

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury a ochrany vod

Bakalářská práce

**Histologické vyšetření raků – zpracování a vyhodnocení
vzorků**

Autor: Václav Kučera

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

Konzultant bakalářské práce: Bernard Erasmus MSC.

Studijní program a obor: Zootechnika, rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: Třetí

České Budějovice, 2020

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. 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 odevzdávanému textu do 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 na Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Václav Kučera

Poděkování

Touto formou bych rád poděkoval své vedoucí práce MVDr. Elišce Zuskové, Ph.D. a konzultantovi Bernardu Erasmusovi MSC. za poskytnutí odborné pomoci při pokusech, při tvorbě písemné části bakalářské práce a za jejich ochotu a aktivní přístup. Dále bych rád poděkoval všem, kteří se na mé práci jakkoliv podíleli a společně tak pomohli k jejímu vzniku.

Ústav akvakultury a ochrany vod/Výzkumný ústav
rybářský a hydrobiologický

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno a příjmení stu Václav Kučera

Studijní program: B4103 / B1601 / N4106

Studijní obor: Rybářství/Ochrana vod/Rybářství a ochrana vod

Název tématu: Histologické vyšetření raků – zpracování a vyhodnocení vzorků

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

Histologie je biologická disciplína zabývající se mikroskopickým vyšetřením tenkých barvených tkáňových řezů za účelem studie jejich struktury úzce související i s funkcí. Histologické vyšetření může odhalit příznaky onemocnění, které nelze zachytit běžným makroskopickým vyšetřením, a proto je vhodným diagnostickým nástrojem při sledování zdravotního stavu ryb. Ačkoli jsou histologické metody zpracování tkání ryb a korýšů v podstatě shodné s těmi, které se používají u savců, jsou zde různé odchylky, které je důležité znát pro správné histopatologické vyhodnocení. Histologické vyšetření je často jedinou metodou, která dokáže přesně určit strukturální charakter změn v dané tkáni, popřípadě vhodně doplňuje a rozšiřuje informace získané jinými diagnostickými metodami. Cílem práce je histologicky zpracovat vzorky raků exponovaných chemikáliím, kvalifikovat a kvantifikovat rozsah nalezených změn ve vybraných tkáních se zaměřením na žábry a hepatopankreas. K celému průběhu zpracování a vyhodnocení provést fotodokumentaci.

Rozsah grafických prací: 10 stran

Rozsah průvodní zprávy: 30 stran

Seznam odborné literatury:

Shields, J.D., and R. Boyd, 2014, Atlas of Lobster Anatomy and Histology, Virginia Institute of Marine Science, www.vims.edu/~jeff/lobster_atlas.pdf also to made available at www.lobster.vims.edu/lobster_atlas.pdf

Genten F., Terwinghe E., Danguy A. (eds.) 2008. Atlas of Fish Histology. Science Publishers. Enfield, NH, USA, 223 pp.

Takashima F. T., Hibiya A. (eds.) 1995. An atlas of fish histology: Normal and Pathological features. 2nd edition. Kodansha Ltd, Tokyo, 195 pp.

Bancroft J.D., Gamble M. (eds.) 2008. Theory and practice of histological techniques. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia, PA, USA, 744 pp.

Vedoucí bakalářské/diplomové práce: MVDr. Eliška Zusková, PhD.

Konzultant: Bernard Erasmus

Datum zadání bakalářské/diplomové práce: 11.1.2018

Termín odevzdání bakalářské/diplomové práce: 18.5.2020

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Histologické zpracování tkání raka.....	8
2.1. Fixace	8
2.1.1. Chemická fixace a typy používaných fixativ	9
2.1.2. Fyzikální fixace a její metody	11
2.2. Odvápňení	11
2.3. Odvodnění	12
2.4. Prosycení tkáně rozpouštědlem a zalití do média	12
2.4.1. Xylen a parafín/ etanol-ether a celodiin	12
2.5. Krájení na mikrotomu	13
2.5.1. Typy využívaných mikrotomů	13
2.5.2. Krájení sekcí.....	14
2.6. Deparafinace a zavodnění	14
2.7. Barvení preparátu	14
2.8. Montování	15
3. Žábry.....	16
3.1. Morfologický popis.....	16
3.2. Žaberní komplex a jeho přidružené části	17
3.3. Fyziologické fungování žaberního aparátu	20
3.4. Výměna dýchacích plynů a amoniaku a into-transportní funkce.....	21
4. Hepatopankreas (HP, slinivkojaterní žláza).....	23
4.1. Morfologický popis.....	23
4.1.1. Svalovina a inervace.....	23
4.1.2. Epitel a typy buněk.....	23
4.1.3. Funkce detoxikační.....	27
5. Patologické změny pozorovaných struktur.....	28
5.1. Vybrané chemické látky.....	29
6. Experimentální část.....	33
6.1. Materiál a metodika.....	33
6.1.1. Pokusná zvířata.....	33
6.1.2. Chemická expozice.....	33
6.1.3. Design experimentu.....	33

6.1.4. Histologie	34
6.2. Výsledky	35
7. Diskuze	38
8. Závěr	39
9. Seznam použité literatury	40
10. Obrázková příloha- technické vybavení laboratoře	48
11. Abstrakt.....	50
12. Abstract.....	51

1. Úvod

Histologie je vědní disciplína zabývající se mikrostrukturou živočišných i rostlinných tkání a jejich změnami. V širším přesahu můžeme histologii pojmenovat jako anatomii buněk a tkání (Gartner a Hiatt, 2007). Obecně se zde jedná o mikroskopické vyšetřování velmi tenkých plátků tkáně fixovaných v médiu (nejčastěji parafinu). Před samotným zalitím do média projde vzorek mnoha chemickými látkami, které buď zastaví samovolné procesy v buňce, nebo přispějí k zprůhlednění či lepšímu zpracování daného vzorku tkáně. Předmětem histologického vyšetření mohou být všechny typy tkání těla zkoumaného organismu. Zpracování jednotlivých tkání se pak v závislosti na jejich anatomických a chemických specifikacích může lišit (Junqueira a kol., 1997; Vacek, 1996).

Histologie je v posuzování otrav ryb nebo raků silným a velmi často používaným nástrojem na odhalení míry poškození vyšetřovaných tkání vystavených rozličným chemikáliím a chovným režimům. Celý proces lze rozdělit na několik kroků, kterým se práce věnuje v první části práce a podrobněji popisuje správné metody vedoucí k vytvoření kvalitního a interpretovatelného vzorku. Podrobněji se zabývá procesem fixace, odvápnění, odvodnění, zalévání do média, krájení, barvení a montování. Popisované metody jsou využity při tvorbě vlastních preparátů a jejich vyhodnocování v experimentální části práce. Hlavním cílem této práce je přiblížit proces správného zpracování vzorků raka a následně klasifikovat buněčné změny ve zpracovávaných vzorcích.

Jelikož se u raků velmi často vyšetřují hepatopankreas a žábry, níže je popsána jejich anatomická a fyziologická funkce. Popis a pochopení jejich struktury pomáhá pochopit buněčné změny způsobené vystavením organismu chemickým látkám. Vzávěrečné části rešerše se práce věnuje typickým patologickým změnám obou zmíněných orgánů způsobených rozličnými látkami (nebo jejich směsmi), které se mohou potencionálně vyskytovat v našich povrchových vodách.

2. Histologické zpracování tkání raka

2.1. Fixace

Po smrti celého organismu dochází vinou přerušení zásobování tkání kyslíkem, ATP a minerály k posmrtným změnám. Tyto změny nenastávají okamžitě. Většina buněk vykonává dále svojí funkci, dokud nejsou kvůli nedostatku chemického substrátu pro své reakce přinuceny přejít na jiné reakce např. z aerobního spalování na anaerobní. V buňkách pak pozorujeme buněčnou dezorganizaci a poruchu buněčného metabolismu. V činnosti ale bohužel zůstávají nativní proteolytické enzymy, a proto zde dochází k procesu autolýzy tj. posmrtnému samonatravení (Vacek, 1988; Jirkovská, 2006).

Tento proces je jedním z rizik při odběru vzorku na histologické zpracování. Aby nedocházelo k posmrtným změnám, je nutné vzorek co nejdříve zafixovat tj. zbavit veškeré enzymy a buněčné součásti jejich přirozené funkce (můžeme zde hovořit o denaturaci vzorku). Hlavním důvodem fixace je tedy zachovat strukturu buněk a potažmo tkání ve stavu co nejpodobnějšímu tomu, v němž se vyskytují v živém organismu. Nemá

tedy smysl odebírat vzorky z rozkládajících se živočichů, ale pouze z bezprostředně usmrcených nebo uhynulých organismů (Junqueira, 1997). V histologické praxi jsou užívány dvě hlavní cesty fixace vzorků, a to zejména chemická a okrajově i fyzikální (Hopwood, 1969).

2.1.1. Chemická fixace a typy používaných fixativ

Fixace je prováděna ponořením vzorků tkání do roztoků (činidel) a je závislá na mnoha faktorech. Důležitými vlastnostmi každého činidla musí být vysoká rychlost prostoupení činidla do odebraného materiálu. Na rychlost prostoupení činidla má vliv velikost vzorku, ale obecně se časové rozmezí fixace pohybuje v závislosti na použitém fixativu od 12 do 48 hodin. Fixační činidlo nesmí ovlivňovat výsledky barvení v pozdějších fázích tvorby preparátu a jeho nativní buněčnou stavbu (Junqueira, 1997).

Mezi faktory ovlivňující proces fixace patří i pH, přičemž fixace je neúčinnější při neutrálním pH v rozmezí mezi 6-8. Kyselé pH pak podporuje tvorbu formalínovo-hemového pigmentu, který se projevuje jako černá polarizovatelná usazenina v tkáni a je tudíž nežádoucí. Z tohoto důvodu je roztok pro fixaci pufrován (tj. je do něho přidán tlumivý roztok zajišťující konstantní pH v průběhu fixace). Dalším faktorem je objem použitého fixativa. Literatura popisuje použití vyššího množství fixativa, a to v poměru 50:1 (Habrová, 1986), popřípadě 20-50:1 (Vacek, 1988).

Velmi důležitá je i teplota, při níž je vzorek uchovávan po dobu prostupování činidla tkáněmi. V některých případech se doporučuje fixovat vzorky při teplotě 4-6°C v lednici. Zpomalí se sice proces fixace, ale zároveň se zpomalují autolytické děje (Jírovec, 1958). Obecně proto můžeme říci, že s rostoucí teplotou se rychlost fixace zvyšuje. Dle Perracia a Mitlera (1972) je pro vlastní fixaci ideální postupné zvyšování teploty od cca 4°C.

K dispozici je velké množství fixačních látek, bohužel žádná z nich nedokáže splnit všechny požadavky. Při výběru špatného fixativa pak hrozí tvorba artefaktů, špatná prostoupení tkání nebo jsou to látky nebezpečné člověku a jeho zdraví (Habrová, 1986)

Přehled roztoků používaných k fixaci vzorků určených pro histologické zpracování

Etanol-Pro fixaci se používá v koncentraci vyšší než 70% (Jírovec, 1958). Při dlouhodobé fixaci v etanolu se snižuje barvitelnost tkání a smršťují se jemné buněčné struktury, a proto se v dnešní době již příliš nevyužívá. Pokud ano, tak se užívá jako denaturovaný etanol s příměsí benzenu nebo benzínu. (Čížková, 2018).

Formaldehyd (jeho 37-40% vodné roztoky jsou uváděny pod názvem formalín nebo formol)-Je jedním z nejčastěji používaných fixativ. Používá se v koncentraci okolo 4%. Jeho pronikání do vzorku je poměrně rychlé a to mezi 24-44 hodinami v závislosti na velikosti vzorku (Vacek, 1988).

Davidson- Preferované činidlo složené z ledové kyseliny octové (115ml), formalínu (220ml), 95% etanolu (330ml) a destilované vody (335ml). Davidson by měl být nahrazen po 24-72 hodinách 70% etanolem. Optimální doba fixace se pohybuje mezi 24-48 hodinami. Následně může být vzorek skladován buď v 70% etanolu, nebo v roztoku

Davidsona, do něhož nebyla přidána kyselina octová. Optimální síla tkáně by se měla pohybovat mezi 4-5mm. Jedná se o preferované činidlo pro fixaci raků, neboť má odvápnovací účinky (Shaw a Battle, 1957).

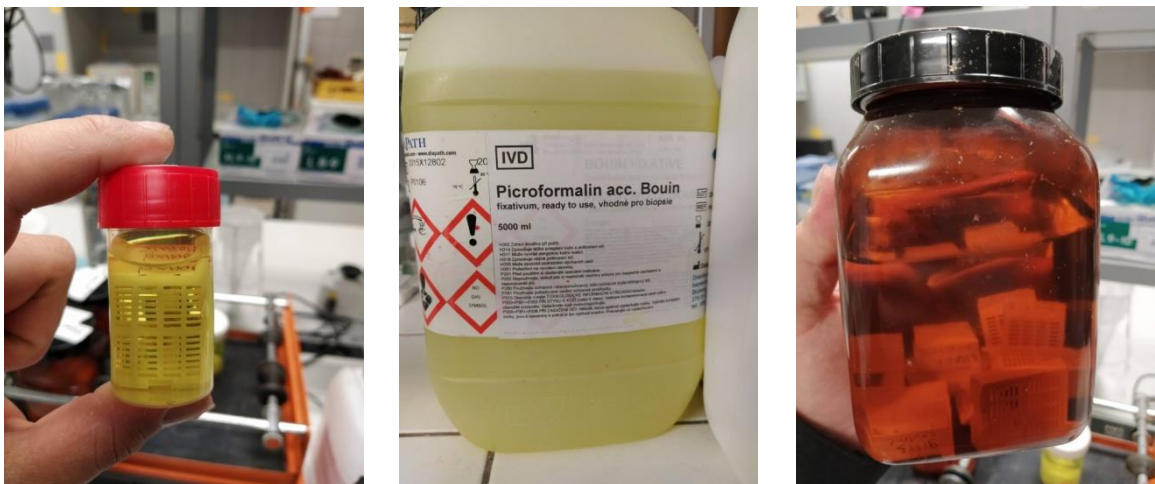
Bouin (Bouinův roztok)- Je roztok žluté barvy a je jedním z nejužívanějších fixačních tekutin. Jedná se o směs kyseliny pikrové, vodného roztoku formolu, kyseliny octové a vody. Tento roztok velmi dobře proniká do vzorků, přičemž doba fixace se pohybuje v rozmezí od 8 do 24hodin (Vacek, 1988) případně od několika do 18hodin (Bancroft a Stevens, 1996). Nehodí se pro fixaci krevnatých orgánů, neboť krev účinkem Bouina hemolyzuje a stává se z ní tvrdá hmota znesnadňující krájení na mikrotomu. Vypírá se v 80 % etanolu (Vacek, 1988).Bouinův roztok se skládá ze saturovaného vodného roztoku kyseliny pikrové (75ml), 25ml 40% formaldehydu a 5 ml ledové kyseliny octové (Bancroft a Stevens, 1996).

Hellyho roztok (Zenkerova tekutina)- Skládá se z 950ml destilované vody, 25g dichromanu draselného, 50g chloridu rtuťnatého a 50g ledové kyseliny octové. Jako jedno z mála fixativ neobsahuje formaldehyd. Velmi dobře stabilizuje proteiny a fosfolipidy, bohužel však hydrolyzuje DNA (Bancroft-Stevens, 1996).

Bakerova tekutina- Bakerova tekutina se skládá z formolu, vody a chloridu vápenatého. Jedná se o tekutinu nerozpouštějící tuky, a proto se hodí na průkaz lipidů (Vacek, 1988).

Pasteelova tekutina- Je vhodná pro tkáně určené k průkazu polysacharidů. Fixuje vzorky v rozsahu 4-24hodin. Následně je tkáň převedena do bezvodého etanolu (Čížková, 2018).

Existuje ještě nespočet dalších fixativ, která se však nevyužívají rutinně, a proto ve výše uvedeném výčtu chybí.



Obrázek 1- vlevo: Bouinův roztok s již umístěným vzorkem v kazetě v průběhu fixace.;uprostřed: Čistý Bouin v zásobním kanystru.; vpravo: Vzorky v kazetách umístěné v roztoku formaldehydu (foto: V. Kučera).

2.1.2. Fyzikální fixace a její metody

Méně často užívaná cesta pro fixaci vzorků. Hlavním principem je zde ovlivnění transportních funkcí vody pro enzymy. Jelikož nejsou tyto metody využívány při fixaci vzorků raka, nebudeme se jimi příliš podrobně zabývat. Níže jsou uvedeny pouze některé postupy využívané v histologii.

Freezing drying

Freezing drying je drahá metoda kombinující prudké zmrazení a působení vakua. Používá se při průkazu citlivých látek, jako jsou např. enzymy. Malé kousky tkáně se při této metodě zmrazí na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a současně vysuší ve vakuu (Pearse, 1980).

Hluboké zmrazení

Fixace hlubokým zmrazením je prováděna použitím tekutého dusíku při teplotě -196°C . Zabrání se tak krystalizaci vody a následnému poškození buněk krystaly. Používá se v histochemii nebo cytochemii (Habrová, 1986).

Fixace suchým teplem

Fixace suchým teplem je téměř výhradně bakteriologická metoda, při níž se fixuje nátěr několikerým protažením podložní sklička plamenem Bunsenova hořáku (Vacek, 1988).

2.2. Odvápnění

Odvápnění (dekalifikace) je proces, při němž jsou nerozpustné vápenaté soli obsažené v tkáni převedeny do roztoku (Vacek, 1988).

Tento krok je zejména u zpracování raka velmi důležitý, neboť rak ukládá dostupné minerály i do hepatopankreatu. Tvoří si tím další zásobárnu minerálních látek nutných k rekalifikaci krunýře ve fázi postecdysis tj. období po výměně krunýře (Kozák, 2013).

Samotné odvápnění se provádí pomocí kyselin jako je například 5% kyselina dusičná, 5% kyselina trichloroctová a 22-23% kyselina mravenčí nebo za pomoci komplexotvárných sloučenin jako jsou EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina). Proces dekalifikace je závislý na typu roztoku a velikosti dekalifikovaného vzorku a pohybuje se v rozmezí od několika hodin po několik dnů. Po vyjmutí z odvápňovacího roztoku je třeba vzorek důkladně opláchnout v čisté vodě a následně uchovat až do další procedury v 70% etanolu (Vacek, 1988).

Rychlost dekalifikace je možné zvýšit i elektrickým proudem. Podle autorů jsou ionty Ca^{2+} uvolňovány z tkáně efektivněji v přítomnosti elektrického proud (Ducey a Shippy, 1950; Scheliga, 1952).

2.3. Odvodnění

Celý proces odvodnění (dehydratace) je prováděn řadou etanolových lázní s vzestupnou koncentrací. Postupné zvyšování koncentrace namísto přímého ponoření do 100% etanolu je prováděno jako prevence před smrštěním tkáně (Vacek, 1988).

V dnešní době existují přístroje tzv. tkáňové procesory, které jsou schopny při nastavení programu automaticky přesouvat vzorky mezi jednotlivými koncentracemi a tím dosáhnout perfektního odvodnění. Většinou se začíná tkáň odvodňovat v etanolu o koncentraci 70% a postupně se přes 80% a 96% dostaneme až k 100 % etanolu. Přístroje tohoto typu většinou pracují s pěti nádobami rozdílných koncentrací a s vyšší teplotou. V extrémních případech (malá velikost vzorku, urgentní vyšetření) je možné dobu procesování tkáně zkrátit až na 2hodiny. V tomto případě vstupuje do hry i použití vakua a rovněž alkoholová řada se liší svými koncentracemi (Bancroft a Stevens, 1996).

Stejně jako u všech předchozích kroků je doba odvodnění závislá na velikosti vzorku, tj. 1cm³ odpovídá 2-4h v 70% etanolu, 2-6h v 80% etanolu, 4-6h v 96% etanolu a třikrát 1-4h v 100% etanolu. Dohromady proces trvá kolem 20-24hodin (Jirkovská, 2006).

2.4. Prosycení tkáně rozpouštědlem a zalití do média

2.4.1. Xylen a parafin/ etanol-ether a celoidin

Před zalitím vzorku do parafinu je potřeba odstranit přebytečný etanol. Ten by při zbytkovém podílu v tkáni mohl vytvořit tvrdší, špatně zpracovatelnou hmotu. Pro tyto účely se využívá xylén, který je následně odpařen rozpouštěným parafinem. Prosycení parafinem při teplotě 58-60°C odpaří a nahradí veškerý xylén ve vzorku. Tento krok je také někdy popisován jako „projasnění“. Parafin je zde užíván i pro zpevnění tkáně pro snadnější řezání na mikrotomu. Při všech těchto krocích je každý vzorek umístěn v samostatné mřížkové kazetě (Junqueira, 1997).

Zalévání do formiček se provádí v termostatu, kde se zjednodušeně jedná o nahřívání zásobník na rozpouštěný parafin, vyhřívání nádoby na formičky a chlazenou plochu pro fixaci vzorku v požadované poloze. Tento proces může být prováděn jak manuálně, tak i automaticky například v zalévací lince (Bancroft a Stevens, 1996). Zde je automaticky vypouštěn parafin do vybraných formiček. Oproti starému systému tvorby papírových formiček a jejich tvarování a ořezávání (Vacek, 1988) je zde ušetřeno velké množství času a manuální lidské práce.

Při použití celoidinu tj. nitrátu celulózy je místo xylenu vzorek prosycen etanol-etherem po dobu 6-8 hodin. Tento postup je využíván především při tvorbě preparátů z tvrdších tkání. Postup prosycení spočívá v postupném ponoření tkáně do vzestupné řady koncentrací celoidinu. Začíná se na 2% a postupuje se přes 4%, 8% a finálně 10% koncentrací celoidinu (Lauschová a kol., 2007).

Následně je vzorek zalit 10% celoidinem (Čížková, 2018) a přes exikátor, kde jsou odpařeny páry etanol-eteru pomocí listu papíru nebo filtračního papíru, vysušen do konzistence měkké gumy. Takovýto blok je odříznut a ponechán delší dobu na vzduchu, aby ještě více ztuhnul. Finálně je blok vytvrzen ponořením do etanolu o koncentraci 75-80% po dobu 24 hodin. Následně je v etanolu ponechán až do krájení na mikrotomu.

Nevýhodou zalévání do celoidinu je dlouhá doba přípravy preparátu pohybující se v řádech týdnů. Není vhodná vzhledem k povaze etanol-eteru na přípravu průkazu lipidů, které jsou zde extrahovány a nedá se využít po fixaci tkáně Bouinem. Naopak jeho výhodou je velká šetrnost, neboť zalévání celoidinem se děje při pokojové teplotě (na rozdíl od parafínu kdy je vzorek ohříván na teplotu 58-60°C). V celoidinu je také možno krájet tvrdší tkáně, které by nebylo možné krájet zalité v klasickém parafínu (Vacek, 1988).

2.5. Krájení na mikrotomu

2.5.1. Typy využívaných mikrotomů

Mikrotom je specifický přístroj sloužící v histologické praxi pro odřezávání ultratenkých plátků tkáně zalité v médiu. Jedná se o velmi přesný přístroj pohybující se řádově v hodnotě stovek tisíc korun. V dnešní době můžeme najít několik typů mikrotomů. Stejně tak existuje i velké množství typů nožů využívaných při krájení. Každý mikrotom je designován pro specifický účel, ačkoliv mnoho z nich je možno používat i univerzálně. Mikrotomy můžeme rozdělit do dvou základních skupin, a to manuálních a automatických (Mohammed a kol., 2012). Ve své práci uvedu jen některé z typů.

Houpací mikrotom je v Cambridge vynalezený a často používaný mikrotom minulého století, který je dnes už prakticky nevyužíván a je zde uveden pouze pro ilustraci vývoje histologické techniky v posledních desetiletích (Bancroft a Stevens, 1996).

Rotační mikrotom (také nazývaný Minot po svém vynálezci) je v dnešní době jeden z nejčastěji využívaných mikrotomů. Stal se velmi populárním pro přesné řezy již od síly 3 μ m a svojí schopností odříznout i velmi tvrdé tkáně (Bacroft a Stevens, 1996). Oproti houpacímu mikrotomu je těžší a stabilnější (Sloane a Harris, 1952).

Sáňkový mikrotom je využíván především v laboratořích potýkajících se s tvrdými tkáněmi nebo velkými bloky tkání. Nejčastěji je užíván v neuropatologii, kde jsou histologicky vyšetřovány velké bloky mozkové tkáně (Mohammed a kol. 2012). Nevýhodou je náročnější produkce konzistentních 3 μ m plátků v porovnání s rotačním mikrotomem (Bacroft a Stevens, 1996).

Sliding mikrotom je zvláštním typem, neboť se zde pohybuje nůž a ne blok tkáně. Je proto nebezpečnější pro obsluhu než předchozí zmíněné typy a byl vyvinut primárně pro krájení větších celoidinových bloků (Bancroft, 2008).

Laserový mikrotom je užíván pro přesné bezkontaktní krájení sekcí bez tepelného poškození. Je vybaven moderní femtosekundovou laserovou technologií. V závislosti na zpracovávaném materiálu je možné dosáhnout síly řezu od 5 do 100 μ m. Další výhodou tohoto přístroje je absolutní minimum artefaktů ve výsledném řezu (Tobie, 1958).

2.5.2. Krájení sekci

Než je oddělen plátek s tkání vhodnou na mikroskopické pozorování, je třeba z bločku odřezat vrstvu nepotřebného média (v tomto případě např. parafínu)- tomuto se říká trimování. Aby bylo trimování tj. odstranění nepotřebných částí parafínu úspěšné, musí být bloček ochlazen na optimální teplotu (děje se tak např. potíráním plochy bločku štětcem namočeným do ledové tříště). Následně nastavíme na mikrotomu sklon ostří a sílu řezu, která se při trimování pohybuje mezi 10-15 μ m. (Bacroft a Stevens, 1996).

Poté, co je z bloku odstraněn přebytečný parafín a je obnažena část tkáně vhodné k pozorování, je mikrotom přenastaven podle našich preferencí na jinou sílu řezu, většinou mezi 1-10 μ m (Junqueira, 1997) a je zhotoveno několik (až několik desítek) ultratenkých plátků, které jsou následně umístěny na hladinu vodní lázně a po propnutí následně na podložní sklíčka. Zde jsou ponechány 5-10 minut, aby při pokojové teplotě osychaly (Bacroft a Stevens, 1996).

2.6. Deparafinace a zavodnění

Protože je většina využívaných barviv hydrosolubilních tj. rozpustných ve vodě, není je ve formě vodných roztoků možno implementovat do preparátu a tím ho obarvit. Vzhledem ke skutečnosti, že byl v předchozích krocích vzorek odvodněn a následně zalit do parafínu, je proto třeba vzorky zpětně zavodnit. V prvním kroku je vzorek zbaven parafínu aplikací xylenu (2 lázně po pěti minutách) a následně je vzorek vždy na pět minut ponořen do sestupné řady alkoholových lázní. Začínáme na 100 % etanolu a končíme na 70%. Následně řezy na podložních sklíčkách vypereme v tekoucí vodě. Zavodňování vzorku je ukončeno při finálním ponoření vzorku do roztoku 70% etanolu (Bancroft a Stevens, 1996; Vacek, 1996).

2.7. Barvení preparátu

Vzhledem k tomu, že se neobarvené řezy dají sledovat pouze mikroskopem s fázovým kontrastem, je třeba většinu tkání na histologické vyšetření obarvit. Existuje široká škála barviv užívaných v histologické praxi. Můžeme je rozdělit na barviva bazofilní (zásaditá, jaderná), která jsou schopná svými radikály obarvit jaderný chromatin a eosinofilní (kyselá, plazmatická) schopná obarvit svými radikály cytoplazmu buňky. S označením jaderná a plazmatická se setkáváme především ve starší literatuře (Vacek, 1988 a Habrová 1986).

Hematoxylin & Eosin (H&E)

Hematoxylin je barvivo extrahované ze stromu s latinským názvem *Haematoxylin campechianum*. Toto barvivo není barevné samo o sobě. Typické zbarvení přináší až oxidační produkt hematincož je zásadité barvivo schopné diferencovat jádra jednotlivých buněk ve fialovém až černém odstínu (Titford, 2005). Je možné ho získat dvěma základními cestami. První z nich je přírodní cestou při vystavení světlu a vzduchu. Tento proces však trvá velmi dlouho (okolo 3-4měsíců) a je proto nevhodný pro laboratorní využití. Druhou možností je přidání oxidačního činidla jako je například jodičnan sodný (tímto postupem získáme velmi běžně užívaný Mayerův hematoxylin) nebo oxid rtuťnatý

čímž získáme Harrisův hematoxylin (Vacek, 1998). Pokud do čistého roztoku hematoxylinu přidáme některé z těchto činidel, k oxidaci dochází téměř okamžitě a roztok je připraven k použití. Na rozdíl od přírodní cestou vzniklého hematinu je nadále oxidován a pokud není montován, časem ztratí svou rozlišovací a barvicí schopnost a přemění se v bezbarvou látku (Titford, 2005).

Eosin je jedním z nejvíce vhodných barviv kombinovatelných s různými formami hematoxylinu. Jeho hlavní schopností je ale přesné (při správně provedené diferenciaci) obarvení jednotlivých struktur a rozlišení mezi cytoplazmou jednotlivých typů buněk a zároveň i různými druhy pojivových tkáňových vláken. Je nejčastěji používán jako 0,5-1% vodný roztok s přidáním krystalu tymolu (velmi silné antiseptikum zaručující sterilitu barvicího roztoku). Je vhodné do roztoku přidat ještě kyselinu octovou (0,5ml na 1000ml roztoku), protože se zostří barevné přechody mezi růžovou a červenou. Eosin je tedy kyselé barvivo schopné diferencovat cytoplasmu (různé odstíny růžové), svalová vlákna (tmavě růžová/červená), červené krvinky (oranžová až červená) a fibrin (tmavě růžová) (Bancroft a Stevens, 1996).

Aplikace barviva

Jak již bylo popsáno výše v kapitole Deparafinace a zavodnění je plátek přilepený na podložním sklíčku zavodněn a zbaven parafínu. Následuje už samotné barvení, kdy je celé sklíčko se vzorkem ponořeno do vodného roztoku barviva. Pro Mayerův hematoxylin se doba ponoření do roztoku pohybuje mezi 5-10 minutami (Bancroft a Stevens, 1996) popř. 3-10 minutami (Vacek, 1988, 1996). Následně je vzorek pečlivě opláchnut pod tekoucí vodou po dobu nejméně pěti minut. Po opláchnutí dochází k diferenciaci v 1% roztoku kyselého alkoholu. Tento krok je prováděn, protože hematoxylin sice obarví jádra buněk, ale zároveň přibarví i tkáňové složky jako například vazivo. Následně je vzorek opět omýván pod tekoucí vodou a ponořen do 1% roztoku eosinu po dobu asi 10 minut (Bancroft a Stevens, 1997) popř. 1-5 minut (Vacek, 1988). Vzorek je pak opět oplachován a finálně odvodněn řadou alkoholů. Na závěr je vzorek projasněn dvěma lázněmi xylenu a je připraven na pozorování a případné montování pro tvorbu trvalého preparátu.

2.8. Montování

Jedná se o poslední krok, kdy vzorek obarvený H&E zalijeme do uzavíracího média. Většinou se jedná o látky rozpustné v xylenu, a proto je stačí pouze aplikovat. Mezi látky dříve využívané a spíše přírodního charakteru můžeme zařadit hustý cedrový olej, kanadský balzám anebo z opačného konce spektra umělé pryskyřice (Vacek, 1996).

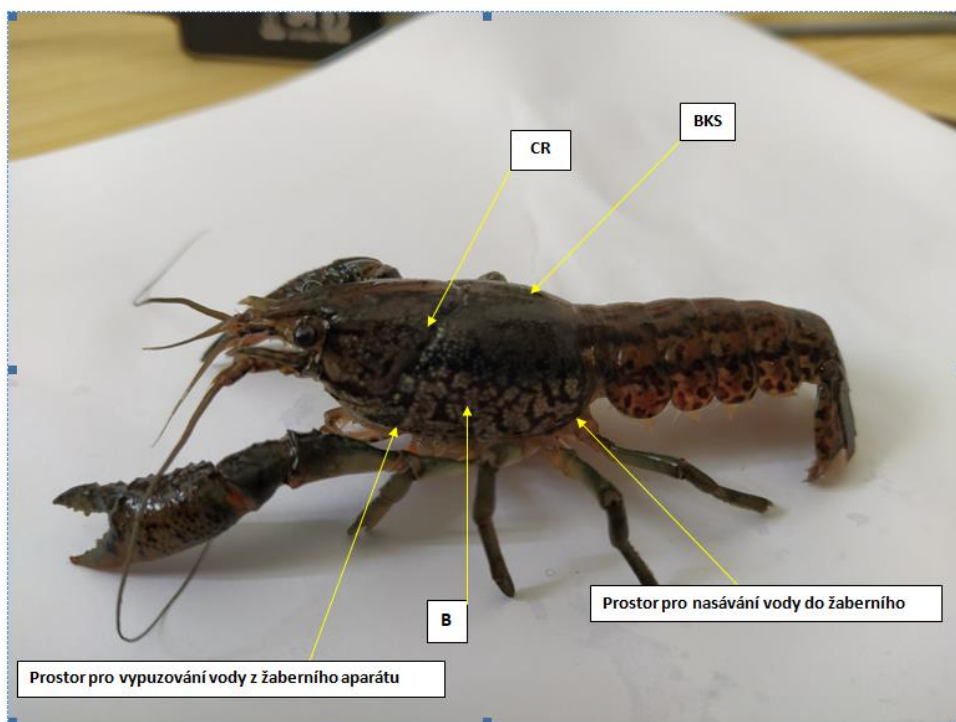
V následující kapitole popisují anatomickou stavbu a fyziologické fungování vyšetřovaných orgánů raka a to jmenovitě žaber a hepatopankreatu. Jedná se o orgán přicházející do styku s vnějším prostředím (žábry) a o orgán podílející se na detoxikaci xenobiotik (hepatopankreas) vyskytujících se ve vodním prostředí, a tudíž o tkáň snadno postižitelné cizorodými látkami a vnějšími vlivy (Vogt, 2020). Bez pochopení jejich fyziologické funkce a anatomické stavby není možné posuzovat dopady na organismus při změnách jejich primární buněčné struktury.

3. Žábry

3.1. Morfologický popis

Rak je organismem opatřeným ochranným krunýřem znemožňujícím příjem látek a jejich vyloučení prostou difúzí přes povrch těla. Račí tělo je schopno přímé difúze pouze v místech měkké membrány kloubů a spodiny zadečku. Tato metoda je ale silně nedostačující (Zarenkov, 1982). Z tohoto důvodu se u raků vyvinuly složité žábry, které plně zabezpečují přísun kyslíku, minerálních látek ale i vylučování metabolitů. Povrch žaber je schopen přijímat a vylučovat dýchací plyny a minerály asi 300x efektivněji než krunýř (Vogt, 2002; Péqueux, 1995).

Kvůli zranitelnosti jemného žaberního aparátu jsou žábry umístěny v tzv. žaberních komorách na bocích hlavohruď. Komory jsou párové a jsou na rakovi pozorovatelné jako dvě linie táhnoucí se od ústního pole až k bázím hrudních kráčivých končetin. Samotné překrytí žaber a vytvoření linie (mezery v krunýři) je tvořeno záhybem karapaxu, tj. vnější ochrana hlavohruďi raka tvořená primárně chitinem, uhličitanem vápenatým a z menší části fosforečnanem vápenatým. Tento překryv žaber je odborně označován jako branchiostegit. Linie tvořené spodním okrajem branchiostegitu se nazývají brachiální brázdy. Záhyb karapaxu je tedy mechanickou ochranou před vniknutím větších nečistot a zároveň i ochranou před útokem predátorů na nejzranitelnější část račího těla. Drobné mechanické nečistoty pak před vnikem do aparátu odcloní ještě husté štětiny pokrývající spodní okraj brachiální brázdy. Jako ochrana samotného povrchu žaber samozřejmě slouží i slizová vrstva (Zarenkov, 1982).



Obrázek 2- Vnější popis raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*) užívaného pro testy a histologické pokusy. B-branchiostegit, CR- cervikální rýha, BKS-branchio-kardiální šev, (foto: V. Kučera).

3.2. Žaberní komplex a jeho přidružené části

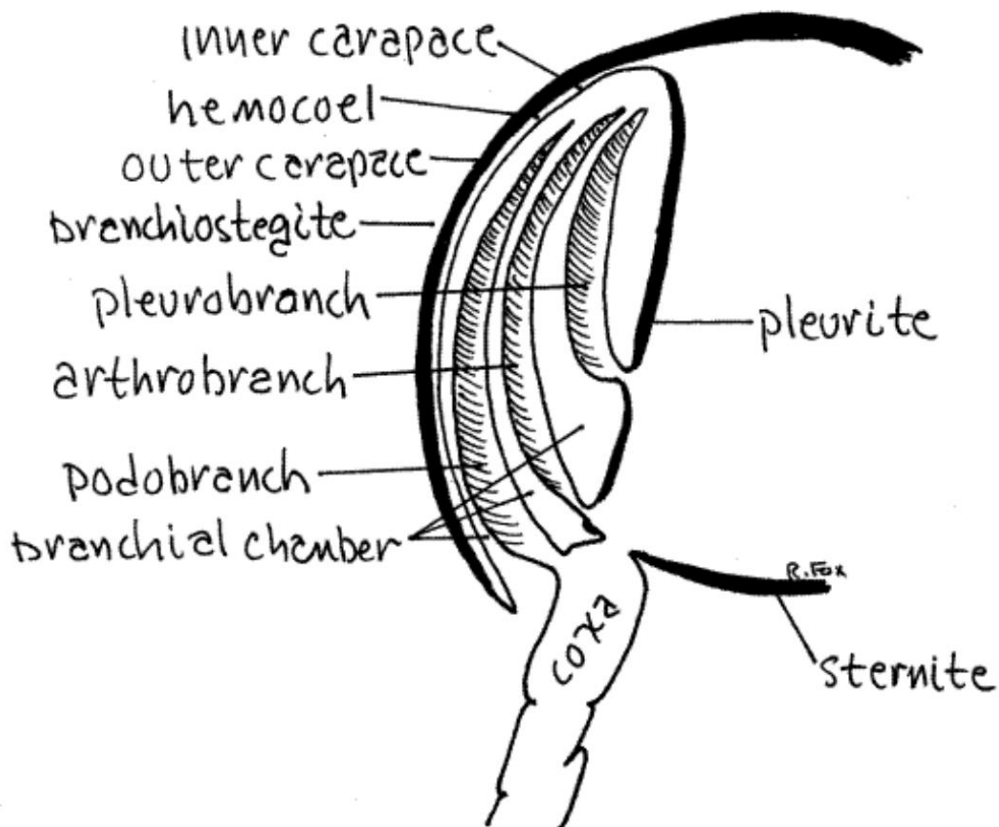
Na těle raka můžeme najít hned několik typů žaber. Jsou umístěny v žaberní dutině a liší se pouze základnou odkud „vyrůstají“. Můžeme proto rozlišovat tři základní typy:

Podobranchie tj. žábry vyrůstající z epipoditů. Epipoditem nazýváme ploché výrůstky membránovitěho typu vyrůstající z koxálního článku končetiny (Huxley, 1879).

Arthrobranchie tj. žábry umístěné na měkké membráně mezi bází nohou a tělem. Pokud jsou arthrobranchia rudimentální, mohou se například u raka říčního podílet na vylučování slizu (Bock, 1925).

Pleurobranchie tj. žábry vyrůstající nad končetinami (Huxley, 1879).

Během diferenciacce žaber se jako první vyvíjí žábry na koxální části končetiny a následně migrují do svojí finální polohy (Holdich a Reeve, 1988).



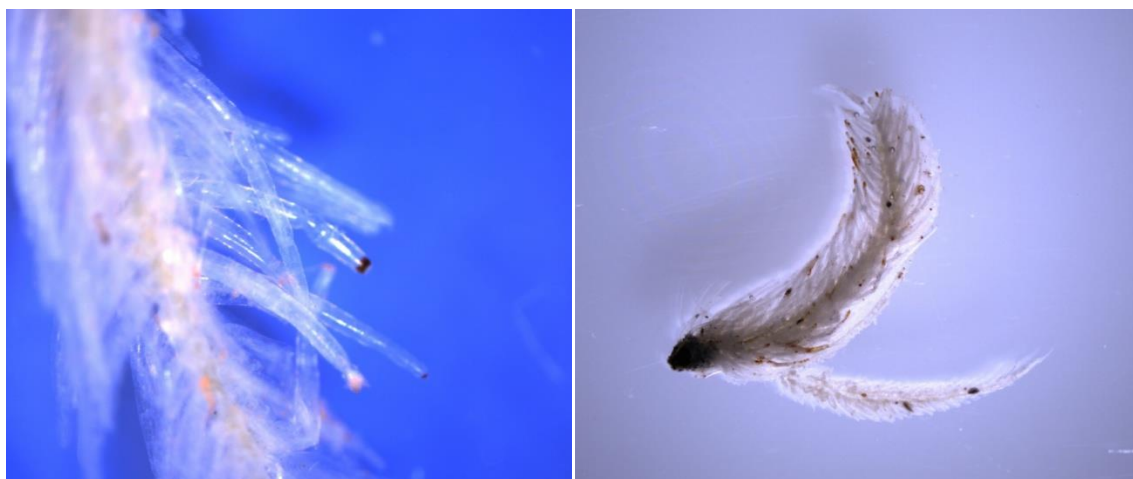
Obrázek 3- Schématický nákres obecné stavby branchiální dutiny a rozložení typů žaber u desetinožců (Decapoda). (autor: Fox, 2006).

Rak proto může mít z každé strany na každém hrudním článku až 4 žábry (např. u raka říčního se nachází 1 podobranchie, 2 artrobranchie a 1 pleurobranchie). Na každém článku se však počet může lišit, a proto se zpravidla udává pouze celkový počet funkčních žaber v jedné žaberní komoře. Tento počet bývá druhově nebo rodově specifický (rak říční 18, *Cambaridae* 17, raci jižní polokoule v rozmezí mezi 12-21) (Vogt, 2002).

Žábry raků, jak bylo již popsáno výše, jsou hlavním orgánem zajišťujícím přenos minerálů a dýchacích plynů mezi tělem raka a vnějším prostředím. Z tohoto důvodu je nutné, aby měly žábry co největší povrch sloužící k přenosu látek. Celá stavba žaber je podmíněna této skutečností. Žábry můžeme popsat jako rozvětvené tzv. trichobranchiálního typu. Základem žaber je kmen, ze kterého vyrůstají žaberní filamenta. Těch bývá okolo 300 na každém kmenu. Filamenta jsou pokryta kutikulou o síle od 1 do 15 micrometrů v závislosti na činnosti probíhající na dané části žaber. Tyto kmeny a buňky kmenů jsou inervovány z ganglií hřbetních článků (Fomičev, 1986).



Obrázek 4- Odhalená žaberní dutina (označená žlutou elipsou) raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*), (foto: V. Kučera)



Obrázek 6- Vlevo: bližší pohled na filamenta žaberního aparátu, vpravo: kmen podobranchie oddělený z žaberního aparátu, (foto: V. Kučera).

Přidružené části žaberního komplexu

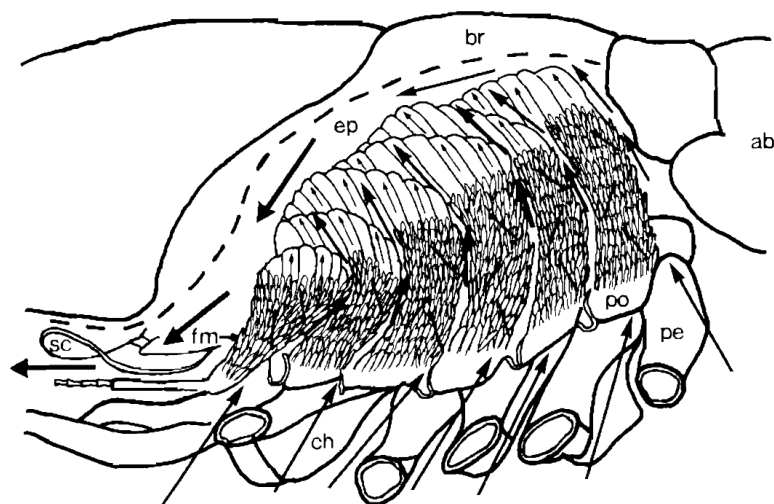
Nedílnou součástí komplexu žaber jsou i další výrůstky na těle raka sloužící buď k vhánění vody do žaberního aparátu a tím zlepšení přijímání kyslíku nebo výrůstky zajišťující případné odstranění nečistot z aparátu. Do skupiny „čističů“ můžeme zařadit setobranchie tj. dlouhé výrůstky vycházející z papil na třetí maxilipedě tj. nohočelisti a prvních čtyřech pereopodách tj. kráčivých končetinách. Tyto výrůstky pronikají při pohybu končetin mezi žaberní filamenta a uvolňují případné nečistoty z žaber (Vogt, 2002). Mezi další pomocnou strukturu můžeme zařadit veslovitý výrůstek nacházející se v oblasti druhého páru čelistí tzv. skafognatit, tj. exopod vyrůstající z druhé maxily. Při jeho kmitání je voda z žaberní dutiny tlačena směrem dopředu ve směru rostra, kde je vypouštěna po stranách ústního pole a v zadní části žaber mezi bázemi nohou a spodním okrajem krunýře naopak díky vytvoření podtlaku nasávána nová, okysličená voda proudící k žábrám. Skafognatit spolupracuje se specifickými kyslíkovými receptory na filamentách žaber. Ty při poklesu hladiny kyslíku v hemolymfě vysílají signál skafognitu ke zvýšení frekvence kmitání a tím zvýšení průtoku okysličené vody žaberní dutinou. V normálních podmínkách je u raka říčního (*Astacus astacus*) frekvence kmitání skafognatitu mezi 44-150 kmitů za minutu a touto frekvencí je do žaberní dutiny vháněno mezi 0,2-0,81 litry vody za hodinu (Wolvekamp a Waterman, 1960). Objem vody závisí na velikosti zvířete, momentální kondici raka a právě probíhajících fyziologických procesech (Holdich, 2002).

Celý proces kmitání je řízen tak, aby nasávaný proud vody nevtahoval do žaberní dutiny nečistoty. Z toho důvodu je směr kmitání často obrácen. U raka červeného *Procambarus clarkii* to jsou asi 2 kmitů za minutu v opačném směru při celkovém počtu 112 kmitů za minutu (Reiber, 1994). Silně zvýšené požadavky na kyslík se dostávají při svlékání nebo při nošení vajíček u samic (Reiber, 1997).

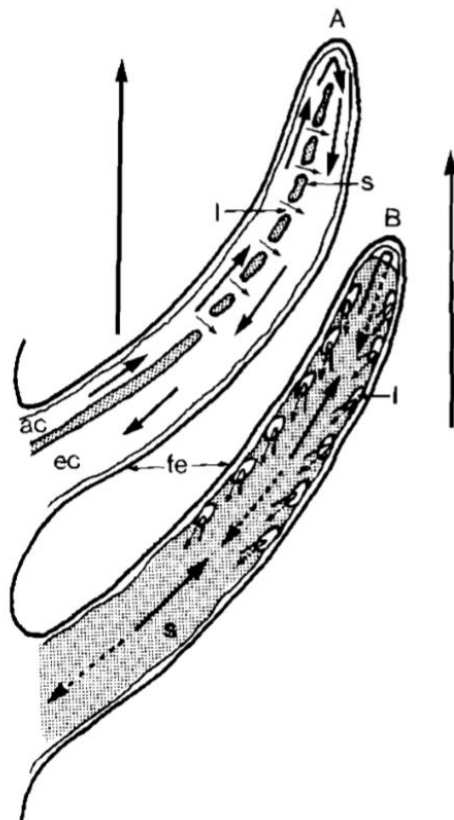
3.3. Fyziologické fungování žaberního aparátu

Žábry raka fungují jako hlavní brána pro přenos dýchacích plynů tedy O_2 a CO_2 , a rovněž pro odstranění amoniaku z hemolymfy. Existují zde i buňky epitelu schopné filtrace patogenů a odpadních produktů, které kumulují ve vakuolách a následně napomáhají při jejich odstraňování z hemolymfy. Jedná se o buňky zvané nefrocyty (Holdich, 2002).

Jedním z důležitých období pro fungování žaber je proces ekdyze (období svlékání krunýře a tím intenzivního růstu), kvůli silně zvýšené potřebě kyslíku a zároveň zpětnému aktivnímu vstřebávání chloru a sodíku pro dekalifikaci krunýře. Žábra se také aktivně podílí na osmoregulaci a rak tak vyměňuje s okolním prostředím v závislosti na dalších tělesných pochodech i vápník, vodík, hydrogličitanové ionty, sodík a chlor (Kozák, 2013).



Obrázek 7- Schématický nákres směru proudění vody uvnitř branchiální komory. Prerušovaná čára značí místo oddělení branchiostegitu. Dlouhé a slabé šipky naznačují místo nasávání vody. Silné šipky v horní části nákresu znázorňují místo odtoku vody ven z komory. *ab*-abdomen, *br*-branchiostegit, *ep*-epibranchiální prostor, *fm*-filamenta, *ch*-chelipedy, *pe*-pereopody, *po*-podobranchie, *sc*- skafognatit (autor: Burggren, 1974).



Obrázek 8- Schématický nákres směru proudění vody kolem podobranchiálních filament a tok hemolymfy uvnitř filament. Schémata A a B jsou tímtež filmanetem pouze zobrazeným s 90° rotací. Plné šipky uvnitř filament znázorňují tok hemolymfy v aferentním kanálu, přerušované šipky tok v eferentním kanálu. Tok vody kolem žaber je naznačen velkými vertikálními šipkami. (ac-aferentní kanál, ec-eferentní kanál, fe-epitel filamenta, l-lakuna, s-septum)(autor: Burggren, 1974).

3.4. Výměna dýchacích plynů a amoniaku a into-transportní funkce

Na rozdíl od mořských zástupců korýšů jako jsou humři nebo krabi, neexistuje u raků na žábrách rozčlenění na přední část, která se fyziologicky zaměřuje na výměnu plynů a zadní část specializovanou na iontovou regulaci. Například u Raka bahenního (*Astacus leptodactylus*) nebo u Raka červeného (*Procambarus clarkii*) můžeme pozorovat u všech žaber stejnou funkci. Rozdělení na iontovou transportaci a výměnu plynů je totiž realizováno až na úrovni jednotlivých filament (Dickson a kol., 1991; Baradas a kol., 1999).

U Raka červeného bylo zjištěno, že se téměř celý aparát s výjimkou špiček žaber a celé 6.pleurobranchie specializuje na výměnu dýchacích plynů. Měření určující fyziologickou funkci byla provedena na základě barvení stříbrem-indikátorem into-transportních tkání, strukturální analýzou a měřením Na^+ , K^+ a ATPázy, jakožto hlavním hybatelem iontové výměny. Na základě těchto měření bylo jasně určeno, že se na filamentech liší epitel, a tudíž i funkce jednotlivých částí žaberního lístku jsou rozdílné (Dickson a kol., 1991).

Části filament zastupující funkci výměny plynů mají velmi tenkou membránu a jsou chudá na orgány, jako jsou např. mitochondrie. Patně je to pro menší spotřebu kyslíku u buněk samotných a tím efektivnější přenos kyslíku do tělního oběhu. Síla kutikuly se zde pohybuje kolem 2 μm , v závislosti na druhu raka (Baradas a kol. 1999; Fisher, 1972).

Takto jemná stěna mezi hemolymfou a vodním prostředím zajišťuje prostou difúzi rozpuštěného kyslíku do hemolymfy. Rak říční (*Astacus astacus*) je schopen takto z vody využít kolem 49-71% dostupného kyslíku. Takto vysoká efektivnost využívání kyslíku je blízká rybám a jiným obratlovcům a je velmi vysoká v porovnání s dalšími bezobratlými (Wolvekamp a Waterman, 1960). Zde se také uskutečňuje vylučování odpadních látek. První z nich je oxid uhličitý, který je pravděpodobně transportován v tělním oběhu jako HCO_3^- , a před vstupem membránou filamenta je zde katalyzována dehydratace na plynný CO_2 , který snadněji membránou prochází. Amoniak, jakožto hlavní odpadní produkt metabolismu dusíku, je vylučován na stejné části filamentu prostou difúzí, podobně jako u ryb, a to během celého života raka a to dokonce i v době svlékání (Zare a Greenaway, 1998). Zároveň v době svlékání dochází k razantnímu zvýšení spotřeby kyslíku (Kozák, 2013).

Předpokládá se také, že menší část obou odpadních látek, jak amoniaku, tak i oxidu uhličitého je vyloučena nepřímo při výměně „iontu za iont“. Mezi tyto procesy patří výměna Cl^- za HCO_3^- a výměna Na^+ za NH_4^+ (Taylor a Taylor, 1992; Péqueux, 1995).

Ionto-transportní funkce

Části filamentu s into-transportní funkcí mají silnější membránu. Stejně znaky můžeme nalézt i na bazální membráně podobbranchií. Jejich hlavní funkcí je udržování osmotického tlaku. Rak nejintenzivněji využívá tři ionty a to Na^+ , Cl^- a Ca^{2+} . Jejich preference při přijímání nebo vylučování do vodního prostředí závisí na fyziologických procesech v račím těle. Svlékání je jedním z nejvíce zatěžujících a nejvíce energeticky i iontově náročných procesů. Během svlékání je nejprve nutno račí krunýř dekalifikovat a následně opět rekalifikovat (Wheatly a Gannon, 1995; Wheatly, 1999).

Primárními ionty tohoto procesu jsou Na^+ a Cl^- , a například u raka *Cherax destructor* je intenzivně přijímán i Mg^{2+} . Přijímání těchto iontů je daleko intenzivnější ve 3. fázi svlékání, než ve 4. fázi. Rak se totiž v této fázi snaží intenzivnějším příjmem iontů vyrovnat hladinu minerálů po přijetí velkého množství vody bezprostředně po svleku krunýře (Zare a Greenaway, 1998).

Experiment s perfúzí (tj. průtokem tekutiny tkání/orgánem) prokázal, že ionto-transportní epitel je citlivý na ionty Ca^{2+} a Na^+ , ale nezdá se být citlivý ke změnám Cl^- . Což napovídá, že se jedná o majoritní cestu příjmu vápníku a sodíku do organismu. Stejně tak projevily citlivost k Na^+ i dýchací epitel žaber, který ale neprojevily citlivost k iontům Ca^{2+} a Cl^- . Permeabilita membrány ionto-transportních částí filamentu současně s laminou podobbranchií je tedy selektivní. Lamina je totiž velmi propustná, na rozdíl od filamentu, pro ionty Cl^- , což naznačuje její důležitou roli v absorpci tohoto aniontu. Permeabilita membrány se mění v průběhu svlékání, pravděpodobně v souvislosti s hladinou ekdyzonu v krvi (Wheatly a Gannon, 1995).

4. Hepatopankreas (HP, slinivkojaterní žláza)

4.1. Morfologický popis

Jedná se o velký trojlaločný orgán umístěný v hlavohrudí raka přímo napojený na trávicí soustavu. Jeho hlavní funkcí je tvorba a sekrece trávicích enzymů, produkce emulgátorů, metabolismus sacharidů a depozice těžkých kovů a vápníku. Je hlavním orgánem přijímání natrávených částí potravy a jejich vstřebání do těla. Až 95% všech látek je u raka přijímáno právě přes slinivkojaterní žlázu. Anatomicky se dělí hepatopankreas do dvou částí, které přiléhají k oběma stranám pylorického žaludku. Každá z těchto částí je tvořena stovkami slepě zakončených trubic. Tyto trubice jsou ponořeny do hemolymfy. Dohromady tak vytváří jakési sběrné potrubí ústící do předsíně pankreatu (Vogt, 2002).

4.1.1. Svalovina a inervace

Trubice tzv. hepatopankreatické tubuly, se skládají z jednovrstevného epitelu a jsou obaleny bazální laminou spojenou s hustou sítí ok tvořených svalovinou. Síťovaný vzhled je zde zapříčiněn širokými kruhovými pásy svaloviny kolem tubulů a jejich propojeními formou longitudinálních vláken (Holdich a Reeve, 1988). Inervace těchto svalů je poměrně nejistá, ale zdroje se shodují, že jsou nejspíše ovládány nervy vedoucími z okolí vrátníku. Tato svalovina zajišťuje pohyb zažitiny a zároveň vyprazdňování a naplňování tubulů (Leavitt a Bayer, 1982; Loizzi, 1971; Vogt, 1985).

4.1.2. Epitel a typy buněk

Tradičně jsou sekce tubulů rozdělovány do 3 základních zón. Jedná se o distální zónu, zónu B-buněk a proximální zónu. V distální zóně můžeme nalézt především E-buňky jakožto embryonální nebo kmenové buňky, které stojí za vznikem všech ostatních typů buněk nacházejících se v hepatopankreatu (Al-Mohanna a kol., 1985).

Epitel hepatopankreatu je velmi specifický a je tvořen několika druhy specializovaných buněk. R-buňky (z anglického „resorptive“), F-buňky (z anglického „fibrillar“), B-buňky (z anglického „blister-like“), E-buňky (z anglického „embryonal“) a na závěr M-buňky (z anglického „midget“). Buňky typu F, B a R jsou typické pouze pro hepatopankreas a vznikají mitotickým dělením z E-buněk, jak bylo popsáno u raka říčního (*Astacus astacus*). Na rozdíl od dříve zmíněných typů buněk nejsou M-buňky typické pouze pro HP, ale běžně se vyskytují i v jiných orgánech jako je například vrátník nebo slepé střevo (Vogt, 1994).

Zóna B-buněk je charakterizována přítomností dospělých F, R a zejména B-buněk v epitelu. Závěrečná proximální část je téměř bez B-buněk, neboť ty jsou na konci svojí zóny eliminovány holokrinní sekrecí (Gibson a Barker, 1979; Hirsch a Jacobs, 1928).

Ve starší literatuře je možné se dočíst, že se buňky mění během života jedna na druhou. Toto tvrzení je chybné, buňky se diferencují pouze v průběhu mitotického dělení z E-buněk a po celý svůj život už zůstávají stejného typu. Stárnoucí R-buňky a F-buňky jsou vylučovány z epitelu v místě setkání sousedních tubulů, nebo ve specifické oblasti předsíně žaludku, kde se setkává epitel hepatopankreatu a epitel předsíně. Růst obou typů epitelů je navíc směřován tak, že se přesně v místě setkání obou typů tkání zároveň setkávají i nejstarší buňky hepatopankreatu (Holdich, 2002).

F-buňky

F-buňky se v infrastruktuře jeví jako buňky podílející se na tvorbě a transportu proteinů. imunohistochemicky bylo prokázáno, že se zde tvoří trávicí enzymy, a to jak proteázy, tak i lipázy a enzymy štěpící celulózu (Möhrlen a kol., 2001). V jejich struktuře můžeme nalézt rozsáhlá drsná endoplazmatická retikula (dER) a Golgiho aparát. Do Golgiho aparátu je „dovážen“ substrát pomocí tzv. kyvných váček z endoplazmatického retikula. Sám Golgiho aparát pak vypouští přetvořené proteiny v tzv. Golgiho váčkách. Tyto váčky následně migrují k hranici buňky a jsou vypuštěny do tubulárního lumenu. Stimulací F-buněk buněk trávicí tekutinou z žaludku bylo během dvou hodin dosaženo zvýšené tvorby váček s obsahem enzymů směřujících k hranicím buňky. (Vogt, 1994). F-buňky neprodukují každá pouze svůj specifický typ enzymu, ale jsou schopné tvořit kompletní set enzymů. Stejně jako u obratlovců jsou zde enzymy produkovány ve formě proenzymů, které jsou následně při své cestě do žaludku aktivovány (Möhrlen a kol., 2001).

R-buňky

Jedná se nejpočetnější buňky hepatopankreatu raka. Na základě ultrastrukturálních pokusů a identifikace nosičů nutrietů bylo objeveno, že R-buňky mají vedoucí pozici při přijímání (resorpci) živin (Ahearn, 1987). V apikální části buňky najdeme sdružené mikroklky, mitochondrie a hladká endoplazmatická retikula (hER). Bazální část sousedící s hemolymfou je charakteristická rozsáhlým tubulárním systémem, drsným endoplazmatickým retikulem (dER) a mitochondriemi. Golgiho aparát zde produkuje typicky tvarované váčky, jež nejsou nikterak vypouštěny do lumenu, což napovídá o jejich intercelulárním využití (Loizzi, 1971; Al-Mohanna a Nott, 1987; Sagristà a Durfort, 1991).

U raka říčního (*Astacus astacus*) byly zaznamenány změny v buněčné organizaci v apikální zóně, a to zejména po nakrmení jednotlivých jedinců. Vysoký počet mitochondrií se naakumuloval pod membránou buňky a došlo k vertikální organizaci váček hER. Toto specifické uspořádání organel reflektuje příjem mastných kyselin a jejich transport přes hER až do mitochondrií jakožto místa průběhu β -oxidace. Podobné uspořádání bylo pozorováno i v potravu-absorbujících enterocytech savců (Schiebler a Schneider, 1991). Po pěti hodinách po nakrmení došlo k aktivitě v bazální části buněk, což pravděpodobně reflektuje finální zpracovávání živina jejich export do hemolymfy. Tubulární systém R-buňky, jakožto nejnápadnější část bazální zóny buňky má návaznost na mezibuněčný prostor a obsahuje malé částice. Tyto částice byly histochemicky charakterizovány jako lipoproteiny (Sagristà a Durfort, 1991). Systém tubulů mimo jiné

podobný hER je považován za místo syntézy tzv. high density lipoproteins(HDL), kterými jsou pak přes hemolymfu zásobovány ostatní orgány. Je zvláštní, že HDL desetinožců obsahují jako svoji hlavní složku fosfolipidy (Abdu a kol., 2000).

B-buňky

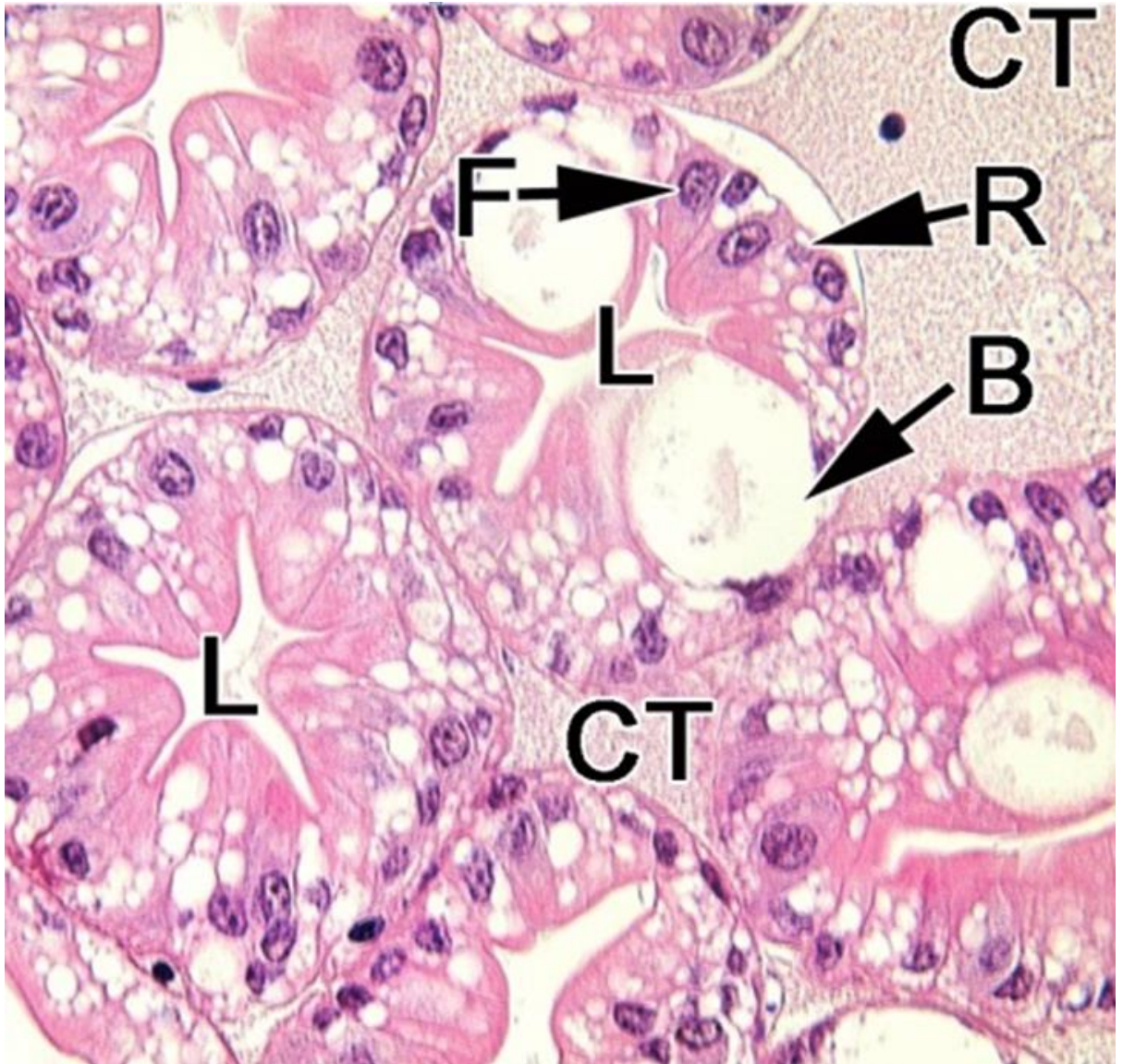
V jejich centru najdeme velkou objemnou vakuolu, která při své růstu odtlačuje ostatní orgány na buněčnou periferii. Někteří autoři proto považují B-buňky za dospělé F-buňky a centrální vakuole přisuzují jako hlavní účel skladování připravených trávicích enzymů (Watling, 2013; Hu a Leung, 2007; Loizzi, 1971; Al-Mohanna a Nott, 1986). Jejich hlavním úkolem se zdá být vstřebávání zbytků z trávení nebo případně syntéza a recyklace tukových emulgátorů. V tomto případě by byla centrální vakuola považována za prostor pro natrávení přijatých živin (Gibson a Barker, 1979).

Recyklace tukových emulgátorů byla experimentálně testována na tygřích krevetách (*Penaeus monodon*), které byly krmeny nevyváženou stravou sacharidů, proteinů a lipidů. Dlouhodobé krmení potravou s vysokým obsahem tuku vedlo ke zvýšení počtu B-buněk v hepatopankreatu a zvětšení jejich centrálních vakuol. Pokud byla dieta změněna a krevety se živily takřka čistým proteinem, počet B-buněk se nezměnil, ale jejich vakuoly nebyly centrální ale drobné a rozestě v buňce (Vogt, 1993).

Podle dalších výzkumů se zdá být jejich primární funkcí vstřebávání endocytózou, a to zejména živin vysokou molekulární hmotností jako je například cholesterol. Jako druhé vysvětlení se jeví to, že B-buňky zkrátka absorbují veškeré zbytky zanechané v prostoru lumenu R-buňkami. Ultrastrukturálně je patrné, že většina takto vstřebaných látek je skladována v centrální vakuole a později je opět vypuštěna do lumenu (Vogt, 1994). Jedná se zde o jakousi recyklaci. Toto tvrzení je podloženo na základě studie, ve které byla pozorována barva žaludeční tekutiny po jejím opakovaném odebrání. Normálně se tekutina raka říčního (*Astacus astacus*) jeví jako hnědá. Shodnou barvu můžeme pozorovat i ve vakuole dospělých B-buněk. Při porovnání odebrané žaludeční tekutiny a obsahu vakuol B-buněk od nekrmeného raka, došlo k vyblednutí jak žaludeční tekutiny, tak i obsahu vakuol v B-buňkách (Vogt, 2019).

M-buňky

Jedná se o nejmenší a nejméně často se vyskytující buňky. M-buňky můžeme nalézt rozestě po celém trávicím traktu raka. Proto můžeme předpokládat, že přítomnost M-buněk v hepatopankreatu je zapříčiněna jejich migrací z okolních orgánů, a to buď hemolymfou (v případě dospělých buněk), nebo v podobě kmenových buněk. Jsou to malé buňky s vyšším počtem granula. Najdeme je vždy osamocené v buněčné struktuře. Jelikož chybí v tubulárním systému inervace, předpokládá se, že se M-buňky podílí na regulaci tubulární svalové sítě nebo různých dalších funkcích hepatopankreatu, popř. obojího (Holdich, 2002).



Obrázek 9- Příčný řez části hepatopankreatu, barveno H&E. CT-pojivová tkáň, L-lumen, F-F-buňka, B- B-buňka, R- R-buňka (40x). (autor: Vogt, 2002, upraveno)

4.1.3. Funkce detoxikační

Hepatopankreas je hlavním místem detoxikace cizích látek z okolního prostředí. Jako takový dokáže hepatopankreas kumulovat velké množství anorganických i organických xenobiotik (King a kol., 1993; Rainbow a White, 1989). HP je také schopen detoxikovat organické součásti látek pomocí cytochromu P450 (Ashley a kol., 1996).

U sloučenin, které nejsou snadno metabolizovány jako je např. hexachlorbifenyl najdeme jejich větší část především v lipidových kapičkách v R-buňkách. Látky snadněji metabolizovatelné jako např. benzo (a)-pyren, byly z větší části obsaženy v cytoplazmě F-buněk. To naznačuje, že jsou metabolizovány především v F-buňkách a hlavním produktem jsou zejména konjugáty rozpustné ve vodě (Lee, 1989).

Expozice krevet (*P. monodon*) pesticidu dimethoát v koncentraci 1 µl/l po dobu 10 dní vedla k významnému namnožení váčků dER F-buněk (Vogt, 2018). Vzhledem k lokalizaci cytochromu P450 působícího na membránách ER lze předpokládat, že F-buňky HP jsou preferovaným místem detoxikace organických xenobiotik (Brignag-Huber a kol., 2016).

Dále můžeme najít v hepatopankreatu látky jako je glutathion peroxidáza. Jedná se o antioxidační enzym, který chrání buňky tkání proti oxidativnímu poškození tím, že redukuje peroxid vodíku a celou řadu dalších organických peroxidů (Wang a kol., 2012).

Studie na odbourávání kovů odhalily různé výsledky dokonce i u stejných druhů (Rainbow a White, 1989; Roldan a Shivers, 1987). Většina kovů je směřována právě do hepatopankreatu, kde se ukládá do kovových granulí. Zdá se, že pozorované rozdíly závisí na druhu organismu, chemické sloučenině, způsobu absorpce, koncentraci a době expozice. Kovy jsou následně detoxikovány buďto vazbou na metalothionein v cytoplazmě (Del Ramo a kol., 1989; Lyon a kol., 1983) nebo jsou skladovány v lysozomech R a F-buněk (Ogura, 1959; Roldan a Shivers, 1987). Kovy silných kyselin jako je vápník jsou přednostně ukládány v koncentricky vrstvených fosfátových granulích a kovy slabých kyselin jako je měď v sulfidových granulích. Kovy na přechodu mezi těmito dvěma skupinami (např. železo) jsou ukládány do ferritinových granulí do lysozomů F a R buněk (Brown, 1982; Lyon a Simkiss, 1984).

Těžké kovy jako např. kadmium jsou také detoxikovány v hepatopankreatu, ale nejsou zde skladovány v granulích. Jsou navázány na metalothionein cytoplazmy. Tento jev byl popsán u krevet *P. indicus* (Nunez-Nogueira a kol., 2006) a u raka *P. clarkii* (Del Ramo a kol., 1989). Proces detoxikace není pozorovatelný světelnou mikroskopií, a tak zůstává typ buněk podílejících se na metabolizaci těžkých kovů neznámý (Vogt, 2018).

5. Patologické změny pozorovaných struktur

Rozdělení základních skupin chemických látek nebo organismů působících patologické změny na pozorovaných organismech a jejich vybraných orgánech (Vogt, 2020).

- **Toxiny v potravě**- Aflatoxiny (Ghaednia a kol., 2013), minosin (Vogt, 1990).
- **Těžké kovy**- Jde především o produkty antropogenní činnosti uvolněné do vodního prostředí akumulované v potravním řetězci, dně nebo volně ve vodě. Jedná se zejména o olovo, měď a kadmium.
- **Organické polutanty**- Zejména se jedná o pesticidy, herbicidy a insekticidy.
- **Viry**- White spot syndrom virus
- **Bakterie**
- **Protista**- *Dinoflagellata*, *Miscrosporidia*, *Haplosporidia*
- **Metazoa**- Metacerkarie, Rhizocephalární parazité
- **Houby a plísňe**- *Aphanomyces astaci*

Protože jsou žábry v přímém styku s vodním prostředím, je velmi pravděpodobné, že při expozici raka chemické látky dojde k jejich zasažení a případně i změnám buněčné stavby. Také hepatopankreas, jakožto hlavní orgán pro detoxifikační funkci, vstřebávání nutrientů a látek, které rak přijímá z vodního prostředí, je orgánem velmi snadno postižitelným při přítomnosti chemické látky ve vodě (Vogt, 2020). Poškození vodních organismů chemickými látkami je velmi často indukováno pesticidy nebo jejich toxickými metabolity. Problém nastává zejména při smíchání několika různých typů pesticidů a jejich metabolitů. Vzniká tzv. koktejl, který je často více toxický než samotné látky. Tento efekt se však velmi obtížně posuzuje, a tak jeho důsledek můžeme pouze předpovídat podle testů provedených s jednotlivými látkami a jejich metabolity. Praxe ukazuje, že se tyto předpovědi ale mohou markantně lišit od reálných účinků (Ceyhun a kol., 2010).

Rak jakožto necílový druh ve vodním prostředí a zároveň druh velmi citlivý na kvalitu vody a zároveň člen skupiny Arthropoda, je ideálním druhem pro studium vlivu cizorodých a antropogenních látek ve vodním prostředí (Vogt, 2020). Pro laboratorní testy a pokusy popsané níže v této kapitole jsou využívány nepůvodní druhy raků jako je rak mramorovaný (*Procambarus fallax f. virginalis*) a rak červený (*Procambarus clarkii*). Používají se především kvůli své vysoké reprodukční schopnosti, možnosti jejich využití coby pokusných zvířat, jednoduššímu odchovu v laboratorních podmínkách a jejich velikosti (Burggren a McMahon, 1983).

Jelikož se experimentální část práce zabývá změnami způsobenými organickým polutantem, níže v této kapitole uvádím patologické změny indukované látkami potenciálně se vyskytujícími v přírodě a ze stejné skupiny xenobiotik.

5.1. Vybrané chemické látky

2-hydroxy-terbuthylazin (T2H)

Jedná se o hlavní degradační produkt terbuthylazinu. Ten byl využíván od roku 2006 pro kontrolu trav, vodních rostlin a řas jako náhrada za zakázaný herbicid atrazin. Terbuthylazin je obsažen v nejméně 14 běžně užívaných herbicidních prostředcích. Morfologická stavba žaber byla při koncentraci metabolitu ve vodě 0,75µg/l a 75µg/l nezměněná oproti kontrole. Změnu morfologie způsobila až koncentrace 375 a 750µg/l. Změny se týkaly především rozdílné síly membrány filament až celkového rozpadu filament s místní infiltrací hemocyty. Se stoupající koncentrací nabývaly změny na frekvenci.

Na hepatopankreas měla vliv už ale i nižší koncentrace, kde byly patrné změny v podobě alterace tkáně. Největší změny byly zaznamenány ve dvou nejvyšších koncentracích, kde skrz epitel tubulů prosakovala hemolymfa a v určitých místech došlo i k úplnému rozpadu struktury hepatopankreatu (Koutník a kol., 2017). V souvislosti s výše uvedeným metabolitem je i následující soubor látek běžně se vyskytujících v přírodě.

Atrazin-2-hydroxy (A2H), 2-hydroxy-terbuthylazin (T2H) a terbuthylazin-desethyl (TD)

Račí vajíčka byla vystavena koncentracím potvrzených v řekách ČR, a to jak samostatně, tak i v koktejlů. Skupina A2H-0,66µg/l, skupina T2H-0,73µg/l, skupina TD-1,80µg/l a směs dříve uvedených metabolitů v uvedených koncentracích.

Vystavení račích vajíček, a později i juvenilů, uvedeným koncentracím jednotlivých metabolitů nalezených v řekách, nezpůsobilo u žádného jedince histologické změny. Odlišné výsledky můžeme pozorovat na hepatopankreatu raků vystavených koktejlů. Zde se již dočkáme změny v buněčné struktuře. Můžeme pozorovat zejména zvýšení počtu resorptivních R- buněk (Velíšek, 2017).

Diazinon

Jedná se o organofosfátový insekticid s neurotoxickým účinkem. Je to nesystémový jed používaný k hubení švábů, rybenek, mravenců a dalších organismů. Byl používán masově především v 70. a 80. letech minulého století. Byl zakázán v roce 2004 pro domácí užívání, ale je stále, i když omezeně užíván v zemědělství. Mechanismus účinku spočívá v blokaci acetylcholinesterázy. Je silně toxický pro téměř všechny skupiny živočichů.

Expozice raků diazinonu vedla k početným změnám na buňkách hepatopankreatu a to zejména na buňkách trávicích. Došlo u nich k vakuolizaci a charakteristické ztrátě hustoty cytoplazmy a přítomnosti početných žlutých granul. Degenerace buněk zde byla velmi významná po vystavení ½ LC 50 po dobu 4dnů (Heiba, 1999).

Ethion

Tato látka je typickou součástí organofosfátových insekticidů a je opakovaně a ve vysokých dávkách užívána především pro svůj velmi krátký čas rozpadu. Ethion je používán pro hubení mšic, pavouků a obecně hmyzu. Jedná se o běžně používaný insekticid (Heiba, 1999).

Raci byli při pokusu vystaveni 1mg/l ethionu a následně byla koncentrace ethionu a jeho možných degradačních produktů změřena ve vodě a orgánech raků. Na konci expozičního období byl ethion akumulován zejména v játrech a žábřácích. Při vystavení raka $1/4$ 96h LC50 (0,36mg/l) způsobil ethion rozsáhlé změny v buněčné struktuře. Jako nejvýraznější se jeví vakuolizace, degradace a rozsáhlá lýzabuněk hepatopankreatu.

Po 24 hodinách vystavení se na hepatopankreasu projevila změna tvaru tubulárního lumen. Z normálního kruhového průřezu se změnil na nepravidelný až rozvětvený. Jindy blízko u sebe, nyní byly tubuly široce odděleny vrstvami volné pojivovtkáně. Byla zde rovněž detekována degradace a vakuolizace buněk. S prodlužující se dobou expozice se tato poškození stávala stále patrnějšími.

Po 24 hodinách expozice se na žaberním aparátu objevovaly změny, a to zejména hyperplazie jednotlivých filament, a to převážně na jejich špičkách, které projevovaly různé malformace. Po 3 dnech se na žábřácích projevil i pokles počtu mitochondrií a cytoplasmatická vakuolizace. Po 5 dnech bylo možné na žábřácích pozorovat rozsáhlou degradaci epitelu s vakuolami obsahujícími zbytky cytoplasmatické membrány (Desouky, 2013).

Prometryn

Jedná se o selektivní herbicid užívaný pro kontrolu jednoletých jednoděložných a dvouděložných rostlin v kulturách fazolí, mrkve a jiné zeleniny. Bylo zjištěno, že již při expozici koncentracím momentálně se vyskytujícími v našich povrchových vodách, dochází k histologickým změnám na žaberním aparátu. Hodnoty se celosvětově pohybují v povrchových vodách v rozpětí mezi 0,190-4,4 μ g/l (Vryzas a kol., 2011) a do 1 μ g/l ve vodě podzemní (Papadopoulou-Mourkidou a kol., 2004).

V testu byla raná stádia Raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*) rozdělena do 4 skupin s rozdílnými koncentracemi prometrynu (E1-0,51, E2-144, E3-1440 a E4-4320 μ g/l). Všechny skupiny (kromě E1) vystavené prometrynu vykazovaly histopatologické změny na žábřácích. Při koncentraci 0,51 μ g/l (hodnota reálně naměřená z českých řek) nedošlo k žádné histologické změně na hepatopankreatu. Jak kontrola, tak skupina E1 měly tubuly těsně u sebe a jednotlivé typy buněk byly přesně diferencovatelné a v nativním tvaru. Znatelné změny na hepatopankreatu způsobily až koncentrace 144 a 1440 μ g/l. Změny byly následující. Tubulární dilatace s převahou mononukleárních buněk v intersticiální tkáni a destrukce ústřední dystrofické tkáně. Ve skupině E3 byly tyto změny znatelnější. Na žábřácích pak koncentrace E2 a E3 daly vzniknout rozsáhlým pseudocystám (na pohled jako cysta se jeví útvar, který ale postrádá obklopující epitel). Nejznatelnějšími změnami byla rozsáhlá fragmentace a dilatace filament do pseudocystických útvarů obsahujících jemnozrnné substance. Stejně jako u hepatopankreatu se četnost změn zvyšovala se vzrůstající koncentrací prometrynu.

Histologie skupiny E4 nebyla pozorována, neboť všichni jedinci během testu uhynuli (Velíšek a kol., 2014).

Metribuzin

Jedná se o asymetrický herbicid ze skupiny triazinů. Poprvé byl registrován v USA v roce 1973. Je užíván pro selektivní kontrolu listnatých a travních plevelů v téměř všech monokulturách plodin od zeleniny přes obilí až po trávníky (Fairchild a Sappington 2002).

V testu byli jedinci Raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) vystaveni dvěma koncentracím-0,52µg/l (reálná hodnota naměřená v ČR) a 3,06µg/l (10% 96h LC50) (Velíšek a kol., 2013). Po 10 dnech nevykazoval hepatopankreas ani žábry žádné změny v buněčné struktuře. Všechny typy buněk měly fyziologický tvar a byly lehce rozlišitelné. Změna v buněčné struktuře se dostavila až po třiceti denní expozici metribuzinu. Hlavním nálezem byla rozsáhlá autolytická dezintegrace tubulárního epitelu hepatopankreatu. Raci byli zkoumání ještě 30dní po experimentu, a protože zde nebyly odhaleny žádné analogické histopatologické změny předpokládá se, že popsané změny byly plně reversibilní. Toto tvrzení je zde podloženo nálezem vyššího množství mononukleárních buněk v intesticiálním prostoru hemolymfy (Koutník a kol., 2014).

Mix bensulfuron-metylu a acetochloru (MBA)

Bensulfuron-metyl je herbicid běžně užívaný na rýžových polích v Číně. Jeho koncentrace byly naměřeny i v Japonsku jak v polích, tak i kanálech a odtokových stokách. Jeho účinek byl prokázán při testech na *Danio renio* jako genotoxický a blokující vývoj (Parveen a kol., 2005; Jiang, 2009).

Acetochlor je rovněž velmi rozšířeným herbicidem plošně užívaným jak v Japonsku, Číně tak i USA. Pokusy s *Danio renio* kategorizovaly tento herbicid jako endokrinní disruptor (Yang a kol., 2016).

Žábry Raka červeného (*Procambarus clarkii*) po 96hodinové expozici MBA ukázaly granulované hemocyty uvnitř intralamelárního prostoru a disorganizaci buněk epitelu popř. degeneraci kutikuly. Byly také zaznamenány změny v barvení pomocí H&E. Kutikula byla rozmazanější, jádra buněk epitelu zbarvená sytěji a současně byla zaznamenáno oddělení některých buněk epitelu od kutikuly. Procenta raků s poškozenými žábry (100% u MBA) byla výrazně vyšší než u raků z kontrolní skupiny, kde se procentuální zastoupení raků s poškozením žaber pohybovalo kolem 4% (Yu a kol., 2017).

Kyselina peroctová

Kyselina peroctová (KP) je velmi silný oxidačně-dezinfekční prostředek používaný jako terapeutický agent v akvakultuře a to u ryb, jako dezinfekce v laboratořích, dezinfekce při výrobě potravin a piva, vlákniny a textilním průmyslu. (Pechacek, 2014). Při koncentraci 10mg/l efektivně ničí zoospory původce račího moru hnilečka račího (*Aphanomyces astaci*) a má potenciál se tak stát běžně užívanou látkou v chovech raků (Jussila, 2011).

Raci byli v tomto testu exponováni koncentracím 2 a 10mg/l po dobu 7dnů a následně byli ponecháni 7 dní v čisté vodě pro zjištění možného zotavení. Nejvíce postiženým orgánem se zde ukázaly být žábry. Kontrolní skupina nejevila po době expozice žádné změny na žábrách ani hepatopankreatu. U skupiny exponované koncentraci 2mg/l byla po 3 dnech stále pozorována normální organizace epiteliálních buněk. Po 7 dnech se projevila disorganizace. U raků vystavených 10mg/l po 3dny se projevilo nahromadění hemocytů v lakunách, infiltrace granulárních hemocytů, malformace špiček lamel a disorganizace epiteliálních buněk. Tyto změny se staly více znatelnými s prodlužující se expozicí. Po 7dnech zotavení v čisté vodě došlo k regeneraci některých částí žaber, zatímco jinde změny přetrvávaly. Můžeme ale říci, že jejich rozsah byl v porovnání s raky vystavenými 10mg/l po dobu 7 dnů daleko menší. Na hepatopankreatu raků vystavených 2mg/l nebyly pozorovány žádné změny. Ve skupině vystavené vyšší koncentraci došlo k zvětšení tubulárního lumenu a zvýšení vakuolizace (Chupani, 2016).

Methoprene

Jedná se o insekticid užívaný pro kontrolu komárů. Je klasifikován jako endokrinní disruptor. Vystavení sub-letálními koncentracím kolem 0,05μl/l po dobu 24hodin vyústilo v rozsáhlou vakuolizaci epiteliálních buněk a závažnou dilataci váčků dER a Golgiho aparátu v F-buňkách hepatopankreatu. Tento insekticid byl testován na Humrovi americkém (*Homarus americanus*) (Walker a kol., 2010).

Pymetrozine

Nový insekticidní přípravek pyridin-azomethin. V testech na *P.clarkii* koncentraci 1,034mg/l (hodnota LC50) byla po 24hodinách zaznamenána hepatotoxicita. Histopatologické vyšetření odhalilo léze a narovnávání tubulárního lumenu, vakuolizaci epiteliálních buněk a jejich lýzu a pokles lipidových zásob (Yu a kol., 2018).

6. Experimentální část

6.1. Materiál a metodika

6.1.1. Pokusná zvířata

Test toxicity byl proveden na raku maromorovaném (*Procambarus virginalis*). Raci byli odchováni v laboratorních podmínkách Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech v České republice. Celkem bylo do testu využito 108 raků a průměrné hmotnosti $5,48\text{g} \pm 0,67\text{g}$ a průměrné délce těla $26,14 \pm 2,87\text{mm}$. Tito raci byli náhodně rozděleni do tří nádrží v hustotě 18 raků na nádrž (vzhledem k opakování skupiny bylo celkem využito 36 raků na každou experimentální skupinu). Objem testovacích nádrží byl 20l. Kanibalismus byl potlačen přidáním plastových úkrytů. Raci byli krmeni komerčními peletami (Crabs Natural, Sera GmbH, Germany) dvakrát denně v dávkách odpovídajících 1% tělesné hmotnosti. Raci byli před samotným pokusem týden aklimatizováni.

6.1.2. Chemická expozice

Raci byli vystaveni thiaclopridu (THIA) ([3-(6-Chloro-3-pyridinylmethyl)-2-thiazolidinylidene]cyanamide) (Sigma Aldrich, Czech Republic, čistota $\geq 98,0\%$) ve dvou koncentracích, a to koncentraci THenv $4,5\mu\text{g/l}$ (koncentrace nalezená v povrchové vodě ve Střední Evropě (Süss a kol., 2006) a TH10 $64,64\mu\text{g/l}$, která odpovídá 10% mortalitě raků vystavených THIA po dobu 96 hodin a byla odvozena od předběžného testu toxicity 96hLC50, jenž byl součástí jiné studie. Thiacloprid je vysoce selektivní typ nového pesticidu patřícího do skupiny neonikotinoidů. Napadá nervový systém bezobratlých a to konkrétně acetylcholin (Tomizawa, 2002). Celkově byly tedy THIA exponovány dvě skupiny raků označené jako THenv (environmentální koncentrace), TH10 (odvozená od 96hLC50) a jedna CON sloužila jako kontrolní, bez přidání chemické látky. Do každé nádrže byl vložen přístroj na kontinuální měření teploty během testu. Dosažené koncentrace THIA ve vodě byly stanoveny analyticky pomocí kapalinové chromatografie (HPLC-MS/MS) (Hao a kol., 2015) a během celého testu nepoklesly pod 95% nominální hodnoty.

6.1.3. Design experimentu

Aklimatizovaní raci byli vystaveni koncentracím THIA ($4,5\mu\text{g/l}$ a $64,645\mu\text{g/l}$) po dobu 28 dní a následně dalších 28 dní byli ponecháni v čisté vodě kde byla sledována jejich depurace. Experiment probíhal semistaticky s výměnou lázně každý druhý den. Kvalita vody byla měřena vždy před a po výměně lázně. Teplota vody v nádržích byla $17,00 \pm 0,72^\circ\text{C}$, hladina rozpuštěného kyslíku ve vodě $91,19 \pm 3,77\%$, pH $7,77 \pm 0,10$, světelný režim ve formě 12 hodin tmy / 12 hodin světla. Denně bylo sledováno chování raků a zaznamenávána mortalita. Vzorky pro histologickou analýzu (hepatopankreas a žábry od 2 raků z každé skupiny) byly odebrány 7, 14 a 28 den expozice v THIA a následně 14. a 28. den depurační fáze.

6.1.4. Histologie

Histopatologie byla hodnocena u všech experimentálních skupin v daných vzorkovacích dnech. Vzorky žaber a hepatopankreatu byly okamžitě fixovány v 10% formalínu. Histologické zpracování probíhalo na tkáňovém procesoru Histomaster 2052/1,5 s dobou aplikace lázní a jejich střídáním podle následující tabulky.

Tabulka 1 – vpravo: protokol užívaný na tkáňovém procesoru; vlevo: protokol užívaný na barvicím automatu.

Barvicí automat TISSUE-TEK		Tkáňový procesor Histomaster 2052/1,5	
Lázeň	Doba aplikace	Lázeň	Doba aplikace
Xylen	10min	Etanol 70%	30min
Xylen	10min	Etanol 7%	30min
Xylen	10min	Etanol 95%	30min
Etanol 100%	5min	Etanol 95%	1hod
Etanol 96%	5min	Etanol 100%	1,5hod
Etanol 80%	5min	Etanol 100%	1hod
DH ₂ O	30sek	Etanol 100%	1hod
Hematoxylin	15min	Xylen	30min
DH ₂ O	30sek	Xylen	30min
Scott's Tap Water	4min	Xylen	1h
DH ₂ O	30sek	Parafin	2x30min
Eosin	1min	Parafin	2x30min
DH ₂ O	2sek		
Etanol 80%	2min		
Etanol 96%	2min		
Xylen	10min		
Xylen	10min		

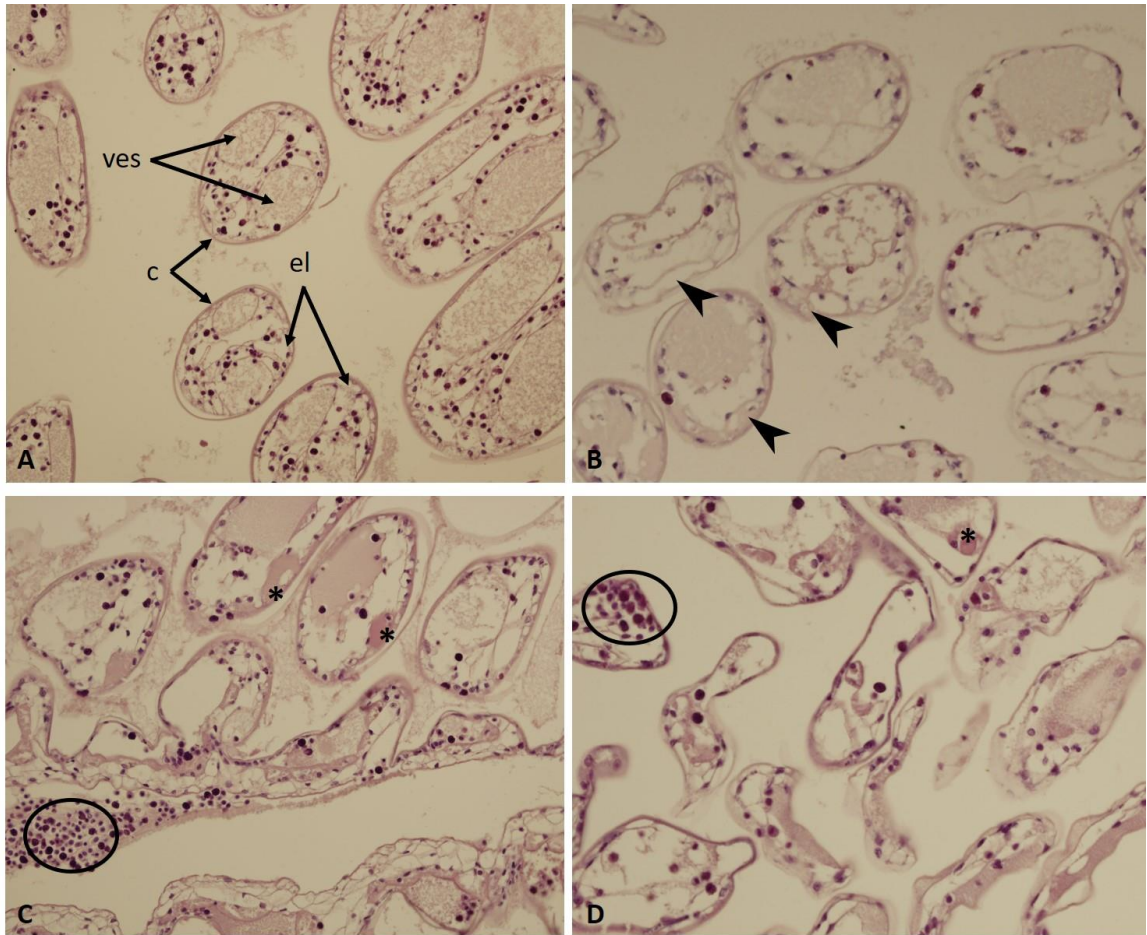
Následně byly vzorky prosyceny parafínem a zality do parafínových bločků. Krájení bločků bylo děláno rotačním mikrotomem s nastavením tloušťky řezu 5 μ m. Barvení H&E probíhalo v barvicím automatu (TISSUE-TEK® DRS™ 2000, SEKURA). Protokol užívaný pro barvení je popsán v tabulce výše. Takto připravené preparáty hepatopankreatu a žaber byly následně zkoumány za využití světelného mikroskopu kombinovaného s kamerovým systémem E-600 (Olympus BX-51, Japonsko). Laboratorní přístroje užívané pro tvorbu preparátů najdeme v obrázkové příloze.

6.2. Výsledky

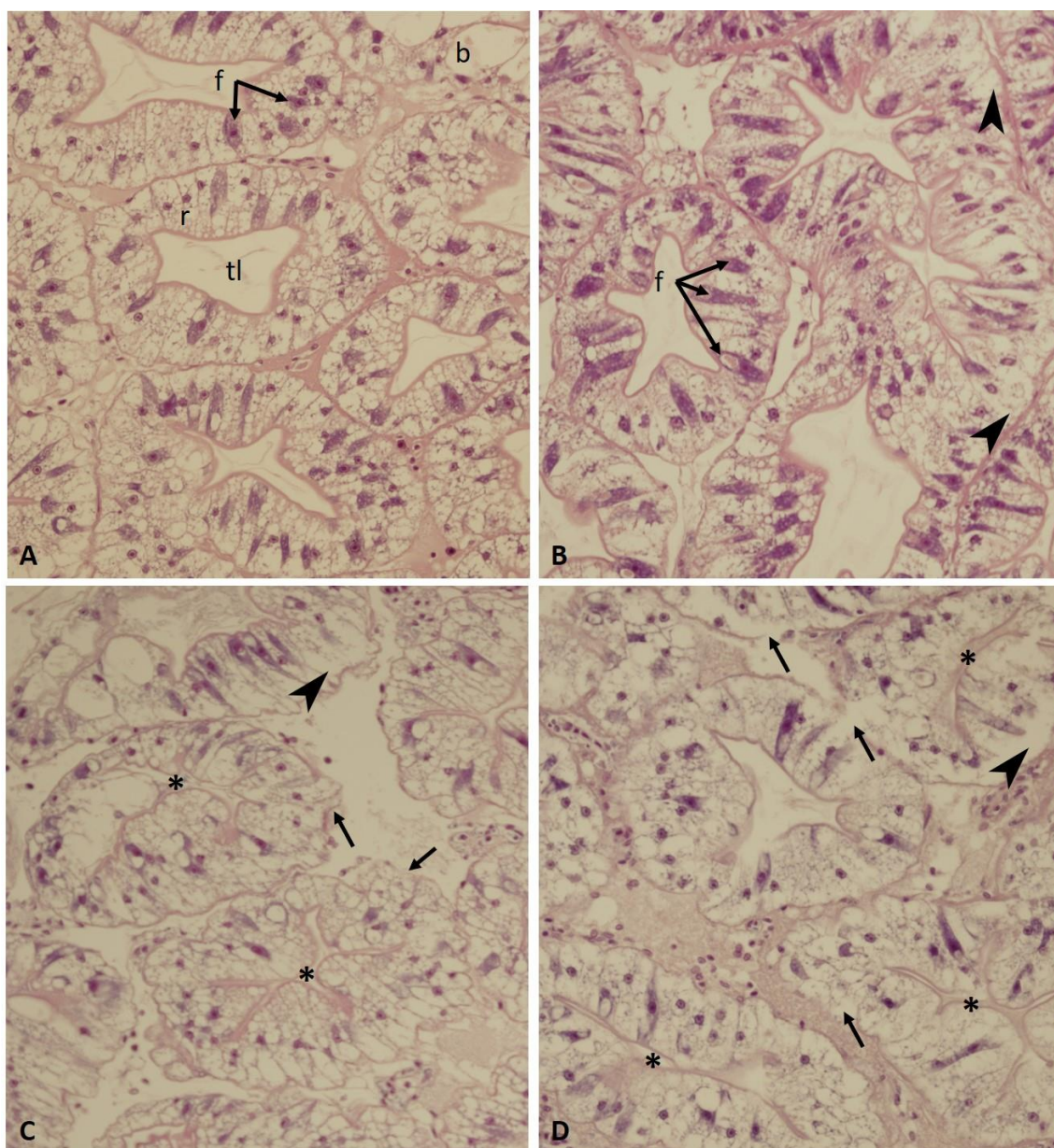
Žábry raků z kontrolních skupin nevykazovaly známky poškození. Buňky tvořící jednovrstevný epitel byly v jednotlivých lístečcích vesměs uniformně strukturovány a pokryty tenkou vazivovou vrstvou. V jednotlivých žaberních lístečcích byly dobře patrné přívodné a odvodné cévy (obrázek 1A). Změna struktury žaber byla pozorována již u skupiny THenv, kdy po sedmi dnech expozice došlo k patrné vakuolizaci epitelálních buněk a zastření strukturální organizace jednotlivých lístků (obrázek 1B).

Po 14-ti denní expozici bylo v žaberních cévách patrné smětnání krve a ložiskový výskyt hyalinních kapének (obrázek 1C). Kombinace všech výše popsanych změn spolu s progresivní ztrátou tvaru, povrchu a vnitřní struktury lístečků byla pozorována na konci expozice (den 28, obrázek 1D). Obdobné změny a průběh byly zaznamenány u skupiny TH10, kde byl ale zaznamenán rychlejší nástup pozorovaných změn v časové ose. Histologický obraz žaber se v průběhu regenerační doby nezměnil.

Hepatopankreas kontrolních skupin byl bez histo-patologických změn s obvyklou strukturou a zastoupením všech typů buněk (obrázek 2A). Skupina THenv měla po dobu expozice převážně zachovanou tubulární strukturu, místy narušenou odlučováním buněk od bazální membrány. Semikvantitativně bylo v tubulech patrné četnější zastoupení F buněk (obrázek 2B). Skupina TH10 vykazovala plošné edematózní zduření epitelu a po 14 dnech i ložisková poškození tubulární výstelky – četné zejména v oblasti bazální membrány tubulů (obrázek 2C). V průběhu regenerační doby byl u obou testovaných koncentrací THIA počet F buněk srovnatelný s kontrolní skupinou, přetrvaly nálezy odloučených buněk od bazální membrány a u skupiny TH10 přetrval i edém a ložiskové poškození tubulární výstelky (obrázek 2D).



Obrázek 10: Histologický řez tkání žaber raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po expozici THIA v dávce $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$; (A) kontrolní skupina s typickou strukturou žaberních lístečků: el- jednovrstevný epitel, c- vazivová krycí vrstva (kutikula), ves- přívodná a odvodná céva; (B) skupina THenv po 7 dnech expozice: šipky vyznačují místa vakuolizace epiteliálních buněk; (C) skupina THenv po 14 dnech expozice: elipsy značí místa smětnání krve, hvězdičky značí okrsky hyalinizace; (D) skupina THenv po 28 dnech expozice: ztráta tvaru a vnitřní strukturální organizace lístečků. Zvětšení $\times 200$; H&E.



Obrázek 11: Histologický řez tkání hepatopankreatu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po expozici TH1A; (A) kontrolní skupina s typickou strukturou epiteliálních buněk tubulů: tl- lumen tubulu, r- resorpční buňky s tukovými kapénkami, b- blister-like sekreční univakuolární buňky, f- fibrilární buňky; (B) skupina THenv po 28 dnech expozice: f- fibrilární buňky, klínové šipky vyznačují místa odlučování buněk od bazální membrány; (C) skupina TH10 po 28 dnech expozice: šipky značí desorganizaci tubulární výstelky v oblasti bazální membrány tubulů, hvězdičky značí zúžení až vymizení tubulárního lumen způsobené edémem; (D) skupina TH10 po 28 dnech regenerační fáze testu: klínové šipky vyznačují místa odlučování buněk od bazální membrány; šipky značí desorganizaci tubulární výstelky v oblasti bazální membrány tubulů, hvězdičky značí zúžení až vymizení tubulárního lumen způsobené edémem. Zvětšení $\times 200$; H&E.

7. Diskuze

Žábry jsou primárním cílovým orgánem působnosti většiny polutantů rozpustných ve vodním prostředí. Zároveň mohou být jedním z prvních orgánů reagujícími na toxicitu polutantu (Desouky a kol., 2013). Histopatologické změny na žábrách mohou vyústit v hypoxii, poruchy dýchání, problémy s iontovou regulací a acido-bazickou rovnováhou (Alazemi a kol., 1996). Výsledky pokusů naznačují, že expozice raků thiaclopridu v koncentracích přirozeně se vyskytujících ve vodách může na podkladě zjištěných histopatologických změn narušit mechanismus výměny plynů.

Expozice thiaclopridu nebyla dříve testována na racích, ale spíše na jiných organismech jako jsou perloočky, larvy vážek a blešivci (Beketov, 2008), včely (Iwasa a kol., 2004) Protokol vedení testů na zmíněných organismech a doba expozice se oproti testu v této práci liší. Nejlepším srovnáním jsou z důvodu největší blízkosti organismů zřejmě vodní larvy brouků a korýši. Ve studii Betekova (2008) bylo pro thiacloprid stanoveno rozmezí 1,8-3,2 µg/l pro přežití makrobentosu a zooplanktonu. Protože testovaná environmentální koncentrace 4,5 µg/l byla vyhodnocena jako koncentrace způsobující patologické změny v hepatopankreatu a žábrách, je velmi pravděpodobné, že se hodnota stanovená Beketovem (2008) blíží i kritické hodnotě pro přežívání raků.

U korýšů je hepatopankreas největší tělní žlázou. Jeho hlavní funkcí je sekrece trávicích enzymů a absorpce natrávené potravy (Miyawaki a kol., 1984). Jedná se o orgán detoxikační a zároveň velmi citlivý na stres. Hepatopankreas také velmi rychle reaguje na expozici škodlivým látkám. Podle Negro a kol. (2011), se při zasažení desetinožců pesticidem zvýší počet F-buněk. Tentýž fenomén byl identifikován i v případě naší studie v hepatopankreatu raků vystavených 14denní environmentální koncentraci thiaclopridu. Jelikož jsou F-buňky hlavním místem syntézy proteinů a enzymů (Sousa a kol., 2005), je proces zmnožení F-buněk pravděpodobně odpovědí na vzrůstající toxicitu v organismu. Další histopatologické změny při zasažení insekticidem jsou popisované v práci SaravanaBhavana a Geraldina (2000) jako např. melanizace a zeslabení bazální membrány. Tyto histopatologické změny nebyly při vystavení thiaclopridu pozorovány.

Ve skupině insekticidů se můžeme s podobnými histopatologickými změnami setkat u ethionu. Jeho dávka je však v řádech mg/l a změny jsou podstatně drastičtější (Desouky, 2013). Vakuolizaci epiteliálních buněk hepatopankreatu můžeme pozorovat i při expozici insekticidu methoprenu popsaného Walkerem a kol. (2010). Na rozdíl od našeho testu však zde byl prováděn pouze test akutní toxicity. Na druhou stranu, koncentrace methoprenu, které byli raci při tomto testu vystaveni, byla téměř 10x nižší než koncentrace thiaclopridu použitá v našem testu. Dalším insekticidem způsobujícím vakuolizaci epiteliálních buněk je i pymetrozin (Yu a kol., 2018) a diazinon (Heiba, 1999). Stejně jako u dalších autorů se změny způsobené environmentální koncentrací nebo koncentrací blízkou environmentální, stávají zřetelné až po delším časovém úseku a to většinou v rozmezí 7-14-30 dnů expozice.

8. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit na histologické úrovni toxicitu pesticidu thiaclopridu. Histologické vyšetření bylo prováděno na hepatopankreatu a žábřách. Rešeršní část práce se proto zabývá správným postupem tvorby histologického preparátu a fyziologickou a anatomickou stavbou hepatopankreatu a žaber.

Již po 7 dnech expozice skupiny THenv (4,5 μ g/l THIA) došlo k patrné vakuolizaci epitelálních buněk žaber a zastření strukturální organizace jednotlivých žaberních lístků. Stejná koncentrace nezpůsobila žádné strukturální změny hepatopankreatu. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena faktem, že žábry jsou na rozdíl od hepatopankreatu méně uniformní a citlivěji reagují na přítomnost polutantů, jelikož se nachází v přímém styku s vodním prostředím, a tak i případným polutantem.

Po 14dnech expozice u skupiny THenv došlo v žaberních cévách k městnání krve a k výskytu ložiskových hyalinních kapének. Na konci expozice tj. 28. den, všechny tyto změny přetrvaly a přidala se ztráta tvaru, povrchu a vnitřní struktury žaber.

Skupina TH10 vykazovala po 14dnech edematózní zduření epitelu a poškození tubulární výstelky hepatopankreatu, a to zejména v oblasti bazální membrány tubulů. Za 28dní expozice u skupiny THenv došlo v hepatopankreatu k strukturálním změnám - expozice způsobila semikvantitativní namnožení F-buněk. Pravděpodobné vysvětlení této skutečnosti je potřeba organismu vytvářet větší množství proteinů nutných pro detoxifikaci přítomného polutantu (Negro a kol., 2011).

Počet F-buněk u obou testovaných koncentrací THIA se během doby depurace nelišil oproti kontrole. Jedná se zde o jedinou reversibilní změnu odhalenou během testu.

Z těchto výsledků je patrné, že již environmentální koncentrace THIA způsobuje ireversibilní změny žaber a s prodlužující se dobou expozice a zvýšenou koncentrací polutantu i ireversibilní změny hepatopankreatu.

9. Seznam použité literatury

Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A., 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 37, 75–83.

Ahearn, G. A., 1987. Nutrient transport by the crustacean gastrointestinal tract: Recent advances with vesicle techniques. *Biological Reviews*. 62, 45–63.

Alazemi, B. M., Lewis, J.W., Andrews, E.B., 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: *Mormyridae*) exposed to selected pollutants: an ultra structural study. *Environ. Technol.* 17, 225–238.

Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., Lane, D. J.W., 1985. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (*Crustacea: Decapoda*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 65, 901–910.

Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (*Crustacea: Decapoda*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 66, 403–414.

Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A., 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (*Crustacea: Decapoda*). *Marine Biology*, 95, 129–137.

Ashley, C. M., Simpson, M. G., Holdich, D. M., & Bell, D. R., 1996. 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin is a potent toxin and induces cytochrome P 450 in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic Toxicology*, 35, 157–169.

Bancroft, J. D., Gamble, M., 2008. *Theory and practice of histological techniques* ed. 6, Churchill Livingstone Inc. Edinburgh.

Bancroft, J. D. a Stevens, A., 1996. *Theory and Practice of Histological techniques*. 4. vydání. Churchill Livingstone New York. ISBN 0-443-04760-X.

Barradas, C., Dunel-Erb, S., Lignon, J., Péqueux, A., 1999. Superimposed morphofunctional study of ion regulative and respiration in single gill filaments of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Crustaceans Biology*, 19, 14-25.

Beketov, M. A., Liess, M., 2008. Acute and Delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environmental toxicology and chemistry*. 23, 461-470.

Bock, F., 1925. Die Respirationsorgane von *Potamobius astacus* Leach (*Astacus fluviatilis* Fabr.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 124, 51-117.

Brignac-Huber, L. M., Park, J. W., Reed, J. R., Backes, W. L., 2016. Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity. *Drug Metabolism and Disposition*, 44, 1859–1866.

- Brown, B. E., 1982. The form and function of metal containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biological Reviews*. 57, 621–667.
- Burggren, W. W., McMahon, B. R., 1983. An analysis of scaphognathite pumping performance in the crayfish *Orconectes virilis* - Compensatory changes to acute and chronic hypoxic exposure. *Physiol Zoology*, 56,309–318.
- Burggren, W.W., McMahon, B. R., Costerton J.W., 1974. Branchial water-and blood-flow patterns and structure of the gill of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Canadian Journal of Zoology*. 52(12), 1511-1518.
- Ceyhun, S. B., Senturk, M. Erdogan O., Kufrevioglu O. I., 2010. *In vitro* and *in vivo* effect of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills, *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 177-181.
- Čížková, K., 2018. *Základy histochemických metod*. Olomouc. Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. 1. Vydání. ISBN 978-80-244-5316-3
- Del Ramo, J., Pastor, A., Torreblanca, A., Medina, J., Díaz-Mayans, J., 1989. Cadmium-binding proteins in midgut gland of freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 42, 241–246.
- Desouky, M. M. A., H. Abdel-Gawad, B. Hegazi., 2013. Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Food and Chemical Toxicology*. 52, 42-52.
- Dickson, J. S., Dillaman, R. M., Roer, R. D., Roye, D. B. 1991. Distribution and characterization of ion transporting and respiratory filaments in the gill of *Procambarus clarkii*. *Biological Bulletin*. 180, 154-166.
- Ducey, E. F., Shippy, R. T., 1950. Decalcification of Bone by Electrolysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 20, 85-86.
- Fairchild J. F., Sappington L. C., 2002. Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. *Arch Environ Contam Toxicol*. 43, 198–202.
- Fischer, J. M., 1972. Fine-structural observations on the gill filaments of the freshwater crayfish, *Astacus pallipes*, Lereboullet. *Tissue and Cell*. 4, 287-299.
- Fomičev, N. I., 1986. *Rečnoj rak. Metody issledovania*. Izd. Nauka, Leningrad.
- Fox, R., 2006. *Procambarus Crayfish*. *Invertebrate Anatomy OnLine* [online]. Lander University, [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/procambarus.html>
- Gartner, L. P., Hiatt J. L., 2007. *Color textbook of Histology*. 3rd ed., W. B. Saunders Philadelphia. ISBN-13:978-1-4160-2945-8.

- Ghaednia, B., Bayat, M., Sohrabi Haghdoost, I., Motallebi, A.A., Sepahdari, A. 2013. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, health indices, phagocytic activity and histo pathological alteration in *Fenneropenaeus indicus*. Iran J Fish Sci. 12, 813–826.
- Gibson, R., Barker, P. L., 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review. 17, 285–346.
- Habrová, V., 1986. Biologická technika - Mikroskopické a histologické metody, 1st ed., SPN:Praga.
- Hao C., Morse D., Zhao X., Sui L., 2015. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoids in environmental water. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 2225–2232.
- Heiba, F., 1999. Effects of the insecticide, diazinone on the hepatopancreas of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. 3(2), 197-213 DOI: 10.21608/ejabf.1999.3412. ISSN 2536-9814.
- Hirsch, G. C., Jacobs, W., 1928. Der Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen von *Astacus leptodactylus*. I. Teil: Methodik, Technik, der Beweis der Periodizität. Zeitschrift für vergleichende Physiologie. 8, 102–144.
- Holdich D. M., Reeve, I. D., 1988. Functional morphology and anatomy. Freshwater Crayfish—Biology, Management and Exploitation, (eds D. M. Holdich, R. S. Lowery). Timber Press, Portland, 11-51.
- Holdich, D. M., 2002. Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, ISBN 0-632-05431-X.
- Hopwood, D., 1969. Fixatives and fixation: a review. The Histochemical Journal. 1, 323-360.
- Hu, K. J., Leung, P. C., 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. Comparative Biochemistry and Physiology. 146, 69–80.
- Huxley, T. H., 1879. The crayfish. An introduction to the Study of Zoology. Kegan Paul. London.
- Chupani, L., Zusková E., Stará A., Velišek J., Kouba A., 2016. Histological changes and antioxidant enzyme activity in single crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) associated with sub-acute peracetic acid exposure. Fish & Shellfish Immunology. 48, 190-195.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., Roe, R. M. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides on the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protection. 23, 371-378.
- Jiang, G. C., 2009. Study on the acute toxicity and genetics toxicity of bensulfuron-methyl on *Danio rerio*. J. Anhui Agric. Sci. 37, 15879–15881.

- Jirkovská, M., 2006. Histologická technika. Pro studenty lékařství a zdravotnické techniky. Praha: Galén, ISBN 80-7262-263-3.
- Jírovec, O., (1958). Zoologická technika, 3rd ed., SPN:Praha. 314s.
- Junqueira, L. C., Careniro U.J., Kelley R.O., 1997. Základy histologie. 7.vydání. Jinočany: H&H. ISBN 80-857-8737-7.
- Jussila J., Makkonen J., Kokko H., 2011. Peracetic acid (PAA) treatment is an effective disinfectant against crayfish plaque (*Aphanomyces astaci*) spores in aquaculture. *Aquaculture* 320, 37-42
- King, T. L., Uthe, J. F., & Musial, C. J., 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the digestive glands of the American lobster, *Homarus americanus*, captured in the proximity of a coal-coking plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 907–914.
- Koutník, D., Stará A., Zusková E., Kouba A., Velíšek J., 2014. The effect of subchronic metribuzin exposure to signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters*. 35, 51-56
- Koutník, D., Stará A., Zusková E., Kouba A., Velíšek J., 2017. The chronic effects of tebutylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 136.
- Kozák, P., 2013. Biologie a chov raků. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, ISBN 978-80-87437-42-1.
- Lauschová, I., Sedláčková, M., Krejčířová L., Čech, S., Horký D., Šťastná, J., Ilkovics, L., 2007. Histologická praktika a laboratorní technika. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online] , [cit. 26. 04. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.med.muni.cz/clanek-432-histologicka-praktika-a-laboratorni-technika.html>. ISSN 1801-6103.
- Leavitt, D. F., Bayer, R. C., 1982. A description of the muscle net surrounding the digestive epithelium in the midgut gland of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*. 2, 40 –44.
- Lee, R. F., 1989. Metabolism and accumulation of xenobiotics within hepatopancreas cells of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research*, 28, 93–97.
- Loizzi, R. F., 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 113, 420–440.
- Lyon, R., Simkiss, K., 1984. The ultrastructure and metal-containing inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of a crayfish. *Tissue & Cell*. 16, 805–817.

- Lyon, R., Taylor, M., Simkiss, K., 1983. Metal-binding proteins in the hepatopancreas of the crayfish (*Austropotamobius pallipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology. C.* 74, 51–54.
- Miyawaki, M., Taketomi, Y., Tsuruda, T., 1984. Absorption of experimentally administered materials by the hepatopancreas cells of the crayfish, *Procambarus clarki*. *Cell Biology International Reports* 8, 873-877.
- Mohammed, F., Arishiya, T. F., Mohamed, S., 2012. Microtomes and microtome knives. *Annals of Dentistry. University of Malaya.* 19(2), 43-50. ISSN 2462-2060.
- Möhrlen, F., Baus, S., Gruber, A., Rackwitz, H. R., Schnölzer, M., Vogt, G., Zwillig, R. 2001. Activation of pro-astacin. Immunological and model peptide studies on the processing of immature astacin, a zincendopeptidase from the crayfish *Astacus astacus*. *European Journal of Biochemistry.* 268, 2540–2546.
- Negro, L., Senkman, L., Montagna, M., Collins, P., 2011. Freshwater Decapods and Pesticides: An Unavoidable Relation in the Modern World. 197-226.
- Nunez-Nogueira, G., Mouneyrac, C., Amiard, J. C., Rainbow, P. S. 2006. Subcellular distribution of zinc and cadmium in the hepatopancreas and gills of the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine Biology.* 150, 197–211.
- Ogura, K., 1959. Midgut gland cells accumulating iron or copper in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Annotationes Zoologicae Japonenses.* 32, 133–142.
- Papadopoulou-Mourkidou E., Karpouzas D. G., Patsias J., Kotopoulou A., Milothridou A., Kintzikoglou K., Vlachou P., 2004. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. *Sci. Total Environ.* 321, 127–146.
- Parveen, S., Kohguchi, T., Biswas, M., Nakagoshi, N. 2005. Predicting herbicides concentrations in paddy water and run off to the river basin. *J. Environ. Sci.* 17, 631–636.
- Pearse, A. G. E., 1980. *Histochemistry: Theoretical and Applied*, 2 vols., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York.
- Pechacek N., Osorio M., Caudill J., Peterson B. 2014. Evaluation of the toxicity data for peracetic acid in deriving occupational exposure limits. *A minireview Toxicol. Lett.* 223, 45-57.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustaceans Biology*, 15, 1-60.
- Perracia, C., Mittler, B. S., 1972. New glutaraldehyd fixation procedures. *Journal of Ultrastructure Research.* 39, 57-64.

- Rainbow, P. S., White, S. L., 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: Zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*. 174, 245–262.
- Reiber, C. L., 1994. Hemodynamics of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiological Zoology*. 67, 449-467
- Reiber, C. L., 1997. Ontogeny of cardiac and ventilatory function in the crayfish *Procambarus clarkii*. *American Zoologist*. 37, 82-91.
- Roldan, B. M., & Shivers, R. R., 1987. The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinquus*) hepatopancreas and antennal gland. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 86C, 201–214.
- Sagrìstà, E., Durfort, M., 1991. Membranous tubular system in R cells of decapod hepatopancreas investigated using electron opaque tracers. *Cell and Tissue Research*. 266, 585–590.
- Saravana Bhavan, P. & Geraldine, P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*. 50, 331-339, ISSN: 0166-445X.
- Shaw, B. L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*. 35, 325-347.
- Schelig, N., 1952. A method of electrolytic decalcification of teeth. *Deutsche Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde mit Zentralblatt für die Gesamte Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde*. 17(5-6), 192-202.
- Schiebler, T. H., Schneider, F., 1991. *Histologie*, 3. Auflage. Berlin: Springer.
- Sloane J. F., Harris J.E., 1952. A twin-knife microtome attachment. *Quart J Micr Sci*. 92(3), 347-350
- Sousa, L. G., Cuartas, E. I., Petriella, A. M. 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermolt. *Biocell*. 29 (1), 25-31, ISSN 1667-5746.
- Süss A., Bischoff G., Mueller A.C.W., Buhr L., 2006. Chemisch-biologisches Monitoring zu Pflanzenschutzmittelbelastungen und Lebensgemeinschaften in Gräben des Alten Landes*). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 58, 28–42.
- Taylor, H. H., Taylor, E. W., 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: *Decapod Crustacea*. (eds. F.W. Harrison & A. G. Humes). Wiley-Liss, New York pp. 203-93.
- Titford M., 2005. The long history of hematoxylin, *Biotechnic & Histochemistry*. 80(2), 73-78, DOI: 10.1080/10520290500138372

- Tobie J. E., 1958. Certain technical aspects of fluorescence microscopy and the Coons fluorescent antibody technique. *J Histochem Cytochem.* 6(4), 271.
- Tomizawa, M, Casida, J.E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Vacek, Z., 1988. *Histologie a histologická technika.* Praha: Avinaceum-zdravotnické nakladatelství.
- Vacek, Z., 1996. *Histologie a histologická technika II. 1. Vydání.* Brno: Institut pro další zdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 184. ISBN 80-7013-202-7
- Velíšek J., Kouba A., Stará A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters.* 34(2), 31–36.
- Velíšek, J., Stará A., Koutník D., Zusková E., Kouba A., 2014. Effect of prometryne on early life stages od marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Neuroendocrinology Letters.* 35, 93-98
- Velíšek, J., Stará A., Zusková E., Kouba. A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at enviromentally relevant concetrations on early stages od marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere.* 175, 440-445
- Vogt, G., 1985. Histologie und Cytologie der Mitteldarmdrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda). *Zoologischer Anzeiger.* 215, 61–80.
- Vogt, G., 1990. Pathology of midgut gland-cells of *Penaeus monodon* postlarvae after *Leucaena leucocephala* feeding. *Dis Aquat Org.* 9, 45–61.
- Vogt, G., 1993. Differentiation of B-cells in the hepatopankreas of the prawn *Penaeus monodon*. *Acta Zoologica.* 75, 51-60.
- Vogt, G., 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cell of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology.* 114, 83-101.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. *Biology of freshwater crayfish.* Blackwell Science, 2002. ISBN 0-632-05431-X.
- Vogt, G., 2018. Investigating the genetic and epigenetic basis of big biological questions with the parthenogenetic marbled crayfish: A review and perspectives. *Journal of Biosciences.* 43, 189–223.
- Vogt, G., 2019. Functional cytology of the hepatopankreas of decapod crustaceans. *Journal of morfology.* 280, 1405-1444.
- Vogt, G., 2020. Cytopathology and imune response in the hepatopancreas of decapod crustacenas. *Diseases of Aquatic organisms.* 138, 41-88.

- Vryzas Z., Alexoudisa C., Vassiliou G., Galanisa K., Papadopoulou-Mourkidou E. 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotox Environ Safe.* 74, 174–181.
- Walker, A.N., Goldner, R., Horst, M.N. 2010. Morphologic effects of in vivo acute exposure to the pesticide methoprene on the hepatopancreas of a non-target organism, *Homarus americanus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73, 1867– 1874.
- Wang, L., Wu, J., Wang, W. N., Cai, D. X., Liu, Y., Wang, A. L., 2012. Glutathione peroxidase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and its regulation upon pH and Cd exposure. *Ecotoxicology.* 21, 1585–1592.
- Watling, L., 2013. Feeding and digestive system. In L. Watling & M. Thiel (Eds.), *The natural history of the Crustacea. Vol. 1: Functional morphology and diversity* (pp. 237–260). New York: Oxford University Press.
- Wheatly, M. G., 1999. Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *Journal of Experimental Zoology.* 283, 620–640
- Wheatly, M. G., Gannon, A. T., 1995. Ion regulativ in crayfish: freshwater adaptations and the problem od molting. *American Zoologist.* 35, 49-59.
- Wolvekamp, H. P., Waterman, T.H., 1960. Respiration. *The Physiology of Crustacea. Vol. I: Metabolism and Growth*, (ed. T. H. Waterman). Academic Press, New York. 35-100.
- Yang, M., Hu, J.J., Li, S.Y., Ma, Y.N., Gui, W.J., Zhu, G.N. 2016. Thyroid endocrine disruption of acetochlor onzebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J. Appl. Toxicol.* 36, 844–852.
- Yu, J., Xu, E. G., Li, W., Jin, S. et al. 2018. Acute toxicity of an emerging insecticide pymetrozine to *Procambarus clarkii* associated with rice-crayfish culture (RCIS). *Int J Environ Res Public Health.* 15, 984.
- Yu, J., Xu, E. G., Ren, Y., Jin, S., Zhang, T., Liu, J., Li, Zi., 2017. Mixture toxicity of Bensulfuron-Methyl ad Acetachlor to red Swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): Behavioral, Morphological and Histological Effects. *International journal od Environmental Research and Public Health.* 14
- Zare, S., Greenaway, P., 1998. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺ K⁺-ATPase and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destruktor* (*Crustacea:Parastacidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology.* 119A, 739-745.
- Zarenkov, N. A., 1982. Členistologie. Rakoobraznye, Část 1. Izd.MGU, Moskva

10. Obrázková příloha- technické vybavení laboratoře



Obrázek 12- vlevo: rotační mikroskop používaný v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie ve Vodňanech na Fakultě rybářství a ochrany vod.; vpravo: tkáňový procesor Histomaster 2052/1,5 (MDS-group, Germany) používaný k odvodnění v řadě koncentrací etanolu, aplikaci xylenu a následnému prosycení parafínem (foto: V. Kučera).



Obrázek 13- Barvicí automat TISSUE-TEK® DRS™ 2000 pro aplikaci heamoxylinu a eosinu (foto: V. Kučera).



Obrázek 14- vlevo: nahříváná pinzeta pro manipulaci se vzorkem při zalévání do bločků; vpravo: termostat určený k zalévání do bločků roztaveným parafínem (foto: V. Kučera).



Obrázek 15- Vlevo: vodní lázeň určená pro montování slidů na podložní sklička; vpravo: optický mikroskop s kamerovým systémem Olympus E-600 pro vyšetřování hotových preparátů (foto: V. Kučera).

11. Abstrakt

Thiacloprid je vysoce selektivní typ nového pesticidu patřícího do skupiny neonikotinoidů. Napadá nervový systém hmyzu, a to konkrétně acetylcholinové dráhy (Tomizawa, 2005). Raci byli v testu vystaveni dvěma koncentracím thiaclopridu, a to environmentální koncentraci 4,5 μ g/l (skupina THenv) a 10% 96hLC50 tj. 64,64 μ g/l (skupina TH10). Vzorke hepatopankreasu a žaber byli odebírány 7., 14. a 28. vden pokusu a 14. a 28den depurační postexpoziční fáze. Odebrané vzorky žaber a hepatopankreatu byly zpracovány rutinním histologickým postupem.

Na žábrách byly sledovány změny již po 7dnech expozice environmentální koncentrací a intenzita histopatologických změn se stupňovala s prodlužujícím se časem expozice. Environmentální koncentrace neměla na hepatopankreas významný vliv.

Na hepatopankreatu byly pozorovány změny u skupiny TH10 již po 7 dnech expozice. V depurační době všechny změny přetrvávaly, kromě semikvantitativních změn počtu F-buněk. Změny se zdají být ireversibilní. Na základě provedeného testu se insekticid thiacloprid jeví jako raky poškozující již v environmentální koncentraci. Pro potvrzení těchto výsledků by bylo třeba provést rozsáhlejší test s větším množstvím vyšetřovaných jedinců.

12. Abstract

Thiacloprid is a highly selective type of pesticide belonging to the group of neonicotinoids. It attacks nervous system of the insects, especially acetylcholin system (Tomizawa, 2002). In our test, crayfish were exposed to two concentrations of the thiaclopride – environmental concentration 4,5µg/l (THenv) and 10% 96hLC50 64,64µg/l (TH10). Samples of the tissues (gills and hepatopankreas) were collected 7th, 14th and 28th day of the test and 14th and 28th day of the regeneration period. The samples of the crayfish were processed by routine histological procedure.

The histological changes of gills were mentioned in group THenv after 7 days of exposure. Intensity and number of changes became more significant with an increased exposure time. Environmental concentration didn't have marked effect on the hepatopankreas.

The changes of hepatopankreas tissue were mentioned in group TH10 after 7 days of exposure. All described changes except the increased number of F-cells, were found in both exposed groups till the end of regeneration period. Based on the obtained results, thiaclopride has harmful effect on crayfish even at environmental relevant concentrations. Further tests with higher numbers of examined individuals are necessary for the confirmation of obtained results.