocyty a myeloidními buňkami se může lišit, což je často specifické pro daný druh ryb.

Peritoneální model zánětu umožňuje studium různých aspektů imunitní reakce, včetně mobilizace bílých krvinek, produkce cytokinů, efektorové funkce individuálních populací či eliminace patogenu a prezentace antigenů ostatním buňkám imunitního systému. Jelikož u candáta popis základního mechanismu zánětlivé reakce chybí, bylo mým druhým cílem analyzovat průběh po stimulaci peritonea inaktivovanou *A. hydrophila*, která posloužila jako modelový antigen. Po provedení stimulace byly sledovány dramatické změny v počtu buněk. Jak je patrné z výsledků, imunitní reakce měla dvě fáze; první byla dominována myeloidní populací buněk, zatímco druhá fáze byla řízena lymfocyty. Toto odpovídá mým předpokladům, jelikož takto imunitní reakce probíhá nejen u candáta, ale i u ostatních druhů ryb, jako je např. pstruh duhový (Borucinska a Martin, 2001; Korytář et al., 2013; MacArthur et al., 1984).

Aby patogen byl eliminován, je zapotřebí, aby imunitní systém vytvořil zánětlivou reakci. Prvními signály k rozvoji zánětlivých reakcí iniciují degranulované tkáňové buňky, fagocyty a látky uvolněné z poškozených buněk. Fagocyty uvolňují cytokiny a další mediátory, které implikují zánětlivé děje. Antigeny vylučované mikroorganismy jsou prezentovány T a B-lymfocyty, které stimulují jejich aktivaci a diferenciaci. B-lymfocyty metamorfují v plasmatické buňky, které sekretují protilátky, a napomáhají opsonizaci mikroorganismů.

Během rozsáhlejší zánětlivé reakce, kdy do peritonea vstupuje masivní množství mikroorganismů, se uvolňují další a další cytokiny, které způsobují novotvorbu a vylití většího množství leukocytů (Magnadottir, 2006).

V první fázi reakce v peritoneu převládaly myeloidní buňky, které se aktivně podílely na eliminaci mikroorganismů. Po eliminaci patogenu byly tyto buňky vystřídány

lymfocyty. Z výsledků pokusu je patrné, že indukci peritoneální dutiny patogenem se mění jednotlivá zastoupení buněk v lymfatických orgánech a v krvi. Z hlavové ledviny se v první den reakce vyplavilo velké množství myeloidních buněk, jež byly transportovány do místa zánětu. V krvi a slezině se toto vyplavení projevilo zvýšeným procentuálním zastoupením buněk myeloidního typu, tak jak bylo popsáno dříve (Havixbeck et al., 2016).

Je zajímavé, že k eliminaci patogenu dojde velmi rychle. Presentovaný pokus byl prováděn po dobu 72 hodin, a po 24 hodinách byl patogen myeloidními buňkami prakticky eliminován. Takto rychlá reakce byla sledována nejen u candáta, ale i u pstruha duhového, u kterého též dochází k dramatickým změnám v počtu buněk a rychlé eliminaci patogenu z těla ryb (Korytář et al., 2013).

V další části této práce bylo cílem studovat vliv snížené koncentrace kyslíku na průběh imunitní reakce. Tento výzkum je relevantní zejména s ohledem na podmínky chovu ryb v akvakulturních systémech a je důležitý pro pochopení vlivu poklesu hladiny kyslíku v chovných nádržích na obranyschopnost ryb. Z výsledků zkoumání vlivu hypoxie na imunitní reakci se došlo k závěru, že hypoxie ovlivňuje rozsah a průběh imunitní reakce, neboť hypoxické ryby prokazovaly rozdílná zastoupení buněk v peritoneální dutině, krvi a lymfatických orgánech. Bylo prokázáno, že hypoxie ovlivňuje zejména zastoupení lymfocytů v peritoneální dutině - hypoxické ryby v peritoneální dutině v průběhu pokusu vykazovaly nižší procentuální zastoupení lymfocytů oproti skupině ryb v normoxii. Naproti tomu rozdíly stavů myeloidních buněk u sledovaných ryb v hypoxii byly dramatičtěji vyšší než u sledované skupiny ryb v normoxii. Tento fenomén nebyl u ryb dosud hlouběji studován a i v savčích systémech je dostupná literatura značně omezená (Taylor a Colgan, 2017). Domnívám se, že důvodem, proč při hypoxii je imunitní reakce zpomalená a stavy lymfocytů v peritoneu jsou nižší, je to, že imunitní systém investuje velké množství energie k eliminaci patogenu, avšak mu nezbyvá tolik energie k tvorbě imunologické paměti.

Z výsledků pokusu je zřejmé, že imunitní reakce candáta obecného probíhala obdobně jako imunitní reakce u ostatních druhů ryb. Při léčbě bakteriálního zánětu by se dalo těchto vědomostí využít k diagnostice a návrhu dalších a efektivnějších postupů léčby bakteriálního onemocnění.

7. ZÁVĚR

Candát obecný patří mezi nové akvakulturní druhy, jejichž intenzivní chov v recirkulačních systémech má v budoucích letech velkou perspektivu. Intenzifikace chovů však sebou nese komplikace zejména se zvýšenou úrovní stresu a sníženou obranyschopností. Jedním z cílů optimalizace chovu je tedy i porozumění imunitní odpovědi chovaných ryb, které však u candáta chybí. Hlavním cílem předkládané práce tedy bylo rozšířit dostupné informace o imunitním systému, průběhu imunitní reakce a vlivu abiotických faktorů na imunitu. Pro tuto práci byly vytyčeny tři dílčí cíle:

- a) Popsat složení hlavních lymfatických orgánů
- b) Popsat kinetiku imunitní odpovědi v peritoneální dutině
- c) Vyhodnotit vliv hypoxie na průběh imunitní reakce v peritoneální dutině

Tyto cíle byly studovány postupně v logickém sledu. Základem tohoto studia, a první částí práce, bylo popsáno složení jednotlivých populací bílých krvinek v lymfatických orgánech (hlavové ledvině, slezině), krvi a peritoneální dutině pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie.

V další části diplomové práce byla provedena simulace peritoneální dutiny inaktivovanou bakterií *Aeromonas hydrophila*, představující modelový antigen. Výsledky této části poskytly nejen detailní popis akutního zánětu v peritoneální dutině, ale ukázaly také, jakým způsobem akutní zánět ovlivňuje složení hlavních lymfatických orgánů.

Ve třetí části práce byl sledován vliv hypoxie na průběh imunitní reakce v peritoneální dutině candáta obecného, zejména s přihlédnutím k intenzitě a průběhu reakce.

Data získaná v rámci této diplomové práce mají využití na úrovni základního i aplikovaného výzkumu. Nabízí detailní popis imunitní reakce, který vytváří kostru pro budoucí studium jednotlivých aspektů imunitní odpovědi u tohoto nového akvakulturního druhu, ale také ukazují na důležitost optimalizace správných chovných podmínek u negativních dopadech hypoxie na zdraví chovaných ryb. Získané výsledky také otevírají nové příležitosti ke studiu mechanismů, kterými saturace kyslíkem řídí imunitní odpověď.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Afonso, A., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1997. The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0089>

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/35004599>

Amler, E., Rauchová, H., Svobodová, J., Drahot, Z., 1986. Regulation of glycerol 3-phosphate oxidation in mitochondria by changes in membrane microviscosity. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81328-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81328-X)

Balik, I., Emre, Y., Sümer, C., Tamer, F.Y., 2011. Spatial and temporal variations and assemblage structure of fish species in Beymelek Lagoon, Turkey. *J. Appl. Ichthyol.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01762.x>

Blecha, M., Kristan, J., Policar, T., 2016. Adaptation of Intensively Reared Pikeperch (*Sander Lucioperca*) Juveniles to Pond Culture and Subsequent Re-Adaptation to a Recirculation Aquaculture System. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_1_02

Borucinska, J., Martin, J., 2001. Peritonitis and pericarditis associated with gastric perforation by a retained fishing hook in a blue shark. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 347–354. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013<0347:PAPAWG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013<0347:PAPAWG>2.0.CO;2)

Brietzke, A., Korytář, T., Jaros, J., Köllner, B., Goldammer, T., Seyfert, H.-M., Rebl, A., 2015. *Aeromonas salmonicida* infection only moderately regulates expression of factors contributing to toll-like receptor signaling but massively activates the cellular and humoral branches of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Immunol. Res.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/901015>

Buřič, M., Bláhovec, J., Kouřil, J., 2016. Feasibility of open recirculating system in temperate climate - a case study. *Aquac. Res.* <https://doi.org/10.1111/are.12572>

Dahiya, I., Stevenson, R.M.W., 2010. *Yersinia ruckeri* genes that attenuate survival in rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) are identified using signature-tagged mutants. *Vet. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.003>

Endut, A., Jusoh, A., Ali, N., 2014. Nitrogen budget and effluent nitrogen components in aquaponics recirculation system. *Desalin. Water Treat.* <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.826336>

Fabbri, M., Smart, C., Pardi, R., 2003. T lymphocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00037-2)

Fao, 2009. *The State of World Fisheries and Aquaculture*, FAO Fisheries and Aquaculture Department.

Frisk, M., Skov, P.V., Steffensen, J.F., 2012. Thermal optimum for pikeperch (*Sander lucioperca*) and the use of ventilation frequency as a predictor of metabolic rate. *Aquaculture.* <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.024>

Hansen, J.D., Zapata, A.G., 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol. Rev.* 166, 199–220. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01264.x>

Harnisz, M., Tucholski, S., 2010. Microbial quality of common carp and pikeperch fingerlings cultured in a pond fed with treated wastewater. *Ecol. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.015>

Havixbeck, J.J., Rieger, A.M., Wong, M.E., Hodgkinson, J.W., Barreda, D.R., 2016. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *J. Leukoc. Biol.* 99, 241–252. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0215-064R>

Hyršl, P., 2017. *I MUNOKOMPETENCE* Bakalářská práce Květa Ciprysová.

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>

Janda, J.M., Abbott, S.L., 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.*

- Joseph, S.W., Carnahan, A., 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu. Rev. Fish Dis.* [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90033-7)
- Koichi Akashi, D.T.T.M.I.L.W., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 193–197.
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., Goldammer, T., Köllner, B., 2013. Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.032>
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., Goldammer, T., Köllner, B., 2013. Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1192–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.032>
- Kucharczyk, D., Kestemont, P., Mamcarz, A., 2007. Artificial reproduction of pikeperch. *Mercur.* Olsztyn, Pol.
- Laing, K.J., Hansen, J.D., 2011. Fish T cells: Recent advances through genomics. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1282–1295. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.004>
- Lawson, T.B., 2013. Recirculating Aquaculture Systems, in: *Fundamentals of Aquacultural Engineering.* https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7047-9_10
- Lebien, T.W., Tedder, T.F., 2008. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood.* <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lewbart, G.A., 2008. *Invertebrate Medicine, Invertebrate Medicine.* <https://doi.org/10.1002/9780470344606>
- Luchiari, A.C., De Morais Freire, F.A., Koskela, J., Pirhonen, J., 2006. Light intensity preference of juvenile pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Aquac. Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01599.x>
- Lugo-Villarino, G., Balla, K.M., Stachura, D.L., Bañuelos, K., Werneck, M.B.F., Traver, D., 2010. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15850–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000494107>

- Lusk, S., Hanel, L., Lusková, V., 2004. Red List of the ichthyofauna of the Czech Republic: Development and present status. *Folia Zool.*
- MacArthur, J.I., Fletcher, T.C., Pirie, B., Davidson, R., Thomson, A.W., 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L. : effects of stress and endotoxin. *J. Fish Biol.* 25, 69–81.
- Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.010>
- Manning, M.J., Nakanishi, T., 2008. The Specific Immune System: Cellular Defenses. [https://doi.org/10.1016/s1546-5098\(08\)60274-5](https://doi.org/10.1016/s1546-5098(08)60274-5)
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d'Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>
- Masarykova Univerzita, 2016. Histologie buněk imunitního systému.
- Murphy, K., Weaver, C., 2016. Janeway's Immunobiology, Janeway's Immunobiology. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A.M., Barreda, D.R., Somamoto, T., Nakao, M., 2014. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Front. Immunol.* 5, 445. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00445>
- Parra, D., Korytář, T., Takizawa, F., Sunyer, J.O., 2016. B cells and their role in the teleost gut. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 150–166. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2016.03.013>
- Parra, D., Takizawa, F., Sunyer, J.O., 2013. Evolution of B cell immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 65–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103651>

- Peňáz, M., Baruš, V., Prokeš, M., 1996. Fish assemblage structure in a reservoir with an extreme hydrological regime (Mohelno Reservoir, Czech Republic). *Folia Zool.*
- Pihu, E., Järvalt, A., Laas, A., Peeter, N., 2004. The influence of water level fluctuations and associated hypoxia on the fishery of Lake Vortsjärv, Estonia. *Ecohydrol. Hydrobiol.*
- Press, C., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Press, C.M., Evensen, Ø., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318. <https://doi.org/10.1006/FSIM.1998.0181>
- Rasmussen, L.A., Conway, H., Raymond, C.F., 2007. Influence of upper air conditions on the Patagonia icefields. *Glob. Planet. Change.* <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2006.11.025>
- Rongved, A.K., 2016. Characterization of Nitrogen Dynamics in Different Recirculation Systems. *Nor. Univ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Saulamo, K., Lappalainen, J., Lehtonen, H., 2005. Biological characteristics of pikeperch, *Sander lucioperca*, during spawning migration in a Baltic Bay. *Fish. Manag. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2004.00434.x>
- Schram, E., Roques, J.A.C., Van Kuijk, T., Abbink, W., Van de Heul, J., De Vries, P., Bierman, S., Van de Vis, H., Flik, G., 2014. The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture.* <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.027>
- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–74. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Skupina rybářů Odry, 2019. Candát Obecný - *Sander lucioperca* - Místní skupina Odry [WWW Document]. URL <https://www.crsmsodry.cz/ryby-nasich-vod/candat-obecny-2/>
- Steinberg, K., Zimmermann, J., Meyer, S., Schulz, C., 2018. Start-up of recirculating aquaculture systems: How do water exchange rates influence pikeperch (*Sander lucioperca*) and water composition? *Aquac. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.10.006>

Sunyer, J.O., 2013. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat. Immunol.* 14, 320–326. <https://doi.org/10.1038/ni.2549>

Taylor, C.T., Colgan, S.P., 2017. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat. Publ. Gr.* 17. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>

Tolonen, A., Lappalainen, J., Pulliainen, E., 2003. Seasonal growth and year class strength variations of perch near the northern limits of its distribution range. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00141.x>

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha)*. 56, 486–503.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>

Zwollo, P., Mott, K., Barr, M., 2010. Comparative analyses of B cell populations in trout kidney and mouse bone marrow: Establishing „B cell signatures". *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1291–1299. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.003>

9. SEZNAM GRAFŮ, OBRÁZKŮ, TABULEK

Seznam grafů

Graf 1: Světová produkce candáta obecného (t)	12
Graf 2: Světová akvakulturní produkce candáta obecného	12
Graf 3: Počet myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie	46
Graf 4: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie ..	47
Graf 5: Počet lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie.....	47
Graf 6: Procentuální zastoupení lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie	48
Graf 7: Počet myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie	49
Graf 8: Procentuální zastoupení myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie	49
Graf 9: Počet myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie.....	50
Graf 10: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie	51
Graf 11: Procentuální zastoupení myeloidních buněk ve slezině ve stavu normoxie	51
Graf 12: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v hlavové ledvině ve stavu normoxie.....	52
Graf 13: Počet myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie.....	53
Graf 14: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie.....	54
Graf 15: Počet lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie.....	54
Graf 16: Procentuální zastoupení lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie	55
Graf 17: Počet myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie a hypoxie.....	56
Graf 18: Procentuální zastoupení myeloidních buněk a lymfocytů v peritoneální dutině ve stavu normoxie	56
Graf 19: Počet myeloidních buněk v krvi ve stavu normoxie a hypoxie	57
Graf 20: procentuální zastoupení myeloidních buněk ve stavu normoxie a hypoxie.....	58
Graf 21: Procentuální zastoupení myeloidních buněk ve slezině ve stavu normoxie a hypoxie	59
Graf 22: Procentuální zastoupení myeloidních buněk v hlavové ledvině ve stavu normoxie a hypoxie.....	60

Seznam obrázků

Obrázek 1: Candát obecný	11
Obrázek 2: Lymfatické orgány ryby (k-ledvina, p-hlavová ledvina, s-slezina, t-thymus).....	21
Obrázek 3:Schéma hematopoézy	24
Obrázek 4: Podání injekční dávky fyziologického roztoku po anestezii ryb	34
Obrázek 5: Eutanazie ryb	35
Obrázek 6: Pitva ryby	36
Obrázek 7: Princip izolace bílých krvinek gradientovou centrifugací	37
Obrázek 8: Příprava roztoků pro gradientovou centrifugaci	38
Obrázek 9: Chlazení připravených vzorků tkání v termoboxu.....	39
Obrázek 10: Barevné frakce a sběr leukocytů.....	39
Obrázek 11: Boxy pro cytopspin.....	40
Obrázek 12: Odstředivka	41
Obrázek 13: Mikroskopická sklíčka před aplikací fixačního roztoku.....	42
Obrázek 14: Průtokový cytometr	43
Obrázek 15: Poměr lymfocytů a myeloidních buněk v peritoneu, krvi, hlavové ledvině a slezině (měřítko 10 μ m)	45
Obrázek 16: Poměr lymfoidních a myeloidních buněk v peritoneální dutině v průběhu zánětlivé reakce	46

Seznam tabulek

Tabulka 1: Růst candáta v rybničním prostředí	13
Tabulka 2: Výhody a nevýhody chovu v recirkulačních systémech (Zdroj: (Buřič et al., 2016)	17
Tabulka 3: Kvalitativní parametry vody a produktivita systému při produkci candáta obecného v RAS.....	19

10. ABSTRAKT

Candát obecný patří mezi nové akvakulturní druhy, jejichž intenzivní chov v recirkulačních systémech má v budoucích letech velkou perspektivu. Intenzifikace chovů však s sebou nese komplikace zejména se zvýšenou úrovní stresu a sníženou obranyschopností. Jedním z cílů optimalizace chovu je tedy i porozumění imunitní odpovědi chovaných ryb, které je však u candáta chybí. Hlavním cílem předkládané práce tedy bylo rozšířit dostupné informace o imunitním systému, průběhu imunitní reakce a vlivu abiotických faktorů na imunitu.

V experimentální části diplomové práce bylo analyzováno složení hlavních lymfatických orgánů, krve a peritoneální dutiny u naivních jedinců. V dalších krocích byl etablován model peritoneálního zánětu. S využitím dostupných metod byl tento model využit k popisu kinetiky imunitní reakce ve třech dnech po indukci akutního peritoneálního zánětu inaktivovanou *A. hydrophila*. Získané výsledky naznačují, že injekce modelového antigenu do peritoneální dutiny candáta indukuje dramatické zvýšení počtu bílých krvinek, které probíhá ve dvou základních fázích. Počáteční fáze je řízena myeloidními buňkami (granulocyty, monocyty), které jsou dominantní populací buněk v průběhu prvních 24 hodin po injekci. V pozdější fázi se počet těchto buněk snížil a myeloidní buňky byly nahrazeny zvyšujícím se počtem lymfocytů. Tyto změny byly patrné nejen lokálně v peritoneální dutině, ale vedly ke změnám v systémových lymfatických orgánech. Zejména první den byl patrný významný pokles v poměru myeloidních buněk v hlavové ledvině a jejich zvýšený počet v periferní krvi a slezině. Další získané výsledky ukazují, že průběh a intenzita akutního zánětu je výrazně ovlivněna koncentrací dostupného kyslíku ve vodě. U hypoxických ryb byl negativní vliv patrný zejména na počtu lymfocytů, zatímco populace myeloidních buněk byla nedostatkem kyslíku ovlivněna méně.

Data získaná v rámci této diplomové práce vytváří kostru pro budoucí studium jednotlivých aspektů imunitní odpovědi a mechanismů, kterými saturace kyslíkem řídí imunitní odpověď.

11. ABSTRACT

Pike perch is one of the new aquaculture species whose intensive rearing in recirculation systems has a great future perspective. However, the intensification of breeding brings with it especially complications with increased levels of stress and reduced defenses. One of the objectives of breeding optimization is therefore also understanding of the immune response of the farmed fish, which is missing in the zander. The main aim of this work was to extend available information about the immune system, the course of the immune response and the influence of abiotic factors on immunity.

In the experimental part of the thesis, the composition of the main lymphatic organs, blood and peritoneal cavity in naive individuals was analyzed. In the next steps, a model of peritoneal inflammation was established. Using available methods, this model was used to describe the immune response kinetics at three days after induction of acute peritoneal inflammation by inactivated *A. hydrophila*. The results suggest that injection of a model antigen into the peritoneal cavity of the zander induces a dramatic increase in the number of white blood cells that occurs in two basic phases. The initial phase is controlled by myeloid cells (granulocytes, monocytes), which are the dominant cell population during the first 24 hours after injection. At a later stage, the number of these cells decreased and myeloid cells were replaced by increasing lymphocyte counts. These changes were evident not only locally in the peritoneal niche, but led to changes in the systemic lymphatic organs. Especially on the first day, there was a significant decrease in the ratio of myeloid cells in the head kidney and their increased number in peripheral blood and spleen. Further results show that the course and intensity of acute inflammation is significantly influenced by the concentration of available oxygen in water. Hypoxic fish was particularly affected by lymphocyte counts, while myeloid cell populations were less affected by oxygen deficiency.

The data from this thesis creates a framework for the future study of individual aspects of the immune response and the mechanisms by which oxygen saturation controls the immune response