

10/2020  
Metodika

# ODBĚR HLENU U RYB

Ing. Karel Halačka, CSc.  
prof. Dr. Ing. Jan Mareš





**Certifikovaná metodika 10/2020**

# **ODBĚR HLENU U RYB**

**Ing. Karel Halačka, CSc.  
prof. Dr. Ing. Jan Mareš**

Brno, 2020

Metodika vznikla za finanční podpory projektu TAČR TG03010048 Komercializace výsledků zoologického výzkumu – aplikace využitelné v praktické ochraně přírody, dílčího projektu 100107 Měření absorpce UV záření ochranným hlenem ryb.

#### **Podíl autorů:**

Ing. Karel Halačka, CSc. <sup>(1)</sup> 90 %

prof. Dr. Ing. Jan Mareš <sup>(2)</sup> 10 %

#### **Adresa autorů:**

<sup>(1)</sup> Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.,  
Květná 8, Brno 603 65

<sup>(2)</sup> Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie,  
rybářství, hydrobiologie a včelařství, Oddělení rybářství a hydrobiologie,  
Zemědělská 1, 613 00 Brno

#### **Oponenti:**

doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. (oponent z praxe)

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

Ing. Lukáš Mareš (oponent za státní správu)

Ministerstvo zemědělství ČR, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

#### **Osvědčení o uznání certifikované metodiky 25138/2020-MZE-16232:**

Certifikovaná metodika ze dne 21. 5. 2020

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství,  
Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

© Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.

ISBN 978-80-87189-31-3

# Obsah

1. Cíl metodiky .....	4
2. Vlastní popis metodiky .....	4
2.1. Struktura integumentu ryb .....	4
2.2. Tvorba sekretu .....	5
2.3. Důvody odběru hlenu .....	7
3. Metody odběru hlenu .....	7
3.1. Stěr .....	7
3.2. Smývání .....	8
3.3. Odsátí .....	8
4. Srovnání mechanických způsobů odběru .....	9
4.1. Morfologické srovnání pokožky při jednotlivých způsobech odběru .....	9
4.2. Množství lysozymu v hlenu při jednotlivých způsobech odběru .....	11
5. Metodická doporučení .....	12
6. Novost metodiky .....	13
7. Popis uplatnění metodiky .....	14
8. Ekonomické aspekty .....	14
9. Poděkování .....	14
10. Seznam použité související literatury .....	15
11. Seznam publikací předcházející metodice .....	16

## 1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je seznámit odbornou veřejnost a uživatele se získanými informacemi a hodnocením základních způsobů odběru hlenu u ryb. Na základě poznatků a hodnocení tak umožnit co nejefektivnější odběr materiálu pro následný výzkum. Cílovou skupinou dané metodiky jsou zejména osoby z veterinární praxe a ichtyologové zabývající se problematikou integumentu ryb, a to jak ve vztahu k jejich zdravotnímu stavu nebo vývojově-anatomickým studiím. Při výběru druhů ryb k ověření byly preferovány zástupci různých taxonomických skupin.

## 2. Vlastní popis metodiky

Tato metodika obsahuje doporučení k postupu odběru hlenu u ryb podložené histologickým studiem struktury integumentu. Sledována byla možnost narušení sekrečních epidermálních buněk, při němž může dojít k uvolnění jejich obsahu do odebíraného vzorku a tím i ke zkreslení informací o složení hlenové vrstvy na povrchu těla sledovaného jedince. Uvedeny a porovnány jsou základní metody pro odběr hlenu.

### 2.1. Struktura tělního povrchu (kůže, integument) ryb

Hlavní a původní funkcí kůže je izolace a ochrana organismu před vlivy vnějšího prostředí. Během evoluce převzala mnoho dalších významných funkcí, což se projevilo i změnami v její stavbě. U ryb je kůže a zejména pokožka v jistém smyslu složitější než u suchozemských obratlovců a z mnoha jejích funkcí lze jmenovat například od obecně se vyskytujících, jako je mechanická ochrana, výměna plynů, vyrovnávání osmotických vlivů vody, zbarvení (často s možností rychlých změn), sekrece poplachových a jinak informujících látek, produkce hlenu, ochrana proti patogenům, orientace v prostředí pomocí v ní umístěných smyslových buněk, až po raritní jako je bioluminiscence batypelagických ryb či výživa potomstva.

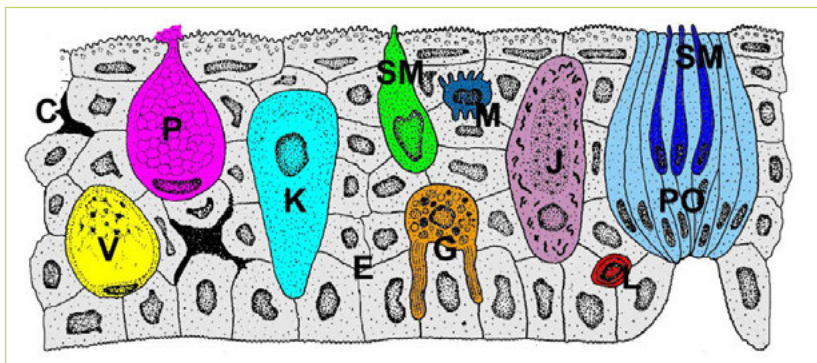
Kůže ryb je tvořena na povrchu pokožkou (epidermis), pod ní ležící škárou (dermis), v níž jsou uloženy šupiny, a podkožím (hypodermis).

Struktura pokožky, tj. jak tloušťka tak i zastoupení jednotlivých typů buněk, je u různých skupin či druhů ryb rozdílná a obvykle dochází ke změnám i v průběhu života daného jedince.

## 2.2. Tvorba sekretu

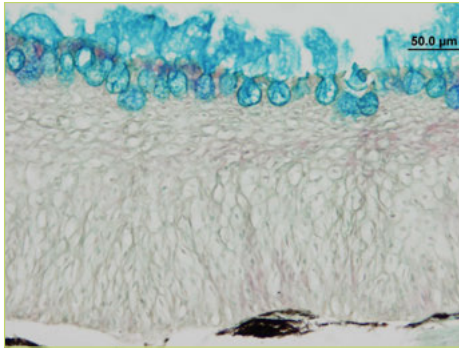
Pokožka ryb je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, který ale, na rozdíl od suchozemských obratlovců, při povrchu nerohovatí. Výjimkou je třecí vyrážka (Obr. 3 dole). Jednotlivé buněčné elementy permanentně vznikají v dolní části tvořené řadou různě vysokých cylindrických buněk (Obr. 1). Během svého vývoje postupují směrem k povrchu, kde postupně nahrazují buňky odumírající.

Obr. 1.: Schematické znázornění pokožky vodních obratlovců s hlavními typy buněk: E – obecné epidermální buňky; C – pigmentová buňka – melanofor; P – pohárková sekreční buňka; V – váčkovitá sekreční buňka; K – kyjovitá sekreční buňka; SM – smyslové buňky; PO – podpůrné buňky; M – Merkelova buňka; G – granulární buňka; L – lymfocyt; J – jedová buňka. (upraveno dle Whitear 1986).



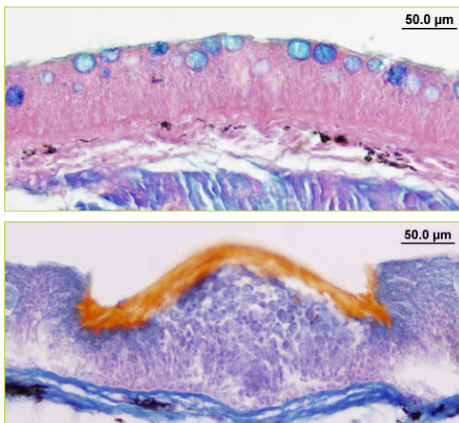
Hlenová vrstva na povrchu rybí pokožky je produkována zejména jednobuněčnými pohárkovými buňkami. Ty se vyskytují zejména v horní části pokožky, kde se svými apikálními konci otevírají na povrch pokožky a tímto otvorem uvolňují obsah centrální vakuoly (Obr. 2). Tyto sekreční buňky jsou přítomny prakticky u všech druhů ryb. U skupiny ryb zahrnující například ryby lososovité, ostnoploutvé či hrdloploutvé je dále v menším množství přítomen morfologicky podobný typ sekrečních buněk označovaný jako váčkovité. Pro další skupinu ryb, zahrnující například máloostné a holobřiché, je charakteristický výskyt speciálních sekrečních buněk, tzv. buňky kyjovité. Ty jsou umístěny ve střední části pokožky a nekomunikují tak za normálních okolností s povrchem. Pokud však dojde, například při útoku predátora, k poranění ryby, uvolňují do vodního prostředí

svůj sekret obsahující „poplachové látky“, sloužící ostatním organismům v okolí jako informace o nebezpečí. Dále obsahují i látky napomáhající regeneraci tkáně po poranění. Kromě těchto speciálních sekrečních buněk se na tvorbě hlenu podílí i nespecializované epidermální buňky při svém rozpadu na povrchu pokožky.



Obr. 2.:  
*Pohárkové sekreční buňky (pstruh obecný, dorzální část hlavy) lokalizované při povrchu pokožky uvolňující svůj obsah, který tvoří dominantní část hlenové vrstvy (barveno Alcian blue při pH 2,5).*

V některých případech lze pozorovat rozdíly ve struktuře pokožky, zastoupení sekrečních buněk a intenzitě tvorby hlenu v průběhu roku, resp. mezi samci a samicemi. Typickým příkladem jsou výrazné změny v období tření u kaprovitých ryb označované jako třecí vyrážka. Vznik třecích pupenů je současně spojen s výrazným zesílením pokožky a zejména s absencí sekrečních buněk, čímž je výrazně omezena tvorba hlenu (Obr. 3).



Obr. 3.:  
*Pokožka oukleje mimo třecí období obsahující v horní polovině množství sekrečních buněk (nahore) a pokožka samce v době výtěru s výrazným třecím pupenem a sníženým množstvím sekrečních buněk (barveno Alcian blue při pH 2,5/hematoxylin/eozin (nahore), resp. barvení dle Papanicolaue (dole).*



### 2.3. Důvody odběru hlenu

Vzorky hlenu ryb se odebírají ke sledování jejich imunologických či fyzikálně-chemických vlastností, případně pro bakteriální a parazitologické vyšetření. Obecným požadavkem je obvykle získání určitého objemu hlenu z povrchu těla jedince, dále podle konkrétního cíle výzkumu je třeba více či méně zamezit kontaminaci vzorku epidermální tkání. V některých případech je třeba zohlednit i možnost potřeby dalšího využití jedinců (odběr jiných tkání, nutnost dalšího sledování živého jedince) a tak například minimalizovat manipulaci a stresovou zátěž.

## 3. Metody odběru hlenu

K základním metodám odběru hlenu patří stěr těla jedince vhodným předmětem, někdy bývá uváděna i možnost získání vzorku vyplavením pomocí umístění ryby do plastového sáčku. Kromě výše uvedených metod byl vyzkoušen odběr pomocí bateriové odsávačky. Za účelem výběru optimálního postupu odběru vzorku hlenu bylo sledováno jednak složení hlenu (4.1.), jednak případná možnost narušení povrchové vrstvy pokožky (4.2).

### 3.1. Stěr

Provádí se obvykle pomocí tupého předmětu, jímž se hlen stírá z boku ryby od hlavy směrem k ocasní části (Obr. 4). Obvykle je tento způsob odběru poměrně účinný, problematický je ale možný vliv síly tlaku na tělo ryby a tím riziko kontaminace a nestandardního výsledku následných měření. Množství hlenu je v rámci sledovaných metod nejvyšší, což je dáno velikostí stírané plochy a možností působit tlakem.

Obr. 4.: Odběr hlenu pomocí tupé a ostré strany skalpelu



### 3.2. Smývání

Odebíraný jedinec se umístí do plastového sáčku obsahujícího několik mililitrů tekutiny (vody, fyziologického roztoku, pufru) ve kterém se ponechá za případného naklápění několik minut (Obr. 5). Nevýhodou dané metody je získání pouze omezeného, navíc ředěného, množství hlenu, odběr je však poměrně standardní.



Obr. 5.:  
*Jedinec bolena  
v plastovém sáčku  
s mediem*

### 3.3. Odsátí

K odběru byla použita bateriová odsávačka se silikonovým nástavcem (Obr. 6).



Obr. 6.:  
*Bateriová  
odsávačka  
použitá k odběru  
hlenu ryb*

Pro zamezení případného úniku získaného materiálu do vnitřní části přístroje byla na konec odsávací trubice nástavce nasazena ependorfka s bočním otvorem (Obr. 7) umožňujícím průchod vzduchu.



*Obr. 7.:  
Nástavec odsávačky  
s nasazenou, bočně  
perforovanou ependorfkou  
omezující vniknutí odsávaného  
materiálu do vlastního přístroje.*

Získaný hlen lze ze silikonového nástavce jednoduše vytlačit pístem získaným z inzulínové injekční stříkačky (Obr. 8), případně bude nahromaděn (v případě nízké viskozity) v nasazené ependorfce.



*Obr. 8.:  
Obsah násadce lze vytlačit  
pístem inzulínové stříkačky*

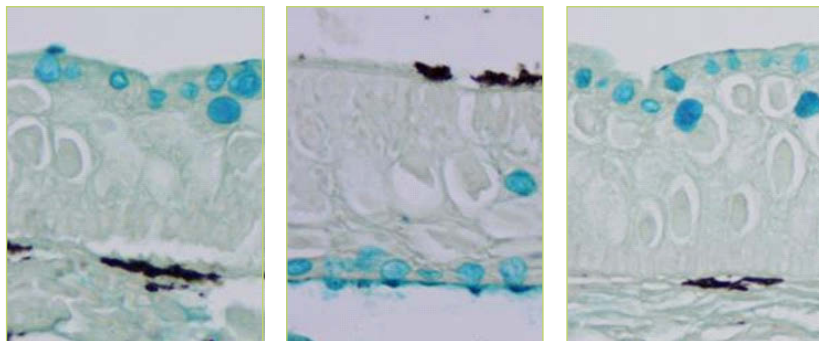
Odběr lze omezit na určitá místa na povrchu jedince či lze poměrně přesně stanovit množství odebraného hleny na předdefinované ploše.

#### 4. Srovnání mechanických způsobů odběru

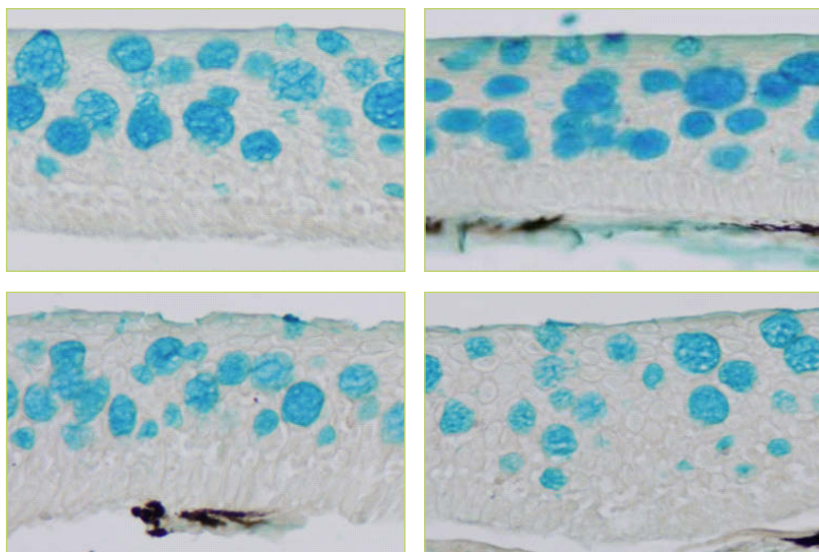
##### 4.1. Morfologické srovnání pokožky při jednotlivých způsobech odběru

Byla sledována histologie pokožky u šesti druhů ryb, tak aby byly zahrnuty hlavní taxonomické skupiny: pstruh duhový, bolen dravý, lín obecný, kapr obecný, mňík jednovousý a keříčkovec červenolemý. Hlen i histologické vzorky byly odebrány ze hřbetu v oblasti mezi hlavou a hřbetní ploutví. Sledování na histologických řezech bylo soustředěno na možné změny způsobené odběrem, tj., narušení povrchu kůže, stržení a absence povrchových vrstev pokožky či jiné deformace způsobené například posunem šupin.

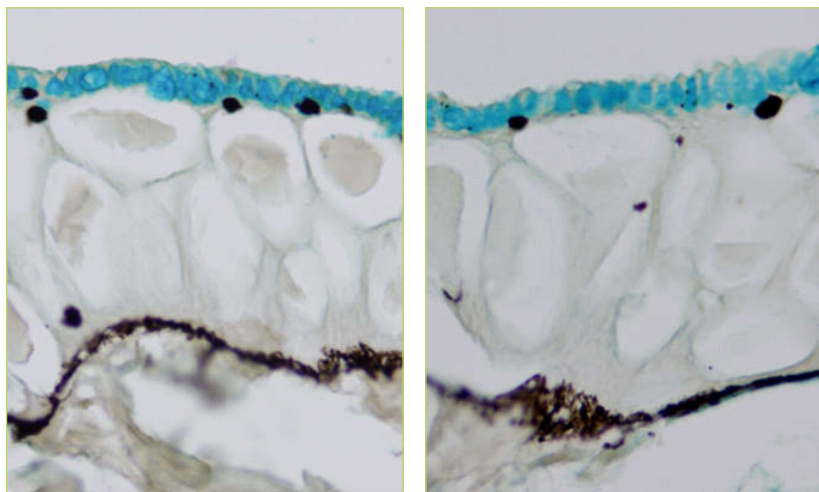
Obr. 9.: Pokožka kapra – vlevo po „tupá“ strana skalpelu, jemný tlak; uprostřed táž strana, silný tlak; vpravo odsávačka – rozdíl ve způsobu odběru (poškození pokožky) není patrný (barveno Alcian blue při pH 2,5)



Obr. 10.: Pokožka pstruha duhového – vlevo nahoře bez odběru; vpravo nahoře „tupá“ strana skalpelu, jemný tlak; vlevo dole táž strana, silný tlak; vpravo dole „ostrá“ strana, silný tlak – rozdíl ve způsobu odběru není patrný (barveno Alcian blue při pH 2,5)



Obr. 11.: Pokožka mníka – vlevo po odběru „tupou“ stranou skalpelu za použití jemného tlaku, vpravo po odběru „ostrou“ stranou se zvýšeným tlakem – rozdíl ve způsobu odběru není patrný (barveno Alcian blue při pH 2,5)



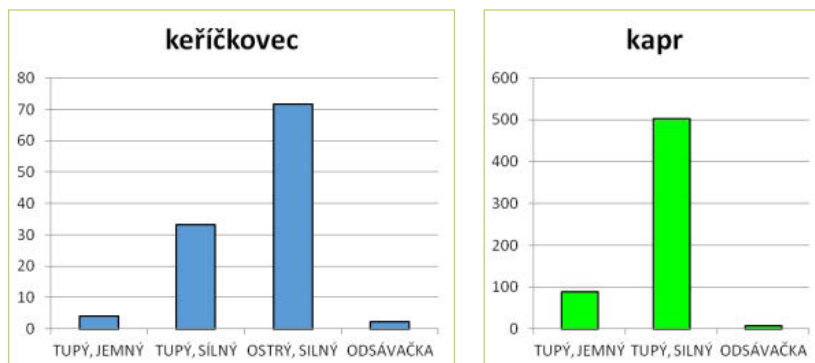
U sledovaných druhů ryb nebylo prokázáno mechanické poškození pokožky způsobené odběrovým zařízením (Obr. 9, 10, 11), a to ani v případě vyššího tlaku či stěru pomocí „ostré“ strany skalpelu. Lze usuzovat, že pokožka, včetně její povrchové vrstvy je u těchto druhů dostatečně mechanicky odolná, aby odolala tomuto typu zásahu. Následně byla proto sledována možnost rozdílů ve složení vzorku i v případě absence zjevného poškození pokožky.

#### 4.2. Stanovení aktivity lysozymu v hleu při jednotlivých způsobech odběru

Ověřen byl možný vliv způsobu odběru na aktivitu lysozymu naměřeného ve vzorcích hleu u kapra obecného a keříčkovce červenolemého. K odběru byl použit skalpel (tupá (resp. ostrá strana u keříčkovce)) pod různým tlakem a bateriová odsávačka u každého jedince. Pro stanovení aktivity lysozymu byla použita metoda radiální difúze podle Hyršl et Marek (1999).

Jak ukazuje obrázek (Obr. 12), byl-li hlen odebírán stěrem za pomoci silného tlaku nebo dokonce ostrou stranou skalpelu, byly naměřené hodnoty několikanásobně vyšší než v případě jemného odběru tupou stranou skalpelu či pomocí odsávačky.

Obr. 12.: Průměrné koncentrace lysozymu (mg/ml) naměřené u jedinců keříčkovce a kapra ve vzorcích odebíraných odlišným způsobem (tupá × ostrá strana skalpelu, malý a silný tlak na nástroj; odsávačka).



Lze tedy předpokládat, že působením tlaku na pokožku dochází k uvolnění obsahu sekrečních či povrchových epidermálních buněk na povrch pokožky.

## 5. Metodická doporučení

Na základě histologického sledování lze konstatovat, že ani při použití zvýšeného tlaku odběrovým nástrojem na pokožku nebylo pozorováno její mechanické poškození (viz 4.1.). Ovšem zjištěné rozdíly v koncentraci lysozymu (viz 4.2.) naznačují, že dochází k uvolnění sekrečního či buněčného obsahu povrchových epidermálních buněk (jedná se pravděpodobně o přirozenou reakci pokožky na tlakový podnět mající zvýšit ochranu těla jedince při styku s překážkou) a tím ke kontaminaci vzorku povrchové vrstvy hlenu.

Pro imunologické či fyzikálně-chemické analýzy je tak nejvhodnější odsávačka, v případě potřeby většího objemu citlivý stěr tupým předmětem. Odběr hlenu by měl v rámci jednoho odběru provádět stále jeden pracovník, aby se snížil vliv odlišného individuálního postupu.

V případě potřeby stanovení množství odebraného slizu nebo definice plochy kůže, ze které je sliz odebírán, se jeví jako nejvhodnější odběr s pomocí odsávačky umožňující vymezení plochy, za které je sliz odebírán, resp. standardizaci odebírané plochy.

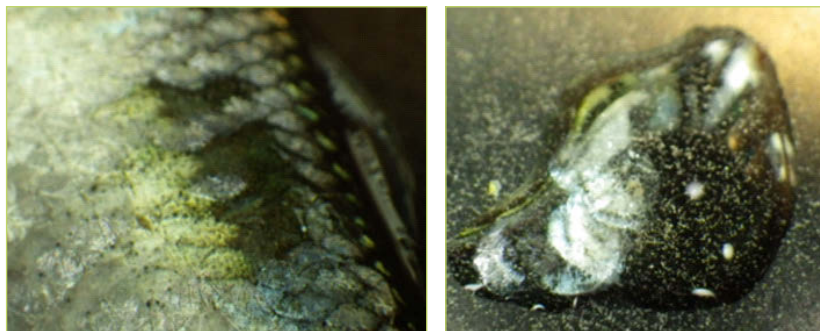
V tomto případě lze doporučit odběr hleu pomocí bateriové odsávačky, zejména s ohledem na preferenci získání vzorku s nízkou kontaminací obsahem epidermálních buněk před objemem vzorku.

Odběr pomocí smývání hleu je vhodný u menších jedinců a druhů s tenkou vrstvou pokožky, kde by odběr ostatními způsoby měl devastující účinek.

Při odběru hleu, resp. již koncepci experimentů je vhodné přihlížet k morfologii pokožky a její dynamice u jednotlivých druhů ryb. Pokud například není pokus založen na sezónním sledování, není pro odběr hleu vhodné období výtěru, kdy je zejména u samců některých druhů ryb (lososovití, kaprovité ryby s třecí vyražkou) produkce hleu snížena.

U některých druhů ryb (ouklej) jsou šupiny v kůži pouze jemně uloženy a při manipulaci, například stěru, dochází k jejich vytržení (Obr. 13). Nález šupin ve vzorku značí zásadní poškození pokožky (šupiny jsou uloženy až v pod ní ležící škáře) a je třeba zvážit, zda je daný vzorek pro typ plánovaných analýz dále vhodný.

*Obr. 13.: Při vytržení šupin ze škáry vždy dochází i k narušení pokožky a tím kontaminace vzorku tkáňi či buněčnými epidermálními elementy.*



## 6. Novost metodiky

I když již je struktura hlenové vrstvy ryb i morfologie jejich pokožky dlouhodobě sledována, nebyl doposud standardizován odběr hleu. Do jisté míry je to způsobeno například morfologickou a velikostní různorodostí sledovaných jedinců či odlišným cílem a potřebou zpracování vzorku. Daná metodika poskytuje přehled a zhodnocení jednotlivých metod odběru včetně nového postupu s využitím modifikovaného odsávacího zařízení.



## 7. Popis uplatnění metodiky

Předložená metodika je určena pro praktické využití v rámci analýz či studia integumentu ryb, konkrétně hlenové ochranné vrstvy, a to jak z v rámci chovu ryb, tak i v rámci výzkumu. Metodika bude uplatněna například Ústavem biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Mendelovou univerzitou v Brně, Masarykovou univerzitou nebo Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno. Metodika je uplatněna na základě smlouvy mezi Ústavem biologie obratlovců AV ČR, v. v. i. a Mendelovou univerzitou v Brně.

## 8. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty lze rozdělit do několika skupin:

- ☞ Omezení nákladů na analýzy nečitelných vzorků.
- ☞ Dobrá kvalita vzorku výrazně ovlivňuje i čas na realizované analýzy, nutnost opakovat měření či přípravu vzorku. Dochází tak k mnohonásobnému navýšení časové náročnosti a tím i nákladů na obsluhu.
- ☞ Špatná interpretace výsledků může mít následně významný dopad na účel, kvůli němuž byly analýzy realizovány, ať již se jedná o produkční účely či vědecký výzkum.

## 9. Poděkování

Metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky Programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací GAMA – Komercializace výsledků zoologického výzkumu – aplikace využitelné v praktické ochraně přírody TG03010048.



## 10. Seznam použité související literatury

Cole A.M., Weis P., Diamond G., 1997: Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 18, 2: 12008–12013.

Ebran N., Julien S., Orange N., Auperin B., Molle G., 2000: Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467: 271–280.

Hyršl P. et Marek M., 1999. Influence of proleg ligature on the protein level in haemolymph of *Bombyx mori* (L.) larvae. *The Biological Bulletin, Poznaň*, 36(2):103–110.

Roberts S.D., Powell M.D., 2005: The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *J Comp Physiol B* 175: 1–11.

Ross N.W., Firth K.J., Wangl A., Burka J.F., Johnson S.C., 2000: Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat Org*, 41: 43–51.

Smith V.J., Fernandes J.M.O., Ernandes, Jones S.J., Kemp G.D., Tatner M.F., 2000: Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 243–260.

Whitear M., 1986: Epidermis. Dermis. In: Bereiter-Hahn J., Matoltsy A.G. & Richards K.S. (eds.), *Biology of the integument*, vol. 2, Vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 8–64.



## 11. Seznam publikací předcházející metodice

Halačka K., 1995: Structure and histochemistry of the epidermis of nase (*Chondrostoma nasus*). *Folia Zool.* 44: 99–104.

Halačka K., Brabec H., Vyhnalíková D., 1991: Morphometry of the epidermis of the grayling (*Thymallus thymallus*) in the spawning season. *Folia Zool.* 40: 187–192.

Halačka K., Kopp R., Klíma O., Mareš J., 2015: Epidermis structure in the Brook char (*Salvelinus fontinalis*) and its Arctic char (*Salvelinus alpinus*) hybrid *Acta Veterinaria Brno*, 84: 159–166.

Halačka K., Papoušek I., Mendel J., Vetešník L., 2007: Structure of the epidermis of salmonids. In: Book of Abstract XII European Congress of Ichthyology, Zagreb: 76 p.

Halačka K., Vetešník L., Papoušek I., Mendel J., Šimková A., 2010: The epidermal structure of *Carassius gibelio*: a link with ploidy status in spawning and postspawning periods. *J Fish Biol* 77: 2171–2179.

Halačka K., Vitek T., Vetešník L., Spurný P., 2012: Epidermis structure and blood parameter differences between sculpin *Cottus gobio* and Siberian sculpin *Cottus poecilopus* from the Morava watershed. *Folia Zool* 61: 9–16.

Knoz J., Halačka K., Brabec H., 1990: Morphometry of the epidermis of brown trout (*Salmo trutta m. fario*). *Folia Zool* 39: 269–278.

Knoz J., Halačka K., 1991: Structure and histochemistry of the epidermis of some freshwater fishes. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno*, 25(8): 1–42.

Sivka U., Halačka K., Sušník B.S., 2012: Morphological differences in the skin of marble trout *Salmo marmoratus* and of brown trout *Salmo trutta*. *Folia Histochem Cytobiol* 50: 255–262.

Šimková A., Hyršl P., Halačka K., Vetešník L., 2015: Physiological and condition-related traits in the gynogenetic-sexual *Carassius auratus* complex: different investments promoting the coexistence of two reproductive forms? *BMC Evolutionary Biology* 15: 154.

Šimková A., Vojtek L., Halačka K., Hyršl P., Vetešník L., 2015: The effect of hybridization on fish physiology, immunity and blood biochemistry: A case study in hybridizing *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio* (Cyprinidae) *Aquaculture* 435: 381–389.



Odběr hlenu u ryb  
Certifikovaná metodika 10/2020

Ing. Karel Halačka, CSc.  
prof. Dr. Ing. Jan Mareš

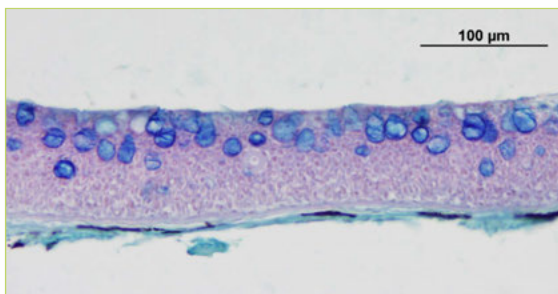
---

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 65 Brno  
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec  
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.  
Vydání: první, 2020  
Počet stran: 18  
ISBN 978-80-87189-31-3









Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.  
Květná 8, Brno 603 65  
Tel.: +420 543 422 540  
E-mail: ubo@ivb.cz

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