Quantitativ-stereologische Analyse der Kiemenmorphologie von in der ökotoxikologischen Forschung verwendeten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

von Sonja Fiedler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Quantitativ-stereologische Analyse der Kiemenmorphologie von in der ökotoxikologischen Forschung verwendeten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

von Sonja Fiedler aus Friedberg

München 2022

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung durch:
Dr. med. vet. habil. Andreas Parzefall

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dušan Palić

Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Priv.-Doz. Dr. Kristina Schauer

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 12. Februar 2022



INHALTSVERZEICHNIS

1		EINLEITUNG	.1
2		ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	.5
3		WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND	7
	3.1	Aquatische Ökotoxikologie	.7
	3.1.1	Umweltrisikobewertung zur Einschätzung des Gefahrenpotenzials von Gewässerschadstoffen	. 9
	3.1.2	Umweltrisikobewertung in der EU-Gesetzgebung	11
	3.1.3	Untersuchung von Biomarkern und Bioakkumulationsmarkern bei in ökotoxikologischen Expositionsversuchen verwendeten Fischen	13
	3.2	Regenbogenforellen in der ökotoxikologischen Forschung	19
	3.2.1	Fische als Testorganismen in der aquatischen ökotoxikologischen Forschung	19
	3.2.2	Regenbogenforellen als geeignete Testorganismen in der aquatischen Ökotoxikologie	20
	3.3	Kiemen als Indikatororgane für Umweltbelastungen	23
	3.3 3.3.1	Kiemen als Indikatororgane für Umweltbelastungen	
	3.3.1		23
	3.3.1 3.3.2	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25
	3.3.1 3.3.2 3.3.3	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29
	3.3.1 3.3.2 3.3.3	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35 36
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1 3.4.2 3.4.3	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35 36 38
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1 3.4.2 3.4.3	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35 36 38
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35 36 38 39 42
	3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4	Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)	23 25 29 35 36 38 39 42

INHALTSVERZEICHNIS

	3.5.3	Quantitativ-morphologische Analysen mittels der Laser-Lichtblatt-
		Fluoreszenzmikroskopie optisch geklärter Gewebeproben56
4		PUBLIKATION 59
5		DISKUSSION 127
	5.1	Diskussion des allgemeinen experimentellen Designs 131
	5.2	Diskussion der quantitativ-stereologischen Analyse der Kiemen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie
	5.3	Diskussion der quantitativ-stereologischen Analyse der Kiemen mittels Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie
	5.4	Diskussion der Ergebnisse147
	5.5	Relevanz und Limitation der Laser-Lichtblatt- Fluoreszenzmikroskopie in quantitativ-morphologischen Untersuchungen von Kiemen
	5.6	Ausblick151
6		ZUSAMMENFASSUNG153
7		SUMMARY155
8		LITERATURVERZEICHNIS 157
9		PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN FACHTAGUNGEN
10)	DANKSAGUNG183

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3DISCO 3D imaging of solvent-cleared organs

A. Arteria

BABB Benzylalkohol/Benzylbenzoat

bzw. beziehungsweise

Ca Kalzium

CCD Charge coupled device / Ladungsgekoppeltes Bauelement

CE Coefficient of Error / Fehlerkoeffizient

Cl Chlor

CLARITY Clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid

imaging/immunostaining/in situ hybridization-compatible tissue-

hydrogel

cm Zentimeter

CO₂ Kohlenstoffdioxid

CUBIC Clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational

analysis

CV Coefficient of Variation / Variationskoeffizient

d. h. das heißt

DB Diffusionsbarriere

DNA Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure

EC Epithelial cells / Epithelzellen

EC₅₀ Median effective concentration / Mittlere effektive Konzentration

ECi Ethyl cinnamate / Zimtsäureethylester

etc. et cetera

EU Europäische Union

FF-PE Formalin-fixed and paraffin-embedded / Formalinfixiert und

eingebettet in Paraffin

fs Linearer Schrumpfungsfaktor

g Gramm

GF Gill filaments / Kiemenfilamente

GFP Green fluorescent protein / Grün fluoreszierendes Protein

GMA/MMA Glycolmethacrylat/Methylmethacrylat

H⁺ Proton (Kation des Wasserstoffs)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HCO₃ Hydrogencarbonat

ISO International Organization for Standardization / Internationale

Organisation für Normung

IUR Isotropic uniform random / Ungerichtet mit gleichförmiger

Zufälligkeit

JD-UQN Jahresdurchschnitts-Umweltqualitätsnorm

K Kalium

L Length / Länge

Laser Light amplification by stimulated emission of radiation /

Lichtverstärkung durch stimulierte Strahlungsemission

LC₅₀ Median lethal concentration / Mittlere letale Konzentration

Ih Harmonische mittlere Dicke

LOEC Lowest observed effect concentration / Niedrigste

Konzentration mit beobachteter Wirkung

LSFM Laser light sheet fluorescence microscopy / Laser-Lichtblatt-

Fluoreszenzmikroskopie

Lv Längendichte einer Struktur innerhalb ihres Referenz-

kompartiments

μm Mikrometer mosm/l Osmolarität

MXR Multixenobiotic resistance / Multixenobiotika-Resistenz

N Number / Anzahl

NA Numerische Apertur

Na Natrium

NH₃ Ammoniak

NH₄ Ammonium

NOEC No observed effect concentration / Konzentration ohne

beobachtete schädliche Wirkung

Ny Numerische Volumendichte von Partikeln / Zellen innerhalb

ihres Referenzkompartiments

O₂ Molekularer Sauerstoff

OECD Organization for Economic Cooperation and Development /

Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und

Entwicklung

PAK Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PEC Predicted environmental concentration / Vorhergesagte

Umweltkonzentration

PL Primärlamellen

PNEC Predicted no effect concentration / Abgeschätzte Nicht-Effekt-

Konzentration

REACH Registration, evaluation, authorisation and restriction of

chemicals / Registrierung, Bewertung, Zulassung und

Beschränkung chemischer Stoffe

RI Refraktionsindex

RL Richtlinie

S Surface / Oberfläche

SA Sphärische Aberration

seeDB See Deep Brain

SL Sekundärlamellen

SNR Signal-to-noise-ratio / Signal-Rausch-Verhältnis

SURS Systematic uniform random sampling / Systematisch zufällige

Probennahme

Sv Oberflächendichte einer Struktur innerhalb ihres Referenz-

kompartiments

Th True harmonic mean thickness / Wahre harmonische mittlere

Dicke

UQN Umweltqualitätsnorm

V Volumen

VO Verordnung

VUR Vertical uniform random / Vertikal mit gleichförmiger Zufälligkeit

Vv Volumendichte einer Struktur innerhalb ihres Referenz-

kompartiments

WHO World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation
YFP Yellow fluorescent protein / Gelb fluoreszierendes Protein

z. B. zum Beispiel

ZHK-UQN Zulässige-Höchstkonzentrations-Umweltqualitätsnorm

1 EINLEITUNG

Die aquatische Ökotoxikologie untersucht potenziell schädigende oder toxische Effekte von Umweltschadstoffen auf aquatische Lebewesen, um diese vor Expositionen in sich nachteilig auswirkenden Umweltkonzentrationen zu schützen [1,2]. Die Toxizität eines potenziellen Umweltschadstoffes wird an empfindlichen Organismen wie der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) mittels eines breiten Spektrums an Toxizitätstests (Expositionsversuchen) untersucht [1,3-6]. Testorganismen werden unterschiedlichen Schadstoffkonzentrationen über definierte Zeiträume ausgesetzt, um anhand verschiedener Analysemethoden (z. B. der Histopathologie [7-9]) zu ermitteln, in welchem Verhältnis die Schadstoffkonzentrationen zu den hervorgerufenen Effekten stehen (Konzentrations-Wirkungs-Beziehung) [1,3,10,11]. Die ermittelten Effekte werden anhand statistischer Endpunkte ausgedrückt, z. B. der *no observed effect concentration* (NOEC) [1,2,10,12].

Um gesetzliche Regularien bezüglich anthropogener Stoffe in der Umwelt festzulegen, werden diese hinsichtlich der von ihnen ausgehenden Umweltrisiken untersucht [3,11,13]. Besteht ein Gefährdungspotenzial für Mensch oder Tier, erfolgt eine stoffspezifische Umweltrisikobewertung anhand der kritischen Evaluation relevanter wissenschaftlicher Publikationen. Die Verlässlichkeit der Umweltrisikobewertung hängt in hohem Maße von der Qualität der verfügbaren Daten ab [13-16]. Die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der in ökotoxikologischen Studien an Regenbogenforellen ermittelten Endpunkte einer bestimmten Prüfsubstanz ist daher von höchster Relevanz. Es existieren jedoch einige Studien, die die Untersuchung der Effekte einer Schadstoffexposition von Regenbogenforellen zum Gegenstand haben und deren ermittelte Endpunkte erheblich variieren. Beispielsweise weichen die mittels histopathologischer Kiemenanalysen an Regenbogenforellen ermittelten NOECs für Diclofenac, einem weitverbreiteten nicht steroidalen Antiphlogistikum, um über das 300-fache voneinander ab [13,17-20].

Variabilitäten hinsichtlich der Interpretation von Gewebsalterationen sowohl innerhalb als auch zwischen einzelnen Studien sind unter anderem auf den subjektiven Charakter der qualitativen histopathologischen Untersuchung zurückzuführen [16,20,21]. Zusätzlich sind qualitative histopathologische Analysen

EINLEITUNG

für die Bewertung subtiler Veränderungen (z. B. infolge niedriger subletaler Stoffkonzentrationsexposition) nicht immer ausreichend sensitiv [22-24]. Die Detektion (subtiler) morphologischer Alterationen kann jedoch notwendig sein für die Identifikation schädlicher und potenziell irreversibler Auswirkungen von zu bewertenden Stoffen [22].

Die Kiemen stellen eines der wichtigsten Indikatororgane für Gewässerbelastungen und Hauptzielorgan für zahlreiche Umweltschadstoffe dar [7,25-27].Schadstoffexpositionen äußern sich neben eindeutig identifizierbaren Kiemenläsionen (z. B. der Sekundärlamellenfusion [27,28]) auch in (subtilen) morphologischen Kiemenalterationen, die zu einer Abweichung quantitativmorphologischer Parameter führen und deren adäguate Detektion guantitativer, sensitiver und akkurater Methoden bedarf [13,17,22,29-32]. Die akkurate Ermittlung quantitativ-morphologischer Parameter erfolgt anhand modellunabhängiger (design quantitativ-stereologischer Probennahmeund Analyseverfahren [22,23,33,34]. Diese ermöglichen die objektive und reproduzierbare Quantifizierung morphologischer Befunde sowie deren statistische Auswertung [34,35]. Quantitativstereologische Analyseverfahren stellen die Methode der Wahl histomorphologische Untersuchungen diverser Organe dar [36-40] und gewinnen auch in der (öko)toxikologischen Pathologie zunehmend an Bedeutung [8,22,23].

Studien zu quantitativ-stereologischen Analysen quantitativ-morphologischer Kiemenparameter an verschiedenen Fischspezies wurden bereits veröffentlicht [31,41-50]. Diese Publikationen folgen jedoch keinem einheitlichen Protokoll, die untersuchten Fischspezies unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrer Körper-/Kiemengröße und Kiemenmorphologie und nicht sämtliche Aspekte der akkuraten Schätzung quantitativ-morphologischer Parameter werden ausreichend berücksichtigt. Es ist zudem nicht möglich, anhand der präsentierten Methoden alle relevanten quantitativ-morphologischen Kiemenparameter an denselben Kiemen bzw. Kiemenproben akkurat zu bestimmen. Die Durchführung einiger der beschriebenen Methoden ist an größeren Kiemen nicht praktikabel und lässt sich somit nicht auf die Untersuchung der Kiemen von Regenbogenforellen mit einem Körpergewicht zwischen 300-2000 g übertragen. Regenbogenforellen dieser Größenordnung werden jedoch häufig als Testorganismen in ökotoxikologischen Studien eingesetzt [51-57].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung praktikabler und gezielt an die Anforderungen der Untersuchung der Kiemen von Regenbogenforellen von 300-2000 g Körpergewicht angepasster Methoden für die akkurate Ermittlung relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter (Gesamtvolumen der Kiemen und Sekundärlamellen, Sekundärlamellenoberfläche, Anzahl und mittleres Zellvolumen der Epithelzellen der Sekundärlamellen, Sauerstoff-Diffusionsbarrierendicke) anhand modellunabhängiger quantitativ-stereologischer Probennahme- und Analyseverfahren.

Die quantitativ-stereologische Analyse besitzt essenzielle Vorzüge, ist jedoch, unter der Notwendigkeit Anfertigung anderem aufgrund der physikalischer Gewebeschnitte, mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden [23]. Die Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM)) optisch geklärter (transparenter) Gewebeproben als modernes deep tissue Bildgebungsverfahren ermöglicht die virtuelle dreidimensionale imaging Probenrekonstruktion und -analyse anhand fluoreszenzbasierter optischer Schnitte, die Gewebeproben bleiben dabei intakt [58]. Dieses effiziente Verfahren ermöglicht die Darstellung selbst komplexer Strukturen innerhalb biologischer Gewebeproben und die Quantifizierung verschiedener morphologischer Parameter [59-65]. Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurde erstmals ein umfassendes Protokoll für die Untersuchung optisch geklärter Kiemenproben mittels LSFM und die darauf basierende akkurate Schätzung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter etabliert.

Die im Jahr 2020 in der Fachzeitschrift PLoS ONE publizierten Methoden [66] (Publikation siehe Abschnitt 4) bilden die Grundlage für die standardisierte, objektive und repräsentative quantitativ-morphologische Analyse der Kiemen von in der ökotoxikologischen Forschung als Testorganismen eingesetzten Regenbogenforellen mit klassischen quantitativ-stereologischen Analyseverfahren sowie der LSFM als modernes Bildgebungsverfahren. Die dargestellten Protokolle gewährleisten die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und leisten damit einen wesentlichen Beitrag zu der Zuverlässigkeit und Qualität der ermittelten histopathologischen Endpunkte.

2 ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war die Entwicklung geeigneter Stichprobenverfahren für die Generierung repräsentativer Kiemengewebeproben quantitativ-morphologische Kiemenanalyse und die für umfassender, standardisierter und praktikabler Protokolle für die Anwendung design-basierter (modellunabhängiger) quantitativ-stereologischer Methoden in der histopathologischen Analyse der Kiemen von in der ökotoxikologischen Forschung Testorganismen Regenbogenforellen 300-2000 g als eingesetzten von Körpergewicht. Neben den modellunabhängigen quantitativ-stereologischen Analyseverfahren auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene [22,23,33], sollte zudem die Eignung der Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) optisch geklärter Gewebeproben [58] für die quantitativ-morphologische Analyse der Kiemen untersucht werden, mit dem Ziel, eine schnelle, effiziente und elegante Alternative zu den klassischen design-basierten quantitativ-stereologischen Analysemethoden zu etablieren. Die in der Originalpublikation zu der vorliegenden Dissertation [66] veröffentlichten Protokolle sollen zukünftigen ökotoxikologischen Studien als Grundlage für eine standardisierte, objektive und repräsentative quantitativ-morphologische Analyse der Kiemen von Regenbogenforellen dienen und so die Vergleichbarkeit der ermittelten histopathologischen Endpunkte sowohl innerhalb als auch zwischen einzelnen Studien ermöglichen. Sie sollen zudem zu einer Reduktion der in Toxizitätstests als Testorganismen eingesetzten Fische beitragen, indem unnötige Wiederholungsversuche vermieden werden.

3 WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

3.1 Aquatische Ökotoxikologie

Die Ökotoxikologie ist ein Wissenschaftszweig der Toxikologie, der sich mit dem Vorkommen natürlicher oder künstlicher Schadstoffe in der Umwelt und deren toxischer Effekte auf Ökosysteme und "non-target"-Spezies auseinandersetzt [67,68]. Die Evaluierung potenziell nachteiliger oder toxischer Effekte hat das Ziel, Populationen und Lebensgemeinschaften verschiedener Spezies vor der Exposition gegenüber Umweltschadstoffen in einer sich nachteilig auswirkenden Konzentration zu schützen [1,68].

Die aquatische Ökotoxikologie untersucht auf verschiedenen Organisationsebenen die Effekte von Chemikalien und weiteren toxischen Substanzen und Materialien speziell auf Gewässerorganismen [1,2,69]. Unter dem Begriff "Gewässer" werden verschiedenste Ökosysteme zusammengefasst, wie beispielsweise verschiedene Oberflächengewässer (Bäche, Flüsse, Teiche oder Seen (Süßwasser) oder Küstengewässer und Tiefseeozeane (Salzwasser)). Alle zeichnen sich durch eigene biotische und abiotische Komponenten und spezifische Charakteristika aus [1]. Jedes aquatische Ökosystem beeinflusst die Wirkweise sowie die biologische Aktivität und Bioverfügbarkeit von Chemikalien und weiteren Umweltschadstoffen auf individuelle Weise. Dementsprechend bestehen Unterschiede in der Vulnerabilität gegenüber Schadstoff-Einflüssen [1,69]. Dies muss in der Beurteilung des Gefahrenpotenzials aller gewässerrelevanten Stoffe berücksichtigt werden.

Die aquatische Ökotoxikologie findet ihren Ursprung in den Bereichen der Limnologie (= Süßwasserökologie) und der Forschung hinsichtlich Gewässerbelastungen [2]. Schon in ihren Anfängen wurden Konzepte für die Einteilung von Flüssen anhand ihrer Wasserqualität auf Grundlage der An- oder Abwesenheit bestimmter Arten veröffentlicht [2,70-72]. Seither ist die aquatische ökotoxikologische Forschung geprägt von der Erkenntnis, dass das Vorhandenoder Nicht-Vorhandensein gewisser Spezies, Populationen oder auch aquatischer Lebensgemeinschaften in einem Ökosystem einen deutlich verlässlicheren und sensitiveren Parameter für die Beurteilung von Umweltbedingungen darstellt als physikalische oder chemische Messungen [2].

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

Lange Zeit wurde der Schwerpunkt des Umweltmonitorings auf die physikalische und chemische Analyse von Wasser- und/oder Sedimentproben gelegt. Die Messung verschiedener Parameter wie Temperatur, Sauerstoffoder Nährstoffgehalt sowie bestimmter chemischer Kontaminanten (z. B. Schwermetalle) ist verhältnismäßig einfach durchzuführen [73]. Sie ermöglicht jedoch nur unzureichende Rückschlüsse auf die Bioverfügbarkeit und den Effekt eines vorhandenen Schadstoffes auf das biologische System und die daraus resultierende Belastung der Lebewesen innerhalb eines Ökosystems [8,73,74]. Im Übrigen können nicht alle Stoffe adäquat über chemische Analysen nachgewiesen werden [8]. Bestimmte Chemikalien (z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs)) oder Pestizide mit kurzer biologischer Halbwertszeit werden teilweise nicht detektiert, haben jedoch das Potenzial, in verschiedenen Organismen (unter Umständen pathologische) Langzeiteffekte hervorzurufen [75].

Zur Ergänzung chemischer Monitoringsysteme durch biologische Kontrollsysteme wurden seit der Mitte des 20. Jahrhunderts vermehrt Methoden entwickelt, die die gezielte Messung der Effekte von Gewässerschadstoffen auf aquatische Lebewesen ermöglichen [2,73,74,76]. In den 1940er- und 1950er-Jahren rückten zusätzlich die Auswirkungen von Abwässern und Chemikalien auf nichtmenschliche Biota zunehmend in das Interesse der Öffentlichkeit [1]. Infolgedessen wurden Spezies, welche sensibel auf veränderte Umweltbedingungen reagieren, gezielt für den Einsatz als Versuchsorganismen in ökotoxikologischen Tests erforscht, um auf diese Weise die zu erwartenden Auswirkungen auf natürliche Ökosysteme zu evaluieren und mögliche Effekte anthropogener und natürlicher toxischer Agenzien abzuschätzen [2].

Die Auswirkungen von Umweltschadstoffen werden meist auf Ebene des Individuums, aber auch auf zellulärer-, Populations- und Ökosystemebene anhand verschiedener Kriterien beurteilt und quantifiziert [1,69]. Nachteilige oder schädigende Effekte werden, je nach Organisationsebene, mithilfe verschiedener Parameter zum Ausdruck gebracht. Gemessene Parameter auf Organismusebene sind beispielsweise Mortalität, morphologische Alterationen von Organen und Geweben, Verhaltensänderungen sowie die Beeinträchtigung von Wachstum, Reproduktion oder Entwicklung [1].

Diese Effekte auf aquatische Lebewesen können mittels eines breiten Spektrums unterschiedlicher Toxizitätstests untersucht werden, es wird dabei zwischen Standard-Biotests und Nicht-Standard-Biotests unterschieden. Standard-Biotests sind harmonisierte, standardisierte Testverfahren, welche breite Anwendung finden und die anhand der Vorgaben nationaler und internationaler Organisationen (z. B. der *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) oder *International Organization for Standardization* (ISO)) durchgeführt werden [1,77]. Ihre Entwicklung geht primär auf internationale Organisationen wie die OECD oder die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization* (WHO)) zurück [3,11,78]. Unter Nicht-Standard-Biotests werden alle Expositionsversuche und ökotoxikologischen Studien zusammengefasst, die sich anderer Methoden und Studiendesigns bedienen [77].

3.1.1 Umweltrisikobewertung zur Einschätzung des Gefahrenpotenzials von Gewässerschadstoffen

Die Umweltrisikobewertung befasst sich mit der Vorhersage und Bewertung der Effekte von Chemikalien und anderen Umweltschadstoffen auf ein Ökosystem unter Berücksichtigung seiner Organisation und Funktionsweise Verschiedene anthropogene Stoffe gelangen über diverse Eintragswege in die aquatische Umwelt und können in Gewässern nachgewiesen werden. Zum Schutz von Ökosystemen, aquatischen Organismen und teilweise auch der menschlichen Gesundheit wird das Potenzial dieser Stoffe, die Umwelt sowie die Gesundheit von Mensch oder Tier zu schädigen, mittels Risikobewertung geprüft und beurteilt [11,78,80]. Die Umweltrisikobewertung von Stoffen hat vielfältige Funktionen. Sie dient der Identifizierung potenziell gefährlicher Stoffe sowie der Umweltbereiche und Organismen, die durch die untersuchten Substanzen nachteilig beeinflusst oder gefährdet sind. Sie ist zudem die Grundlage für weitreichende Entscheidungen bezüglich des Risikomanagements eines Umweltschadstoffes (z. B. der Einführung von Maßnahmen zur Verringerung des Umwelteintrags) und kann zu gesetzlichen Beschränkungen oder Verboten bestimmter Chemikalien führen [11,79].

Ausgangspunkt einer jeden Risikobewertung ist die Identifizierung des stoffspezifischen Gefahrenpotenzials anhand dessen Ursprungs, der vorgesehenen Verwendung sowie der physikalischen und chemischen Eigenschaften [11,78]. Potenziell gefährdende Stoffe werden anhand der zu erwartenden Exposition

verschiedener Umweltbereiche und Organismen (Expositionsbetrachtung) sowie ihrer Toxizität (Effektbewertung) hinsichtlich des von ihnen ausgehenden Risikos für die aquatische Umwelt bewertet [3,11,78,79].

Expositionsbetrachtung

In der Bewertung eines Umweltrisikos müssen sämtliche Faktoren berücksichtigt werden, welche für das Gefahrenpotenzial eines Stoffes in unterschiedlichen Umweltkompartimenten (z. B. Oberflächengewässer, Grundwasser oder Sediment) und/oder Ökosystemen von Bedeutung sind [4]. Dazu zählen die Eintragswege und zu erwartenden Eintragsmengen sowie das Verhalten eines Stoffes innerhalb und zwischen einzelnen Umweltbereichen oder Nahrungskettenstufen. Anhand dieser Daten kann die vorhergesagte Umweltkonzentration (*predicted environmental concentration* (**PEC**)) für einzelne Umweltkompartimente ermittelt werden [3,4,11].

Effektbewertung

Zur Bewertung der Toxizität eines Stoffes werden Organismen verschiedener empfindlicher Spezies stellvertretend für das Ökosystem Toxizitätstests (meist unter Laborbedingungen) unterzogen [1,3,4]. Durch Verwendung der sensitivsten Spezies verschiedener Stufen der Nahrungskette (Trophiestufen) entsprechenden Ökosystems kann dessen Empfindlichkeit möglichst adäquat Zur abgebildet werden [4]. Charakterisierung des stoffspezifischen Gefahrenpotenzials wird in der Regel untersucht, in welchem Verhältnis die untersuchte Schadstoffkonzentration und Expositionsdauer zu den durch die Exposition hervorgerufenen nachteiligen oder schädigenden Effekten auf die Testorganismen stehen (Dosis/Konzentrations-Wirkungs-Beziehung) [1,3,11]. Die biologischen Effekte werden in Abhängigkeit von der Art des Toxizitätstests (z. B. akut oder chronisch) anhand unterschiedlicher Endpunkte (z. B. Mortalität) gemessen [1,2,10,76].

Die in Expositionsversuchen ermittelten Effekte (Endpunkte) chemischer Stoffkonzentrationen auf Testorganismen können durch verschiedene statistische Endpunkte charakterisiert werden. Die mittlere effektive Konzentration (*median effective concentration* (**EC**₅₀)) und mittlere letale Konzentration (*median lethal concentration* (**LC**₅₀)) geben die mittlere wirksame bzw. tödliche Konzentration an, also die Stoffkonzentration, die auf 50 % der Testpopulation eine toxische bzw.

tödliche Wirkung hat. Die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (lowest observed effect concentration (LOEC)) gibt an, welche die niedrigste (gemessene) Stoffkonzentration ist, bei der toxische Effekte auf die Testorganismen nachweisbar sind. Die Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (no observed effect concentration (NOEC)) ist Ausdruck für die höchste (gemessene) Stoffkonzentration, bei der im Rahmen der durchgeführten Untersuchung keine schädigenden Effekte auf die Testorganismen nachgewiesen werden [1,2,10-12]. Die Ergebnisse von Expositionsversuchen mit den Endpunkten NOEC und LOEC werden mit den Ergebnissen von Kontrollgruppen verglichen und so hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz überprüft [2,10].

Abgeschätzte Nicht-Effekt-Konzentration (PNEC)

Als Bestandteil der Umweltrisikobewertung wird anhand bestimmter in Toxizitätstests ermittelter statistischer Endpunkte (z. B. NOEC) eines untersuchten Schadstoffes die Umweltkonzentration bestimmt, unterhalb derer keine Auswirkungen auf verschiedene Umweltkompartimente zu erwarten sind. Diese Konzentration wird beschrieben durch die abgeschätzte Nicht-Effekt-Konzentration (predicted no effect concentration (PNEC)) [3,11,81].

3.1.2 Umweltrisikobewertung in der EU-Gesetzgebung

Die PNEC spielt in der Europäischen Union (EU) eine große Rolle hinsichtlich der Umweltrisikobewertung verschiedener Stoffe und Stoffgruppen, z. B. Chemikalien, Biozidprodukten oder Pharmazeutika. Die Umweltrisikobewertung mit der Ermittlung der stoffspezifischen PNEC ist in der Regel die Voraussetzung für deren Registrierung, Zulassung oder Inverkehrbringen [4,10,81-84]. Entsprechend der Wasserrahmenrichtlinie (RL 2000/60/EG) stellt die Umweltrisikobewertung und die Ermittlung von PNECs zudem die Grundlage für die gesetzliche Festlegung von Umweltqualitätsnormen (UQNs) für Gewässer dar und ist damit die Basis für die Begrenzung oder Beendigung der Emission prioritärer (gefährlicher) Stoffe [85-89].

Auf EU-Ebene können die Verordnungen VO 1907/2006/EG ((REACH-Verordnung) Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) [81], die VO 528/2012/EU (Biozid-Verordnung) [82] und die RL 2000/60/EG (Wasserrahmenrichtlinie) [85] exemplarisch herangezogen werden, um die

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

Bedeutung der zuverlässigen Umweltrisikobewertung und deren gesetzliche Verankerung in Rechtsakten zu veranschaulichen.

Die REACH-VO bildet das gesetzliche Regelwerk für die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung bestimmter chemischer Stoffe. Die für die Registrierung chemischer Stoffe geforderte Stoffsicherheitsbeurteilung sieht neben der Ermittlung schädlicher Wirkungen auf die menschliche Gesundheit auch die Ermittlung schädlicher Wirkungen auf die Umwelt mit der Erhebung stoffspezifischer PNECs für verschiedene Umweltkompartimente vor [81]. Die Ableitung einer aquatischen PNEC des geprüften Stoffes erfolgt im Idealfall anhand von NOECs, ermittelt in Toxizitätstests an Modellorganismen aus drei verschiedenen Trophiestufen. In der Regel handelt es sich bei den Testorganismen um Algen, Daphnien und Fische [81,90]. Je nach Datenlage wird die PNEC für einen untersuchten Stoff unter Zuhilfenahme eines Sicherheitsfaktors (Extrapolationsfaktor) abgeleitet [10,81,90]. Entsprechend der VO 528/2012/EU dürfen von bioziden Wirkstoffen und Biozidprodukten keine unannehmbaren Risiken für die Umwelt sowie keine schädigende Wirkung auf die menschliche oder tierische Gesundheit ausgehen. Daher setzt die Biozid-VO für die Zulassung eines Biozidproduktes eine Ermittlung schädlicher Umweltwirkungen für die in Biozidprodukten enthaltenen Wirkstoffe oder bedenklichen Stoffe voraus. Diese erfolgt ebenfalls anhand einer Risikobewertung mit entsprechender Festlegung von PNECs für die verschiedenen Umweltkompartimente (Luft, Boden, Wasser, Sediment) [82,91].

Die Wasserrahmenrichtlinie verpflichtet die EU-Kommission, sogenannte prioritäre Stoffe zu ermitteln, von welchen ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt ausgeht bzw. die als Teil der aquatischen Umwelt eine Gefahr darstellen [85,87]. Für diese Stoffe sind Konzentrationen in Wasser, Sedimenten und/oder Biota festzulegen, die über die Qualität von Gewässern entscheiden und aus Gründen des Umwelt- und Gesundheitsschutzes nicht überschritten werden dürfen. Diese sogenannten Umweltqualitätsnormen (UQNs) werden für die Einstufung und Überwachung des chemischen und ökologischen Zustandes von Gewässern festgelegt [80,85,86,88,89]. Die im Rahmen der Chemikalienbewertung mittels Toxizitätstests an empfindlichen Organismen verschiedener Trophiestufen ermittelten Endpunkte, und die unter Verwendung eines Extrapolationsfaktors daraus abgeleiteten Stoffkonzentrationen (z. B. die PNEC), sind wichtige

Komponenten in der Festlegung dieser UQNs [80,85,87]. Der Eintrag prioritärer Stoffe wird anhand eines Jahresmittelwertes (Jahresdurchschnitts-UQN (JD-UQN)) überwacht, für bestimmte Schadstoffe wird zusätzlich eine zulässige Höchstkonzentrations-UQN (ZHK-UQN) festgelegt, welche aufgrund der hohen akuten Toxizität nicht überschritten werden darf [80,86]. Ziel dieser Maßnahmen ist es, die Emission bestimmter Schadstoffe gezielt zu reduzieren bzw. im Falle der prioritären gefährlichen Stoffe deren Emission und Eintrag in die Umwelt (schrittweise) zu beenden [85,86].

3.1.3 Untersuchung von Biomarkern und Bioakkumulationsmarkern bei in ökotoxikologischen Expositionsversuchen verwendeten Fischen

Die Auswirkungen von Umweltbelastungen werden auf verschiedenen ökologischen Ebenen sichtbar. Auf der Ebene der Ökosysteme und Lebensgemeinschaften äußern sich diese in beobachtbaren Veränderungen in der Biodiversität und der Artenzusammensetzung. Auf Populationsebene können sich die Effekte von Umweltschadstoffen in veränderten Altersstrukturen. Abweichungen Abundanz einer Population oder genetischen Veränderungen niederschlagen. Auf Ebene des Einzelorganismus sind Mortalität, Reproduktion und Wachstum wichtige Parameter für die Bewertung der Effekte gewässerrelevanter Schadstoffe. Diese fungieren als klassische Endpunkte in Toxizitätstests und werden häufig für die Umweltrisikobewertung von Stoffen herangezogen [1,92]. Auf subindividueller und (sub-)zellulärer Ebene können diverse molekulare, biochemische, physiologische oder morphologische Alterationen gemessen werden, die infolge einer Schadstoffexposition auftreten [92,93]. In der Umweltrisikobewertung werden diese sogenannten Biomarker eingesetzt, um eine Verbindung zwischen externer und interner Schadstoffbelastung und -konzentration und früh auftretenden Schadstoffauswirkungen in Testorganismen herzustellen [94-96].

Biomarker – Definition und Funktion in der ökotoxikologischen Forschung

Generell treten Veränderungen auf Populations-, Lebensgemeinschafts- oder Ökosystemlevel erst in einem späten Stadium der Schadstoffexposition auf. Ihnen gehen Veränderungen auf (sub-)individuellen, (sub-)zellulären und molekularen Ebenen voraus [96,97]. Diese Biomarker werden als sogenannte "Frühwarnsysteme" für Umweltveränderungen und schädigende/toxische Effekte

von Umweltschadstoffen auf Gewässerorganismen herangezogen [75,92,97,98]. Als solche dienen sie der frühen Detektion von Schadstoffemissionen und somit als Warnsignale vor den potenziellen Auswirkungen für höhere ökologische Ebenen. Die Detektion biologischer Reaktionen auf subletale Schadstoffkonzentrationen kann zudem zur Folge haben, dass irreversible Auswirkungen höherer Stoffkonzentrationen vermieden werden [92]. Nach der weit gefassten Definition der WHO können nahezu alle Messungen, die die Interaktion eines biologischen Systems mit einem physikalischen, chemischen oder biologischen Bestandteil der Umwelt detektieren, durch den Begriff "Biomarker" definiert werden [95]. Die Effekte dieser Interaktion können auf Verhaltensebene sowie funktionaler-, physiologischer- oder (sub-)zellulärer Ebene gemessen werden und haben das Potenzial, die Reaktion auf eine Schadstoffexposition und dessen toxische Wirkung aufzuzeigen [75,95]. Der Begriff Biomarker wurde später neu definiert. Laut van Gestel und van Brummelen (1996) [92] versteht man unter einem Biomarker jede biologische Reaktion auf einen Umweltschadstoff, die auf subindividuellem Level stattfindet und an einem Organismus und seinen Ausscheidungen gemessen wird. Biomarker sind in diesem Falle alle Abweichungen von dem physiologischen Zustand, die an einem intakten Organismus nicht feststellbar sind. Somit ist in dieser Definition der Begriff "Biomarker" auf biochemische, physiologische, histologische und morphologische Messungen begrenzt, Verhaltensänderungen sind nicht inkludiert [92]. Biomarker stellen Signale für früh auftretende Veränderungen in Organismen dar, deren Gesundheit davon abgesehen nicht beeinträchtigt ist [8].

Biomarker-Kategorien

Biomarker können kategorisiert werden als Expositions-Biomarker, Effekt-Biomarker und Suszeptibilitäts-Biomarker [99]. **Expositions-Biomarker** sind Nachweise einer exogenen Substanz und ihrer Metaboliten oder des Produkts der Wechselwirkung zwischen der untersuchten Substanz und der Zielstruktur innerhalb eines Organismus [95,96,99]. Die **Bioakkumulation** (Körperlast) persistierender Stoffe innerhalb der Organe oder Gewebe eines Organismus wird, wenn nicht als eigene Biomarkerkategorie definiert [94,96], zu den Expositions-Biomarkern gezählt. **Effekt-Biomarker** (dieser Begriff kann spezifiziert werden als "Biomarker toxischer Effekte" [75]) sind messbare Veränderungen in Geweben, Organen oder Körperflüssigkeiten eines Organismus, die mit einer möglichen oder

bereits etablierten gesundheitlichen Beeinträchtigung/Krankheit einhergehen [95,96,99]. Die Kategorie der **Suszeptibilitäts-Biomarker** fasst die angeborenen oder erworbenen Mechanismen auf verschiedenen Organisationsebenen zusammen, mithilfe derer ein Organismus auf die Schadstoffexposition reagiert und die die Anfälligkeit für nachteilige Schadstoffeffekte unabhängig von der untersuchten Exposition beeinflussen. Sie sind hinweisend auf individuelle oder populationsbedingte Unterschiede hinsichtlich der Reaktionen auf Umweltfaktoren [95,96,99,100].

Chemische, molekulare und biochemische Parameter als Biomarker bei Fischen

Ein bedeutender Biomarker in der Umweltrisikobewertung mithilfe der Untersuchung von Fischen als Testorganismen ist die messbare Menge eines bestimmten Umweltschadstoffes in den Organen oder Geweben (Körperlast) [94,96]. Bioakkumulations-Marker ermöglichen die gezielte Untersuchung von Umweltschadstoffen, die lediglich in niedrigen Konzentrationen in Gewässern vorliegen und zu einer Anreicherung in Fischen neigen [96]. Häufig als Biomarker herangezogen werden zudem Aktivität und Konzentration von Biotransformationsenzymen (Phase I- und Phase-II-Enzyme, wie Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, die Glutathion-S-Transferase oder UDPmikrosomale Glucuronyltransferase) oder oxidative Stressparameter (z. B. die erhöhte Aktivität antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase oder Katalase, oder biochemische Indikatoren für die Lipidperoxidation oder Oxidation von Nucleinsäuren) [94,96,101]. Diverse Indikatoren für umweltbedingten Stress (z. B. erhöhte Werte an Hitzeschock-Proteinen, Metallothioneinen oder Proteinen des MXR-Systems (multixenobiotic resistance)) können als Biomarker für die Exposition eines Organismus gegenüber einem Umweltschadstoff mit nachteiliger oder toxischer Wirkung fungieren [94,96]. Das breite Spektrum an Fischbiomarkern umfasst zudem verschiedene hämatologische Parameter (z. B. erhöhte Enzymaktivität bestimmter Serum-*Transaminasen*), genotoxische Parameter (z. B. DNA-Addukte, DNA-Strangbrüche oder DNA-Mutationen), immunologische Parameter (z. B. Änderungen des zellulären Immunstatus oder die Konzentration der Akute-Phase-Proteine in Körperflüssigkeiten) und endokrine Parameter (z. B. die Plasma-Vitellogeninkonzentration) [94,96,102-104].

Histopathologische Gewebsalterationen als Biomarker bei Fischen

Histopathologische Gewebsalterationen können die Effekte der Exposition von Vielzahl Testorganismen gegenüber einer anthropogener Schadstoffe widerspiegeln [105]. Die Histopathologie hat ihre Eignung für den zuverlässigen und direkten Nachweis toxischer Effekte von Umweltschadstoffen auf Organe und Gewebe von in Expositionsversuchen verwendeten Fischen bereits in zahlreichen ökotoxikologischen Studien bewiesen [7,9,17,106-109]. Morphologische Alterationen sind Biomarker auf Organ- oder Gewebeebene, die als Folge von Interaktionen zwischen dem Testorganismus und einem Umweltschadstoff auf molekularer oder (sub-)zellulärer Ebene auftreten und auf potenziell irreversible Schäden hinweisen können [96,105,110].

Zielorgane und -strukturen toxischer Effekte können mittels histopathologischer Analyse ermittelt werden, ergänzende Methoden wie die Enzym- oder Immunhistochemie ermöglichen zusätzlich die Detektion von Veränderungen auf Zell- und Molekularebene [109]. Reaktionen auf Organ- oder Gewebeebene sind meist schnell und leicht zu identifizieren und bleiben häufig auch nach Ende der Schadstoffexposition bestehen. Auch länger zurückliegende Expositionen können somit zur Beurteilung der Auswirkungen von Umweltschadstoffen herangezogen werden [96]. Die histopathologische Untersuchung zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus, morphologische Gewebsalterationen gelten somit besonders hinsichtlich der Untersuchung von Effekten chronischer Schadstoffexpositionen oder subletaler Schadstoffkonzentrationen als Biomarker von hoher toxikologischer Relevanz [8,109,111].

Die Histopathologie wird als Goldstandard bei der Ermittlung toxischer Effekte von Gewässerschadstoffen angesehen. Sie kann der Beurteilung der Wasserqualität und der Schadstoffbelastung von Gewässern dienen und hat so das Potenzial, einen wichtigen Beitrag zu Umweltmonitoring-Programmen zu leisten [9]. Obwohl Biomarker auf Gewebeebene (z. B. histologische Gewebsalterationen) einer sachkundigen Untersuchung bedürfen und diese mit einem hohen Zeitaufwand einhergeht, liefern sie wertvolle Informationen über die Auswirkungen von Xenobiotika und werden daher für die ökotoxikologische Forschung und Umweltrisikobewertung empfohlen [7]. Histopathologische Endpunkte haben im Vergleich zu anderen Endpunkten in der ökotoxikologischen Forschung eine hohe

Sensitivität und ermöglichen die Detektion von Schadstoffauswirkungen, die mit anderen Biomarkern nicht identifiziert werden können [112]. Auch im Vergleich zu den in Fisch-Standard-Biotests ermittelten Endpunkten (z. B. Mortalität oder Verhaltensänderungen) weisen histologische Biomarker eine höhere Sensitivität auf, da sie infolge einer Schadstoffexposition bereits bei niedrigeren Konzentrationen detektierbar sind [109].

Die histopathologische Untersuchung gilt zwar als sensitive Methode, jedoch sind die erzielten Ergebnisse abhängig von einer adäquaten Probennahme und -prozessierung sowie der Qualität der analysierten histologischen Gewebeschnitte [16]. Die willkürliche Auswahl von Proben oder histologischen Schnitten kann zu systematischen Abweichungen der detektierten und diagnostizierten Gewebsalterationen (sampling bias) führen [13,113]. Artefakte (beispielsweise aufgrund postmortaler Autolyse) können die Evaluierung von Gewebsalterationen erschweren und führen potenziell zu einer Fehlinterpretation der Läsionen [16]. Als bedeutender Aspekt kommt hinzu, dass die qualitative histopathologische Interpretation von Gewebsläsionen subjektiv erfolgt [21]. Diese Aspekte der histopathologischen Analyse können teils starke Abweichungen der Diagnosen einzelner Untersucher_innen zur Folge haben [8,16,20,21,112].

Gerade hinsichtlich der Beurteilung von Schweregraden von Gewebsläsionen in der Fischpathologie und in ökotoxikologischen Studien mit histopathologischen Endpunkten wird die Verwendung quantitativer histomorphologischer Methoden dringend empfohlen [8,16]. Eine quantitative Beurteilung histologischer Schnitte kann beispielsweise durch semiquantitative Punktesysteme, morphometrische Messungen oder quantitativ-stereologische Analysen erfolgen. Die modellunabhängige quantitative Stereologie (siehe Abschnitt 3.4) stellt den Goldstandard für eine objektive, quantitative histomorphologische Analyse dar, kommt in ökotoxikologischen Studien bisher jedoch nur selten zum Einsatz [8].

Bedeutung von Biomarkern und deren Detektion in Nicht-Standard-Biotests

Der Einsatz von Standard-Toxizitätstests ermöglicht die zuverlässige Ermittlung ökotoxikologischer Endpunkte, der standardisierte Versuchsaufbau erlaubt zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einzelner Studien [77]. Daher wird ihr Einsatz für die Erhebung stoffspezifischer PNECs in der von diversen Rechtsnormen vorausgesetzten Umweltrisikobewertung gefordert bzw. bevorzugt [10,15,77,84,87,90]. Die in ökotoxikologischen Standardtests primär erhobenen Endpunkte (z. B. Mortalität oder Reproduktion) sind teilweise jedoch nicht ausreichend empfindlich für die Detektion der toxischen Effekte bestimmter Schadstoffe, da nicht immer der biologisch relevanteste Endpunkt untersucht wird [77,108].

Daten, die in Nicht-Standard-Biotests erhoben werden, können die Umweltrisikobewertung dank der Untersuchung relevanter Endpunkte und deren teils höheren Sensitivität ergänzen und optimieren [77,108,109,111]. Sie liefern Informationen über die biologischen Auswirkungen von Schadstoffen und können Aufschluss geben über die Mechanismen, die einer Schadstoffwirkung zugrunde liegen. Anhand des Screenings mehrerer Biomarker eines Schadstoffes können so über die Effekte der Schadstoffexposition wichtige Informationen Testorganismus gewonnen werden [96]. Neben den Standard-Toxizitätstests tragen somit vielversprechende Informationen zu Umweltmonitoring-Programmen und einer integrativen Umweltrisikobewertung von Schadstoffen bei [76,96,98,108].

Um den in Nicht-Standard-Biotests erhobenen Endpunkten mehr Gewicht zu deren Berücksichtigung in der verleihen und gesetzlich geregelten Umweltrisikobewertung zu fördern, ist es jedoch von größter Wichtigkeit, dass sie die Kriterien für die Erhebung zuverlässiger, reproduzierbarer Daten erfüllen [77,114,115]. Zur Qualitätssicherung der in histopathologischen Studien an Fischen erhobenen Daten ist hierfür unter anderem eine detaillierte Methodenbeschreibung empfohlen, die klare Angaben bezüglich der Probennahme, der Anfertigung histologischer Schnitte, der verwendeten Schnittebenen und der diagnostischen Auswertung enthält [16]. Zudem wird die **Ermittlung** zuverlässiger histopathologischer Endpunkte anhand quantitativer Analysen empfohlen [8,16].

3.2 Regenbogenforellen in der ökotoxikologischen Forschung

Bereits seit dem 18. Jahrhundert ist bekannt, dass erhöhte Mortalitätsraten bei Fischen und das Verschwinden von Fisch-Populationen in Zusammenhang mit Gewässerbelastungen durch den Eintrag anthropogener Umweltschadstoffe stehen können. Infolgedessen dienen Fische seit Langem als *Sentinel-Spezies*, die die Auswirkungen menschlicher Aktivitäten auf die Intaktheit von Ökosystemen aufzeigen [116].

3.2.1 Fische als Testorganismen in der aquatischen ökotoxikologischen Forschung

Die Fischgesundheit ist von essenzieller Bedeutung für die Intaktheit aquatischer Ökosysteme, da deren Beeinträchtigung aufgrund der Position der Fische am oberen Ende der Nahrungskette das Potenzial hat, ganze Ökosysteme nachteilig zu beeinflussen [8]. Fische nehmen in der (Öko)toxikologie eine Schlüsselrolle ein, da sie sowohl in Studien Einsatz finden, die das Gefahrenpotenzial bestimmter Stoffe für die menschliche Gesundheit untersuchen, als auch in Studien, die die Effekte von Schadstoffen auf die Umwelt analysieren. Nach gegenwärtigem Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass Fische diese beiden Bereiche mehr als jede andere Biota-Klasse verknüpfen [117]. Fische gelten in der Überwachung aquatischer Ökosysteme als wertvolle Indikatororganismen, sie sind zudem als Versuchstiere weit verbreitet und werden auch in ökotoxikologischen Studien häufig als Testorganismen eingesetzt [8].

Die Gründe hierfür sind vielfältig: Mit etwa 30000 bekannten Spezies handelt es sich bei den Fischen um die diverseste Klasse unter den Wirbeltieren, Knochenfische machen etwa 95 % aller Fischspezies aus. Dieser Reichtum an Spezies resultiert in einer großen Vielfalt an Lebensräumen, Körperformen und -größen sowie verschiedenen physiologischen Mechanismen und Reaktionen auf Umwelteinflüsse [117-119]. Als aquatische Lebewesen stehen Fische mit Haut und Kiemen in permanentem Kontakt mit dem sie umgebenden Medium und sind daher Gewässerschadstoffen mit sensitiven Geweben und Organsystemen unmittelbar ausgesetzt. Fische eignen sich daher als empfindliche Indikatoren für die Untersuchung der Effekte (aquatischer) Umweltbelastungen häufig besser als Landtiere [25,117,118,120]. In der ökotoxikologischen Forschung wird die Verwendung von Fischen als Testorganismen gegenüber dem Einsatz von

Invertebraten in der Regel präferiert, da Fische die Ermittlung zahlreicher Biomarker, die Beurteilung physiologischer Parameter und die Untersuchung verschiedener Organe ermöglichen [96,116,121]. Als aquatische Vertebraten verfügen sie über ein gut entwickeltes Nerven-, Immun- und endokrines System, ihre Stressreaktionen liefern nützliche Informationen für die Risikobewertung von Umweltschadstoffen [96,122].

Eine Vielzahl der von der OECD anerkannten Toxizitätstests für die Untersuchung von Schadstoffauswirkungen auf biotische Umweltfaktoren werden an Fischen durchgeführt [10,116]. Daten zur Fischtoxizität werden von den Behörden häufig gefordert und dienen unter anderem als Grundlage für die Umweltrisikobewertung und Zulassung diverser Chemikalien [10,123]. Die Leitlinien der OECD für Toxizitätstests sehen die Verwendung verschiedener Süßwasser-Fischarten vor. Neben weiteren gut erforschten Fischarten wie dem Zebrabärbling (*Danio rerio*) und dem Medaka (*Oryzias latipes*), wird auch die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) als sensitive Fischspezies aufgeführt [10].

3.2.2 Regenbogenforellen als geeignete Testorganismen in der aquatischen Ökotoxikologie

Der häufige Einsatz der Regenbogenforelle als Versuchstier in verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen (z. B. der Toxikologie, Onkologie oder Immunologie) begründet sich unter anderem in ihrer weiten Verbreitung, der ganzjährigen Verfügbarkeit, der Vielzahl an Stämmen, ihrer Anpassungsfähigkeit und dem umfangreichen Fachwissen, welches bezüglich der Haltungsbedingungen, Ernährung, Physiologie, Immunologie und Gesundheitsmanagement zur Verfügung steht [5,120]. Die Regenbogenforelle ist sowohl als beliebter Sport- und Speisefisch als auch als Versuchstier von großer Bedeutung [120]. Für keine andere Fischspezies stehen umfangreichere Informationen bezüglich der Physiologie und Biologie zur Verfügung [5]. Als gut erforschte, repräsentative Spezies nimmt die Regenbogenforelle zudem eine Stellvertreter-Rolle für andere Salmoniden-Spezies ein, die seltener und/oder weniger leicht verfügbar sind (z. B. der Amerikanische Seesaibling (Salvelinus namaycush)) [5,120]. Für eine Vielzahl an Regenbogenforellen-Stämmen liegen ebenfalls umfassende, spezifische Informationen bezüglich des Wachstums, Futterumsatzes, Toleranz gegenüber saurem oder basischem wässrigem Milieu, Geschlechtsreife, etc. vor [120].

Die ursprünglich Nordamerika Regenbogenforelle aus stammende ist anpassungsfähig an eine weite Bandbreite von Umwelt- und Haltungsbedingungen, sodass sie heute weltweit verbreitet ist [120,124]. Regenbogenforellen tolerieren ein breites Spektrum an Wassertemperaturen (zwischen 0-25 °C), sie sind zudem in der Lage, sich sowohl an die Bedingungen von Süß- als auch Salzwasser anzupassen [120]. Trotz ihrer Körpergröße und der langen Reproduktionszyklen ist Zucht von Regenbogenforellen verhältnismäßig einfach und wenig kostenintensiv [5,120]. Mit Erreichen der Geschlechtsreife erfolgt jährlich die saisonabhängige Laichzeit, durch externe Beeinflussung der Laichzeit stehen Eier der Regenbogenforelle ganzjährig zur Verfügung [120]. Im Vergleich zu anderen Modell-Fischspezies ist sie für die Durchführung von Studien geeignet, die einer Vielzahl an Proben bedürfen, da ihre Körpergröße die Probengenerierung verschiedenster Gewebe und Zellen für nachfolgende Analysen ermöglicht [5]. Im Vergleich zu anderen Fischarten ähnlicher Größenordnung (z. B. Karpfen (Cyprinus carpio) oder Flussbarsch (Perca fluviatilis)) reagiert die Regenbogenforelle auf Umweltschadstoffe oftmals mit höherer Sensibilität [7].

Die Regenbogenforelle wird sowohl im Bereich der Toxikologie als auch der Ökotoxikologie als Testorganismus eingesetzt [5,124]. Da sie eine empfindliche Fischspezies darstellt, die mit geringer Toleranz auf Umweltschadstoffe im Wasser reagiert, fungiert sie als geeignete Sentinel-Spezies für das Monitoring aquatischer Ökosysteme und wird zudem häufig in Expositionsversuchen als Testorganismus herangezogen [5,123,125]. Die Regenbogenforelle stellt eine der am häufigsten in ökotoxikologischen Studien eingesetzten Fischspezies dar [6]. Das Vorkommen von Xenoöstrogenen in der Umwelt beispielsweise wurde erstmals mithilfe der Regenbogenforelle aufgezeigt [5,126]. Sie hat sich in zahlreichen ökotoxikologischen Studien als gut geeignete Testtierspezies für die Untersuchung der Effekte von Umweltschadstoffen auf aquatische Lebewesen bewiesen, die nicht nur auf ein breites Spektrum anthropogen bedingter Umweltbelastungen (z. B. Pestizide, Schwermetalle, Mikroplastik sowie diverse Pharmazeutika und Chemikalien), sondern auch auf natürlich in der Umwelt vorkommende Toxine sensibel reagiert (z. B. Microcystin) [5,18,27,96,127-130].

3.3 Kiemen als Indikatororgane für Umweltbelastungen

Die Kiemen stellen das primäre Atmungsorgan der meisten Fischarten dar. Zusätzlich üben sie wichtige Funktionen in der Osmoregulation, der Regulation des Säure-Basen-Haushalts und der Ausscheidung stickstoffhaltiger Verbindungen aus [131,132]. Aufgrund ihrer Multifunktionalität, ihres komplexen anatomischen Aufbaus und ihrer direkten Exposition gegenüber dem umgebenden Wasser, stellen sie sensitive Indikatororgane für die Effekte diverser Umweltschadstoffe dar.

3.3.1 Kiemenmorphologie (Kiemenanatomie und -histologie)

Die Kiemenanatomie und -histologie der Regenbogenforelle entspricht der grundsätzlichen Kiemenstruktur der Knochenfische (siehe Abbildung 2 der Publikation [66]) [131,133-135]. Der Kiemenapparat besteht aus vier paarig angelegten Kiemen (Holobranchien), die auf beiden Seiten des Pharynx in der Kiemenhöhle (dem sogenannten Branchialraum) liegen und außen von den Kiemendeckeln (Operkula) bedeckt sind [131,134-136]. Jede Holobranchie setzt sich aus zwei Hemibranchien zusammen, die von dem Kiemenbogen und dem interbranchialen Septum gestützt werden [131,135]. Da sich die vorliegende Arbeit mit den Kiemen der Regenbogenforellen von 300-2000 g Körpergewicht befasst, wird nicht näher auf die Embryonalentwicklung oder die Kiemenanatomie und -funktion in Fischlarven eingegangen. Für entsprechende Informationen wird der/die interessierte Leser_in auf die Publikationen von Rombough (1999) [137] und González et al. (1996) [138] verwiesen.

Das knöcherne Kiemenbogenskelett besteht aus den hypo-, kerato-, epi- und pharyngobranchialen Knochen und steht mit dem Kopfskelett in Verbindung. In juvenilen Fischen wird der Kiemenbogen durch ein knorpeliges Grundgerüst gestützt [28,135,136]. Der Kiemenbogen führt Blutgefäße und Nerven, an seiner konkaven anterioren Seite trägt er zudem Kiemenreusen, die die Hemibranchien vor Partikeln in dem die Kiemen durchströmenden Wasser schützen und den Weitertransport von Futter innerhalb der Maulhöhle unterstützen [135]. An seinem posterioren konvexen Rand trägt der Kiemenbogen zwei Reihen makroskopisch sichtbarer Kiemenfilamente (Primärlamellen (PL)), deren Basis in das interbranchiale Septum eingebettet ist [131,135,139]. Bei Regenbogenforellen kann sich das Septum über bis zu 60 % der Filamentlänge erstrecken und enthält das

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

interbranchiale lymphatische Gewebe, welches vermutlich die Funktion eines sekundären lymphatischen Organs erfüllt [135,140].

Die Primärlamellen der Hemibranchien benachbarter Kiemen greifen mit ihren Spitzen siebartig ineinander und intensivieren so den Wasserfluss entlang der Filamentoberfläche [135,136,139]. Die länglichen, dorso-ventral abgeflachten und postero-lateral ausgerichteten Primärlamellen werden von Knorpelstrahlen gestützt [131,135,136,139]. Neben dem knorpeligen Grundgerüst bestehen Primärlamellen unter anderem aus glatter und quergestreifter Muskulatur sowie zahlreichen Blutgefäßen (z. B. den afferenten und efferenten Filamentarteriolen und dem zentralen Venensinus) [28,135]. Die Kiemenfilamente werden von einem mehrschichtigen Epithel bedeckt [139]. Dieses setzt sich hauptsächlich aus Epithelzellen (auch Pflasterzellen genannt) sowie Chlorid-, Becher- und Neuroepithelzellen zusammen. Chloridzellen sind eher in den interlamellären Bereichen der Primärlamellen lokalisiert und primär am afferenten Rand der Primärlamellen zu finden. Becherzellen und Neuroepithelzellen hingegen kommen gehäuft an den efferenten Rändern der Kiemenfilamente vor [139,141].

Auf ihrer ventralen und dorsalen Oberfläche tragen die Primärlamellen flache, senkrecht zur Primärlamellenachse ausgerichtete respiratorische Kiemenblättchen, die Sekundärlamellen (SL) [131,134,135]. Diese sind Ort des Gasaustausches, ihre Morphologie dient sowohl der Vergrößerung der respiratorischen Oberfläche als auch der Minimierung der Diffusionsdistanz [131,135]. Sie bestehen aus zwei Epithelschichten, die durch die Pilasterzellen (Stützzellen) und deren Zellausläufer voneinander getrennt werden. Die Pilasterzellen halten die zwischen den Epithelschichten lokalisierten vaskulären Räume aufrecht und grenzen diese gemeinsam mit der Basalmembran von dem respiratorischen Sekundärlamellenepithel ab [28,131,135,139,141]. Bei Pilasterzellen handelt es sich um modifizierte Endothelzellen. Lediglich die Kapillaren am äußeren Sekundärlamellenrand sind von echten Endothelzellen ausgekleidet [28,135,139]. Die Stützzellen sind in der Lage, den Blutfluss innerhalb der Sekundärlamellen zu regulieren, vermutlich sind sie zudem Bestandteil des retikuloendothelialen Systems [28]. An die Basallamina schließt ein dünnes, in der Regel zweischichtiges Plattenepithel an, welches vorwiegend aus Pflasterzellen, aber auch aus mitochondrien-reichen vereinzelten Becherund Chloridzellen besteht [28,123,133,139,142]. Die Zellen sind über fingerförmige Ausläufer, Desmosomen

und Tight junctions miteinander verbunden, sodass der parazelluläre Transport von lonen und Wasser stark eingeschränkt ist [28,131,143].

Die Kiemen werden über das arterio-arterielle Gefäßsystem mit sauerstoffarmem Blut aus der ventralen Aorta versorgt, die an jeden Kiemenbogen eine A. branchialis afferens abgibt. Von dieser gehen zahlreiche afferente Filamentarterien ab, afferente lamelläre Arteriolen führen das sauerstoffarme Blut zu den Sekundärlamellen, in welchen die Sauerstoffanreicherung des Blutes stattfindet. oxygenierte Blut gelangt über efferente lamelläre Arteriolen Das und Filamentarterien in die A. branchialis efferens. Über 90 % des Blutes gelangen über die A. branchialis efferens in den (post-branchialen) systemischen Blutkreislauf [135,144]. Zusätzlich zu dem funktionalen Gefäßsystem existiert ein arteriovenöses Gefäßsystem, welches der nutritiven Blutversorgung der Kiemen dient. Die Gefäße entspringen den efferenten Filamentarterien und der A. branchialis efferens. Über den zentralen Venensinus der Primärlamellen wird das Blut dem venösen Kreislauf zugeführt [28,131,135].

3.3.2 Funktion der Kiemen

Die Kiemen der Regenbogenforelle sind am Übergang des Mundraums in den Kiemenraum situiert, welcher von außen durch den Kiemendeckel und die Branchiostegalmembran (Kiemenhaut) begrenzt wird [145]. Durch die schnelle Fortbewegung im Wasser mit geöffnetem Maul wird bei der Regenbogenforelle ein Atemwasserstrom von der Mund- in die Kiemenhöhle erzeugt [145,146]. Zusätzlich kann eine aktive Ventilation erfolgen. Bei dieser strömt Wasser über die Maulöffnung in den Mundraum, während der Kiemendeckel geschlossen bleibt und einen retrograden Einstrom von Wasser in den Kiemenraum verhindert. Mit Anheben des Operkulums und Schließen des Mauls strömt das Atemwasser, dem Unterdruck im Kiemenraum folgend, aus der Mundhöhle in den Kiemenraum und durchströmt dabei unidirektional die Kiemen [136,143,145,146].

Als aquatische Wirbeltiere leben Fische in einem wässrigen Medium, welches im Vergleich zu Luft eine sehr geringe Sauerstoffkonzentration (2-4 % der Sauerstoffkonzentration der Luft) aufweist. Es verfügt zudem über eine etwa 800-mal höhere Dichte und 100-mal höhere Viskosität, infolgedessen geht die Ventilation mit einem höheren Energiebedarf einher [143,145].

Die Kiemen sind an diese erschwerten Bedingungen für die Sauerstoffaufnahme optimal angepasst. Die Ausbildung von Sekundärlamellen dient sowohl der Vergrößerung der respiratorischen Oberfläche als auch der Verringerung der Wasser-Blut-Diffusionsdistanz [131,135]. Durch das Überlappen der Primärlamellenspitzen benachbarter Hemibranchien entsteht ein "Kiementeppich", der den Fluss des Wassers entlang der Primär- und Sekundärlamellenoberfläche intensiviert und so die Sauerstoffaufnahme fördert [135,136]. Der Fluss des Wassers, das die Kiemen von der Maulhöhle aus durchströmt, ist dem Blutfluss innerhalb der Sekundärlamellen entgegengesetzt. Dieses Gegenstromprinzip erhöht die Effizienz des Gasaustausches [131,135,136,145]. Diese Eigenschaften, in Kombination mit einer hohen Ventilationsrate und der Perfusion der Kiemen mit dem gesamten Herzzeitvolumen, fördern nicht nur den Gasaustausch, sondern auch die Aufnahme und/oder Abgabe von Ionen und Wasser und die Ausscheidung stickstoffhaltiger Verbindungen [131].

Atmungsfunktion und Gasaustausch

Mit ihrer großen Oberfläche und dem dünnen respiratorischen Epithel sind die Sekundärlamellen der Kiemen hoch spezialisierte Strukturen und Ort des Gasaustausches zwischen dem umgebenden Wasser und dem durchbluteten intralamellären Raum (mit Ausnahme der Sekundärlamellenanteile, die in das Gewebe der Primärlamellen eingebettet sind) [135,136,139]. Sowohl die Oberfläche der Sekundärlamellen als auch die Oberfläche der vaskulären Räume, die mit dem respiratorischen Epithel in Kontakt steht, sind durch die flache Form der Sekundärlamellen vergrößert [135,147]. Die respiratorische Oberfläche in Relation zum Körpergewicht variiert in Abhängigkeit von der Aktivität der Fischspezies und steigt mit höherer Aktivität [136,147]. Die Sekundärlamellenmorphologie ermöglicht den bilateralen Kontakt der durchfließenden Erythrozyten mit der Wasser-Blut-Diffusionsbarriere, das Hämoglobin der Fische verfügt im Vergleich zu Tetrapoden über eine höhere Sauerstoffaffinität [147].

Die Sauerstoff-Diffusionsbarriere der Kiemen setzt sich aus dem Epithel der Sekundärlamellen, der Basallamina sowie den Zytoplasmaausläufern der Stützzellen zusammen [32]. Die mittels quantitativ-stereologischer Analysemethoden bestimmte Diffusionsbarrierendicke der Kiemen von Regenbogenforellen beträgt etwa 3,4 µm [17] und ist somit deutlich größer als die

alveolokapilläre Diffusionsbarriere der Lunge, deren Dicke etwa 1 µm beträgt [145]. Interlamellärer Wasser- und intralamellärer Blutstrom verlaufen parallel, aber in entgegengesetzter Fließrichtung, der Diffusionsgradient von O₂ und CO₂ zwischen Wasser und Blut, und somit der Gasaustausch, wird trotz fortschreitender Diffusion über die gesamte Sekundärlamellenlänge aufrechterhalten [135,147]. Zusätzlich wird die Geschwindigkeit des Wasserstromes entlang der Kiemen durch die Bildung eines "Kiementeppichs" verlangsamt. Diese Anpassungen führen zu einer Effizienz der Sauerstoffaufnahme von bis zu 80 % [147]. Es ist zu beachten, dass die Kiemenoberfläche in Abhängigkeit von der Aktivität des Fisches oder dem Sauerstoffgehalt des Wassers [136,147], ebenso wie die Perfusion der Primär- und Sekundärlamellen in Abhängigkeit von Aktivität, Hypoxie, Blutdruck oder dem Einfluss vasoaktiver Moleküle, variieren kann [136,148-150].

Osmoregulation, Regulation des Säure-Basen-Haushalts und Ausscheidung stickstoffhaltiger Verbindungen

Neben der Atmungsfunktion haben die Kiemen der Knochenfische eine grundlegende Funktion in der Osmoregulation, der Regulation des Säure-Basen-Haushalts sowie der Ausscheidung stickstoffhaltiger Moleküle inne [131,147]. Während der Gasaustausch an den Sekundärlamellen stattfindet, sind die Zellen des Primärlamellenepithels auf den Ionentransport spezialisiert [151].

Die **Osmolarität** der Extrazellularflüssigkeit beträgt bei Regenbogenforellen etwa 310 mosm/l, sie ist gegenüber dem umgebenden Süßwasser hyperosmotisch [143,152]. Zwischen der Körperflüssigkeit der Fische und dem umgebenden Wasser besteht ein großer osmotischer Gradient, durch welchen der Fisch einem ständigen lonenverlust an das umgebende Medium sowie der Aufnahme von Wasser ausgesetzt ist [143]. Wasser wird sowohl über die Kiemen als auch über die Körperoberfläche aufgenommen und über die Nieren als Harn geringer Osmolarität ausgeschieden [143,151,153]. Der Netto-Verlust von lonen über den Urin sowie über die Kiemen mittels Diffusion wird über die Nahrung und durch aktive Aufnahme von Natrium- (Na+) und Chlorid-Ionen (Cl-) über das Kiemenepithel ausgeglichen [131,143,153].

Der Ionentransport durch das Epithel findet in Süßwasserfischen primär über die transportaktiven Epithelzellen statt. Über die Pflasterzellen werden Na⁺-Ionen aus dem umgebenden Süßwasser in die Extrazellularflüssigkeit transportiert. Mithilfe

einer apikalen *H*+-*ATPase* des vakuolären Typs (*V-Typ-ATPase*) wird ein elektrisches Potenzial erzeugt, das die Aufnahme von Na+ aus dem Wasser in die Zelle über Na+-Kanäle oder Na+/H+-Austauscher bewirkt [132]. Über eine *Na+/K+-ATPase* in der basolateralen Membran wird Na+ aus der Zelle in das Blut oder die interstitielle Flüssigkeit transportiert, unterstützt durch den Ein- oder Ausstrom von Kalium-Ionen (K+) durch basolateral lokalisierte K+-Kanäle [132,143]. Im Austausch gegen Hydrogencarbonat-Ionen (HCO₃-) kann über die Epithelzellen zusätzlich Claus dem Wasser aufgenommen werden, während die Chloridzellen im Kiemenepithel von Süßwasserfischen primär der Aufnahme von Kalzium-Ionen (Ca²⁺) dienen [131,132,143].

Für den **Erhalt des Säure-Basen-Gleichgewichts** der Extrazellularflüssigkeit stehen allen Wirbeltieren verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Biologische Puffersysteme, die respiratorische Regulation über Einstellung der CO₂-Konzentration sowie die Ausscheidung pH-relevanter Moleküle [131,154]. Im Vergleich zu Luftatmern ist der CO₂-Partialdruck im Blut von Fischen als Wasseratmer niedrig (etwa 5 % des CO₂-Partialdruckes der Luftatmer), der CO₂-Gradient zwischen dem arteriellen Blut und dem umgebenden Wasser ist ebenfalls sehr gering. Dies erschwert die Abgabe von CO₂ mittels respiratorischer Kompensation [131,155]. Der Einfluss der verschiedenen Puffersysteme ist aufgrund der niedrigen Plasmakonzentration von HCO₃ und des niedrigen Hämatokriten der Fische (15-25 %) in der Regulation des Säure-Basen-Haushalts ebenfalls von geringer Relevanz [131,155,156].

In der Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichts kommt daher dem Transfer pHrelevanter Ionen eine besondere Bedeutung zu [155,156]. In Fischen spielt die Niere
hier nur eine untergeordnete Rolle, über 90 % des Transfers pH-relevanter Ionen
erfolgt über die Kiemen [131,156]. Von besonderer Relevanz ist der Austausch von
Na+- gegen H+-Ionen sowie Cl-- gegen HCO₃-Ionen. Die Aufnahme von Na+ oder
Cl- ist stets an den Transfer pH-relevanter Ionen gekoppelt und ermöglicht so die
Regulation des Säure-Basen-Haushalts in Kombination mit der Aufnahme von Na+
und Cl- aus der aquatischen Umwelt [155].

Die für die **Ausscheidung stickstoffhaltiger Endprodukte**, Osmoregulation und Regulation des Säure-Basen-Haushalts über die Kiemen grundlegenden Mechanismen sind eng miteinander verknüpft. Die meisten Knochenfische sind

ammoniotelisch, stickstoffhaltige Endprodukte werden primär als Ammoniak (und zu einem kleineren Teil als Harnstoff) ausgeschieden [131,143,156]. Ammoniak (NH₃) oder Ammonium-Ionen (NH₄+) werden über die Kiemen entweder per Diffusion oder im Austausch gegen Na+ an die aquatische Umwelt abgegeben, nur etwa 20 % der stickstoffhaltigen Endprodukte werden renal über den Urin ausgeschieden. Die Diffusion von Ammoniak ist hierbei eine energiesparende Form der Stickstoff-Ausscheidung [131,143].

3.3.3 Kiemen als Indikatororgane für die Effekte von Umweltschadstoffen

Die vielfältigen Funktionen der Kiemen können durch Gewebsalterationen, die auf die Effekte von Gewässerschadstoffen zurückzuführend sind, negativ beeinflusst werden [157]. In der Untersuchung toxischer Effekte diverser Umweltschadstoffe an Fischen sind Kiemenveränderungen häufig beobachtete Symptome [27]. Es wird angenommen, dass diese auf die Interaktion von Toxinen mit spezifischen membrangebundenen Rezeptoren und Transportsystemen zurückgehen, die in ähnlicher Form auch in toxikologisch relevanten Organen von Menschen zu finden sind (z. B. Leber, Niere oder Darm). Die Kieme ist daher ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung pathologischer, durch toxische Stoffe hervorgerufener Gewebsalterationen [157].

Die Kiemen stellen eine wichtige Schnittstelle zwischen der Umwelt und dem inneren Milieu der Fische dar. Aufgrund ihrer exponierten Lage und großen Oberfläche sind sie hinsichtlich toxischer Einflüsse höchst vulnerabel und eines der Hauptindikatororgane von Umweltschadstoffen [16,25,27]. Als sensitive Organe sind sie für die Bewertung von Umweltschadstoffen und das Monitoring von Gewässerbelastungen von großer Bedeutung [25,158,159]. Die Kiemen stehen mit dem umgebenden Wasser und den im Wasser gelösten Stoffen in direktem Kontakt und sind Umweltbelastungen daher permanent und ungeschützt ausgesetzt [25,159]. Das Blut innerhalb des intralamellären Raums der Sekundärlamellen wird von dem umgebenden Wasser lediglich durch eine dünne Barriere, bestehend aus dem respiratorischen Epithel, der Basalmembran und den Ausläufern der Pilasterzellen, getrennt [141]. Die Absorption von Chemikalien aus dem Wasser erfolgt an den Kiemen mit hoher Effizienz, da das Kiemenepithel eine hohe Permeabilität für im Wasser gelöste chemische Stoffe aufweist [19,160].

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

Infolgedessen sind die Kiemen anfällig für die Effekte diverser Xenobiotika, welche sich in morphologischen Gewebsalterationen äußern [27,29,157,161].

Die Kiemen sind ein Organ höchst komplexer Struktur, ihre Organisation erlaubt ein breites Spektrum an (zellulären) Anpassungsreaktionen infolge veränderter Umweltbedingungen oder Toxinexposition [28]. Morphologische Kiemenveränderungen aufgrund von Anpassungsreaktionen auf eine Schadstoffexposition können von protektiver Wirkung sein, indem sie den Eintritt von Toxinen verhindern oder die Fläche für Interaktionen mit Umweltschadstoffen reduzieren. Sie haben jedoch das Potenzial, die physiologischen Kiemenfunktionen zu beeinträchtigen Fusion von Sekundärlamellen stellt ein [28,30]. Beispiel Anpassungsreaktionen der Kiemen dar. Als eine der am häufigsten beobachteten reaktiven Kiemengewebsalterationen dient sie der Verringerung der Angriffsfläche für Toxine und andere Pathogene [28]. Mit einer reduzierten Kiemenoberfläche ist die Effizienz des Gasaustausches an den Sekundärlamellen der Kiemen jedoch stark eingeschränkt, dies kann längerfristige gesundheitliche Beeinträchtigungen nach sich ziehen [30]. Anpassungsmechanismen wie die Sekundärlamellenfusion oder die Epithelzellhyperplasie, welche mit einer erhöhten Diffusionsdistanz einhergeht, können die Atemfunktion, die Osmoregulation und die Exkretionsrate der Kiemen nachteilig beeinflussen, insbesondere bei diffusen Veränderungen, die große Kiemenareale betreffen [28].

Laut Evans (1987) [157] erfolgt die Beschreibung histopathologisch detektierbarer Kiemenläsionen häufig ohne ergänzende Erläuterung bezüglich veränderter physiologischer Parameter, und vice versa. Funktionale Einschränkungen können jedoch histopathologisch evaluierbaren Gewebeveränderungen vorangehen, dementsprechend können nicht nur morphologische Kiemenalterationen, sondern auch Abweichungen bestimmter physiologischer Parameter (z. B. hämatologisch) hinweisend sein auf die Beeinträchtigung der Kiemenfunktion infolge einer Gewebeschädigung durch ein toxisches Geschehen [28]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass sich nicht alle morphologischen Kiemenveränderungen zwingend in einer Einschränkung der Kiemenfunktion und der Veränderung systemischer Parameter äußern [28]. Die Beurteilung expositionsbedingter Kiemenalterationen sollte demnach sowohl morphologische als auch physiologische Effekte berücksichtigen.

Der histopathologischen Untersuchung des Kiemengewebes in der aquatischen Ökotoxikologie kommt hierbei eine tragende Rolle zu. Kiemen eignen sich in besonderem Maße für die Feststellung morphologischer Kiemenalterationen infolge toxischer Effekte von Umweltschadstoffen [25]. In der Ermittlung subletaler und chronischer Effekte von Gewässerbelastungen stellt die histopathologische Kiemenuntersuchung die Methode der Wahl dar [159]. Histologisch detektierbare Kiemenveränderungen dienen als wertvolle Biomarker für die Effekte von Umweltschadstoffen und können als "Frühwarnsignal" für veränderte Umweltbedingungen dienen [7,142]. Der Fokus ökotoxikologischer Untersuchungen von Kiemen liegt auf dem respiratorischen Epithel der Sekundärlamellen sowie dem interlamellären Bereich der Primärlamellen [27].

Häufig im Zusammenhang mit Gewässerschadstoffen beobachtete morphologische Kiemenveränderungen sind die Fusion von Sekundärlamellen, das Abheben des Epithels der Sekundärlamellen infolge eines interstitiellen Ödems, die Hyperplasie und Hypertrophie der Epithelzellen, Teleangiektasien der Sekundärlamellengefäße, Nekrosen oder Veränderungen in der Population der Chloridzellen [16,27,28]. Pathologische Kiemenveränderungen treten, in Abhängigkeit von Agens und Expositionsdauer, in variierenden Verteilungsmustern und an unterschiedlichen Zielstrukturen/-zellen auf. Die Effekte einer Nitrat- oder Kadmiumexposition beispielsweise betreffen primär die Chloridzellpopulation [28]. Manche Läsionen stärker sind mit bestimmten Schadstoffgruppen assoziiert als andere. Kiemenepithelnekrosen oder Läsionen der Becherzellen beispielsweise sind häufiger mit der Exposition gegenüber Schwermetallen verbunden als mit anderen Stoffgruppen [27]. Bei vielen ökotoxikologischen Studien korreliert der Schweregrad histopathologisch detektierter morphologischer Kiemenalterationen mit der Stoffkonzentration und/oder Expositionsdauer [27,162,163].

Als potenzielle Grundlage für weitreichende politische Entscheidungen ist die Akkuratesse in der Erhebung und Interpretation histopathologischer Gewebsalterationen infolge einer Schadstoffexposition von größter Bedeutung [16,113]. Die Objektivität und höhere Sensitivität quantitativ-stereologischer Analysen gegenüber der routinemäßig durchgeführten qualitativen Bewertung von Gewebsalterationen in der toxikologischen Forschung wurde bereits in zahlreichen Fachpublikationen erörtert [22,23,34]. Auch in der Erhebung histopathologischer

Endpunkte in Toxizitätstests an Fischen wird die Quantifizierung histomorphologischer Gewebsalterationen empfohlen [8,16].

Gegen Ende des 20. Jahrhunderts wurden morphologische Kiemenparameter (z. B. die respiratorische Kiemenoberfläche oder die Dicke der Sauerstoff-Diffusionsbarriere) bereits mittels einfacher morphometrischer Messungen an verschiedenen Fischspezies untersucht, auch im Hinblick auf die Quantifizierung der Effekte bestimmter Umweltschadstoffe [32,164-168]. Moderne quantitativstereologische Analyseverfahren zur Charakterisierung morphologischer Kiemenparameter kamen in Studien bezüglich der Effekte von Gewässerschadstoffen bisher nur in geringem Maße zum Einsatz [8]. Ein Beispiel ist das sogenannte "mucosal mapping", anhand dessen quantitativ-morphologische Parameter bezüglich der Becherzellen (z. B. die Volumendichte der Becherzellen an dem Primär- und Sekundärlamellenepithel) an den Kiemen des Atlantischen Lachses (Salmo salar) und des Seeskorpions (Myoxocephalus scorpius) bezüglich der Effekte von Schwermetall- oder Peressigsäureexposition ermittelt wurden [48-Im Rahmen eines Kupfer-Expositionsversuchs wurden zudem die Volumendichten verschiedener Kiemenkompartimente an den Kiemenfilamenten und das mittlere Zellvolumen der Chloridzellen an den Kiemen des Nil-Tilapias (Oreochromis niloticus) untersucht [31].

Es wurden jedoch bereits Studien bezüglich der Bestimmung des Volumens der Kiemen und des interbranchialen lymphatischen Gewebes des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) [41] publiziert. An den Kiemen des Südamerikanischen Lungenfisches (*Lepidosiren paradoxa*) wurden Kiemenvolumen und -oberfläche geschätzt [42]. Zudem wurden das Kiemenvolumen, die Volumendichten verschiedener Kiemenkompartimente an den Kiemen, die (respiratorische) Kiemenoberfläche und die Dicke der Diffusionsbarriere an Kiemen des Arapaima (auch Pirarucu genannt) (*Arapaima gigas*) [43,44], eines Fisches aus der Familie der Harnischwelse (*Pterygoplichthys anisitsi*) [47] und des Pangasius (*Pangasianodon hypophthalamus*) [45,46] untersucht.

In ökotoxikologischen Studien, die quantitative (und zum Teil quantitativstereologische) histopathologische Endpunkte anhand der Untersuchung der Kiemen von Fischen zum Gegenstand haben, ist es immer noch gängige Praxis, entsprechende Analysen an willkürlich ausgewählten Kiemenproben und -lokalisationen vorzunehmen [29-31,50,169-173]. Histologische Schnitte von meist in Paraffin eingebetteten Proben werden zudem häufig in präferierten Schnittebenenorientierungen angefertigt [31,170-175]. Semiquantitative Bewertungssysteme und einfache zweidimensionale morphometrische Analyseverfahren finden auch in aktuelleren ökotoxikologischen und physiologischen Studien breite Anwendung [30,50,170-172,176-178].

Einfache zweidimensionale quantitative oder morphometrische Messungen an willkürlich orientierten Schnitten bewusst ausgewählter Probennahmelokalisationen ermöglichen jedoch keine Rückschlüsse auf die dreidimensionale Organ- oder Gewebestruktur und erzeugen systematisch verfälschte (*biased*) Daten, da sie die Größe, Form und Ausrichtung von Partikeln oder Strukturen nicht berücksichtigen [24,179]. Die Erhebung akkurater quantitativ-morphologischer Parameter als Grundlage für die Objektivität und statistische Auswertung histopathologischer Endpunkte bedarf daher bestimmter Voraussetzungen [23,33,34,180] (siehe Abschnitt 3.4).

3.4 Quantitative Stereologie

Der Begriff "Stereologie" wurde 1961 von der Internationalen Gesellschaft für Stereologie etabliert, abgeleitet von dem griechischen Wort "stereos" (räumlich) [34,180]. Die Stereologie beschreibt die Gesamtheit mathematischer Methoden, die die Ermittlung der dreidimensionalen Struktur eines untersuchten Objektes anhand der Interpretation zweidimensionaler Schnittbilder (z. B. Schnittprofile oder planare Projektionen) ermöglichen [180].

Die Stereologie hat ihren Ursprung bereits im 17. Jahrhundert. Bonaventura Cavalieri, ein Mathematiker und Schüler Galileo Galileis, entwickelte eine Methode zur Volumenbestimmung eines Objektes nach dessen planparalleler, äquidistanter Lamellierung anhand der Distanz der Querschnitte und der Summe der Querschnittsflächen. Im 18. Jahrhundert veröffentlichte Georges-Louis Leclerc de Buffon, ein Philosoph und Mathematiker, Studien zur geometrischen Wahrscheinlichkeitstheorie [34,181]. Unter Achille Delesse, einem Geologen, fanden Mitte des 19. Jahrhunderts die Ansätze beider Wissenschaftler erstmals praktische Anwendung in der Ermittlung der Volumendichte einzelner Bestandteile in Gestein anhand der Flächendichte ihrer Anschnittsprofile [34,181,182].

Seit der Mitte des 20. Jahrhunderts hat die Beurteilung von Untersuchungsgegenständen mittels quantitativer Verfahren in zahlreichen wissenschaftlichen Disziplinen wie der Geologie oder den Material- und Naturwissenschaften beträchtlich an Bedeutung gewonnen [34,181]. Insbesondere der Biologie, der Medizin und verwandten Fachbereichen wie der experimentellen, klinischen oder toxikologischen Pathologie dienen quantitativmorphologische Verfahren der Beantwortung komplexer Fragestellungen sowie der akkuraten Erfassung selbst subtiler, dreidimensionaler struktureller Veränderungen innerhalb von Organen und Geweben und der objektiven Einstufung des Schweregrades von Gewebsläsionen [22,23,34,183].

Für die Beurteilung und Erfassung quantitativer Objektmerkmale ist das visuelle System des Menschen, im Gegensatz zu seiner Leistungsfähigkeit bei der Erkennung von Mustern, nur mit Einschränkungen geeignet [34,35]. Für die Erfassung subtilerer quantitativer Veränderungen eines Strukturparameters (z. B. der Anzahl) fehlt dem menschlichen Auge die Sensibilität, erst ab Abweichungen in einer Größenordnung von 25-40 % werden diese durch das

visuelle System wahrgenommen [23,35]. Um diese Schwäche auszugleichen, bedarf die quantitativ-morphologische Beurteilung von Gewebsalterationen sensitiver Analysemethoden [22,24]. Die subjektive, rein visuelle Beurteilung des Schweregrades histopathologisch detektierter Organ- und Gewebsalterationen ohne das Heranziehen standardisierter, quantitativer Messmethoden unterliegt Expert innen einer großen Untersucher innen-Variabilität selbst unter [34,184,185]. Mittels quantitativ-morphologischer Analysemethoden können in der histopathologischen Untersuchung reproduzierbare und akkurate Aussagen bezüglich morphologischer Gewebeveränderungen getroffen werden. Sie ermöglichen eine objektive Charakterisierung und Einstufung von Gewebsalterationen sowie deren statistische Auswertung [34].

Es ist zu beachten, dass sich, trotz einiger Überschneidungen, die häufig synonym verwendeten Begriffe "Stereologie" und "Morphometrie" in ihrer Bedeutung unterscheiden. Die Morphometrie als "Gestaltmessung" umfasst alle Verfahren, anhand derer quantitative Informationen über räumliche Strukturen gewonnen werden. Im Gegensatz zu der Stereologie sind morphometrische Methoden quantitativer-, nicht aber zwingend auch dreidimensionaler Natur [34,183,186]. In der Stereologie hingegen wird zwischen qualitativ- und quantitativ-stereologischen Verfahren unterschieden. Ein Beispiel für eine qualitativ-stereologische Methode ist die dreidimensionale Rekonstruktion eines Untersuchungsgegenstandes anhand von Serienschnitten. Quantitativ-stereologische Methoden hingegen erfassen quantifizierbare morphologische Parameter (Längen-, Volumen-, Oberflächen- und numerische Volumendichten), zum Beispiel auch die von Delesse entwickelte Methode zur Bestimmung der Volumendichten einzelner Kompartimente innerhalb eines Bezugskompartiments anhand der Flächendichte ihrer Anschnittsprofile in repräsentativen Schnitten [34].

3.4.1 Quantitativ-stereologische Analysemethoden in der biomedizinischen Forschung

Quantitativ-stereologische Analyseverfahren wurden in der biomedizinischen Forschung, insbesondere der Histologie und Zellbiologie, ab der Mitte des 20. Jahrhunderts verstärkt entwickelt und angewandt [34,187-191]. Einige der zu dieser Zeit etablierten Verfahren finden auch heute noch Anwendung. Ein Beispiel hierfür ist die Methode zur Bestimmung der numerischen Volumendichte und des

mittleren Volumens von Partikeln unter Annahme einer Kugel- oder Zylindergestalt nach Weibel und Gomez (1962) [190], welche auch 40 Jahre später noch in der quantitativ-morphologischen Analyse von Nierenglomerula eingesetzt wird [34,192]. Vielen der in den 1940er- bis 1960er-Jahren etablierten Verfahren ist gemein, dass es sich um modellbasierte (*model based*) stereologische Analysemethoden handelt [34]. Sie bemühen geometrische Modellannahmen bezüglich der Form, Orientierung oder räumlichen Ausrichtung einer Struktur (z. B. die Annahme einer Kugelgestalt für die Morphologie einer Zelle) für die Analyse quantitativ-morphologischer Parameter anhand zweidimensionaler Schnittbilder. Dies kann zu Verzerrungen (*bias*) der Schätzwerte führen, also einer systematischen Abweichung von dem wahren Wert [34,193,194].

Mit der Weiterentwicklung der Stereologie fanden statistische und mathematische Verfahren stärkere Berücksichtigung in der Etablierung stereologischer Methoden [34,195-203]. Im Gegensatz zu modellabhängigen Verfahrensweisen sind modernere design-basierte und damit modellunabhängige stereologische Probennahme- und Analysemethoden so konzipiert, dass die ermittelten Schätzwerte dem wahren Wert eines bestimmten Parameters mit hoher Genauigkeit entsprechen [193]. Diese sensitiven Methoden fußen nicht auf geometrischen Modellannahmen, sondern ausschließlich auf statistischen Probennahmestrategien und stochastisch-geometrischen Gesetzmäßigkeiten. Sie sind daher frei von systematischer Abweichung (Verzerrung) (unbiased) und liefern erwartungstreue mathematisch-statistische Schätzwerte [22,23,34]. Mittels der Probennahmestrategien Testsysteme modellunabhängiger und stereologischer Verfahren werden quantitative Strukturparameter (z. B. Volumina, Längen, Oberflächen oder Partikelzahlen) von Objekten oder Strukturen unabhängig von deren Größe, Form, Orientierung und Verteilung ermittelt [24,193].

Die Quantifizierung morphologischer Befunde ermöglicht deren objektive und reproduzierbare Erhebung und statistische Auswertung [34]. Veränderungen, die mittels subjektiver Bewertung nicht wahrnehmbar wären, können mithilfe quantitativer Messmethoden sichtbar gemacht werden. Diese ermöglichen zudem die Detektion bereits subtiler struktureller Veränderungen sowie die Verknüpfung funktioneller Einschränkungen mit morphologischen Organ- oder Gewebsalterationen [22,34,35]. In toxikologischen Studien können quantitativ

erhobene histomorphologische Endpunkte in der Beurteilung von Gewebsalterationen zudem die Vermittlung des Ausmaßes der Veränderungen erleichtern (z. B. an Nicht-Patholog_innen) [22].

Modellunabhängige quantitativ-stereologische Analysen sind mittlerweile fest in den Bereichen der Pathologie und Anatomie etabliert und stellen die Methode der Wahl für die quantitativ-morphologische Untersuchung verschiedener Organe dar [36-40]. Auch in der toxikologischen Pathologie gewinnt die Anwendung quantitativ-stereologischer Testsysteme und repräsentativer Probennahmestrategien zunehmend an Bedeutung [22,23].

3.4.2 Prinzipien der modellunabhängigen quantitativen Stereologie

In modellunabhängigen quantitativ-stereologischen Analysen werden mittels repräsentativer Probennahmestrategien und der Anwendung geeigneter Testsysteme geometrischer Sonden (probes) quantifizierbare und Strukturparameter ermittelt. Die analysierten dreidimensionalen Partikel oder Strukturen innerhalb eines Organs oder Gewebes werden so anhand zweidimensionaler Schnitte rekonstruiert [23]. Grundlage einer akkuraten Rekonstruktion ist die Verwendung repräsentativer Probennahmeverfahren und die Erhebung erwartungstreuer Schätzwerte diverser quantitativ-morphologischer Parameter wie Volumina, Oberflächen, Längen und Partikelzahlen mit statistisch definierter Fehlerwahrscheinlichkeit [22,23,33,193]. In der quantitativen Stereologie ist es von größter Bedeutung, dass die mathematisch-statistischen Schätzwerte präzise (effizient) und erwartungstreu sind, ihre Qualität misst sich an der Erfüllung beider Kriterien [34,200]. Aus der Kombination von Erwartungstreue und Präzision ergibt sich die mathematische Genauigkeit (accuracy) eines Schätzwertes [183].

Ein erwartungstreuer (*unbiased*) Schätzwert ist frei von systematischen Fehlern, das bedeutet, er entspricht dem wahren Wert mit hoher Genauigkeit [22-24]. Die statistischen Grundsätze, auf welchen die modellunabhängigen quantitativstereologischen Verfahren beruhen, garantieren die Genauigkeit quantitativmorphologischer Schätzwerte, auch wenn der wahre Wert selbst unbekannt ist [22]. Die Erwartungstreue ist eng mit dem Studiendesign verknüpft, solange repräsentative Probennahmeverfahren und die adäquate Anwendung stereologischer Testsysteme auf jeder Ebene der quantitativ-stereologischen

Analyse zum Einsatz kommen, ist der ermittelte quantitativ-stereologische Schätzwert "unbiased" [179].

Die Präzision (Wiederholungsgenauigkeit) beschreibt die Varianz innerhalb eines Schätzwertes, drückt also die Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses aus [24,34]. Die Präzision eines Schätzwertes kann anhand des Fehlerkoeffizienten (Coefficient of Error (CE)) ermittelt werden, welcher die Streuung der einzelnen Messwerte in Bezug auf den Mittelwert angibt [23]. Mit verbesserter Präzision wird der CE verringert. Im Sinne der Effizienz werden hierfür mehr Proben auf den höheren Ebenen der Probennahmekaskade (z. B. Testorganismen, Gewebeblöcke) generiert, während der Aufwand auf den unteren Ebenen reduziert wird (z. B. durch Reduktion der Anzahl an Testpunkten pro Gesichtsfeld) [22,179,194,204].

3.4.3 Besondere Anforderungen quantitativ-stereologischer Analysen

Für die Ermittlung erwartungstreuer und präziser Schätzwerte in modellunabhängigen quantitativ-stereologischen Analysen bedarf es einer umsichtigen Studienplanung [179]. Diese muss der Volumetrie, der Anwendung von Verfahren zur Auswahl repräsentativer Proben (z. B. der systematischen Probennahme mit zufälligem Ausgangspunkt), der Randomisierung Schnittebene, den geeigneten Einbettungsmedien, der Berücksichtigung der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung und der adäquaten Verwendung stereologischer Testsysteme Rechnung tragen [33,179].

In quantitativ-stereologischen Studien ist die **Bestimmung des Gesamtvolumens** des Referenzorgans, -gewebes oder der Referenzstruktur von größter Bedeutung. In quantitativ-stereologischen Verfahren werden die morphologischen Parameter als Relativwerte erhoben, z. B. Volumendichte (**V**v), Oberflächendichte (**S**v), Längendichte (**L**v) und numerische Volumendichte (**N**v). Diese Schätzwerte sind über ihren Anteil innerhalb des Volumens eines Referenzkompartiments definiert [33,180]. Durch Multiplikation der Relativwerte mit dem Volumen des Referenzkompartiments erhält man die absoluten morphologischen Parameter (Volumen (**V**), Oberfläche (**S**), Länge (**L**) oder Anzahl (**N**)) [33,179,194]. Die Beurteilung quantitativ-morphologischer Gewebsalterationen und die eindeutige Quantifizierung pathologischer Prozesse kann nur anhand der Absolutwerte erfolgen [33,38]. Die alleinige Auswertung der Relativwerte gibt keinen Aufschluss

darüber, Abweichungen ob auf Alterationen der Zielstruktur. des Referenzkompartiments oder beider Kompartimente zurückzuführen sind. Dies kann zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen (reference trap) [34,196]. Die Volumenbestimmung erfolgt entweder direkt anhand der Verdrängung eines Mediums durch die vollständig untergetauchte Gewebeprobe wässrigen (Archimedisches Prinzip) oder mithilfe des Gewichts der Gewebeprobe und deren spezifischer Gewebedichte, ermittelt anhand der Verdrängung eines wässrigen Mediums bekannter Dichte durch das zu volumetrierende Organ (Submersionsmethode) [179,205,206]. Das Volumen eines Organs oder Gewebes kann zudem nach dem Prinzip von Cavalieri ermittelt werden. Nach Cavalieri ergibt sich das Volumen eines Organs, Gewebes oder einer Gewebestruktur aus dem Produkt der Schnittprofilflächen, die an planparallelen, äquidistanten Schnittebenen gemessen werden, und dem Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen [33,179,202,206].

Für die Gewährleistung der Präzision und Erwartungstreue der ermittelten quantitativ-morphologischen Schätzwerte ist die Repräsentativität der untersuchten Stichproben von größter Wichtigkeit [22]. In der guantitativen Stereologie findet die zufällige Stichprobenauswahl (sampling) auf allen Ebenen der Analyse statt: auf Ebene der Gewebeproben, der histologischen Schnitte, der mikroskopischen Gesichtsfelder und der stereologischen Testsysteme, anhand derer die Ermittlung der quantitativ-morphologischen Schätzwerte erfolgt [33,180]. Um die Repräsentativität des gewonnenen Probenmaterials auf allen Ebenen zu gewährleisten, muss das gewählte Samplingverfahren sicherstellen, dass für alle Bereiche des zu analysierenden Organs/Gewebes stets die gleiche Wahrscheinlichkeit besteht, in die Stichprobe aufgenommen zu werden [22,193,194]. Die Methode der Wahl in quantitativ-stereologischen Analyseverfahren ist die systematisch zufällige Probennahme (systematic uniform random sampling (SURS)) [22,23,202]. In diesem effizienten Stichprobenverfahren wird die erste Stichprobenlokalisation nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, nachfolgende Lokalisationen werden systematisch anhand eines festgelegten Intervalls bestimmt [23,33,207].

Das Studiendesign muss hinsichtlich der Probenauswahl und der Probenprozessierung stets den zu untersuchenden Zielparameter berücksichtigen [23,179]. Für die erwartungstreue Schätzung der orientierungssensitiven

quantitativ-morphologischen Parameter L_V bzw. L (Längendichte bzw. Länge) und S_V bzw. S (Oberflächendichte bzw. Oberfläche) muss die räumliche Orientierung der zu analysierenden Struktur (also der untersuchten Gewebeprobe) bzw. der Schnittflächenebene der Gewebeprobe randomisiert werden [33,179,193]. Bei L_V und S_V ist die **Randomisierung der Schnittebenenorientierung** obligat, da die Schnittflächenprofile der zu analysierenden Strukturen aufgrund der üblicherweise vorliegenden Anisotropie (= dem Besitz einer Vorzugsrichtung) biologischer Zielstrukturen/-partikel stark von der Schnittrichtung abhängig sind (im Gegensatz zu isotropen Strukturen) [183]. Durch die Randomisierung erhält jede mögliche Schnittebenenorientierung im dreidimensionalen Raum die gleiche zufällige Chance, für die Anfertigung histologischer Schnitte und die anschließende quantitativ-stereologische Auswertung herangezogen zu werden [207].

In quantitativ-stereologischen Analysen werden häufig isotrope Schnitte mit gleichförmiger Zufälligkeit (isotropic uniform random sections (IUR)) und vertikale Schnitte mit gleichförmiger Zufälligkeit (vertical uniform random sections (VUR)) verwendet [23,33]. IUR-Schnitte sind in allen drei Raumrichtungen randomisiert und für die Ermittlung aller quantitativ-morphologischen können herangezogen werden [23]. Sie können beispielsweise mit der Isector- [208], der Orientator- [209] oder der Ortrip-Methode [210] erzeugt werden. In VUR-Schnitten wird eine vertikale Achse der Probe definiert und die Probe mit systematischer Zufälligkeit um diese Achse rotiert, anschließend wird eine VUR-Schnittfläche parallel zur vertikalen Achse generiert. Die vertikale Achse ist von der untersuchenden Person frei wählbar, unter der Bedingung, dass sie im histologischen Schnitt eindeutig identifizierbar ist. VUR-Schnitte sind folglich in nur zwei Raumebenen randomisiert, der Erhalt der "vertrauten" Histomorphologie erleichtert die Untersuchung histologischer Schnitte [23,197,211]. Diese Methode ist zudem gut geeignet für die Generierung randomisierter Schnitte von flachen Strukturen oder Proben (z. B. Proben der Haut oder der Wand von Hohlorganen) [23,197]. Mit Ausnahme von Längendichten können alle stereologischen Parameter an VUR-Schnitten geschätzt werden [197].

Die Prozessierung von Gewebeproben für die Anfertigung histologischer Schnitte (insbesondere die Fixierung und Einbettung) geht mit einer Volumenreduktion der Gewebeproben einher, der **einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung** [23,179]. Die dreidimensionale Gewebeschrumpfung hängt von dem Volumen der

Gewebeprobe sowie der Art des Fixiermittels und des Einbettungsmediums ab [23,212,213]. Der systematische Fehler, der durch Schrumpfungsartefakte entsteht, kann neben der Verwendung geeigneter Fixierlösungen vor allem durch die Verwendung eines Plastikeinbettungsmediums anstelle von Paraffin reduziert werden. Die Gewebeschrumpfung fällt im Vergleich üblicherweise geringer und gleichförmiger aus, zudem ist die Generierung dünner, gleichmäßiger Schnitte möglich (z. B. für die Anwendung des physikalischen Disektors, Zusätzlich Abschnitt 3.4.4) [23,212-215]. muss bei der Ermittlung schrumpfungssensitiver Parameter das Ausmaß der Volumenschrumpfung des Gewebes über den Vergleich des Probenvolumens vor und nach der Prozessierung bestimmt werden (z. B. durch den Vergleich von Organ- oder Gewebe-Anschnittsprofilflächen vor und nach der Einbettung), um den linearen Schrumpfungsfaktor f_s zu ermitteln [180,183,206]. Mit Ausnahme von V_V (unter Annahme einer gleichförmigen, isotropen Schrumpfung) sind alle stereologischen Parameter (L_V, S_V und N_V) schrumpfungssensitiv. Ihre Werte müssen entsprechend der auftretenden dreidimensionalen einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung mit dem linearen Schrumpfungsfaktor korrigiert werden (siehe Tabelle 1 der Publikation [66]) [180,183].

3.4.4 Akkurate Ermittlung quantitativ-morphologischer Strukturparameter

Die quantitative Stereologie ermöglicht die Analyse dreidimensionaler Strukturen und Partikel innerhalb von Organen und Geweben anhand zweidimensionaler histologischer Gewebeschnitte. Dies erfolgt mithilfe geometrischer Größen wie der Anzahl, Länge, Oberfläche oder Volumen [22,23,33]. Das Anfertigen einer Schnittfläche führt zu der Reduktion dreidimensionaler Strukturen auf zweidimensionale Anschnittsprofile, diese geht mit dem Verlust einer Dimension einher [22,33]. Volumina präsentieren sich als Flächen, Oberflächen als Linien und Längen als Punkte. Die Partikelanzahl wird in einem zweidimensionalen Schnitt nicht dargestellt und kann daher an einem einzelnen dünnen Schnitt nicht geschätzt werden [23,33,194]. Die Beziehung zwischen den Strukturmerkmalen in den histologischen Schnitten und den dreidimensionalen Eigenschaften der Strukturen oder Partikel innerhalb des Gewebes ist somit nicht ohne Weiteres erkennbar [193].

Indem stereologische Testsysteme (z. B. Punkte- oder Zykloidbogenraster) unterschiedlicher Dimensionalität auf physikalisch generierte histologische Schnitte

oder eine planare Schnittfläche projiziert werden, können anhand der Interaktion der randomisierten Sonden mit der Zielstruktur deren geometrische Eigenschaften im dreidimensionalen Raum quantifiziert werden [22,23,33,180]. Bei diesen stereologischen *probes* kann es sich um Testvolumina, -flächen, -linien oder -punkte handeln. Je nach Zielparameter wird die adäquate geometrische Sonde so gewählt, dass ihre Dimension in Addition mit der Dimension des untersuchten Strukturparameters drei Dimensionen ergibt [33]. Bis auf Testvolumina lassen sich alle *probes* an einzelnen Schnitten anwenden. Für den Einsatz von Testvolumina bedarf es dreidimensionaler Testsysteme, wie zum Beispiel den Disektor, welcher aus zwei parallelen (optischen oder physikalischen) Schnittebenen bekannten Abstands besteht [23,33,198,199].

Die Planung einer quantitativ-stereologischen Studie muss bezüglich der ausgewählten Einbettungsmedien, der Orientierung der Schnittebene, der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung sowie der verwendeten geometrischen Sonden und Testsysteme den individuellen Anforderungen an eine erwartungstreue Ermittlung der einzelnen stereologischen Parameter Rechnung tragen.

Die Volumendichte (V_V) beschreibt den Volumenanteil einer Phase (z. B. eines Gewebes, einer Struktur, einer Zellart oder auch einzelner Zellorganellen) innerhalb des Volumens eines Bezugskompartiments (Referenzkompartiment) [33]. Die Ermittlung von Vv bedarf keiner Schnittebenenrandomisierung und kann, unter Einhaltung aller Grundsätze für die erwartungstreue und präzise Erhebung repräsentativer quantitativ-morphologischer Schätzwerte, an nicht-randomisierten sowie an VUR- oder IUR-Schnitten erfolgen [23,33,197]. Da es sich bei Vv um einen dimensionslosen stereologischen Parameter handelt, keine muss Schrumpfungskorrektur vorgenommen werden und Paraffin stellt, unter der Annahme einer einheitlichen Schrumpfung unterschiedlicher Gewebskompartimente, ein adäquates Einbettungsmedium dar [23,180]. Werden effiziente (SURS) Stichprobenverfahren auf allen Ebenen der quantitativ-morphologischen Analyse angewandt, kann die Volumendichte der untersuchten Struktur innerhalb des entsprechenden Referenzkompartimentvolumens anhand der Dichte ihrer Anschnittsprofilflächen in dem Anschnittsprofil der Referenzstruktur mittels Punktezählung erwartungstreu geschätzt werden (Prinzip von Delesse) [33,180,182]. Als dreidimensionaler Parameter wird das Volumen bzw. die Volumendichte einer Struktur innerhalb eines Referenzkompartimentvolumens mit

Testsystemen bestimmt, die aus Punkten bestehen [33]. Punkte sind dimensionslose probes, die nur durch ihre Position charakterisiert sind und weder Orientierung noch räumliche Ausrichtung aufweisen [193]. Die mit (systematisch) zufälligen Stichprobenverfahren gewonnenen Gewebeschnitte werden mit einem Punktraster überlagert und die Punkte gezählt, die mit den Schnittflächenprofilen des gesamten Referenzkompartiments und der Zielstruktur interagieren, diese also treffen [33,180]. Aus dem Verhältnis der Trefferpunkte der Zielstruktur und des Referenzkompartiments lässt sich die Punktdichte der Zielstruktur in dem Bezugskompartiment ableiten. In erwartungstreuen Punktrastern wird jedem Punkt die gleiche Fläche zugeordnet, somit entspricht diese Punktdichte der Flächendichte, diese wiederum entspricht der Volumendichte der Zielstruktur innerhalb des Volumens des Referenzkompartiments [33,180,182,193,216]. Die Anzahl der zu zählenden Punkte (also der Punkte, die das Referenzkompartiment treffen) kann mithilfe eines Nomogramms ermittelt werden, welches Volumendichte und die zu erwartende relative Schätzfehlerwahrscheinlichkeit in Beziehung setzt [180].

Die Oberflächendichte (Sv) beschreibt den Anteil der Oberfläche einer Struktur an dem Volumen eines Referenzkompartiments [33,180]. Im Gegensatz zu der Bestimmung von Vv oder Nv bedarf die Ermittlung von Oberflächen einer Randomisierung der Schnittebene [33]. Auch wenn Sv an IUR-Schnitten ermittelt werden kann, ist die Methode der Wahl die Generierung von VUR-Schnitten, da diese Methode eine "gewohnte" Darstellung von Gewebestrukturen ermöglicht [23,197]. Da es sich bei der Oberfläche um einen schrumpfungssensitiven Parameter handelt, ist eine Kunststoffeinbettung gegenüber der Einbettung der Gewebeprobe in Paraffin vorzuziehen, zudem muss eine Schrumpfungskorrektur erfolgen, indem Sv mit dem linearen Schrumpfungsfaktor fs multipliziert wird [23,180,183,213]. Als zweidimensionale geometrische Größe wird die Oberfläche bzw. Oberflächendichte einer Struktur innerhalb des Referenzkompartimentvolumens anhand von Linien ermittelt [33]. Linien sind eindimensionale probes, die durch ihre Position sowie ihre dreidimensionale Orientierung charakterisiert sind [193]. Für die Ermittlung erwartungstreuer Schätzwerte für Sv müssen diese geometrischen Sonden isotrop mit den Schnittflächenprofilen der Oberflächen interagieren [33,193]. Zu Erzeugung dieser Isotropie wird an IUR-Schnitten ein Testsystem mit geraden Linien verwendet, VUR-Schnitte hingegen werden mit

einem an der vertikalen Achse ausgerichteten Testsystem überlagert, welches Zykloidbögen und Punkte beinhaltet [23,33,197]. Als Interaktion werden die Schnittpunkte der Linien des Testsystems mit den Schnittflächenprofilen der Oberfläche der untersuchten Struktur gezählt, die Anzahl der Schnittpunkte ist direkt proportional zu der Oberflächendichte der Struktur [23,193]. Für die Schätzung von Sv werden zusätzlich die Trefferpunkte mit dem Referenzkompartiment gezählt [33,197,211].

Die Ermittlung Längendichte Struktur der (L_V) einer in einem Bezugskompartimentvolumen anhand histologischer Schnitte bedarf ebenfalls einer Randomisierung der Schnittebene [33,193]. Die erwartungstreue Ermittlung von Lv erfolgt standardmäßig an dünnen **IUR-Schnitten** [33]. Aufgrund schrumpfungssensitiven Charakters von Ly ist eine Kunststoffeinbettung gegenüber der Einbettung der Gewebeprobe in Paraffin vorzuziehen [23,180,213] und eine Schrumpfungskorrektur mit dem Schrumpfungsfaktor fs² vorzunehmen [183]. Die Schätzung der Länge als eindimensionaler Parameter erfolgt mithilfe einer zweidimensionalen geometrischen Sonde. Diese ist eine von einem Sicherheitsbereich umgebene, mit einem Rahmen (sampling frame oder unbiased counting frame) abgegrenzte und mit einem Punktraster ausgestattete Fläche bekannter Größe, welche auf einen IUR-Schnitt projiziert wird [23,33,195]. Anschließend wird die Anzahl an Querschnitten (transects) der Zielstruktur mit der Flächensonde gezählt [33,193,194]. Zur Schätzung von Lv erfolgt zusätzlich die Zählung aller Punkte, die das Referenzkompartiment treffen, um so das Volumen des Referenzkompartiments zu ermitteln [33].

Eine besondere Form der Schätzung von Längen ist die Ermittlung der **Dicke** biologischer Barrieren (z. B. Diffusionsbarrieren). Die Ermittlung der wahren harmonischen mittleren Dicke (**T**h) an IUR-Schnitten anhand der orthogonalen Schnittpunktmethode stellt das Verfahren der Wahl für die erwartungstreue Schätzung der Barrierendicke dar [23,217,218]. Die Lokalisationen der Messungen werden randomisiert mit adäquaten Methoden festgelegt (z. B. mit einem quadratischen Gitterlinienraster) und die Barrierendicke entlang der kürzesten Strecke zwischen der äußeren und inneren Grenze der Barriere mit einem logarithmischen Lineal vermessen [217-220]. Über das harmonische Mittel der Barrierendicke (**I**h) kann **T**h abgeleitet werden [217,219].

Der stereologische Parameter der **numerischen Volumendichte** (**N**v) untersuchter Partikel (z. B. Zellen oder Zellkerne) in dem Volumen eines Referenzkompartiments kann nicht anhand von Schnittflächenprofilen der Partikel in einem einzelnen dünnen histologischen Schnitt geschätzt werden [22,33]. Zahlen sind dimensionslose Parameter, aufgrund der Dimensionsreduktion bei der Erstellung zweidimensionaler Gewebeschnitte von dreidimensionalen Strukturen haben sie in einfachen Schnitten kein entsprechendes Pendant [22,193,199].

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Partikel von einer Schnittebene getroffen wird, steigt proportional zu dessen Größe [198]. Damit jeder Partikel unabhängig von Größe, Form und Orientierung die gleiche Wahrscheinlichkeit hat, von der Stichprobe erwartungstreu erfasst zu werden, muss dessen Schätzung anhand eines dreidimensionalen Testsystems erfolgen [22,33,193,198,199]. Unter den zahlreichen quantitativ-stereologischen Methoden zur Ermittlung der Zell- oder Partikelanzahl wie dem Selector, dem optischen Disektor (einem Schätzverfahren, das auf der Generierung eines einzelnen dicken Schnittes beruht, in welchem parallele optische Schnitte mit bekanntem Abstand zueinander erzeugt werden) oder dem physikalischen oder optischen Fractionator (einer effizienten, schrumpfungsunabhängigen Methode zur direkten Schätzung von N, die keiner Bestimmung des Referenzkompartimentvolumens und Schnittdickenmessung bedarf) [23,33,199,203,221], ist die physikalische Disektor-Methode besonders hervorzuheben.

Der physikalische Disektor besteht aus einem dreidimensionalen Testvolumen, welches über den bekannten Abstand zweier paralleler physikalischer Schnitte und der untersuchten Schnittfläche des Referenzkompartiments definiert ist [33,198,199]. Es werden alle Partikel (Q-) gezählt, deren Schnittprofile von der Ausgangsebene (*reference-* oder *counting section*), nicht aber von der Vergleichsebene (*look-up section*) erfasst werden [22,24,198,199,222]. Zum Zählen der Partikel werden erwartungstreue Testfelder (*unbiased counting frames*) mit bekanntem Flächeninhalt verwendet [195,198].

Das physikalische Disektor-Verfahren kann an mit systematisch zufälligen Stichprobenverfahren ausgewählten histologischen Serienschnitten (nichtrandomisiert, VUR oder IUR) durchgeführt werden [23,33,197]. Zur Bestimmung des Disektorvolumens muss die wahre Schnittdicke ermittelt werden, sowohl für in

Plastikmedien [215] als auch für in Paraffin eingebettete Gewebeproben [223] stellt die spektrale Reflexionsmessung eine geeignete Methode dar. Die Erwartungstreue des mithilfe des physikalischen Disektors ermittelten Schätzwertes für N_V ist zudem abhängig von der Gleichmäßigkeit und der einheitlichen Schnittdicke der angefertigten histologischen Schnitte. Die Einbettung in ein Plastikmedium ermöglicht die Anfertigung dünner, gleichmäßiger Schnitte und ist damit der Einbettung in Paraffin vorzuziehen [22,23,214,215]. Plastikmedien haben gegenüber Paraffin zudem den Vorteil, dass die Gewebeschrumpfung geringer und einheitlicher ausfällt [23,212,213]. Unter Ermittlung und Berücksichtigung der Gewebeschrumpfung sowie einer adäquaten Bestimmung der Schnittdicke kann physikalische Disektorverfahren auch an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchgeführt werden, was die Anwendung immunhistochemischer Protokolle ermöglicht [223]. Die mit der physikalischen Disektor-Methode ermittelte numerische Volumendichte bestimmter Partikel/Zellen innerhalb des Referenzkompartimentvolumens muss (im Gegensatz zu der Fractionator-Methode) mit dem Schrumpfungsfaktor f_s³ korrigiert werden [22,180,183,199]. Mittels Punktezählung wird die Flächendichte der Schnittflächenprofile der Referenzstruktur an der (bekannten) Fläche des erwartungstreuen Testfeldes ermittelt, durch Multiplikation mit der Disektorhöhe ergibt sich das Volumen der Referenzstruktur innerhalb des Testvolumens. Ny errechnet sich aus der Anzahl aller gezählten Partikel und dem kumulierten Referenzkompartimentvolumen der ausgewerteten physikalischen Disektoren [33,198,199].

3.5 Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie optisch geklärter Gewebeproben

Die Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM)) optisch geklärter (transparenter) Gewebeproben ermöglicht die Analyse dreidimensionaler Gewebestrukturen auf Grundlage fluoreszenzbasierter virtueller optischer Schnitte [58,224]. Die in den analysierten Gewebeproben detektierten Fluoreszenzsignale (= spontane Lichtemission nach Anregung eines Moleküls durch Licht) beruhen entweder auf Autofluoreszenz, auf der gezielten Markierung verschiedener Gewebestrukturen (in oder ex vivo) mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, Lektinen (z. B. tomato lectin) oder anderen Markermolekülen oder auf der Expression von Fluoreszenzproteinen (z. B. grün fluoreszierendes Protein (GFP), gelb fluoreszierendes Protein (YFP) oder Gewebeproben transgener Versuchsorganismen mCherry) in [58,60,64,225,226]. Durch die Verwendung transparenter (optisch geklärter) Gewebeproben wird die Lichtabsorption und -streuung innerhalb der Probe erheblich reduziert und die Lichtdurchdringung selbst tiefer Gewebeareale ermöglicht [58,227].

Die LSFM optisch geklärter biologischer Proben stellt eine ausgezeichnete Methode für die dreidimensionale Darstellung morphologischer und funktioneller Eigenschaften von intakten, etwa 1 cm³ großen Gewebeproben mit einer Auflösung im Mikrometerbereich dar [58,224,228]. Gegenüber anderen fluoreszenzoptischen Bildgebungsverfahren wie der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie oder der Zwei-Photonen-Mikroskopie, verbindet sie die schnelle Abbildung selbst tiefliegender Strukturen großer Gewebeproben mit einer hohen Auflösung und einer geringen Phototoxizität [58,229,230].

Ihren Ursprung findet die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Entwicklung einer Methode zur Visualisierung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen (Goldpartikel) anhand der horizontalen Durchleuchtung einer Probe mit einem dünnen "Lichtblatt" und der Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals senkrecht zu der Lichtblattebene [58,231]. Über die Jahrzehnte wurde diese Methode dank des technischen Fortschrittes laufend weiterentwickelt, mit der Entstehung zahlreicher Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie-Versionen wie der Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie mit

einem dünnen Laser-Lichtblatt (Laser = *light amplification by stimulated emission of radiation*) [58,228,232,233]. Da die LSFM die Möglichkeit bietet, Proben mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung abzubilden, stellt sie ein wertvolles Instrument in der Erforschung moderner biologischer Fragestellungen dar, welche komplexe Gewebe, Organe und Organismen zum Gegenstand haben [229].

3.5.1 Generierung optisch geklärter Gewebeproben

Die Opazität einer Probe beschreibt die Lichtundurchlässigkeit, welche sowohl durch Lichtstreuung als auch starke Lichtabsorption verursacht wird. Beide Effekte verringern die Lichtdurchdringung, wodurch die Abbildungstiefe der LSFM-Methode insbesondere bei der Untersuchung großer biologischer Proben stark eingeschränkt wird [58,227,234]. Ursächlich für die Absorption von Licht unterschiedlicher Wellenlänge sind hauptsächlich die im Gewebe vorkommenden natürlichen Farbstoffe (z. B. Hämoglobin oder Melanin) [58,227,235]. Die Streuung des einfallenden Lichts ist auf die Heterogenität des Gewebes zurückzuführen, sowohl bezüglich der Organisation der zellulären und extrazellulären Bestandteile als auch deren unterschiedlicher Refraktionsindices (RI) (Brechungsindices) [58,236,237]. Der RI wird definiert durch das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zu der Lichtgeschwindigkeit im entsprechenden Medium. An der Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher RIs erfolgt eine Lichtbrechung (Refraktion) und Reflexion der Lichtwellen [227,234]. Lichtstreuung und -absorption sind abhängig von der Wellenlänge des Lichts und treten im Gewebe gemeinsam auf [58].

Die Lichtabsorption innerhalb der Gewebeprobe kann durch Maßnahmen wie die vaskuläre Perfusion zur Entfernung von Hämoglobin aus dem Gefäßsystem oder die Entfärbung des Blutes (z. B. mit Aminoalkohol) minimiert werden [227,238]. Lichtabsorption und -streuung können neben der Anpassung der verwendeten Wellenlänge des Laser-Signals durch verschiedene Verfahren zur optischen Klärung von Gewebeproben (optical tissue clearing) reduziert werden [58,227]. Ziel dieser Clearingverfahren ist es, die RIs unterschiedlicher Gewebebestandteile anzugleichen und eine Transparenz des Gewebes herbeizuführen. Die resultierende Transparenz selbst großer Gewebeproben verbessert neben der Abbildungstiefe und der Lichtdurchdringung auch den Kontrast der optischen Schnittbilder [58,227,234].

Alle Clearingprotokolle beruhen auf dem gleichen Prinzip: Durch Immersion in einer Clearinglösung werden störende Partikel (z. B. Lipide oder Pigmente) entfernt und die RIs innerhalb der Probe angeglichen. Beides erfolgt unter Erhalt der Zell- und Gewebestruktur [58,237,239].

Es existieren drei Gruppen an Clearingverfahren. Die ersten beiden Gruppen nutzen Immersionslösungen, entweder basierend auf organischen Lösungsmitteln (hydrophobe Clearingverfahren) oder wässrigen Lösungen (hydrophile Clearingverfahren). Die dritte Gruppe nutzt die Umwandlung von biologischem Gewebe Hydrogele [58,227,239]. lm Folgenden werden alle in drei Verfahrensgruppen näher erläutert.

Den auf organischen Lösungsmitteln basierenden Clearingprotokollen ist gemein, dass durch Dehydratation und Auflösung der Lipide eine überwiegend proteinhaltige Gewebeprobe entsteht. Anschließend erfolgt die Angleichung der RIs innerhalb der biologischen Probe an den RI der Clearing-Immersionslösung [58,227]. Diese Verfahren sind schnell und einfach durchzuführen, bedürfen keiner speziellen Laborausstattung und führen im Zuge der Verhärtung der Probe zu einem guten, dauerhaften Erhalt der Proben [239]. Nachteil ist, dass bei auf organischen Lösungsmitteln basierenden Clearingverfahren eine ex vivo Immunmarkierung von Gewebeproben aufgrund der hydrophoben Beschaffenheit der optisch geklärten Probe in der Regel bereits vor dem Clearing erfolgen muss und die Dehydratation der Probe die Lichtemission einiger Fluorophore (Fluorophor = physikalisches System, bei dem Fluoreszenz auftritt) beeinträchtigt [58,227]. Ein weiterer Nachteil ist der Verlust lipidhaltiger Strukturen. Die Proben stehen daher weder für elektronenmikroskopische Analysen noch für die Markierung mit lipophilen Farbstoffen zur Verfügung [240]. In der Analyse von mit auf organischen Lösungsmitteln basierenden Clearingverfahren geklärten Proben muss zudem die dehydratationsbedingte Gewebeschrumpfung berücksichtigt werden [227,241,242]. Zu Vertretern dieser Gruppe gehört unter anderem das Clearingverfahren mit BABB (Benzylalkohol/Benzylbenzoat), welches eine Dehydratation der biologischen Probe mit z. B. Ethanol, gefolgt von einer Immersion in Benzylalkohol/Benzylbenzoat vorsieht [224]. Diese schnelle, etablierte Methode hat den Nachteil, dass bestimmte endogene Fluoreszenzsignale abgeschwächt werden (z. B. von GFP, welches häufig als zellulärer Marker eingesetzt wird) [58]. Die 3DISCO-Clearingmethode (3D imaging of solvent-cleared organs), eine Modifikation des BABB-Protokolls, ist ein praktikables, schnelles, reproduzierbares Clearingverfahren, das eine hohe Transparenz erzielt, an nahezu sämtlichen Geweben angewendet werden kann und mit vielen Methoden der Fluoreszenzmarkierung kompatibel ist [240]. Die Proben bleiben aufgrund der vergleichsweise soliden Konsistenz der Gewebeproben auch über längere Zeit gut erhalten und können für wiederholte Analysen herangezogen werden [239,240].

Protokolle auf der Basis wässriger Lösungen sehen den Ersatz der Gewebeflüssigkeit durch wasserlösliche Stoffe mit höherem RI vor. Dies erfolgt passiv durch die Immersion der Gewebeprobe in einer wässrigen Lösung mit hohem Brechungsindex (z. B. Formamid [243] oder Fruktose [244]) [58,227,234]. Auch diesen Verfahren ist eine einfache Handhabung immanent, sie haben aber den Vorteil, dass lipidhaltige Strukturen erhalten bleiben und eine weite Bandbreite an Fluoreszenzmarkern für die Bildgebung verwendet werden kann. Nachteil ist der begrenzte Transparenzgrad und die nur bedingte Eignung für das Clearing größerer Gewebeproben [58,227]. Beispiele für diese Gruppe der Clearingprotokolle sind seeDB (see Deep Brain) oder Clear^T [58,243-245]. Es liegen auch Protokolle vor, die die Entfernung von lipidhaltigen Strukturen (ohne die Verwendung hydrophober Stoffe) und die Senkung des RI der Gewebeprobe (z. B. mit Urea) vorsehen. Auf diese Weise bleibt ein für fluoreszierende Proteine vorteilhaftes wässriges Milieu erhalten. Beispielhaft ist hier die CUBIC-Methode (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis) zu nennen [58,225,227].

Einen anderen Ansatz verfolgen **Hydrogel-Clearingverfahren**. Diese erzielen eine Transparenz der Gewebeproben weitestgehend unter Erhalt der Proteinstruktur und ermöglichen eine Untersuchung der molekularen Struktur durch verschiedene Immunfärbemethoden. Ein stabiles Hydrogel-Gewebe-Hybrid auf der Basis von Acrylamid wird chemisch erzeugt, um die Proteinbestandteile zu fixieren [58,234]. Die Lipidbestandteile werden entfernt, danach erfolgt die Anpassung des RI. Die Lipidentfernung geschieht entweder passiv über mehrere Wochen mittels der Inkubation in einem Lösungsmittel oder mittels Elektrophorese über einige Tage [227]. Ein prominentes Beispiel ist die **CLARITY**-Methode (*Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hYdrogel*), bei deren Anwendung sowohl die Feinstruktur des Gewebes als auch endogene Fluorophore erhalten bleiben [58,246]. Die Protokolle dieser Gruppe haben zahlreiche Vorzüge (wie den Erhalt der Proteine und

endogenen Fluorophore, die hohe Transparenz sowie die Kompatibilität mit vielen Färbemethoden), zum Teil sind sie jedoch mit hohem zeitlichen Aufwand verbunden und technisch aufwendig, zudem gehen lipidhaltige Strukturen verloren [58,239]. Für eine umfassende Darstellung der hier aufgeführten und weiteren Clearingverfahren aller Clearingprotokoll-Kategorien wird der/die interessierte Leser_in auf die Publikationen von Feuchtinger *et al.* (2016) [58] und Gómez-Gaviro *et al.* (2020) [247] verwiesen.

3.5.2 Prinzip der Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie

Die LSFM stellt ein Verfahren für die Anfertigung optischer Schnitte dar, welches eine dreidimensionale Bildgebung mit hoher räumlicher Auflösung ermöglicht [248]. Eine skizzenhafte Darstellung des Prinzips ist in Abbildung 17 der Publikation [66] dargestellt. Während die laterale Auflösung (entlang der x- und y-Achse) von der numerischen Apertur (Auflösungsvermögen) des detektierenden Fluoreszenzmikroskop-Objektivs abhängig ist, wird die vertikale (axiale) Auflösung (entlang der z-Achse) primär von der Dicke des Laser-Lichtblattes (oder der Laser-Lichtblätter, siehe unten) bestimmt [248-250]. Die zeitliche Auflösung ist unter anderem abhängig von der Aufnahmegeschwindigkeit der verwendeten Kamera und der Geschwindigkeit, mit welcher die Gewebeprobe entlang der z-Achse durch das Lichtblatt bewegt wird (oder *vice versa*) [229,248,251]. Die Auflösung ist somit abhängig von den verwendeten Detektionsobjektiven und Kamerasystemen, von der Art des eingesetzten Laserlichtstrahls sowie der Probengröße und -transparenz [229,248-250].

Durch ein horizontales Laser-Lichtblatt werden in der Fokusebene des Fluoreszenzmikroskop-Objektivs innerhalb der Gewebeprobe bestimmte Fluorophormoleküle angeregt. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden orthogonal zu der Lichtblattebene durch das Fluoreszenzmikroskop detektiert, aufgenommen und in virtuelle optische Bilder transformiert (siehe Abbildung 17 der Publikation [66]) [58,224,252]. Anschließend können die Bilddatensätze beispielsweise als Einzelschnitte oder dreidimensionale Rekonstruktion (*volume rendering*) digital visualisiert und mittels digitaler Bildanalyse untersucht werden [58].

Zur Darstellung der Gewebemorphologie können unterschiedliche Fluoreszenzsignale herangezogen werden. Detektierte Fluoreszenzen können von

inhärent fluoreszierenden Biomolekülen im Gewebe (z. B. Porphyrine, Elastin oder Kollagen) oder von Schiff schen Basen, welche im Rahmen einer Gewebefixierung mit aldehydhaltigen Fixiermitteln entstehen, herrühren. Dieses Phänomen wird als Autofluoreszenz bezeichnet [58,227]. Fluorophore können auch von extern in das Gewebe eingebracht werden, beispielsweise anhand einer in vivo Applikation fluoreszenzmarkierter Substanzen und/oder Antikörper. Über verschiedene Marker können Strukturen oder Zellen (z. B. Gefäßstrukturen über Lektine oder infizierte Zielzellen über Viren) sowie physiologische Vorgänge (z. B. der Transport von Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke) spezifisch adressiert werden [58,252-254]. Ein weiteres Verfahren stellt die ex vivo Immunmarkierung größerer Gewebeproben (whole-mount-immunostaining) durch Penetration der Probe mit Antikörpern dar [58,255]. Diese Art der Fluoreszenzmarkierung muss bei der Anwendung bestimmter Clearingverfahren (z. B. 3DISCO) schon vor dem Clearing erfolgen [58]. Nicht alle Gewebestrukturen lassen sich mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper optimal abbilden. Durch Verwendung transgener Modelle kann die Darstellung der (sub-)zellulären Gewebearchitektur auf Grundlage der Expression Fluoreszenzproteinen (z. B. GFP-Fusionsproteine) erfolgen [58,60,225,256-258].

Eine optisch transparente (geclearte) Gewebeprobe wird in einen Probenbehälter verbracht und von der Seite von einem nur wenige Mikrometer dicken ebenen Laser-Lichtblatt einstellbarer individuell Wellenlänge durchleuchtet [64,224,228,249]. Das Lichtblatt befindet sich in der Fokusebene der Objektivlinse des Fluoreszenzmikroskops, seine Dicke bestimmt maßgeblich die Eignung der Methode zur Anfertigung optischer Schnitte sowie die Bildqualität. Gemeinsam mit dem Auflösungsvermögen der Detektionslinse des Fluoreszenzmikroskops bestimmt die Dicke des Lichtblattes die axiale Auflösung und den Kontrast der virtuellen optischen Schnittbilder [229,248]. Bei größeren Proben wird die Durchleuchtung des Gewebes mit zwei in einer Ebene befindlichen Laser-Lichtblättern von zwei gegenüberliegenden Seiten empfohlen, Lichtabsorption durch das Gewebe auszugleichen und eine reduzierte Anregungsintensität im Zentrum der Probe zu verhindern [224,259]. Streuungs-(scattering) und Beugungseffekte (diffraction) innerhalb des Gewebes führen zu einer Verbreiterung des Laser-Lichtblattes und einer somit geringeren Fluoreszenzintensität innerhalb der Fokusebene. Ihr Einfluss wird (neben der Verwendung optisch transparenter Proben) durch eine Durchleuchtung von beiden

Seiten reduziert, da die Fluoreszenz des Lichtblattes, welches in geringerem Maße von beiden Effekten betroffen ist, dominiert [224].

Die Probenbereiche außerhalb der Fokusebene werden nicht beleuchtet, sodass die Lichtstreuung innerhalb der Gewebeprobe auf ein Minimum reduziert wird [58,249,252]. Im Gegensatz zu der konfokalen Mikroskopie treten keine Lichtsignale aus Nicht-Fokusebenen auf, zudem können die Fluorophore optimal genutzt werden, da ein "Ausbleichen" (photobleaching) durch Anregung von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene vermieden wird [224,228,229]. Die Bildgebung mittels LSFM ermöglicht die Aufnahme kontrastreicher Bilder in hoher Geschwindigkeit bei einem gleichzeitig günstigen Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise-ratio (SNR)) [228,229]. Zusätzlich wird die Untersuchung photosensitiver Gewebeproben durch die reduzierte Exposition der Probe gegenüber dem Laserlicht begünstigt [229].

Die Fluoreszenzsignale in der von dem Laser-Lichtblatt durchleuchteten Gewebeschicht (Fokusebene) werden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert und aufgenommen [249]. Es ist ausgestattet mit einer Objektivlinse, deren Auflösungsvermögen maßgeblich die laterale und axiale Auflösung der optischen virtuellen Schnittbilder bestimmt [229,248]. Ein Emissionsfilter dient dazu, Lichtsignale, die ihren Ursprung außerhalb der Fokusebene haben, herauszufiltern. Das Fluoreszenzmikroskop ist gekoppelt an eine CCD-Mikroskopkamera (*charge coupled device*), eine Tubuslinse bildet das Primärbild auf dem CCD-Sensor der Kamera [224,229,249]. Die Bilder werden anschließend auf einen Computer übertragen und als virtuelle optische Schnitte gespeichert [58,249].

Durch die schrittweise Bewegung der Probe oder des Lichtblattes entlang der vertikalen z-Achse mit frei wählbaren Abständen werden Stapel optischer Gewebeschnitte generiert [58,63,224,249]. Die hohe Aufnahmerate (bis zu 50 Bilder pro Sekunde) ist die Grundlage für die dreidimensionale Darstellung von Gewebeproben in hoher Geschwindigkeit [228]. Die Ausrichtung der Probe innerhalb des Probenbehälters ist frei wähl- und veränderbar, sodass Bildstapel verschiedener Orientierung aufgenommen werden können [229,249]. Die nachteiligen Effekte der Lichtstreuung und abnehmenden Fluoreszenz in tieferen Gewebearealen auf die Bildqualität und dreidimensionale Rekonstruktion der Gewebeprobe können durch dieses Verfahren reduziert werden (z. B. durch das Erzielen einer höheren Auflösung) [229].

Mit der LSFM werden hochauflösende virtuelle optische Schnittbilder erzeugt. Diese stehen für weitere Analyseverfahren und/oder die dreidimensionale Rekonstruktion der Probe anhand des Stapels optischer Schnitte mittels entsprechender Software zur Verfügung [58,224]. Aufgrund der hohen Bildaufnahmerate, der hohen Auflösung und der Möglichkeit der Bildgebung über einen langen Zeitraum umfangreiche Datensätze. Es bedarf daher effizienter entstehen Datenverarbeitungsverfahren [58,227,239]. Für die dreidimensionale Visualisierung und die digitale Bildanalyse stehen zahlreiche, zum Teil kommerzielle Softwareangebote zur Verfügung, eine Aufzählung findet sich bei Feuchtinger et al. (2016) [58].

3.5.3 Quantitativ-morphologische Analysen mittels der Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie optisch geklärter Gewebeproben

Neben der (dreidimensionalen) Visualisierung komplexer Strukturen innerhalb biologischer Organ- oder Gewebeproben (z. B. der Mikrozirkulation), stellt die LSFM optisch transparenter Gewebeproben einen eleganten Ansatz für die Quantifizierung verschiedener morphologischer Parameter dar [59-65]. Um akkurate Ergebnisse zu erzielen, müssen prozessierungsbedingte Effekte wie die mechanische Deformation/Kompression oder die auf einige Clearingverfahren zurückzuführende Gewebeschrumpfung [242,260] der Proben vermieden bzw. entsprechend in der Auswertung berücksichtigt werden (z. B. durch die Korrektur der Gewebeschrumpfung) [63,65]. Quantitativ-morphologische Analysen erfolgen anhand der aus dem z-Stapel optischer Schnitte rekonstruierten virtuellen dreidimensionalen Gewebeprobe. Es ist daher bei der Bestimmung von Volumina und weiterer quantifizierbarer Parameter von großer Bedeutung, dass die Strukturen und das Volumen der untersuchten Probe durch die digitale Rekonstruktion genau wiedergegeben werden. Verzerrungen (z. B. Stauchung oder Streckung) des rekonstruierten dreidimensionalen Bildes aufgrund probenund/oder sphärischer Aberrationsartefakte hardwarebedingter müssen entsprechend berücksichtigt und reduziert bzw. vermieden werden [261].

Der Abbildungsfehler aufgrund der linsen-, objektiv- und probenassoziierten sphärischen Aberration (SA) ist eine wichtige Einflussgröße. Die linsenassoziierte SA tritt auf, weil Lichtstrahlen bei dem Durchtritt durch eine sphärische Linse umso stärker gebrochen werden, je weiter sie von der optischen Achse entfernt sind. Sie

werden folglich auf verschiedene Punkte der optischen Achse fokussiert. Nichtlinsenassoziiert tritt SA auf, wenn Licht durch eine Grenzfläche zweier Medien oder Strukturen mit unterschiedlichen Refraktionsindices fällt. Dies kann beispielsweise bei ungenügender Anpassung der RIs innerhalb der Gewebeprobe durch das angewendete Clearingverfahren, bei unterschiedlichen RIs von Probe und Immersionsmedium und/oder der Verwendung von Trockenobjektiven oder nicht-RI-optimierten Objektiven der Fall sein [227,261]. Die SA hat verschiedene nachteilige Effekte auf die Bildgebung. Zum einen führt sie zu einer Unschärfe der Bilder. Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv, Auflösungsvermögen (numerische Apertur (NA)) und der RI-Abweichung zwischen der Gewebeprobe, dem Immersionsmedium und dem Medium, welches sich zwischen Immersionsmedium und Linsenoberfläche befindet, kann es zudem zu einer Verschiebung der nominalen Fokusebene kommen [261]. Die Abweichung zwischen den nominalen und tatsächlichen Abständen der optischen Schnitte des z-Stapels ist für die dreidimensionale Bildgebung von besonderer Bedeutung. Sie entsteht, wenn die Distanz, die die Probe zwischen der Aufnahme zweier Bilder entlang der z-Achse durch das Lichtblatt zurücklegt, nicht den Abständen der virtuellen optischen Schnittbilder des z-Stapels entspricht. Folge kann eine Verzerrung durch die artifizielle axiale Stauchung oder Streckung der dreidimensionalen Rekonstruktion sein [227,261,262].

Verzerrungsartefakte und Bildunschärfe lassen sich durch die Verwendung adäguater Clearingverfahren und Immersionsmedien vermeiden bzw. reduzieren. SA ist zudem abhängig von der Auswahl des Mikroskopobjektivs. Durch die Verwendung geeigneter Tauchlinsen oder SA-korrigierter Objektive können die RI-Differenzen zwischen dem Immersionsmedium, Luft der zwischen Immersionsmedium und Linsenoberfläche und der Linsenoberfläche selbst kompensiert werden [227,261]. Zusätzlich kann die Methode zur dreidimensionalen Rekonstruktion einer Gewebeprobe durch die Analyse von Testobjekten mit ähnlichen Charakteristika (Form, Volumen, RI, etc.) unter Verwendung der gleichen Geräteeinstellungen validiert werden [63].

4 PUBLIKATION

Fiedler S, Wünnemann H, Hofmann I, Theobalt N, Feuchtinger A, Walch A, Schwaiger J, Wanke R, Blutke A (2020). A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies. PLoS One. 15(12):e0243462.

DOI: 10.1371/journal.pone.0243462

Die Nummerierung der einzelnen Abschnitte in der nachfolgenden Veröffentlichung ist unabhängig von der Kapitelnummerierung in der vorliegenden Dissertationsschrift.

PLOS ONE



A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies

Sonja Fiedler¹, Hannah Wünnemann², Isabel Hofmann⊚¹, Natalie Theobalt¹, Annette Feuchtinger³, Axel Walch³, Julia Schwaiger², Rüdiger Wanke¹, Andreas Blutke⊚³*

- 1 Institute of Veterinary Pathology at the Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, 2 Unit 73 Aquatic Ecotoxicology, Microbial Ecology, Bavarian Environment Agency, Wielenbach, Germany, 3 Research Unit Analytical Pathology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany
- * andreas.parzefall@helmholtz-muenchen.de



OPEN ACCESS

Citation: Fiedler S, Wünnemann H, Hofmann I, Theobalt N, Feuchtinger A, Walch A, et al. (2020) A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies. PLoS ONE 15(12): e0243462. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0243462

Editor: Konradin Metze, University of Campinas, BRAZII.

Received: June 29, 2020

Accepted: November 21, 2020

Published: December 9, 2020

Copyright: © 2020 Fiedler et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files

Funding: SF, IH, and NT received a PhD scholarship from the Hanns-Seidel-Stiftung e.V., using funds of the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) are frequently used as experimental animals in ecotoxicological studies, in which they are experimentally exposed to defined concentrations of test substances, such as heavy metals, pesticides, or pharmaceuticals. Following exposure to a broad variety of aquatic pollutants, early morphologically detectable toxic effects often manifest in alterations of the gills. Suitable methods for an accurate and unbiased quantitative characterization of the type and the extent of morphological gill alterations are therefore essential prerequisites for recognition, objective evaluation and comparison of the severity of gill lesions. The aim of the present guidelines is to provide practicable, standardized and detailed protocols for the application of unbiased quantitative stereological analyses of relevant morphological parameters of the gills of rainbow trout. These gill parameters inter alia include the total volume of the primary and secondary gill lamellae, the surface area of the secondary gill lamellae epithelium (i.e., the respiratory surface) and the thickness of the diffusion barrier. The featured protocols are adapted to fish of frequently used body size classes (300-2000 g). They include well-established, conventional sampling methods, probes and test systems for unbiased quantitative stereological analyses of lightand electron microscopic 2-D gill sections, as well as the application of modern 3-D light sheet fluorescence microscopy (LSFM) of optically cleared gill samples as an innovative, fast and efficient quantitative morphological analysis approach. The methods shown here provide a basis for standardized and representative state-of-the-art quantitative morphological analyses of trout gills, ensuring the unbiasedness and reproducibility, as well as the intra- and inter-study comparability of analyses results. Their broad implementation will therefore significantly contribute to the reliable identification of no observed effect concentration (NOEC) limits in ecotoxicological studies and, moreover, to limit the number of experimental animals by reduction of unnecessary repetition of experiments.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

In ecotoxicological studies, the rainbow trout (O. mykiss) is frequently used as a sensitive experimental fish species to examine the effects of various surface water pollutants, including diverse chemicals, pharmaceuticals, heavy metals, as well as solid particles such as microplastic, on aquatic organisms [1-5]. In a typical experimental approach, different groups of fish are exposed to various concentrations of a test substance under defined experimental conditions [6]. The patterns and severities of observed (histo-) morphological organ/tissue alterations, combined with hematological analysis findings and clinical-chemical test results, are then used to define inter alia the no observed effect concentration (NOEC) of the examined test substance [4,6,7]. These findings often have far-reaching consequences, as they are included in risk assessment of test substances and regularly provide the basis for specification of the legal concentration limits of the substance in surface waters (predicted no effect concentration (PNEC)) [8-11]. Therefore, the comparability and reproducibility of analyses results of different ecotoxicological studies examining rainbow trout for detection of NOEC of a specific test substance are particularly important. However, there are some examples of aquatic toxicology studies examining the effects of exposure of rainbow trout to the same substance, in which the NOEC differs significantly over multiple orders of magnitude [4,7,12,13]. Histopathological diagnoses and, in particular, qualitative gradings of the severities of detected lesions often exhibit a substantial variability between different observers and different studies. This is especially relevant for the evaluation of histopathological alterations in experimental animals exposed to low concentrations of test substances, where lesions might be subtle and not manifested in all individuals, respectively in all examined samples of one animal [7,8,14]. Following exposure to a broad variety of different aquatic pollutants, early detectable morphological alterations in fish often tend to manifest in the gills due to their delicate histomorphology and continuous exposure to the ambient water [15-17]. Next to respiration, fish gills are also the primary site for osmoregulation, excretion of nitrogenous waste products and metabolism of hormones and xenobiotics [18]. Thus, histopathological gill lesions can serve as sensitive indicators of toxic effects of low exposure concentrations of aquatic pollutants [4,13,16,19]. Besides easily recognizable qualitative histomorphological gill lesions, such as fusion of adjacent secondary gill lamellae, thickening of filament tips, inflammatory cell infiltrations, focal cell proliferations and erosive/ulcerative lesions [3], relevant alterations also affect different quantitative morphological gill properties, which cannot be adequately assessed by microscopic examination alone [20-23].

Relevant quantitative parameters characterizing gill morphology *e.g.*, include the total volume of the secondary gill lamellae, the total surface area of the respiratory epithelium of the gills and the thickness of the diffusion barrier (*i.e.*, the distance between the epithelial cell surface and the capillary space in the secondary lamellae). In a given study, also any other quantitative morphological parameter might be of interest to characterize distinct histomorphological or ultrastructural gill alterations, including, but not limited to *e.g.*, the total volume of an inflammatory infiltrate present in the gills, the total number and the mean cellular volume of a specific cell type, or the volumes of distinct cell organelles in a particular cell type. Due to the complex 3-D tissue-architecture of gills, these quantitative morphological parameters cannot adequately be determined in standard histological sections taken from a few deliberately chosen gill locations. Accurate, *i.e.*, precise and unbiased estimates of quantitative morphological gill parameters can be obtained using so-called "unbiased quantitative stereological analysis" methods and techniques, warranting for a reproducible and objective quantitative characterization of relevant organ alterations [8,14,24–26]. Using appropriate sampling designs, probes and test systems, quantitative stereological analyses examine two-

dimensional (2-D) histological sections to provide estimates of three-dimensional (3-D) morphological parameters (*i.e.*, volumes, surface areas, lengths, and numbers) of the examined tissue structures of interest with statistically defined error probabilities [24,25]. During the last five decades, quantitative stereological analysis techniques have been continuously refined and have become the generally accepted "gold standard" for objective quantification of morphological tissue properties in diverse life science disciplines [25,27,28]. By now, several scientific societies and high-impact journals have released editorial policies, demanding stereological analysis techniques for studies reporting quantitative morphological data of biological samples [27,29–32].

In the 70's, 80's and 90's of the past century, several early, basic research studies examined morphological gill parameters, such as the gill respiratory area or the oxygen diffusion barrier in diverse fish species, using simple morphometric analysis tools [20,33–35]. However, modern unbiased quantitative stereological analysis approaches have rarely been implemented to characterize morphological parameters of fish gills, including determination of the volume of interbranchial lymphoid tissue in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [36], volume- and numerical volume densities of the structural gill filament components of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [21], gill volume, surface and water-blood barrier thickness of the gills of South American lungfish (*Lepidosiren paradoxa*) [37], the Brasilian pirarucu (*Arapaima gigas*) [38,39], or the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalamus*) [40,41].

Due to considerable differences in the size of studied fish species and correspondingly the size of their gills, several of the previously described quantitative stereological analysis methods cannot practically be applied for examination of the gills of rainbow trout with body sizes of 300–2000 g, commonly used in ecotoxicological studies [42–46].

In the past decade, several "deep tissue imaging" methods based on examination of optically cleared (*i.e.*, transparent) samples by laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM) have been developed, allowing microscopic examination in 3-D without the necessity of preparation of 2-D histological sections [47–53]. Besides visualization of complex 3-D architectural tissue properties, such as *e.g.*, vascularization patterns [54,55], LSFM of optically cleared samples also provides an elegant, fast and effective approach for the quantification of diverse histomorphological parameters, thus holding a great potential for quantitative characterization of the morphology of gill samples [53,56–58]. However, qualitative or quantitative examinations of optically cleared gills by LSFM have not been reported so far.

Aim of the present article is to provide a comprehensive collection of practicable methods for unbiased quantification of relevant morphological parameters of rainbow trout gills, featuring both "classical" unbiased quantitative stereological sampling and analysis methods based on examination of light- and electron microscopic sections, as well as protocols for LSFM-based quantitative morphological analyses of optically cleared gills. The featured methods and protocols shown here provide a basis for standardized and representative state-of-the-art quantitative morphological analyses of trout gills in ecotoxicological studies, ensuring the unbiasedness and reproducibility as well as the inter- and intra-study comparability of analysis results. This will significantly contribute to reliably identify NOEC limits of aquatic pollutants and help to reduce the number of sacrificed fish in ecotoxicological studies by avoiding unnecessary repetitions of experiments.

Experimental fish, ethical statement

For development and demonstration of the methods shown in the present study, rainbow trout (O. mykiss) (n = 5) of both sexes and body weights ranging from 300 to 2000 g were sacrificed. For comparison of the analysis results of different quantitative morphological analysis

methods, gill samples of four different fish were used. The fish were obtained from the breeding facility of the Bavarian Environment Agency in Wielenbach, Germany. Fish were euthanized with tricaine methanesulphonate solution (500 mg/l, Tricaine Pharmaq 1000 mg/g (Pharmaq Ltd., United Kingdom)) and subsequent mechanical disruption of the brain after circulatory arrest, using a sharp 14 gauge cannula (Braun Sterican B.Braun Melsungen AG, Germany). The use of the fish in this study was approved by the institutional review board of the Institute for Veterinary Pathology at the Center for Clinical Veterinary Medicine of the Ludwig-Maximilians University Munich and performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and with permission of the local authorities.

Contents

Section 1 provides an initial, short introduction to the basic principles and methodological aspects of unbiased quantitative stereological analyses. Essential aspects of trout gill morphology, histology and ultrastructure are recapitulated in Section 2. Section 3 outlines the relevant quantitative morphological gill parameters. Sections 4–7 illustrate the work steps from gill-preserving killing to gill dissection and adequate processing for further analyses. Sections 8–15 sequentially guide through the sampling- and analysis procedures for quantitative stereological analysis of relevant morphological gill parameters. The application of LSFM of optically cleared gill samples in quantitative histomorphological analyses is described in Section 16.

Topic	Section	
Basic principles of unbiased quantitative stereological analyses	1	
Trout gill morphology and nomenclature	2	
Relevant quantitative stereological gill parameters	3	
General experimental design for quantitative stereological analyses of trout gill morphology in ecotoxicological studies		
Adequate killing methods for quantitative stereological gill analyses	5	
Vascular perfusion fixation of the gills	6	
Excision and fixation of the gills	7	
Determination of the gill filament volume	8	
Systematic uniform random (SUR) sampling of representative gill filament samples	9	
Randomization of the orientation of the sample section plane	10	
Determination of plastic embedding-related three-dimensional shrinkage of the gill filaments	11	
Estimation of volume densities and total volumes of distinct gill filament structures	12	
Estimation of the surface area of the secondary lamellae in the gill filaments	13	
Estimation of the total number, the total volume and the mean volume of epithelial cells in the secondary gill lamellae		
Determination of the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness in the secondary gill lamellae	15	
Laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM) of optically cleared samples and its application for quantitative morphological analyses of trout gills	16.1	
LSFM-based determination of volume- and surface area densities of secondary gill lamellae in the gill filaments	16.2	

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.t001

1. Basic principles of unbiased quantitative stereological analyses

Commonly applied quantitative stereological analysis approaches follow few fundamental principles, which are briefly outlined below and schematically illustrated in Fig 1. Quantifiable morphological tissue parameters generally comprise volumes, surface areas, lengths and

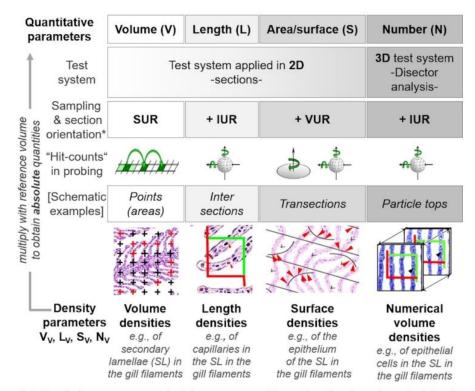


Fig 1. Quantitative parameters, stereological test systems, sampling, section orientation and stereological probes in quantitative stereological analyses. Volume densities ($V_{V(structure\ of\ interest/reference\ space)}$), length densities ($L_{V(structure\ of\ interest/reference\ space)}$), (structure of interest/reference space)) and surface area densities (S_{V(structure of interest/reference space)}) are estimated in representative, systematically uniform random (SUR) sampled 2-D sections of the reference space. Volume densities are deduced from the fractional areas of the structure of interest and the reference space, determined e.g., by point counting. Length densities are estimated on isotropic uniform random (IUR) sections from the number of intersections of the structure of interest with the section area. (Note that the present guidelines do not cover quantitative stereological estimation of length parameters of gill structures. Determination of the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness in the secondary lamellae (SL) is described in Section 15.) For estimation of surface area densities, the number of interactions of the examined surface area with appropriate stereological probes is counted in vertical uniform random (VUR) sections. Estimation of numerical volume densities (N_{V(structure of interest/reference space)}) requires 3-D test systems, such as the physical disector, to sample and count particles. A physical disector is a stereological probe used for unbiased counting and sampling of particles. It consists of two parallel histological sections (a reference section and a look-up section) with a defined distance, thus defining a known tissue volume. Particles that are sectioned in the reference section, but not in the look-up section are counted (Q'), using the unbiased counting frame. Estimation of $N_{V(structure of interest/reference space)}$ using the physical disector is described in detail in Section 14. Absolute quantities of volumes, lengths, surfaces and numbers are obtained from the respective densities and the total reference space volume. Mean particle volumes are calculated from their volume densities and their numerical volume densities in the reference space, as described in Section 14. *The section plane orientation illustrated for the corresponding parameters is highly recommended, but there are several options for most morphological parameters regarding the orientation of the section plane.

numbers of tissue structures within the organ, tissue, or organ compartment harboring these structures (*i.e.*, the reference compartment). Quantification of these 3-D morphological parameters is achieved by analysis of representative (2-D) histological sections of the reference compartment [25,26].

Systematic uniform random sampling (SURS) methods are used to generate a sufficient number of representative samples from the entire reference compartment, adequately reflecting the quantitative morphological parameters of interest in the examined organ/tissue. To

warrant unbiased analysis results, appropriate random sampling procedures are applied on all hierarchical sampling levels, *i.e.*, sampling of the histological sections cut from the blocks of embedded specimens as well as sampling of the test fields to be examined within these sections [26,59]. The dimensional reduction that is associated with the examination of 2-D sections of 3-D tissue structures, is inevitably associated with a loss of structural information: in 2-D sections, 3-D volumes will be represented as areas, surfaces present as transection lines and lengths as intersection points with the section plane, whereas the number of particles in a 3-D reference volume has no direct equivalent in a 2-D section [14,25,60]. Moreover, the areas, shapes and number of (anisotropic) 3-D particles in 2-D sections, as well as the lengths of transections of surfaces or the number of intersections of lengths within the plane of a histological section generally depend on the orientation of the section plane relative to the sectioned sample, as well as on the sizes, shapes and the spatial distributions of the sectioned structures within the reference compartment [8,25,26,60]. Finally, quantitative stereological determination of surface areas, lengths and particle numbers is affected by the tissue shrinkage that occurs during the histological embedding process of the specimen [26,60,61].

In quantitative stereological analyses these issues are addressed by analysis of 2-D histological sections with randomly oriented section planes (isotropic uniform random (IUR) or vertical uniform random (VUR) sections) [14,24,62], by using suitable histological (plastic-) embedding media allowing for estimation and correction of embedding-related tissue shrinkage, using the linear tissue shrinkage correction factor f_s [26,60,63,64], and by appropriate stereological probes and test systems for analysis of the sections [24,65]. Table 1 provides a brief summary of the appropriate sample section plane orientations, embedding media and adequate tissue shrinkage correction factors for the relevant quantitative morphological parameters.

Table 1. Adequate sample section plane orientation, embedding medium and tissue shrinkage correction factor (f_s) for different quantitative morphological parameters.

Parameter	Section plane orientation	Embedding medium	f_s	
Volume density $(V_{V(X/Y)})^a$	Arbitrary, VUR, IUR	Paraffin, plastic resin	-	
Surface area density $(S_{V(X/Y)})^b$	VUR, IUR	Plastic resin ^e	fs	
Length density (L _{V(X/Y)}) ^c	IUR	Plastic resin ^e	f _s ²	
Numerical volume density $(N_{V(X/Y)})^d$	Arbitrary, VUR, IUR	Plastic resin ^e	f _s ³	

 $^{\mathrm{a}}\mathrm{V}_{\mathrm{V(X/Y)}}$, the volume density of a tissue compartment or cell type within the reference compartment can be determined using arbitrary-, VUR- or IUR sections of SUR sampled specimen. As a dimensionless parameter, volume densities are generally independent of the effect of (homogenous, *i.e.*, an overall equal extent of embedding-related tissue shrinkage of different histological gill structures) embedding-related tissue shrinkage, so embedding in plastic resin medium or paraffin wax is appropriate and no correction for embedding-related tissue shrinkage is performed. X: Structure of interest, Y: Reference compartment.

^bEstimation of $S_{V(X/Y)}$ is principally feasible in VUR- or IUR sections of plastic resin-embedded samples. As a shrinkage-sensitive parameter, $S_{V(X/Y)}$ needs to be corrected for embedding-related tissue shrinkage, *i.e.*, it needs to be multiplied by f_s .

Estimation of $L_{V(X/Y)}$ has to be performed on IUR sections of plastic resin-embedded samples. As a shrinkage-sensitive parameter, $L_{V(X/Y)}$ needs to be multiplied by f_s^2 for correction of embedding-related tissue shrinkage. dEstimation of $N_{V(X/Y)}$ is feasible in arbitrary-, VUR- or IUR sections of plastic resin-embedded specimen, $N_{V(X/Y)}$ as a shrinkage-sensitive parameter needs to be multiplied by f_s^3 for embedding-related tissue shrinkage correction. eEstimation of $S_{V(X/Y)}$, $L_{V(X/Y)}$ and $N_{V(X/Y)}$ is also possible using paraffin as embedding medium [66], however it is not recommended due to the paraffin embedding-related pronounced tissue deformation. For details, the interested reader is referred to several excellent publications [14,24–26,62,67,68].

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.t002

In the outlined experimental approach (Section 4), the analysis of histological sections yields relative quantities of the examined morphological parameter per volume unit of the reference compartment (i.e., volume-, surface area-, length densities and numerical volume densities). Interpretation of these relative parameters alone, however, may be inconclusive, since changed densities may result from changes of the target structures, as well as from altered volumes of the reference compartments, or both, which is referred to as the "reference trap" [25,67]. The eventually relevant data, i.e., the absolute quantities of volumes, surface areas, lengths or numbers of the examined tissue structures of interest, are calculated by multiplication of the respective density parameter by the volume of the complete reference compartment [24,67]. Therefore, determination of the reference compartment's volume must not be omitted [69,70]. Since determination of different quantitative morphological parameters may require different sampling designs, special sample processing procedures and histotechniques, as well as application of distinct stereological test systems, an adequate planning of the sampling strategy in advance is essential in any quantitative stereological study [70]. For a more detailed discussion of the general principles of quantitative stereology, the interested reader is referred to the standard textbooks of stereology and several excellent reviews of quantitative stereological analyses in biomedical research [25,26,32,71].

2. Trout gill morphology and nomenclature

Analyses of qualitative and quantitative histomorphological gill alterations require consideration of the physiological functions and the complex 3-D gill architecture, which are briefly recapitulated here and illustrated in **Figs 2–4** and **S1**. As a teleost freshwater fish species, the rainbow trout possesses four pairs of gills (*holobranchs*) (I-IV, from rostral to caudal, the pseudobranch is not taken into account here) [18,72]. Each holobranch is composed of a bony gill arch, bearing gill rakers on its rostral concave margin and hemibranchs (*i.e.*, two rows of gill filaments) on its caudal convex margin (**Figs 2** and **S1**). In trout, the hemibranchs are supported by an interbranchial septum that extends from the basis of the filaments up to 60% of the gill filament length and contains lymphoid tissue [72,73]. Each gill filament (*primary*

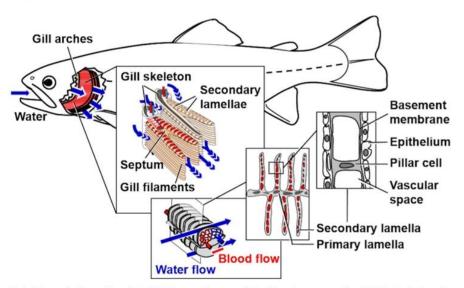


Fig 2. Schematic illustration of the 3-D histo-architecture of the gills and corresponding 2-D histological sections. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g002

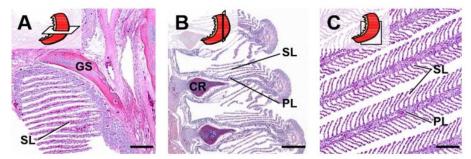


Fig 3. Appearance of histological gill section profiles in different section plane orientations (schematically indicated). A. Transverse section. B. Frontal section. C. Sagittal section. Important morphological structures are indicated: GS: Gill arch support skeleton, CR: Cartilage rod, PL: Primary gill lamellae, SL: Secondary gill lamellae. Haematoxylin and Eosin (HE)-stained sections of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) gills. Bars = 200 µm.

lamella) is supported by a cartilaginous rod and bears numerous, parallel oriented, delicate respiratory lamellae (secondary lamella) originating from the dorsal and ventral side of the primary lamella. Representing the functional unit of the gills, the secondary lamella is the site of gas and ion exchange as well as metabolism of diverse endogenous and exogenous substances [18]. In histological gill sections, we define the border between the secondary and the primary lamellae by an imaginary line tangential to the epithelial surface of the primary lamella between two adjacent secondary lamellae at the transition of the multilayered primary lamella epithelium into the thinner epithelium covering the secondary lamellae [74] (Fig 4A). The respiratory surface area is increased by forming plate-like secondary lamellae which are composed of complex vascular networks defined by pillar cells and an epithelium composed of different specialized cell types, mainly pavement-, but also e.g., chloride- or goblet cells [74]. The gas exchange barrier (Figs 2 and 4C) between the water and the vascular spaces consists of the secondary lamellar gill epithelium, its basement membrane and the pillar cell flanges delimiting the lamellar blood spaces, endothelial cells are only partially present as lining of the marginal channel [33,72]. The perfusion of the secondary lamellae is regulated by contraction of the pillar cells and varies in response to e.g., stress, hypoxia or increased activity [75]. As

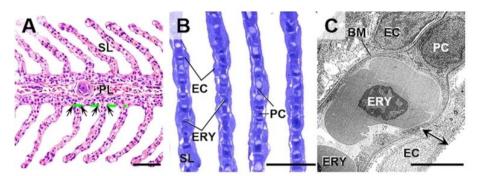


Fig 4. Gill histomorphology and ultrastructure. Important morphological structures are indicated: PL: Primary gill lamellae, SL: Secondary gill lamellae, PC: Pillar cell, EC: Epithelial cell, ERY: Nucleated erythrocyte inside a SL-capillary, BM: Basement membrane of the SL-capillary. A, B. Light-microscopic histomorphology of gill filaments (sagittal section). A. The anatomical border between the SL and the PL is indicated by arrows and a dashed green line. FFPE. HE. B. Semithin section of Epon-embedded gill filaments. Toluidine blue (TB) staining. Bars = $50 \mu m$. C. Ultrastructure of the secondary gill lamella. The oxygen diffusion barrier between the epithelial surface of the SL and the capillary lumen is indicated by a double arrow. Transmission electron micrograph. Bar = $5 \mu m$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g004

indicated in **Figs 2** and **S1**, the water flows from the buccal chamber into the opercular chamber, passing between the secondary lamellae. The flow rates of water perfusing the gills at a time differ between fish species as well as between individual gills and different parts of one gill, and can be regulated (*e.g.*, by opercular movement) depending on the current oxygen demand of the fish. Within the vascular network of the secondary lamellae, the direction of blood flow is opposed to the direction of the water flow. Due to this counter-current principle, the large surface of the secondary lamellae, the short oxygen diffusion distance as well as the adaptive regulation of water perfusion through different gill regions, the gas exchange at the secondary lamellar epithelium is highly efficient [18,72,76].

Due to the highly anisotropic 3-D architecture of the gills (*i.e.*, the strictly directed spatial orientations and positional relations of different structural elements), the presentation of different gill structures in histological (2-D) sections strongly depends on the position and the 3-D orientation of the section plane relative to the sectioned gill specimen, as illustrated in Fig 3.

3. Relevant quantitative stereological gill parameters

The present guidelines feature approaches for the determination of selected quantitative stereological parameters (listed in Table 2), which are highly relevant for the detection and characterization of (trout) gill lesions in ecotoxicological studies.

These morphological parameters are directly related to physiologically relevant gill functions such as the capacity of gas or ion exchange (*i.e.*, the respiratory surface or the thickness of the diffusion barrier), or to common pathophysiological reaction patterns of gills exposed to different noxious agents (*e.g.*, proliferation or loss of cells in the gill epithelium, characterized by the total number of cells). Previous studies have shown that the exposure to aquatic pollutants and diverse chemical compounds frequently manifests in a large variety of histopathological gill alterations and associated changes in the featured quantitative morphological gill parameters [3,16,33,76,77]. They can therefore be used as sensitive indicators of toxic effects of aquatic xenobiotics in ecotoxicological studies, as well as for the objective quantification and comparison of the extent of defined gill lesions in different (ecotoxicological and non-ecotoxicological) experimental settings or the quantification of morphological gill parameters in non-pathological experiments. Using the analysis protocols described below, values for $V_{\rm (GE)}$, $V_{\rm V}$ ($V_{\rm (SL/GF)}$, $V_{\rm (SL/GF)}$, $V_{\rm (SL,GF)}$,

Table 2. Relevant quantitative stereological gill parameters.

Parameters	Abbreviation	
Total gill filament (GF) volume	$V_{(GF)}$	
Volume density of secondary lamellae (SL) in the GF	V _{V(SL/GF)}	
Total volume of SL in the GF	V _(SL,GF)	
Surface area density of the SL in the GF	S _{V(SL/GF)}	
Total surface area of SL in the GF	S _(SL,GF)	
Volume density of epithelial cells (EC) in the SL	$V_{V(EC/SL)}$	
Total volume of EC in the SL	$V_{(EC,SL)}$	
Numerical volume density of the EC in the SL	N _{V(EC/SL)}	
Total number of EC in the SL	N _(EC,SL)	
Mean cellular volume of EC in the SL	$\overline{\tilde{v}}_{(EC,SL)}$	
True harmonic mean of the diffusion barrier (DB) thickness of the SL	$T_{h(DB)}$	

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.t003

methods and to evaluate the results of the methods with quantitative morphological analysis results based on laser light sheet fluorescence microscopic (LSFM) examination of gill filament samples (Section 16).

4. General experimental design for quantitative stereological analyses of trout gill morphology in ecotoxicological studies

To provide accurate estimates of quantitative morphological tissue parameters, any quantitative stereological study essentially depends on an appropriate experimental sampling design. The sampling design has to consider the determination of the volume of the reference compartment of interest (e.g., the total gill filament volume), the application of efficient approaches for random sampling of organ/tissue locations, histological sections and section test fields, as well as appropriate methods for the randomization of the 3-D orientation of the section planes and for consideration of tissue shrinkage related to the histological embedding process [70]. Depending on the analysis parameter(s) of interest (Tables 1 and 2), different stereological test systems and probes (Fig 1) are required and, correspondingly, also different histotechniques and sample processing steps must be applied (paraffin- or plastic-embedding media, light-(LM) or electron microscopy (EM)). Since inappropriately processed samples can generally not be used for retrospective analyses of quantitative stereological parameters, the experimental sampling and analysis design of a stereological study must consider all these eventualities in advance. A detailed schematic overview of an experimental study design, covering all the relevant quantitative morphological gill parameters listed in Table 2, is provided in Fig 5. This design can be individually adapted to the requirements of a given study. From Fig 5 it is evident that volumetry and SUR sampling of the gill filaments is mandatory, whereas randomization of the section plane orientation and tissue shrinkage correction, the choice of the appropriate histological embedding medium and the subsequent stereological analysis procedures depend on the individual morphological parameter(s). For estimation of quantitative morphological parameters that are shrinkage-sensitive and/or require generation of thin sections with verifiable thicknesses (S_(SL,GF), N_(EC,SL), $\bar{v}_{(EC,SL)}$, $T_{h(DB)}$), samples are embedded in plastic resin-based embedding media, such as glycol methacrylate/methyl methacrylate (i.e., GMA/MMA) [78] or epoxy resin (Epon, aka Glycid ether 100; Serva, USA). Compared to paraffin, embedding in plastic resins causes less and more homogenous 3-D tissue shrinkage and allows for sectioning of thinner sections with consistent thicknesses [14,64,79,80]. Plasticembedding media are therefore often preferred in quantitative stereological studies [14]. In contrast, estimation of volume density parameters (e.g., V_{V(SL/GF)}) is largely independent of embedding-related (homogenous) tissue shrinkage and can therefore be performed using paraffin sections [25,26]. Estimation of volume- and numerical volume density in SUR sampled specimen is independent of the orientation of the samples and can be performed in arbitrarily oriented sections [26]. Estimation of surface area- and length density parameters requires generation of sections with randomly oriented section planes [24,25], such as VUR- or IUR sections (Section 10, Table 1).

Independent of the parameter(s) of interest in a given study, it is in any case strongly recommended to sample and process a sufficient number of supplementary gill samples suitable for analysis of additional quantitative stereological parameters, which might be of interest in the later course of the experiment.

5. Adequate killing methods for quantitative stereological gill analyses

The chosen killing method has to conform to the applicable legal animal welfare regulations and must not interfere with the analysis of the experimental results [81,82]. For morphological

General experimental design for quantitative stereological analyses of trout gill morphology in ecotoxicological studies

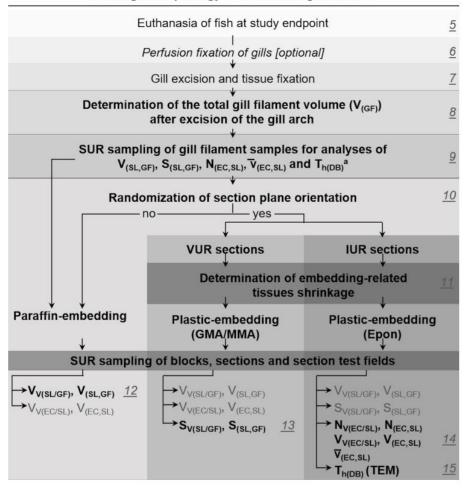


Fig 5. General experimental design for quantitative stereological analyses of trout gill morphology in ecotoxicological studies. The paper sections containing the respective sample processing and analysis steps are indicated (5–15). At the end point of the study, fish are euthanized, using a gill-preserving killing method (Section 5). Optional perfusion fixation, excision-, fixation- and volumetry of gills after removal of the gill arch are described in Sections 6–8. Section 9 presents the systematic uniform random (SUR) sampling of representative gill filament specimens for stereological analyses. "After SUR sampling of the specimens, it is strongly recommended to store the remaining fixed gills and not discard them until final completion of the study. The subsequent processing steps and analysis methods depend on the individual quantitative stereological parameters of interest (Sections 10–15).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g005

gill analysis, physical killing methods damaging the gills, such as the commonly used "blow-on-the-head" that often leads to gill hemorrhage, should be avoided. Instead, killing by immersion exposure to overdosed anesthetics, such as buffered tricaine methanesulphonate solution (500 mg/l; pH 6–8.5; Tricaine Pharmaq $^{\text{\tiny IR}}$ 1000 mg/g (Pharmaq Ltd., United Kingdom)) (if compatible with the given study [83,84]) and securing of the euthanasia by subsequent mechanical brain destruction (*e.g.*, by a thick, sharp trocar) or bleeding (throat-cut) can be recommended.

6. Vascular perfusion fixation of the gills

In various experimental medical research disciplines, vascular perfusion fixation of organs and tissues of laboratory animals is standardly used to generate samples for subsequent morphological analyses [85-89]. For quantitative stereological analyses, vascular perfusion fixation is often particularly advantageous, since it removes all cellular blood compartments from the vasculature and causes an *in situ* fixation of the tissue (histo-) morphology and ultrastructure [90,91]. In ecotoxicological studies using trout, vascular perfusion fixation is, for example, used for examination of the liver [92,93] or kidney [94,95]. Vascular perfusion fixation has also frequently been used in several morphometric studies examining the physiology or histomorphology of gills originating from fish of diverse species [37,96]. For vascular perfusion fixation of rainbow trout gills a cardiac perfusion technique is recommendable, whereas retrograde vascular perfusion through the dorsal aorta is often insufficient [97]. The technique of cardiac perfusion fixation of trout gills is comprehensively described and illustrated in S2 Fig and elsewhere [97]. However, if not performed properly, vascular perfusion fixation can easily cause severe artifacts in the delicate gills (e.g., epithelial detachment from the SL due to inadequately high perfusion pressures and flow rates) and substantially impede subsequent qualitative and quantitative morphological analysis (S3 and S4 Figs). Since the quantitative stereological gill parameters featured here can be reliably determined in non-perfusion fixed gills as well, vascular perfusion fixation is not unconditionally recommended for quantitative morphological analysis of the gills.

7. Excision and fixation of the gills

With regard to the fragile histo-architecture of the secondary lamellae, preparation of the gills should be performed immediately after killing. A practicable gill excision technique and subsequent preparation of the gills is illustrated in Fig 6. Using scissors, the peritoneal cavity is opened in cranio-caudal direction by a longitudinal incision in the ventral midline, starting with a transverse incision of skin and muscles just behind the pectoral fins. The incision is extended cranio-dorsally to the opercular chamber (with severing of the cleithrum) (Fig 6A and 6B). The operculum is removed and the sectioning is proceeded cranially along the medial margins of the mandibular arches. The same procedure is repeated on the other side of the body. The bottom of the oral cavity is severed cranially of the tongue. Then, the dorsal connection of the bony gill skeleton with the viscero-cranium is also cut through (Fig 6C and 6D). Subsequently, the esophagus is severed and the entire gill apparatus (together with the heart, adhering parts of the flank and the cranial aspect of the esophagus) is then removed by gently pulling the gill arches in ventral direction (Fig 6C and 6D). After removal of the heart and the adjacent muscle tissue, the gills are immediately transferred to neutrally buffered 4% formaldehyde solution (or glutaraldehyde, if appropriate) and fixed for 36 to 48 h at room temperature with gentle agitation.

The filamentous part of the gills represents the appropriate reference compartment that has to be sampled for subsequent quantitative stereological analyses, as far as all relevant quantitative morphological gill parameters refer to gill structures which are only present in the filamentous compartment (*i.e.*, primary and secondary lamellae). For subsequent analyses the fixed gills are therefore separated and the gill arches with rakers, bones and adherent (non-gill) soft tissues are removed, leaving two rows of gill filaments (*hemibranchs*), connected by the interbranchial septum (for convenience, hereinafter referred to as gill filaments (GF)).

8. Determination of the gill filament volume

The total volume of the gill filaments ($V_{(GF)}$) is one of the most important parameters in any quantitative stereological study of fish gills, since it provides the reference volume which is

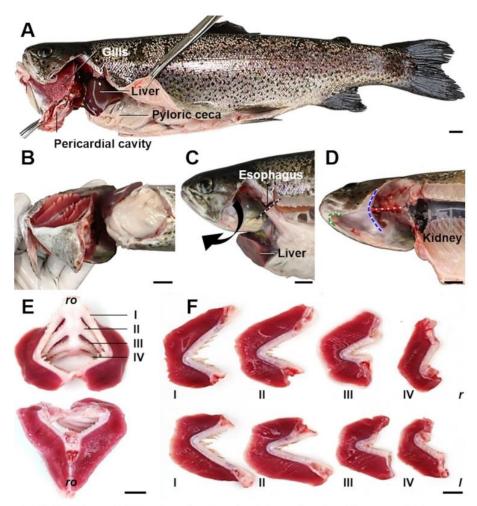


Fig 6. Excision of trout gills. Using scissors, the peritoneal cavity is opened, starting with a transverse incision ventro-caudal to the base of the pectoral fins (B). This incision is elongated caudally along the ventral midline, up to a few millimeters cranial of the anogenital papilla (A). Just behind the pectoral fins and the cleithrum, the incision is continued in dorso-cranial direction, ending in the opercular chamber by severing the cleithrum (A). Then, the operculum is removed and the ventral part of the gill basket is disconnected from the viscerocranium (in D, the orientation of the incision line is indicated by a green dotted line). The dorso-cranial connection between the gill basket and the skull is disconnected by severing the rostral pharyngobranchial bones (indicated by a blue dotted line in D). Subsequently, the esophagus is cut through (indicated by a black dotted line in C), the dorsal connection between the gills and the skull is transected (indicated by a red dotted line in D) and the gill basket is removed from the body by gently pulling the gill arches in ventral direction (arrow in C). E. Dissected gill basket. Top: dorsal aspect. Gills I-IV are indicated. Bottom: ventral aspect. Rostral (ro). F. Dissected gill arches of the left (l) and right (r) side, prior to immersion fixation. Bars = 1 cm.

essential for calculation of all other absolute quantitative gill parameters (refer to **Sections 1** and **4**). Technically, $V_{(GF)}$ can be determined by different means, *e.g.*, by submersion of the GF sample in a liquid of known density (ρ). The weight of the liquid displaced by the submerged sample is measured and the corresponding liquid volume (*i.e.*, the sample volume) is calculated from the weight and the specific weight of the displaced liquid. The same approach is also used to determine the gill filament density (**Fig 7**), which can then be used to calculate the volumes of GF samples from their individual weights [25,26,63,69].

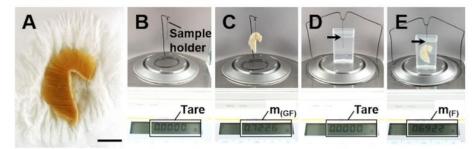


Fig 7. Determination of gill filament density and sample volume, using the submersion method (Archimedes'principle). A. Fixed gill after excision of the gill arch, briefly blotted dry on lab-paper towel to remove adhering liquid. B. Scale tared to the weight of the sample holder. C. Measurement of the GF sample weight $(m_{(GF)})$. D. Scale tared to the weight of a container filled with physiological saline or fixative of known density and the submerged sample holder. Note that the sample holder in ont placed on the scale sensor and does not have contact to the bottom or the walls of the container. The arrow indicates the position up to which the sample holder is submerged into the liquid. E. The sample is attached to the sample holder and completely submerged into the liquid up to the marked position on the sample holder. Note that the sample does not have contact to the bottom or the walls of the container. The weight of the fluid displaced by the GF sample $(m_{(F)})$ is recorded. The sample volume is calculated from the sample weight $(m_{(GF)})$ and the GF density $(\rho_{(GF)})$, using Eq 1.

The individual volume of a plastic medium-embedded GF sample can be determined from the histological GF profile areas measured in equidistant, parallel sections covering the entire (known) height of the embedded GF sample (principle of Cavalieri) [14,24,25]. This approach is used, *e.g.*, for determination of the extent of embedding-related tissue shrinkage, as described in **Section 11**.

For application of the submersion technique, the (fixed or fresh) GF specimen is gently dabbed dry, using a lab-paper towel to remove any liquid adhering to the gill filaments. Subsequently, the sample is weighed to the nearest mg. The volume of the sample is then determined from the volume of liquid of known density which is displaced by the completely submerged specimen (Eq 1), as illustrated in Fig 7E. A transparent container is filled with physiological saline ($\rho = 1.0046 \text{ g/cm}^3$ at room temperature) or fixation solution of known density and placed on the scale. A sample holder is submerged into the liquid to a defined position without any contact to the container or the scale, and the scale is then tared. The GF sample is attached to the sample holder and completely submerged up to the marked position on the sample holder. It is important to ensure that the submerged sample does not have contact to the walls or the bottom of the container. The weight of the liquid that is displaced by the submerged sample is recorded $(m_{(F)})$. The total volume of the GF sample $(V_{(GF)})$ and its density $(\rho_{(GF)})$ is calculated from the weight of the GF sample $(m_{(GF)})$ and the density $(\rho_{(F)})$ and weight of the displaced liquid $(m_{(F)})$ (Eq 1). In studies examining large numbers of fish, it is not necessary to determine the density of all individual GF samples. Instead, the average gill filament density is determined in an appropriate number of representative samples per experimental group and collectively used for calculation of the individual sample volumes from their individual weights [25].

Using the described technique, we determined the average gill filament density (formalinfixed) on 12 GF samples from healthy rainbow trout to account for 1.07 ± 0.02 g/cm³ (mean \pm standard deviation (SD)).

Eq 1. Calculation of the total gill filament volume (submersion method).

$$V_{(GF)} = m_{(GF)}/
ho_{(GF)}$$

V_(GF) Total volume of the gill filament (GF) sample

 $\mathbf{m}_{(GF)}$ Weight of the GF sample (blotted dry) $\mathbf{m}_{(F)}$ Weight of the fluid (F) displaced by the submerged GF sample $\mathbf{\rho}_{(GF)}$ Density of the GF sample $(\mathbf{\rho}_{(GF)} = \mathbf{m}_{(GF)}/V_{(gf)})$ $\mathbf{\rho}_{(F)}$ Fluid density at 20° C $\mathbf{V}_{(gf)}$ Volume of the fluid displaced by the submerged GF sample $(V_{(gf)} = \mathbf{m}_{(F)}/\mathbf{\rho}_{(F)})$

Due to their filamentous lamellar structure, gills do have an extraordinarily high waterbinding capacity. Volume determination of gill samples using the submersion technique may therefore be substantially biased by the amounts of liquid adhering to the gill filaments [69]. The volume of liquid attached to the (moist) gill sample must therefore be considered when the sample volume is determined and adequate removal of this liquid (without damaging the gills) must be guaranteed. The exact volume of liquid attached to a gill specimen can experimentally be determined by photometric measurement of the decrease of the concentration of a dyed liquid, which is diluted by the (unstained) liquid attached to a moist gill sample that is submerged in the dyed liquid. The experiment is illustrated and described in detail in \$5 and S6 Figs. Using this experimental approach, we tested the efficiency of the removal of the liquid attached to moist gill samples by gently dabbing the samples with lab-paper towels (Figs 7A, S6G). In seven tested gill samples, the volume of liquid adhering to the samples (determined as described above) and the volume of water that was removed from the samples by placing them on a lab-paper towel for approximately 10 seconds was not significantly different (mean deviation: $1.78 \pm 0.01\%$, p = 0.736, paired t-test). Therefore, the volume of gill samples can be adequately determined with the submersion technique, if the samples are carefully dabbed dry in advance.

9. Systematic uniform random (SUR) sampling of representative gill filament samples

After volume determination, gill filament (GF) (sub-) samples are taken for quantitative stereological analyses of the morphological parameters of interest. Assuming that the gills of the right and the left side do not differ systematically in their histo-architecture, it is sufficient to randomly sample either the left or the right gills (S1A Experimental data).

The generated GF samples must be representative, *i.e.*, adequately reflect the morphological properties of the entire reference compartment (*i.e.*, the entirety of gill filaments). Representative GF samples can be generated using efficient systematic uniform random (SUR) sampling designs [63,85,98], as described below. The applied SUR sampling design ensures that every possible location in the gill filaments is sampled with the same random probability, which is a crucial prerequisite to obtain precise and unbiased estimates of quantitative parameters in the subsequent stereological analyses [25,26,59,98].

SUR sampling of the reference compartment (GF) for subsequent quantitative stereological analyses of the volume fractions of the relevant quantitative gill parameters ($V_{V(SL/GF)}$, $S_{V(SL/GF)}$, $N_{V(EC/SL)}$) is described below and illustrated in **Fig 8B–8G**. The absolute quantitative parameters of distinct structures/cells of the gill filaments (*e.g.*, $V_{(SL,GF)}$, $S_{(SL,GF)}$, $N_{(EC,SL)}$) are calculated from their relative volume fractions and the total GF volume ($V_{(GF)}$). $V_{(GF)}$ is determined by submersion volumetry/weighing of the gill filaments after removal of the gill arch as described in **Section 8**.

To prevent a loss of gill filaments and to preserve the orientation of the primary gill lamellae in the excised specimen, it is recommended to stabilize the gill filaments by briefly dipping the gills in liquid agar prior to sampling. For SUR sampling, the gills are then placed on their opercular side and randomly overlaid with a cross-grid, printed on a transparent plastic. For SUR

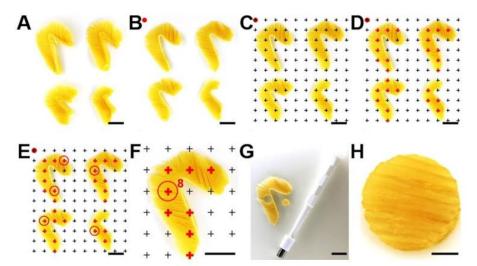


Fig 8. Systematic uniform random (SUR) sampling of representative gill filament samples. A. The 4 formalin-fixed gills of one side before the removal of the gill arches. B. After removal of the gill arches, the gills are placed on their opercular (*i.e.*, lateral) sides. Optionally, the GF are briefly dipped in liquid agar for stabilization. C. The GF are randomly superimposed with an appropriately sized cross-grid printed on a plastic transparency. Here, a 6 mm grid is used. To randomize the position of the grid relative to the gills, the upper left cross of the grid is placed over a random point outside of the GF (indicated by a red spot). D. All crosses hitting the GF are marked (red crosses). In the present example, 27 crosses hit the GF. E. The sampling interval (i) is defined by the number of crosses hitting the sampled reference compartment (n) and the number of SUR samples to be generated (s) for analysis of a specific quantitative stereological gill parameter (i = n/s). In the present example, \geq 5 samples are to be generated. Accordingly, every 5th position (27/5 = 5.4) where a cross hits the GF is sampled. The position of the first location to be sampled is determined randomly within the sampling interval (1-i; here position N*3), using a random number table/generator. Thus, in the present example 5 GF locations are SUR sampled (N*3, N*8, N*13, N*18, N*23), as indicated by red circles. (Counting proceeds from the left to the right and from top to bottom.) F. Detail enlargement of the second gill with the sampling location N*8, indicated by the red circle. G. SUR sampled GF sites are excised, using a 6 mm biopsy punch. H. Detail enlargement of an excised SUR sampled GF specimen. Bars = 1 cm in A-G and = 0.25 cm in H.

sampling of gill filaments in the gills of trout of approximately 300-2000 g of body weight, a cross grid with 4-6 mm lateral distance between two adjacent crosses can be recommended (depending on size of the gills, the diameter of the biopsy punch, and the percentage of the gill filaments that should be sampled). Copy templates of cross grids of diverse sizes can be found at Albl et al. [85] or Howard and Reed [25]. All crosses hitting the gill filaments are counted (a cross is counted as a hit if the right upper corner of the cross hits the gill filaments [26,63,85]), and sampling localizations are chosen systematically according to a defined sampling interval (i). The sampling interval (i) is defined by the number of crosses hitting the sampled reference compartment (n) and the number of SUR samples (s) to be generated (i = n/s). The numbers of samples recommended for analysis of different quantitative morphological gill parameters are given in Table 3. The first sampling location is determined randomly within the sampling interval (1-i) using a random number table/generator [24,25,63,85]. The sampled locations are marked, e.g., with blank paper confetti, and the samples are excised using a biopsy punch of 4.0-6.0 mm diameter (Stiefel Biopsy punch, SmithKline Beecham Ltd., United Kingdom). Subsequently, the SUR sampled GF specimens are differentially processed, according to the specific histo-technical requirements of the respective quantitative stereological analysis methods that are applied for examination of the different morphological parameters of interest (as illustrated in Fig 5). An alternative, efficient sampling and embedding procedure allowing for

Table 3. Recommended sampling design and sample number for quantitative stereological analysis of different morphological gill parameters.

Parameter	Number ^a of SUR samples	Sample processing		Paper Section
		Sample orientation	Embedding medium	
$V_{V(SL/GF)}$	5	Arbitrary	Paraffin ^b	12
$S_{V(SL/GF)}$	5	VUR ^c	GMA/MMA	13
$V_{V(EC/SL)}$, $N_{V(EC/SL)}$, $\bar{v}_{(EC,SL)}$	5	IUR ^d	Epon ^e	14
$T_{h(DB)}$	5	IUR	Epon	15

^aThe indicated sample numbers refer to the gills of one body side and represent orientation values based on a previous study, examining trout with body weights of ~300 g [99]. In a given study, the number of samples may have to be individually adapted to the specific experimental settings and examined parameters.

estimation of the gill volume and the gill surface area is comprehensively illustrated in da Costa et al. [38].

The generation of 5 GF samples of the four gills from either the left or the right side is considered as sufficient for an efficient, unbiased estimation of the relevant quantitative stereological gill parameters (total coefficient of variance (CV) = 1.7% [25]) (S1B Experimental data). However, a higher number of samples might be necessary in experimental settings where the distribution of lesions in the experimental group may be irregular.

10. Randomization of the orientation of the sample section plane

Quantitative stereological analyses of surface areas and lengths of distinct tissue structures in histological sections depend on the 3-D orientation of the analyzed tissue structures relative to the orientation of the 2-D section plane(s) [25,26]. Therefore, the spatial orientation of the analyzed sections (relative to the examined samples or *vice versa*) has to be randomized in quantitative stereological analyses of these parameters (**Tables 1** and **3**, **Figs 1** and **5**) [25,68].

For an efficient randomization of the orientation of a section plane cut through an individual sample, different methods have been developed [25,62,68,100,101]. In isotropic uniform random (IUR) sections, the orientation of the sample (respectively of the section plane cut through the sample) is randomized in all three dimensions of space, IUR sections can be used for analysis of all quantitative stereological parameters [14,24,68,102,103]. However, since the spatial orientation of each individual IUR section is completely random, the histological appearance of IUR sections is variable, and often divergent from the "familiar" histology the pathologist is used to [24]. This is especially relevant for organs with a highly anisotropic histo-architecture, such as fish gills (**Figs 2** and 3).

IUR sections can principally be generated using different approaches, such as the *Orientator* [63,85,101] or the *Ortrip* method [100]. For generation of IUR sections of (small) gill filament (GF) samples, the one-cut *Isector* method [68] has proven suitable, as illustrated in **Figs 9** and \$7. Generation of IUR sections with the *Isector* is reasonably easy: SUR sampled specimens are embedded in (isotropic) Epon spheres, using spherical casting molds. If electron microscopy is to be performed, the SUR sampled GF samples are previously trimmed to a size of $\sim 1 \text{ mm}^3$. After polymerization, the spherical sample is rolled across the workbench surface, stopped at a random position and sectioned at this position to receive an IUR section plane [63,85].

^bParaffin-embedding facilitates identification of distinct tissue structures or cell types by immunohistochemistry or special histological staining.

Estimation of $S_{V(SL/GF)}$ is performed on VUR sections, since a "preferred" sample orientation can be obtained thanks to the unrestricted choice of VA orientation. The estimation of $S_{V(X/Y)}$ on VUR sections is the method of choice for most design-based studies [25].

 $^{^{}d}$ The generation of IUR sections of SUR sampled and Epon-embedded GF samples is highly recommended for estimation of $N_{V(EC/SL)}$, since all other relevant quantitative morphological gill parameters can be estimated on these sections, if necessary.

^eEpon-embedding enables for preparation of semithin serial sections or ultrathin sections for TEM analysis.

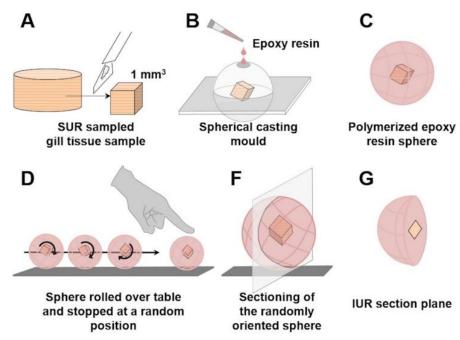


Fig 9. Generation of IUR sections of a SUR sampled gill filament specimen with the *Isector* method. A. A SUR sampled specimen of fixed gill filaments is carefully cut to a size of approximately $1 \text{ mm } \times 1 \text{ mm } \times 1 \text{ mm}$ (suitable for Epon-embedding and electron microscopy), preserving the secondary lamellae as structure of interest. **B.** The specimen is embedded in a sphere of epoxy resin, using a spherical casting mould. **C, D.** After polymerization of the embedding medium, the sphere is rolled across a flat surface and stopped at a random position. **F, G.** The sphere is sectioned at this random position, resulting in an IUR section plane.

Surface area densities, such as the surface area density of the secondary lamellae in the gill filaments (S_{V(SL/GF)}) can be efficiently analyzed in vertical uniform random (VUR) sections [62]. In VUR sections a fixed vertical axis (VA) of the sample is defined, by which the orientation of the section through the sample is only randomized in the two remaining directions of space. The VA can be freely chosen, as long as it is clearly recognizable in all sections. This allows generation of histological sections with a more "habitual" appearance, facilitating quantitative stereological analyses of surface area density parameters [62,104]. For generation of VUR sections of SUR sampled GF specimens, the technique shown in Figs 10 and S8 is recommended. SUR sampling of 5 GF specimens is performed as described in Section 9. VA is defined as the axis perpendicular to the gills placed on the flat workbench with their opercular side (i.e., the horizontal plane). The original orientation of the SUR GF samples (relative to the gill) is marked on paper confetti placed on the samples (Figs 10B and 10F and S8A-S8C). The excised samples are then systematically rotated around their VA in a predefined rotation interval (i) of 36° (i.e., 180°/5 SUR sampled specimens (s)), with the first sample being rotated at a random angle within the rotation interval (Figs 10C-10F and S8B and S8C). To receive VUR GF section planes, the systematically randomly rotated samples are vertically cut through (parallel to their VA) in their respective orientations (Figs 10E-10G and S8D and S8E). Maintaining the orientation of their VUR section planes, the samples are then embedded in a histological plastic embedding medium, sectioned and stained (Fig 10G-10I).

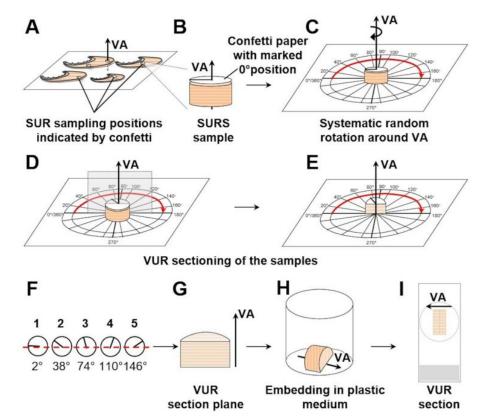


Fig 10. Generation of VUR sections of a SUR sampled gill filament sample. A. SUR sampling positions on the GF are marked by confetti paper. The vertical axis (VA) is indicated. B. SURS sample excised with a biopsy punch. The orientation of the sample relative to the gill is marked by a black line on the confetti paper (0°-180°-line). C. The sample is placed on an equiangular circle, corresponding to the 0°-180°-mark on the confetti paper. D-G. The first SURS specimen is randomly rotated around the VA by an angle between 0° and 36°, determined using a random number generator (here: 2°). The following four samples are systematically rotated around their VA in a predefined rotation interval of 36° (here: 38°, 74°, 110°, and 146°). The samples are sectioned at the corresponding positions (parallel to the VA). H. The samples are embedded in plastic medium (e.g., GMA/MMA), maintaining the orientation of their VUR section surfaces, the VA is still identifiable in light microscopy. I. The resulting histological sections are VUR sections, used for analysis of the surface area densities of the secondary gill lamellae in the gill filaments (S_{V(SL/GF)}), as described in Section 13.

11. Determination of plastic embedding-related three-dimensional shrinkage of the gill filaments

Embedding of samples and preparation of histological sections is generally associated with a 3-D shrinkage of the samples. The extent of shrinkage depends on the tissue, the embedding medium, as well as on the sample size and -volume [14,26,61,64]. Plastic-resins, such as GMA/MMA or Epon, are commonly used as histological embedding media for quantitative analyses of morphological tissue parameters affected by embedding-related tissue shrinkage, since the embedding-related tissue shrinkage is lower and more uniform, as compared to paraffin [14,61,64,79,80]. To obtain unbiased quantitative estimates of shrinkage-sensitive parameters, such as surface area-, length- and numerical volume densities, the extent of the embedding-related tissue shrinkage has to be considered in quantitative stereological studies [26]. The extent of the 3-D embedding-related tissue shrinkage is determined by comparing the sample

volumes before and after embedding (Fig 11). Assuming a uniform shrinkage in all three dimensions of space, the embedding-related shrinkage of solid tissue samples (e.g., liver) can conveniently be determined by comparison of the areas of corresponding organ/tissue section surfaces prior to and after embedding [63,64,80]. For gill samples, however, this approach is not applicable because of the microscopic lamellar architecture of the gill filaments (GF). Instead, the volumes of fixed GF samples are determined prior to and after embedding [71]. The volume of the fixed GF samples is determined directly from their weight and density (refer to Section 8 and Fig 11A-11D). The GF sample volume after embedding in a plastic embedding medium is determined according to the principle of Cavalieri [24,25,59]. For this purpose, the embedded samples are exhaustively sectioned (i.e., over the entire sample height) into equidistant, parallel sections (Fig 11E-11H). The volume of the embedded samples is calculated from the cumulative section profile area of the samples in all examined sections and the average distance between two consecutively examined sections (Eq 2). The GF section profile areas can be determined, e.g., by point counting, as shown in Fig 11J. The linear tissue shrinkage factor (f_s) used for shrinkage correction of quantitative stereological estimates of surface area-, length- and numerical volume densities is calculated according to Eq 3 [26,63], the adequate application of f_s for the relevant quantitative morphological parameters is given in Table 1.

Note that the extent of embedding-related tissue shrinkage does not have to be determined for each individual sample. Instead, the average extent of embedding-related shrinkage determined for identically processed samples of the same organ/tissue and a specific embedding medium are concordantly used for shrinkage correction in a given study. In own experiments, we determined f_s for formalin-fixed, GMA/MMA-embedded rainbow trout gill filaments to account for $f_s = 0.87$, corresponding to a volume shrinkage of 34.31% (S1C Experimental data).

Eq 2. Volume of plastic-embedded gill filament samples.

$$V_{(embedded~GF~samples)} = d imes \sum \! A_{(GF~sample~section~profiles)}$$

 $V_{(embedded\ GF\ samples)}$ Stereologically estimated volume of gill filament (GF) samples embedded in histological plastic embedding media

d Mean distance between two adjacent examined sections (d = h/n)

h Sample height (*i.e.*, the length of the sample axis perpendicular to section plane orientation, calculated from factual mean individual section thickness and total number of sections)

n Number of (parallel, equidistant) examined sections (*i.e.*, sections are SUR sampled for GF section profile area estimation by point counting in a predefined sampling interval)

 $\Sigma A_{(GF\ sample\ section\ profiles)}$ Cumulative sample section profile area of the gill filament samples in all examined sections per case

Eq 3. Linear tissue shrinkage factor for plastic-embedded gill filament samples.

$$f_{s}=\sqrt[3]{V_{(embedded~GF~samples)}/V_{(GF~samples)}}$$

f_s Linear tissue shrinkage factor

 $V_{(embedded\ GF\ samples)}$ Stereologically estimated volume of gill filament (GF) samples embedded in histological plastic embedding media

 $V_{(GF \ samples)}$ Volume of (fixed) GF samples prior to embedding

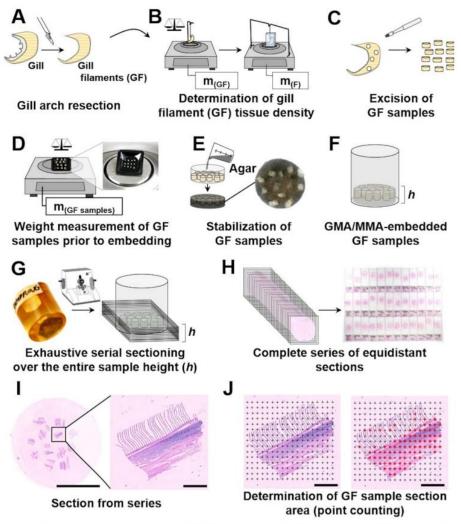


Fig 11. Determination of volume shrinkage of gill filaments due to embedding in plastic embedding media. A-D. Volume determination of SUR sampled GF samples prior to embedding. After dissection of the gill arch (A), the density of the (fixed) GF samples is determined (B). The GF samples are excised by biopsy punch of 0.2 cm diameter (C) and the samples weight is recorded (D). GF sample volume is calculated from GF density and sample weight (submersion technique, refer to Section 8 and Eq 1). E-H. Embedding of GF samples in plastic medium and exhaustive serial sectioning of the embedded samples. For stabilization and visual contrast, the GF samples are embedded in ink-dyed black agar (E) and subsequently routinely processed and embedded in plastic embedding medium (F) (here: GMA/MMA). The embedded samples are then exhaustively sectioned over the entire sample height (h) with a defined section thickness (G). From the section series (H), sections are taken in a defined interval (e.g., every 40th section) and mounted on a glass slide. The factual thicknesses of the individual sections are determined by spectral reflectance measurement (not shown) [80]. I-J. Determination of GF sample section areas in equidistant serial sections. The section profile areas of all samples in all examined sections are determined (here: point counting). Digital microscopic section images are randomly overlaid with a grid of equally spaced test points (crosses) of known distance at the given magnification (i.e., every point (P) is associated with a defined area (A)). The number of points hitting GF section profiles are counted. Since the entire height (h) of the GF samples was sectioned into equidistant, parallel sections, the volume of the embedded GF samples can be calculated according to the principle of Cavalieri [24,59,63], from the total section profile area of all samples in all sections ($A_{(GF\ sample\ section\ profiles)}$) and the mean distance between two examined sections (*i.e.*, section thickness x section interval). A (GF sample section profiles) is calculated from the total number of counted points (ΣP) and the area associated with each point (ΔP) (refer to Eqs 2 and 4). The proportional volume shrinkage of GF samples associated with the embedding in the histological plastic embedding medium is calculated from the quotient of the sample volume prior to and after embedding. The linear tissue shrinkage factor (fs)

for gill filaments embedded in plastic medium is calculated as shown in Eq 3. Bar = 1 cm in I (left image side) and = $500 \mu m$ in I (right image side) and J.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g011

12. Estimation of volume densities and total volumes of distinct gill filament structures

If appropriate SUR sampling designs are applied for the selection of sampled organ/tissue locations, blocks, sections and section areas, the volume densities of distinct gill structures (e.g., secondary lamellae) within their corresponding reference compartments (e.g., gill filaments) can unbiasedly be estimated from their section profile areas (principle of Delesse) [25,26,59,105]. According to Delesse, the unbiased estimate of the quotient of the section profile areas (estimated by point counting as illustrated in Section 11) of a structure of interest (X) and its corresponding reference compartment (Y) (i.e., the section area density $A_{A(X/Y)}$) is an unbiased estimate of the volume density $V_{V(X/Y)}$ (e.g., $V_{V(SL/GF)}$) (Eq 4) [25,26,105]. The total volume of the structure of interest is then calculated from its volume density in the reference compartment and the total volume of the reference compartment (Eq 5). The applied SUR sampling designs as well as the processing and analysis procedures featured in the present guidelines ensure that the estimates of the different volume density parameters are independent of the shape and distribution of both the gill reference compartments and the analyzed gill structures, despite the highly anisotropic spatial histo-architecture of the gills. Within the sampled sections and test fields, AA(X/Y) can be estimated by point counting, using points as non-direction sensitive stereological probes (Figs 11J and 12F) [25,26,59]. For this, the SUR sampled section test fields are randomly superimposed with a grid of equally spaced crosses (points). The number of points hitting section profiles of the structure of interest, as well as the number of points hitting the reference compartment within all examined test fields of all sections of all samples of a case are counted and used to calculate $A_{A(X/Y)}$ (Eq 4).

Eq 4. Volume densities of distinct gill structures.

$$V_{V(X/Y)} = A_{A(X/Y)} = \sum A_{(X)} / \sum A_{(Y)} = \sum P_{(X)} / \sum P_{(Y)} = P_{P(X/Y)}$$

 $V_{V(X/Y)}$ Volume density of the structure X in the reference compartment Y

 $A_{A(X/Y)}$ Area density of the structure X in the reference compartment Y

 $\Sigma A_{(X)}/\Sigma A_{(Y)}$ Quotient of the cumulative section area of the structure X in all examined reference compartment sections per case and the cumulative section area of the reference compartment Y in the same sections

 $\Sigma P_{(X)}/\Sigma P_{(Y)}$ Quotient of the total number of points hitting section profiles of the structure X in all examined sections per case and the total number of points hitting the reference compartment Y in the same sections

 $P_{P(X/Y)}$ Point density of the structure X in the reference compartment Y

Eq 5. Total volumes of distinct gill structures.

$$V_{\scriptscriptstyle (X,Y)} = V_{\scriptscriptstyle V(X/Y)} \times V_{\scriptscriptstyle (Y)}$$

 $V_{(X,Y)}$ Total volume of the structure X in the reference compartment Y

 $V_{V(X/Y)}$ Volume density of the structure X in the reference compartment Y

 $V_{(Y)}$ Total volume of the reference compartment Y

As a dimensionless parameter, volume densities are generally independent of the effect of embedding-related (homogenous) tissue shrinkage and can thus be analyzed in standard paraffin sections (Fig 12) [26]. This also facilitates the use of a variety of different histological stains, as well as identification of specific tissue structures by immunohistochemistry [106].

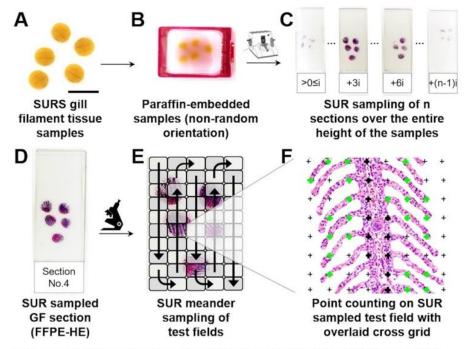


Fig 12. Estimation of the volume density of the secondary lamellae in the gill filaments. A. SUR sampled GF specimens (please compare to Section 9). B, C. SUR sampling of sections from samples embedded in paraffin in non-random orientation. B. Paraffin block with sagittally embedded GF samples. C. SUR sampling of sections. The entire block is exhaustively sectioned. For subsequent analyses, sections are taken in a defined sampling interval (i). The first section is randomly taken within the sampling interval ($>0 \le i$). D-G. Estimation of $V_{V(SL/GF)}$ by point counting. D. SUR sampled section of GF specimens. E. SUR sampling of test fields within the section, performed at a factor of magnification allowing for a reliable differentiation of PL and SL (e.g., 40x-100x microscopic magnification). All sampled sections per case are entirely screened, following a defined meander pattern and test fields are SUR sampled in a defined interval i (i.e., every ith field of view containing GF section profiles), with the first field of view being randomly selected within the sampling interval. F. SUR sampled test field overlaid with an appropriately sized cross grid (here: 8x8 points at 100x microscopic magnification). The number of points hitting GF section profiles ($P_{(GE)}$, indicated by bold crosses) in all sections per case are counted, as well as the number of points hitting SL section profiles ($V_{(SL/GF)}$) is calculated as the point density of $V_{(SL/GF)}$ and the GF volume $V_{(GE)}$. The total SL volume ($V_{(SL/GF)}$) is calculated as the product of $V_{V(SL/GF)}$ and the GF volume $V_{(GE)}$.

Therefore, if a randomization of the section plane orientation of SUR sampled gill filament (GF) specimens is not performed (Table 1, Fig 5), paraffin-embedded samples can be exhaustively sectioned in parallel, approximately equidistant sections of arbitrary orientation (for gill filaments, sagittal section plane orientation relative to the gill filaments may be convenient), and a subset of individual sections is systematically randomly sampled from the section series for subsequent estimation of $V_{V(X/Y)}$ (Fig 12C). In contrast, exhaustive sectioning and SUR sampling of sections from one sample block is not necessary, if $V_{V(X/Y)}$ is determined in VUR-or IUR sections of (plastic-embedded) GF samples, generated for estimation of additional quantitative morphological gill parameters, *e.g.*, numerical volume- or surface area densities (Table 1, Fig 5), which considerably increases the analysis efficiency. Within the sampled sections, test fields (*i.e.*, fields of view at the appropriate factor of magnification/objective) are SUR sampled, *e.g.*, by a meander sampling approach as illustrated in Fig 12E or by SUR sampling with suitable stereology software tools, as comprehensively exemplified in Monteiro et al.

[21]. For a reliable differentiation of secondary and primary gill lamellae and an efficient point counting process, a microscopic magnification of 40x-100x is recommendable. The SUR sampled fields of view are superimposed with an appropriately sized point grid. The number of points hitting section profiles of secondary lamellae ($P_{(SL)}$) in all sampled test fields of all sections per case are counted, as well as the number of points hitting GF section profiles ($P_{(GF)}$). $V_{V(SL/GF)}$ is calculated from $P_{(SL)}$ and $P_{(GF)}$ using Eq 4. The minimal total number of points hitting the reference compartment (per case) that is necessary to achieve a $V_{V(X/Y)}$ estimate with a defined acceptable expected relative error probability, can be obtained from a nomogram published by Weibel [26]. For a $V_{V(SL/GF)}$ of \sim 0.3 (S1D Experimental data), a number of \sim 600 points hitting GF section profiles (in all examined fields of view in all sections of all samples per case) is sufficient to achieve an estimate of $V_{V(SL/GF)}$ with an expected relative error probability of 5% of the mean $V_{V(SL/GF)}$ (S1E Experimental data).

The total volume of the secondary gill lamellae ($V_{(SL,GF)}$) is calculated as the product of V_V ($_{(SL/GF)}$) and the total gill filament volume $V_{(GF)}$, which is directly determined, as described in **Section 8**. The volume densities and volumes of other structures within the gill filaments, such as distinct cell types, can be determined analogously, using appropriately adapted magnification factors, sampling intervals, and point grid sizes.

13. Estimation of the surface area of the secondary lamellae in the gill filaments

The surface area density of the secondary lamellae in the gill filaments ($S_{V(SL/GF)}$) is determined in VUR sections of GMA/MMA-embedded SUR gill filament (GF) samples (Sections 9 and 10, Figs 1 and 5). S_{V(SL/GF)} is estimated using a stereological test system combining test points and cycloids (i.e., test lines that interact isotropically with surface section profiles in VUR sections) [24,62,104], in which a defined length of cycloid arches (at a given factor of magnification) is associated with a known number of test points. A detailed general description of the theoretical basis of surface area estimation by cycloid test systems in VUR sections is provided in Baddeley et al. [62] or Howard and Reed [25], copy templates of point/cycloid test systems with indicated p/l quotients are provided in the supplementary data of Howard and Reed [25]. Fig 13 illustrates the practical application of the method for determination of S_{V(SL/GF)} in trout gill VUR samples. At 100x microscopic magnification, microscopic test fields are SUR sampled within the VUR sections by meander sampling (Fig 12E) or with appropriate stereology software tools. The point/cycloid test system is superimposed to the sampled test fields and aligned to the VUR section image so that the vertical axis (i.e., the minor axis) of the cycloids (Fig 13) is parallel to the vertical axis of the VUR section of the GF sample. In each test field, the number of intersections between the epithelial surface of the secondary lamellae and the cycloid test lines $(I_{(SL)})$ is counted, as well as the number of points hitting gill filament section profiles (P(GF)). Additionally, points hitting profiles of secondary gill lamellae in the same test fields are counted $(P_{(SL)})$, if $V_{V(SL/GF)}$ is to be determined from the quotient of $\Sigma P_{(SL)}/\Sigma P_{(GF)}$ (refer to Section 12).

 $S_{V(SL/GF)}$ is calculated from the cumulative number of intersections $(\Sigma I_{(SL)})$ and points $(\Sigma P_{(GF)})$ counted in all examined test fields in all sections of all samples per case in given magnification (**Eq 6**) [62]. $S_{V(SL/GF)}$ is then corrected for the extent of GMA/MMA-embedding-related tissue shrinkage, using the linear tissue shrinkage factor (f_s) for GMA/MMA-embedded gill filaments (**Section 11**). The total surface area of the secondary gill lamellae in the gill filaments ($S_{(SL,GF)}$) is calculated as the product of $S_{V(SL/GF)}$ and the gill filament volume ($V_{(GF)}$) (**Eq 7**), which is calculated directly via submersion method (**Section 8**). Using the described methodological approach, we determined a (shrinkage-corrected) $S_{V(SL/GF)}$ of 333.53 cm²/cm³

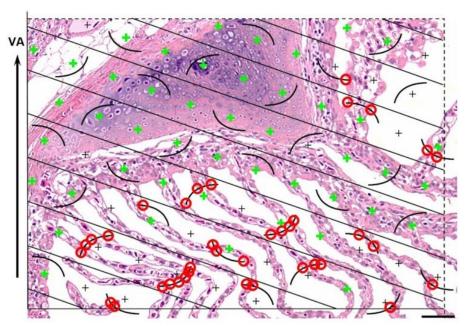


Fig 13. Estimation of the surface area density of the secondary lamellae in the gill filaments. A SUR sampled microscopic test field in a VUR section of a GMA/MMA-embedded (SUR sampled) GF sample is superimposed with a stereological test system combining 35 cycloids and 70 points. The short side of the rectangular frame of the system and therewith the minor axis of the cycloids is aligned parallel to the orientation of the vertical axis of the VUR GF section (VA, indicated by the arrow on the left). All points hitting GF section profiles ($P_{(GF)}$, indicated in green) are counted, as well as all intersections of cycloids with the epithelial surface of SL section profiles ($I_{(SL)}$, encircled in red). The SL surface area density in the GF is calculated from the sum of intersections ($\Sigma I_{(SL)}$) and points ($\Sigma P_{(GF)}$), counted in all examined test fields of all sections of all samples per case, using Eq 6. In the presented example, the length of one cycloid (I) = 1/10 of the frame width [62], the test curve length in general is calculated from cycloid arch height h as: $I = 2 \times h$ [104]. GMA/MMA. HE. Bar = 50 μ m.

and, correspondingly, a $S_{(SL,GF)}$ of 947.24 cm² in a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight (S1F Experimental data).

Eq 6. Surface area density of the secondary lamellae in the gill filaments.

$$S_{V(SL/GF)} = (2 \times (p/l) \times \sum I_{(SL)} / \sum P_{(GF)}) \times f_s$$

 $S_{V(SL/GF)}$ Surface area density of the secondary lamellae (SL) in the gill filaments (GF), corrected for embedding-related shrinkage

p/l Ratio of test point number to cycloid arch length at level of the tissue

 $\Sigma I_{(SL)}/\Sigma P_{(GF)}$ Quotient of the total number of intersections between the epithelial surface of the SL and cycloid arches in all analyzed sections per case and the total number of points hitting section profiles of GF

f_s Linear tissue shrinkage factor for GMA/MMA-embedded GF (0.87)

Eq 7. Total surface area of the secondary lamellae in the gill filaments.

$$S_{\scriptscriptstyle (SL,GF)} = S_{\scriptscriptstyle V(SL/GF)} imes V_{\scriptscriptstyle (GF)}$$

 $S_{(SL,GF)}$ Surface area of the secondary lamellae (SL) in the gill filaments (GF) $S_{V(SL/GF)}$ Surface area density of the SL in the GF, corrected for embedding-related shrinkage $V_{(GF)}$ Total volume of the GF sample

14. Estimation of the total number, the total volume and the mean volume of epithelial cells in the secondary gill lamellae

Unbiased estimates of the total number of epithelial cells (EC) in the secondary lamellae (SL) ($N_{(EC,SL)}$) and of the mean cellular volume of SL-EC ($\bar{v}_{(EC,SL)}$) are determinant measures for the characterization and differentiation of gill epithelial alteration patterns such as cell loss, atrophy, hypertrophy, and hyperplasia. The numerical volume density of epithelial cells in the secondary lamellae ($N_{V(EC/SL)}$) is estimated using IUR sections of SUR sampled, Epon-embedded gill filament (GF) samples (refer to **Figs 1** and **5**, **Sections 9** and **10**). For unbiased estimation of numerical volume densities of cells in their reference tissue compartment, the physical disector method is applied, combined with systematic point counting [24,25,65,107]. The physical disector represents a 3-D stereological test system, used for unbiased counting and sampling of particles, independent of the size, shape, orientation and distribution of the particles within their reference compartment. A physical disector consists of two parallel, corresponding histological sections (*i.e.*, a "reference" section and a "look-up" section) with a known distance (disector height) between the sections [60,65,107], thus defining a known volume of the tissue between the two sections.

The reference- and look-up sections are usually taken from a series of consecutive sections, sectioned with a defined nominal section thickness (d). For determination of N_{V(EC/SL)}, it is recommendable to prepare a series of at least 7 consecutive semithin sections (per sample) [108,109] with a nominal section thickness of 0.5 µm. The mean section profile area of the reference compartment (SL) that is present in the reference- and the look-up section and the disector height define the 3-D reference compartment volume in which the particles of interest (SL-EC) are counted. The disector height (and therefore also the disector volume) depends on the number of sections of the section series located between the reference- and the look-up section and on the factual individual section thickness [25,80]. For accurate analysis results, the nominal section thickness (set on the microtome) therefore needs to be controlled by determination of the factual physical section thickness. The factual thickness of sections of plasticresin-embedded samples can be expeditiously determined by contact-free spectral reflectance measurement or, more elaborately, by electron microscopy of ultrathin sections of orthogonally re-embedded sections [80]. For counting of cells with the physical disector, the referenceand the look-up section are compared. Cells are counted, if their cell nuclei are sectioned by the reference-, but not by the look-up section. Usually, a disector height of approximately 1/3 rd of the mean minimal orthogonal linear projection of the cell nuclei (i.e., their mean minimal diameter) is chosen, because small nuclei that are completely located between the referenceand the look-up section would be unintentionally overseen during the cell (nuclei) counting process [25,107]. For determination of the appropriate disector height, the mean minimal diameter of a sufficient number (~50) of nuclear cross section profiles of the target cells is determined in the reference section, using appropriate morphometry software tools. To warrant the unbiasedness of the analysis, the reference section is randomly sampled from the section series, and the look-up section is selected according to the previously defined disector height. For estimation of $N_{V(EC/SL)}$, a disector height of 1 µm is recommended (i.e., in a section series of seven 0.5 µm thick sections (N°1-7), three possible disector section pairs can be sampled, each with one section between the randomly sampled reference- and the look-up section (N°2 and 4, N°3 and 5, or N°4 and 6)). Within the reference section, the examined fields of view are SUR sampled at the given factor of magnification (and photographed). A microscopic magnification of 200x or 400x is recommendable for disector analysis of N_{V(EC/SL)}. The corresponding fields of view within the look-up section are then localized and photographed as well. The images of corresponding fields of view in the reference- and the look-up section are

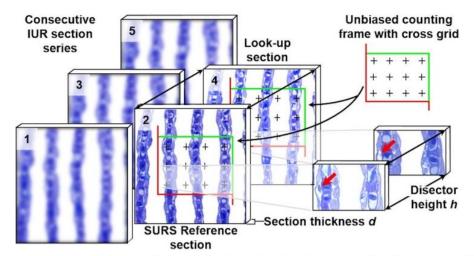


Fig 14. Estimation of the numerical volume density of epithelial cells in the secondary gill lamellae. The number of epithelial cells (EC) per volume unit of secondary lamellae (SL) is estimated, using the physical disector as a 3-D stereological test system for unbiased counting of particles. A physical disector consists of two parallel histological sections (a reference section and a look-up section) with a defined distance (disector height, h). The reference section is SUR sampled from a series of technically impeccable, parallel, consecutive sections with a defined nominal section thickness. The factual physical thickness of the sections (d) defines the disector height. The present example shows corresponding fields of view in a series of 5 consecutive, toluidine blue stained, semithin IUR GF sections with a nominal thickness of 0.5 µm (the examined fields of view in the section are SUR sampled at the given factor of magnification). From the series of five sections, the second section is SUR sampled as reference section. The fourth section (i.e., with a distance of $h = 2 \times d = 2 \times 0.5 \mu m = 1 \mu m$) is defined as look-up section. Corresponding section areas in the reference- and the look-up section are overlaid with an unbiased counting frame [110] of known area and a cross grid of equally spaced test points. The volume of the reference compartment defined by the disector probe, i.e., the volume of SL within the 3-D space defined by both sections of the disector, is given by the disector height and the mean area of the SL section profile(s) (i.e., the reference compartment) present in the reference- and the look-up section. The section area of SL within the area of the unbiased counting frame is determined by point counting: the number of crosses hitting SL section profiles is counted and multiplied by the area associated with a single point/cross of the grid (i.e., the quotient of the number of crosses in the counting frame and the area of the counting frame). SL-EC nuclei that are sectioned in the reference section, but not in the look-up section are counted (Q'), using the unbiased counting frame (particle sections are only counted if they are completely located within the unbiased counting frame or if they touch one of the "acceptance" (green) border lines. Any particle section profiles touching an "exclusion" (red) line are not counted) [25]. In the presented example, a SL-EC nucleus section profile that is present in the reference section, but absent in the look-up section, is indicated by red arrows. The numerical volume density of the SL-EC is then calculated from the EC number counted in all sections of all samples per case in all analyzed disectors and the cumulative reference compartment (SL) volume in all analyzed disectors (Eq 8).

appropriately aligned and superimposed with unbiased counting frames of known area [25,110]. For images representing section areas of approximately 500 μ m x 300 μ m –230 μ m x 150 μ m, counting frame areas between 200 μ m x 100 μ m and 150 μ m x 70 μ m are recommended. Following the rules for sampling and counting of particles with the unbiased counting frame (Fig 14), the number of nuclear profiles of the cell type of interest (SL-EC) present in the reference section and absent in the look-up section is counted (Q*) [107]. The section profile area of the SL reference compartment within the unbiased counting frame is determined by point counting (Sections 11 and 12) [24,26]. The SL volume within the disector volume is then determined from the quotient of the mean SL section profile area within the unbiased counting frames in the reference- and the look-up section and the (known) area of the unbiased counting frame. $N_{V(EC/SL)}$ is calculated from the number of EC (Q*) counted in all analyzed disectors per case and the cumulative volume of the SL in these disectors (Eq 8). To obtain reliable numerical volume estimates, at least 50 nuclei (i.e., Q*, particles, cells) should be counted per case.

The efficiency of the described approach is doubled, if cell section profiles that are present in the look-up section and absent in the reference section are counted as well (*i.e.*, interchanging the roles of the reference- and the look-up section)—if done so, it must be considered that this approach technically implies an independent analysis of two separate disectors. The total number of EC in the SL ($N_{\rm (EC,SL)}$) is calculated from the $N_{\rm V(EC/SL)}$ and the volume of the SL in the GF ($V_{\rm (SL,GF)}$). $N_{\rm V(EC/SL)}$ is corrected for the embedding-related shrinkage of GF samples, using the linear tissue shrinkage factor ($f_{\rm s}$) for Epon-embedded tissue (0.95) (Eq 9) [111].

The identical images can be used to simultaneously determine the volume density of the EC in the SL ($V_{V(EC/SL)}$) by point counting. For estimation of $V_{V(EC/SL)}$, it is sufficient to analyze either the reference- or the look-up section of a disector. The applicable size of the cross grid, *i. e.*, the number of points per counting frame, is determined according to the number of examined disectors and the $V_{V(EC/SL)}$ [26]. With a $V_{V(EC/SL)}$ of ~0.50 and an average number of 10–15 analyzed disectors within the section series of 5 samples per case (S1G Experimental data), a grid of 10x10 points per counting frame is generally sufficient to determine $V_{V(EC/SL)}$ with an expected relative error probability of ~5% of mean $V_{V(EC/SL)}$ (S1H Experimental data).

The total volume of SL-EC ($V_{(EC,SL)}$) in the SL is calculated from the estimates of $V_{V(EC/SL)}$ and $V_{(SL,GF)}$ (**Eqs 10** and **11**). The mean cellular volume of SL-EC ($\bar{v}_{(EC,SL)}$) results from the quotient of $V_{V(EC/SL)}$ and $N_{V(EC/SL)}$, according to **Eq 12**. There are alternative methods for the counting of particles and the estimation of the mean particle volume on a single thick section: the optical disector, where consecutive, parallel IUR sections are generated optically and not physically, and the nucleator [65]. In previously published studies on fish, the nucleator was used in analyses of the liver [112] or gonads [113], in an ecotoxicological study examining the toxic effects of copper, the nucleator was used for estimation of the mean cellular volumes in the gills [21].

Eq 8. Numerical volume density of epithelial cells in the secondary lamellae.

$$N_{V(\mathit{EC/SL})} = (\sum Q^-_{(\mathit{EC})}/(h \times \sum A_{(\mathit{SL})})) \times f_s^3$$

 $N_{V(EC/SL)}$ Numerical volume density of epithelial cells (EC) in the secondary lamellae (SL), corrected for embedding-related tissue shrinkage

ΣQ (EC) Cumulative number of all counted EC nuclei in all analyzed disectors per case

h Disector height (*i.e.*, the distance between the reference and the look-up section)

 $\Sigma A_{(SL)}$ Cumulative area of SL section profiles in all disectors per case (for each analyzed disector, the mean area of the SL section profiles in the reference- and the look-up section is determined)

f_s Linear tissue shrinkage factor for Epon-embedded tissue (0.95) [111]

Eq 9. Total number of epithelial cells in the secondary lamellae.

$$N_{(EC,SL)} = N_{V(EC/SL)} \times V_{(SL,GF)}$$

N(EC,SL) Total number of epithelial cells (EC) in the secondary lamellae (SL)

 $N_{V(EC/SL)}$ Numerical volume density of EC in the SL, corrected for embedding-related tissue shrinkage

V_(SL-GF) Total volume of the SL in the gill filaments (GF)

Eq 10. Volume density of epithelial cells in the secondary lamellae.

$$V_{V(\mathit{EC/SL})} = A_{\mathit{A(EC/SL)}} = \sum A_{(\mathit{EC})} / \sum A_{(\mathit{SL})} = \sum P_{(\mathit{EC})} / \sum P_{(\mathit{SL})} = P_{\mathit{P(EC/SL)}}$$

 $V_{V(EC/SL)}$ Volume density of the epithelial cells (EC) in the secondary lamellae (SL) $A_{A(EC/SL)}$ Area density of EC in the SL

 $\Sigma A_{(EC)}/\Sigma A_{(SL)}$ Quotient of the cumulative section area of EC in all examined reference compartment sections per case and the cumulative section area of SL in the same sections

 $\Sigma P_{(EC)}/\Sigma P_{(SL)}$ Quotient of the total number of points hitting section profiles of EC in all examined sections per case and the total number of points hitting SL in the same sections

PP(EC/SL) Point density of EC in the SL

Eq 11. Total volume of epithelial cells in the secondary lamellae.

$$V_{(EC,SL)} = V_{V(EC/SL)} \times V_{(SL,GF)}$$

V_(EC.SL) Total volume of the epithelial cells (EC) in the secondary lamellae (SL)

V_{V(EC/SL)} Volume density of EC in the SL

V_(SL-GF) Total volume of the SL in the gill filaments (GF)

Eq 12. Mean cellular volume of epithelial cells in the secondary lamellae.

$$\bar{v}_{\rm (EC,SL)} = V_{\rm V(EC/SL)}/N_{\rm V(EC/SL)}$$

 $\bar{\mathbf{v}}_{(\text{EC.SL})}$ Mean cellular volume of the epithelia cells (EC) in the secondary lamellae (SL)

V_{V(EC/SL)} Volume density of EC in the SL

 $N_{V(\text{EC/SL})}$ Numerical volume density of EC in the SL, corrected for embedding-related tissue shrinkage

15. Determination of the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness in the secondary gill lamellae

Accurate estimates of the (oxygen) diffusion distance are essential for identification, quantification, comparison and evaluation of alterations of the diffusion resistance across the diffusion barrier in the secondary gill lamellae due to $\it e.g.$, epithelial lifting, cell hypertrophy, hyperplasia [3] and atrophy, (experimentally) induced by aquatic pollutants/test substances. The thicknesses of biological barriers, such as glomerular basement membranes [28,111,114] or pulmonary oxygen diffusion distances [29,103] in mammals, or the thickness of the gill diffusion barrier [38,40], are unbiasedly estimated by their true harmonic mean thickness ($\it T_h$), $\it T_h$ is determined from orthogonal intercepts [28,103], as described below.

The true harmonic mean of the diffusion barrier thickness ($T_{h(DB)}$) is determined in transmission electron microscopic (TEM) images captured in ultrathin IUR sections of SUR sampled, Epon-embedded gill filament (GF) specimens (refer to Fig 5, Sections 9 and 10), using a logarithmic ruler (S9 Fig) [28]. If TEM analysis is not available, the method can (as an exception) be applied using light microscopic (LM) images of semithin sections of the respective samples, acquired at high magnifications (S10 Fig).

Within the ultra-, respectively semithin IUR sections, fields of view containing SL section profiles are SUR sampled at a given factor of magnification (for TEM analysis of the $T_{\rm h(DB)}$, a magnification factor of 8000-20000x is recommended, and 1000x (oil immersion) for LM-analysis, respectively), photographed, and printed (with plotted size rulers). The factual final magnification of the printed images (M) is determined. For sampling of the diffusion barrier thickness measurement sites, the section images are randomly overlaid with a quadratic line grid printed on a plastic transparency. For TEM images printed in a final magnification of approximately 20000x, a grid size of 1.5 cm x 1.5 cm is recommendable.

Diffusion barrier thickness measurements are conducted at the transection points of grid lines and secondary lamellae (SL) surface section lines (**Figs 15** and **S10**). A logarithmic ruler printed on a plastic transparency is used to measure the diffusion distance along the shortest distance between a transection point and the inner surface of the SL vascular space. This distance is not measured linearly, but in terms of ruler "classes" (A, 1–11). Each ruler class is

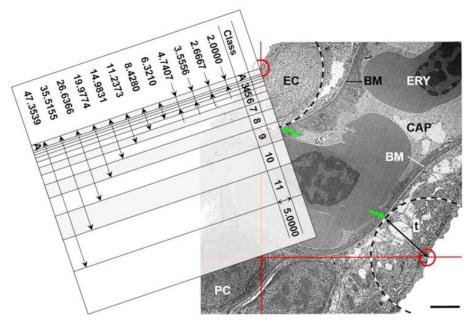


Fig 15. Determination of the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness in secondary gill lamellae. A printed transmission electron microscopic (TEM) image of a SUR sampled field of view of an IUR section of a secondary lamella (SL) is superimposed with a test grid of lines (red). The transections of the gridlines with the epithelial SL surface are marked by red circles. At these locations, the shortest distance (t, double arrow) between the epithelial surface of the SL and the inner surface of the blood space (green arrows) is determined (dashed circles). Along these lines, the diffusion barrier thickness is measured, using a superimposed logarithmic ruler. In the shown example, the measured distance falls in class 9. $T_{\rm h(DB)}$ is calculated from the number of measurements and the corresponding classes (Eq 13), detailed illustration is given in Hirose et al. [115]. Epon. TEM. Bar = 2 μ m.

defined by a lower and upper limit measured from the origin of the ruler and a defined midpoint. In a given study, the ruler dimensions are adapted to the thickness of the diffusion distances in the printed TEM/LM images at a given final magnification, so that none of the measurements falls within the initial division "A" [28,111]. The dimensions of the ruler classes are provided in S1 Table, as well as ruler copy templates suitable for analysis of apparent diffusion barrier section profile distances on IUR SL sections (S9 Fig).

 T_h is calculated from the number of measurements (observations) made in each ruler class (with defined class-midpoints) per case (S1I Experimental data), and the final magnification (M) of the printed IUR section images (Eq 13) [111,115,116]. A detailed calculation example is provided in Hirose et al. [115].

Eq 13. True harmonic mean of the diffusion barrier thickness in the secondary lamellae.

$$T_{h(DB)} = (8/3\pi) imes (10^6/M) imes ar{l}_{h(DB)}$$

 $T_{h(DB)}$ True harmonic mean of the diffusion barrier (DB) thickness $8/3\pi$ Correction factor for oblique sectioning

M Final print magnification

 $\bar{\mathbf{I}}_{h(DB)}$ Apparent harmonic mean thickness of the diffusion barrier (Number of observations/(Midpoints x Number of observations))

16. Application of laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM) of optically cleared trout gill samples in quantitative histomorphological analyses

16.1 LSFM of optically cleared samples and its application for quantitative morphological analyses of trout gills. Determination of quantitative (3-D) morphological (gill) parameters using the "classical" stereological approaches featured above is essentially based on analysis of 2-D histological sections. The necessity to examine 2-D histological sections to acquire information about the 3-D organ/tissue morphology eventually lies in the fact(s) that most tissues are non-transparent (therefore thin, light-permeable sections are needed to visualize the structures of interest) and that the structures of interest are often too small to be recognized by the naked eye (implying the need of optical magnification).

In the recent years, LSFM of optically cleared (i.e., transparent) specimens has emerged as an innovative imaging technology for direct and fast microscopic examination of 3-D samples, elegantly bypassing the necessity of preparation of histological sections [50-53,117]. LSFM of optically cleared samples enables the 3-D representation of complex organ/tissue architectures (\$1 Fig), and also holds a great potential for quantitative morphological analyses [56-58]. By now, a substantial number of different tissue clearing methods have been developed for generation of optically transparent samples of diverse organs and tissues, as reviewed in Feuchtinger et al. [52], Hong et al. [118], or Ueda et al. [119]. Basically, optical clearing of a tissue is achieved by treatment with diverse chemical compounds that remove and/or alter light diffracting tissue components, such as lipids and cell membranes, thereby adjusting the refractive index of the tissue to that of the surrounding medium [52,120]. For optical clearing of trout gill samples for subsequent LSFM analysis of quantitative morphological parameters, application of the 3DISCO (3-dimensional imaging of solvent cleared organs) ("brain"-) protocol [51] is recommendable, allowing for a fast (overnight) and cost-efficient processing of gill samples, using only few chemical compounds (tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (DCM), dibenzylether (DBE) or benzyl alcohol and benzyl benzoate (BABB)). 3DISCO-cleared (gill) samples display a well retained shape, an adequately firm consistency, and a reproducible extent of uniform clearing-related volume-shrinkage of approximately 50% (Fig 16) (S1J Experimental data).

The 3DISCO protocol used for clearing of gill samples (S2 Table) is a slightly altered version of the "Brain (long protocol)"-version of the 3DISCO protocol originally published by Ertürk et al. [51].

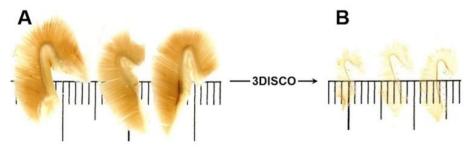


Fig 16. Optical clearing of rainbow trout gills. A. Formalin-fixed (non-transparent) rainbow trout gills, placed on a mm ruler. **B.** The identical gills after optical tissue clearing with the 3DISCO protocol. Note the transparency and the shrinkage of the cleared gills. Note that the images in A and B show intact gills (with gill arches). For LSFM-based quantitative morphological analyses, the gill arches are removed from the gills and the gill filaments are cleared after determination of their weight or volume.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g016

Cleared (transparent) gill filament (GF) samples of a size of up to approximately 3 cm x 3 cm x 2 cm (length x width x height) can directly be analyzed in toto by LSFM, the principle of LSFM of cleared samples is illustrated in Fig 17. The cleared GF sample is placed into the ultramicroscope sample chamber which is filled with an appropriate clearing solution (here: BABB). A sheet (i.e., a few µm thin plane) of laser light of adjustable wavelength is sent through the transparent sample. Fluorescence signals emitted by organ/tissue structures after excitation by the laser light energy are detected perpendicular to the illumination axis by a digital camera, resulting in a 2-D fluorescent image of the illuminated focus plane in the sample (i.e., a virtual digital optical section of the illuminated plane). For a uniform illumination of the entire width of a sample, two precisely aligned light sheets are used to simultaneously illuminate the cleared sample from two opposite sides. The fluorescence signals detectable at specific laser wavelength ranges either originate from the (natural) autofluorescence of different organ/tissue components, from in- or ex-vivo administered fluorescence-labeled tracer substances such as antibodies or lectins [57,121-123], or from the transgene-expression of specific fluorescent reporter molecules, such as EGFP (enhanced green fluorescent protein) or mCherry [124,125]. The sample is moved through the laser light sheet along its vertical axis, with step sizes as small as \geq 5 µm, resulting in the acquisition of a z-stack of serial fluorescence images of parallel

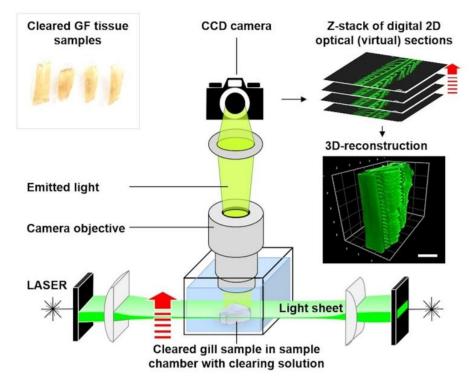


Fig 17. Laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM) of an optically cleared gill filament sample. The cleared GF sample in the sample chamber is stepwise illuminated by thin laser light sheets of defined wavelength ranges. Here, autofluorescence signals emitted by GF structures excited by the laser light energy are detected by a digital charge-coupled device (CCD) camera, resulting in a 2-D fluorescent image of the illuminated focus plane in the sample. The sample is gradually moved through the laser light sheet(s) along its vertical axis (red arrow), resulting in the acquisition of a z-stack of serial fluorescence images, used to compute a 3-D reconstruction of the sample. In the present example, autofluorescence images of a 3DISCO-cleared GF sample acquired at 520/40 nm (excitation range) (ex) and 585/40 nm (emission range) (em) are shown. Bar = 200 μ m.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g017

(virtual) optical sections of the sample. Subsequently, a virtual digital 3-D reconstruction of the sample that can be freely rotated and sectioned is computed from the acquired z-stack of fluorescence images (S1 Fig, S1 Video), using appropriate image analysis software.

In the present work, an UltraMicroscope II (LaVision BioTec GmbH, Germany) equipped with a SuperK EXTREME EXW12 white laser (NTK Photonics, Germany) and a 2x objective lens (Olympus MVPLAPO 2X/0.5 NA) combined with an Olympus MVX-10 zoom body (Olympus, Germany) was used for LSFM analyses of 3DISCO-cleared gill filament samples. Z-stacks of fluorescence images of 5 μ m optical thickness were acquired at 520/40 nm (excitation range) (ex) and 585/40 nm (emission range) (em) for detection of autofluorescence. 3-D images were computed, using ImSpector Pro⁶⁴ (vers. 5.1.328, LaVision Biotec GmbH, Germany) and arivis Vision4D (vers. 3.0, arivis, Germany) software tools.

LSFM-based quantitative morphological analyses of cleared (gill filament) samples basically follow the same sampling- and analysis principles as the "classical" section-based stereological analysis approaches, solely using fluorescence images of 2-D optical (virtual) sections instead of factual (physical) histological slides. The advantage of using LSFM for quantitative morphological analyses, as compared to "classical" stereological analysis approaches, is indeed simply based on the unmatched speed and simplicity of generation of (virtual) optical sections of defined orientations. Moreover, since the cleared samples are not physically sectioned during LSFM analysis, (virtual) optical sections of any orientation (transverse, sagittal, horizontal, VUR, IUR) can be generated successively from the identical specimen. Finally, LSFM-based analyses of the relevant morphological parameters $V_{V(SL/GF)}$ and $S_{V(SL/GF)}$ featured in the present guide can be adequately performed using the natural autofluorescence of 3DISCO-cleared gills, *i.e.*, no fluorescent labeling of the samples is necessary.

16.2 LSFM-based determination of volume- and surface area densities of secondary gill lamellae in the gill filaments. For determination of volume and surface area densities in LSFM virtual optical sections of cleared gill filament (GF) samples, the generally applicable sampling designs and stereological probes are the same as for the "classical" quantitative stereological analysis approaches described above. For practical reasons, the gill filaments of the four (formalin-fixed) gill arches of one side (right or left) are optically cleared in toto after determination of the gill filament volume by submersion volumetry/weighing. Per case, 8 GF locations are SUR sampled from the cleared gill filaments, principally as described above (Section 9). For subsequent handling and analysis of the samples, it is advantageous to excise gill filament stripes (Fig 18A) containing the SUR sampled GF location, rather than using a biopsy punch to excise cylindrical tissue specimens. The SUR sampled cleared GF-stripes are then LSFM-imaged for acquisition of digital (virtual) optical VUR autofluorescence section images for subsequent analysis of V_{V(SL/GF)} and S_{V(SL/GF)}, as shown in Fig 18. The vertical uniform randomization of the (virtual) optical section plane orientation through the cleared SUR GF samples is achieved by systematically rotating the samples around a fixed vertical axis (for practical reasons, a line perpendicular to the sagittal gill plane is defined as vertical axis) in a predefined interval (i.e., 22.5° for 8 samples, with the first sample being randomly rotated within the interval of 0°-22.5°, as described in Section 10). The SUR sampled cleared GF specimen is pinned onto a needle attached to a rotatable axis mounted on a modified LSFM-sample holder (Fig 18A). The position of the sample is aligned so that the vertical axis of the sample is parallel to the rotatable axis of the sample holder. The angle of the VUR section plane relative to the sample is set by rotation of the axis in the predefined interval. The sample holder with the attached sample is then transferred into the sample chamber of the LSF-microscope and imaged at an appropriate wavelength for autofluorescence detection (520/40 nm (ex) and 585/ 40 nm (em)). The featured approach prevents non-true-to-scale optical distortions of optical 2-D VUR sections that might probably occur in VUR sections virtually computed from the

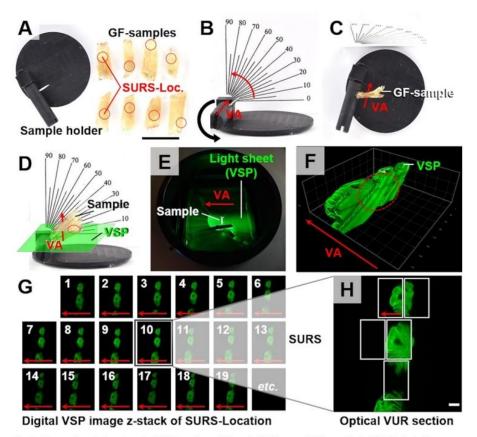


Fig 18. Generation of virtual optical VUR sections of cleared gill filament (GF) samples by LSFM. A. Left image side: top view of a sample holder with a rotatable axis equipped with a needle for sample attachment. Right image side: 8 stripe-shaped samples of optically cleared GF containing the SUR sampled locations (SURS-Loc., indicated by red circles). B-E. For generation of (virtual, optical) VUR sections, the GF sample is pinned to the rotatable axis (B) of the sample holder, so that the opercular side of the sample is oriented perpendicular to the (user-defined, virtual) vertical axis (VA, indicated by a red arrow). The sample is then rotated in a defined rotation interval (compare to Fig 10). In D, a rotation angle of ~40° is shown. A green schematic plane indicates the orientation of a corresponding vertical section plane (VSP), relative to the VA and the sample. The sample holder with the attached sample is then transferred into the sample chamber of the LSF-microscope (E), maintaining the orientation of the sample to the (horizontal) plane of the laser light sheet. F, G. A z-stack series of digital autofluorescence images (i.e., virtual vertical section planes, parallel to VA) of the SURS-Loc. in the sample is acquired at an appropriate magnification (G). In F, the 3-D reconstruction of the region of the GF sample that contains the SURS-Loc. is shown. G, H. Depending on the applied magnification factor and the examined parameter, one to three images are (systematically) randomly sampled from the z-stack series of digital virtual optical VSP images of the SURS-Loc. (e.g., N°10) of each GF sample for subsequent analysis of $S_{V(SL/GF)}$ (and $V_{V(SL/GF)}$). For estimation of $S_{V(SL/GF)}$, inclusion of a calibrated size ruler and indication of VA in the VUR image are mandatory. Note that the orientation of the VA of the sample is always recognizable (in the cleared sample, the 3-D reconstruction, the (virtual) VUR section images, and in the SUR sampled fields of view within these VUR sections). Bar = 1 cm in A and = 200 µm in H.

3-D reconstruction of the specimen, as illustrated in S11 Fig. From the acquired series of optical (virtual) VUR section images from each sample, one to three image(s) per SUR sampled GF location are (systematically) randomly sampled for subsequent stereological analysis (Fig 18G and 18H).

 $V_{V(SL/GF)}$ and $S_{V(SL/GF)}$ are determined (Figs 19 and 20), using the same point grids and point/cycloid probes, respectively, as illustrated for the analysis of histological (VUR) sections

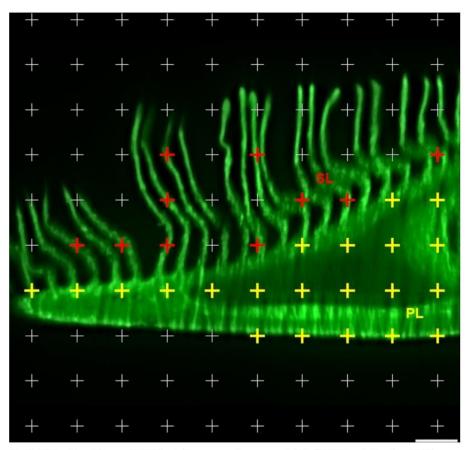


Fig 19. Estimation of $V_{V(SL/GF)}$ in VUR autofluorescence images acquired by LSFM of optically cleared GF samples. For practical reasons, $V_{V(SL/GF)}$ and $S_{V(SL/GF)}$ can be estimated in the same images, *i.e.*, using SUR sampled fields of view from (virtual) optical VUR sections. In the presented example of a SUR sampled field of view of a (virtual) GF VUR section, the vertical axis is not indicated. A (virtual) grid of equally spaced test points (crosses) is superimposed on the SUR sampled test field. All points hitting GF section profiles ($P_{(GF)}$) (including PL section profiles ($P_{(PL)}$, yellow crosses) and SL section profiles ($P_{(SL)}$, red crosses)) are counted [in the presented example: 21 $P_{(PL)}$ and 10 $P_{(SL)}$, *i.e.*, 31 $P_{(GF)}$]. $V_{V(SL/GF)}$ is calculated from $P_{(SL)}$ and $P_{(GF)}$, using Eq 4. LSFM-autofluorescence image acquired at 520/40 nm (ex) and 585/40 nm (em). Bar = 100 μ m.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g019

(Sections 12 and 13). The total volume $(V_{(SL,GF)})$ and (shrinkage corrected) surface area $(S_{(SL,GF)})$ of the secondary lamellae (SL) in the gill filaments (GF) is calculated from $V_{V(SL/GF)}$, respectively from $S_{V(SL/GF)}$ and the total gill filament volume $(V_{(GF)})$ (Eqs 4–7). The extent of 3DISCO-related gill filament tissue shrinkage is calculated from the measured $V_{(GF)}$ prior to and after clearing, as described in Section 16.1.

Using the LSFM- and quantitative analysis methods described in Section 16, we determined a $V_{V(SL/GF)}$ of 0.288, a (shrinkage-corrected) $S_{V(SL/GF)}$ of 346.24 cm²/cm³, and a corresponding $V_{(SL,GF)}$ of 0.818 cm³ and $S_{(SL,GF)}$ of 983.32 cm² in a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight with a total gill filament volume of $V_{(GF)} = 2.84$ cm³ (S1K Experimental data).

The unbiasedness of the described approach for LSFM-based quantitative morphological analyses of optically cleared GF samples was confirmed by comparison of the estimates of $V_{\rm V}$ (SL/GF) acquired by LSFM analysis with the respective estimates determined by "classical" quantitative stereological analysis methods in SUR sampled gill samples of four fish, using the

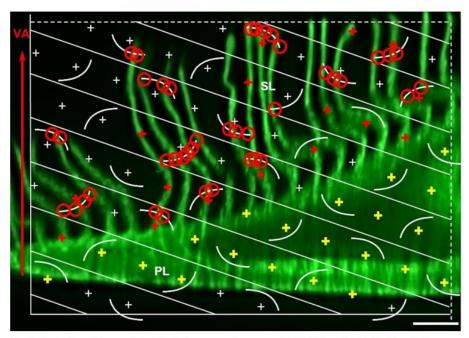


Fig 20. Estimation of $S_{V(SL/GF)}$ in VUR autofluorescence images acquired by LSFM of optically cleared GF samples. Here, a SUR sampled field of view from a (virtual) optical VUR section is shown, generated as described in Section 16.2 and Fig 18. The orientation of the vertical axis (VA, red arrow) and the size ruler are indicated. The VUR images are overlaid with a stereological test system combining cycloids and test points. The short side of the rectangular frame of the system is aligned parallel to the orientation of the VA. All points hitting GF section profiles ($P_{(GF)}$, including PL section profiles ($P_{(PL)}$, yellow crosses) and SL section profiles ($P_{(SL)}$, red crosses)) are counted, as well as all intersections of cycloid arches with the epithelial surface of SL section profiles ($I_{(SL)}$, encircled in red). [In the present example, a test system combining 35 cycloid arches and 70 points is used, refer to Fig 13. 21 $P_{(PL)}$ and 16 $P_{(SL)}$ (*i.e.*, 37 $P_{(GF)}$), and 41 $I_{(SL)}$ are counted]. $S_{V(SL/GF)}$ is calculated from the sum of intersections ($\Sigma I_{(SL)}$) and points ($\Sigma I_{(SL)}$) and points ($\Sigma I_{(SL)}$) and points ($\Sigma I_{(SL)}$) and $\Sigma I_{(SL)}$ and

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.g020

methods described above. Here, the estimates of $V_{V(SL/GF)}$ obtained with both approaches were virtually equal, varying by only 2.23 \pm 1.25% on the average (p = 0.806, paired t-test).

Discussion

In ecotoxicology studies it is still common practice to limit histopathological and quantitative morphological gill analyses to samples taken from arbitrarily chosen locations and histological (paraffin-) sections with determined orientations, using semiquantitative scoring systems or simple 2-D morphometric analysis techniques [22,126–128]. However, such analysis approaches are inherently not capable to provide unbiased quantitative morphological data [14,25,70,129]. The large discrepancies of no observed effect concentrations (NOEC) partially based on the assessment of rainbow trout gill lesions in different studies examining the same compounds [7] substantiate the necessity for the establishment of standardized, unbiased, representative, reproducible and thus comparable analysis techniques for examination of quantitative morphological gill parameters in ecotoxicological studies. Assessment of quantitative morphological data by unbiased stereological analysis allows for an objective presentation of distinct tissue properties and their statistical comparability [8,14,129]. Quantitative stereological analyses can also identify subtle, yet probably (patho-) biologically relevant alterations (e.g.,

increased diffusion barrier thickness), which might escape subjective visual perception in standard histopathologic- or electron microscopic examination. The present work therefore presents the principles of quantitative stereological analyses and provides detailed descriptions of the determination of relevant histomorphological gill parameters in rainbow trout as a widely used fish species in ecotoxicological studies. The featured methods are based on established, state-of-the-art, unbiased (i.e., model-free) analysis and sampling methods [14] that have previously proven their general suitability for quantitative morphological analyses of gills of fish of various species and sizes [21,36-41]. The protocols presented here are adapted to rainbow trout of 300-2000 g body weight, which are frequently used in ecotoxicology studies. The sampling designs also ensure that enough gill filament material remains for additional analyses. In contrast, several previously published quantitative stereological analysis approaches scheduled a complete embedding of the gills, so that the gills under examination are not available for other analytical methods [36-40]. The methods described in the present work are of course also applicable to other fish species of comparable size and gill structure. The set of the featured quantitative morphological gill parameters ($V_{(GF)}$, $V_{(SL,GF)}$, $S_{(SL,GF)}$, $V_{(EC,SL)}$, $N_{(EC,SL)}$, $\bar{v}_{(EC,SL)}$, T_{h(DB)}) covers the most relevant descriptors, effectively characterizing gill morphology. The described methods and protocols can easily be adapted to any other quantitative morphological parameter of interest in the context of a given study (e.g., numbers and cell volumes of additional distinct cell types or tissue structures in the gills). The analysis protocols were designed to allow for a feasible and expeditious analysis without restriction of the necessary precision. The recommended numbers of gill filament samples and sections to be generated, the microscopic magnification factors, the dimensions of the applicable stereological probes (i. e., sizes of cross grids and cycloid probes, areas of counting frames, disector heights) and the indicated numbers of points, intersections, and particles (Q) to be counted for sufficiently precise quantitative stereological estimates were confirmed to warrant reliable analysis results without unnecessary sampling and analysis efforts.

Given the relevance of the precise volume measurement of samples (*i.e.*, reference compartments) in quantitative stereological studies, we performed detailed analyses to ascertain practicable and accurate methods for volume determination of gill filament samples. Accordingly, we could demonstrate that briefly dabbing of gills on a lab-paper towel is sufficient to remove enough of the fluid attached to the (moist) gill to determine the weight of the gill sample with adequate precision for subsequent unbiased determination of the sample volume from its weight and density. The thus determined average density of formalin-fixed gill filaments of adult rainbow trout of 1.07 ± 0.02 g/cm³ may serve as an orientation value in subsequent studies, as data on the gill density have not yet been published.

The shrinkage of samples related to the embedding in histological plastic embedding media, such as GMA/MMA, must also be considered in analyses of any shrinkage-sensitive quantitative morphological parameter. In the present study, we applied unbiased analysis approaches to accurately determine the factual volumes of gill filament samples before (submersion volumetry) and after embedding in GMA/MMA (Cavalieri volumetry with histological sections of precisely measured thicknesses) to calculate the extent of trout gill filament tissue shrinkage related to GMA/MMA-embedding. The obtained result of $f_s = 0.869$ (corresponding to a 3-D volume shrinkage of ~34.31%) conforms to the linear tissue shrinkage factors determined for a variety of other biological tissues embedded in GMA/MMA [111,114]. However, the extent of tissue shrinkage related to histological plastic-embedding may vary, depending on the kind, size and processing of the samples, and the used embedding medium. For example, embedding of glutaraldehyde-fixed gill samples of the armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) in methacrylate (Historesin (Historesi

associated with notable shrinkage [130]. In any quantitative stereological study, the embedding-related tissue shrinkage should therefore be regularly controlled in a sufficient number of representative samples, using appropriate analysis approaches.

The practical feasibility of the described quantitative stereological analysis methods was confirmed by their application on representative trout gill samples in the present work and in previous studies [99]. The obtained relative and absolute values of the examined quantitative stereological gill parameters provided in the present work are, however, not intended to serve as reference values for the rainbow trout in general, since these data may vary substantially with regard to the age, size, and body weight of the examined fish.

The classic unbiased quantitative stereological methods featured in the present guidelines have been described in the 1990's and earlier. However, these methods still present the gold standard for quantitative morphological analyses in several live science disciplines [25,27]. Nevertheless, the practical implementation of these methods is often cumbersome, work-intensive and time consuming, particularly due to the specific sampling procedures and tissue processing steps associated with quantitative stereological analyses. In recent years, gross and histopathological evaluation has moved fast forward driven by the developments in virtual microscopy, digital image analysis and modern communication technologies [131–133]. Here, we present the application of LSFM imaging of optically cleared tissue samples as a modern, innovative, fast and efficient approach for quantitative morphological analyses of the gills.

For the first time the application of LSFM of optically 3DISCO-cleared trout gill samples is presented, for a straightforward determination of relevant quantitative morphological gill parameters without the need for generation of physical sections. The applied 3DISCO clearing protocol [51] and the LSFM imaging procedure are fast and easily to perform and allow for an excellent 3-D visualization of the complex microscopic gill architecture without additional (inor ex-vivo) fluorescent labeling. For the analysis of quantitative morphological gill parameters by LSFM, digital images of virtual optical (autofluorescence) sections of the cleared gill filament samples are analyzed, whereas the random sampling designs and stereological probes are the same as used in the "classical" quantitative stereological analysis approaches. Considering the extent of 3-D volume shrinkage of gill samples associated with the applied 3DISCO clearing protocol ($50.72 \pm 2.88\%$), the quantitative morphological analysis results obtained by LSFM analysis are virtually identical to the estimates obtained by "classical" unbiased quantitative stereological analyses of the identical gills, thus proving the applicability of LSFM for quantitative morphological gill analyses. With the significant reduction of the required sample processing steps and the associated expenditure of time, the benefit of the LSFM-based approach for quantitative morphological gill analyses is clearly confirmed. Whereas e.g., GMA/MMA-embedding of gill samples and subsequent preparation of histological sections usually takes more than 3 days, 3DISCO clearing and LSFM imaging of gill samples is completed within 1-2 days, while the costs of the necessary laboratory consumables and chemicals are comparable. In combination with standard histological analyses of (SUR sampled) FFPE gill filament samples for qualitative histopathological evaluation, LSFM-based analyses can thus significantly contribute to a fast, reliable and unbiased analysis of quantitative morphological gill parameters, which is particularly important for ecotoxicological studies examining high numbers of samples. Remarkably, LSFM analyses of 3DISCO-cleared specimens can be combined with additional (multimodal) histo-technical analyses. Subsequent to LSFM analysis, optically cleared samples can e.g., be re-embedded in paraffin (or other embedding media) and sectioned for subsequent standard histological as well as immunohistological analyses [134]. Conversely, it is also possible to clear and image (gill) samples that had previously been embedded in paraffin (following deparaffinization of the samples) [135]. For LSFM analysis of optically cleared samples, diverse commercial software tools for 3-D image reconstruction and image analysis are available. These programs also include functions for (semi-) automatic analysis of *e.g.*, volumes, surfaces and numbers of delimitably identifiable tissue structures, such as specifically fluorescently labeled cells or tissue compartments. Combined with appropriate sampling designs, these software tools can be applied for rapid digital analyses of quantitative morphological parameters, *e.g.*, for counting and sizing of kidney glomeruli after *in-vivo* labeling with fluorescence-labeled antibodies [57]. For LSFM-based analyses of the interested quantitative morphological parameters in (unlabeled) cleared gill samples, automatic digital image analysis is, however, not applicable, as long as no specific fluorescent labeling of distinct gill structures of interest, such as distinct cell types, is available.

Conclusion

In summary, the present guidelines thus represent a solid base for standardized, objective quantitative morphological analyses of rainbow trout gills. The broad implementation of the featured methods will significantly contribute to the representativity, unbiasedness, reliability and comparability of analyses results in ecotoxicology studies reporting quantitative morphological gill parameters and therefore add urgently required certainty to the detection of NOEC values as a base for the specification of legal concentration limits of aquatic pollutants. Additionally, the application of the described protocols can help to lower the required number of experimental fishes by avoiding unnecessary repetitions of experiments or studies.

Supporting information

S1 Fig. 3-D architecture of gills demonstrated by laser light sheet microscopy (LSFM) of a solvent-cleared gill.

(DOCX)

S2 Fig. Cardiac vascular perfusion fixation of rainbow trout gills.

S3 Fig. Histological perfusion fixation artifacts in rainbow trout gills. (DOCX)

S4 Fig. Ultrastructural perfusion fixation artifacts in rainbow trout gills. (DOCX)

S5 Fig. Determination of the gill volume/density in consideration of the attached liquid volume.

(DOCX)

S6 Fig. Photographic illustration of the determination of the gill volume/density in consideration of attached liquid volume.

(DOCX

S7 Fig. Processing of a SUR sampled gill filament sample for generation of IUR sections (*Isector* method).

(DOCX)

S8 Fig. Processing of a SUR sampled gill filament sample for generation of GMA/MMA-embedded VUR sections.

(DOCX)

S9 Fig. Ruler copy templates suitable for analysis of apparent diffusion barrier section profile distances.

(DOCX)

S10 Fig. Determination of $T_{h(DB)}$ in secondary gill lamellae in semithin IUR sections (light microscopic analysis).

(DOCX)

S11 Fig. Appearance of GF profiles in different vertical section planes (VSP) of virtual 3-D GF-reconstructions.

(DOCX)

S1 Table. Dimensions of ruler (divisions equidistant on log reciprocal scale).

(DOCX

S2 Table. 3DISCO clearing of rainbow trout gills.

(DOCX)

S1 Video. 3-D reconstruction of rainbow trout gills.

(MP4)

S1 Experimental data.

(DOCX)

S1 Eq. Concentration determination by Lambert-Beer Law.

(DOCX)

S2 Eq. Determination of dyed liquid volume after dilution.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Lisa Pichl^{1*}, Doris Merl^{1*}, Frank Bodenstaff^{1*}, Claudia Mair^{1*}, Heidrun Schöll^{1*}, Hans-Georg Hartmann^{2*}, Christoph Feick^{2*}, Cristina Huebner Freitas^{3*}, Claudia-Mareike Pflueger^{3*}, Ulrike Buchholz^{3*}, and Elenore Samson^{3*} for excellent technical assistance (*corresponding to the author affiliations).

Author Contributions

Conceptualization: Sonja Fiedler, Hannah Wünnemann, Julia Schwaiger, Rüdiger Wanke, Andreas Blutke.

Data curation: Sonja Fiedler, Hannah Wünnemann, Julia Schwaiger, Andreas Blutke.

Formal analysis: Sonja Fiedler, Isabel Hofmann, Natalie Theobalt.

Investigation: Sonja Fiedler, Isabel Hofmann, Natalie Theobalt, Andreas Blutke.

Methodology: Sonja Fiedler, Rüdiger Wanke, Andreas Blutke.

Resources: Hannah Wünnemann, Annette Feuchtinger, Axel Walch, Julia Schwaiger.

Supervision: Rüdiger Wanke, Andreas Blutke.

Visualization: Sonja Fiedler, Andreas Blutke.

Writing - original draft: Sonja Fiedler, Andreas Blutke.

Writing – review & editing: Sonja Fiedler, Hannah Wünnemann, Isabel Hofmann, Natalie Theobalt, Annette Feuchtinger, Axel Walch, Julia Schwaiger, Rüdiger Wanke, Andreas Blutke.

References

- Ašmonaitė G, Sundh H, Asker N, Carney Almroth B. Rainbow Trout Maintain Intestinal Transport and Barrier Functions Following Exposure to Polystyrene Microplastics. Environ Sci Technol. 2018; 52: 14392–14401. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04848 PMID: 30451503
- Lavado R, Schlenk D. Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and coho salmon (Oncorhynchus kisutch): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity. Aquat Toxicol. 2011; 101(1): 57–63. https://doi.org/10.1016/j. aquatox.2010.09.002 PMID: 20947181
- Mallatt J. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. Can J Fish Aquat Sci. 1985; 42(4): 630–648.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD. Toxic effects of the non-steroidal antiinflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquat Toxicol. 2004; 68(2): 141–150. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.014 PMID: 15145224
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol. 2003; 13(2): 57–149. https://doi.org/10.1016/ s1382-6689(02)00126-6 PMID: 21782649
- 6. Fish Toxicity Testing Framework, OECD Series on Testing and Assessment, No. 177. (2014).
- Wolf JC, Ruehl-Fehlert C, Segner HE, Weber K, Hardisty JF. Pathology working group review of histopathologic specimens from three laboratory studies of diclofenac in trout. Aquat Toxicol. 2014; 146: 127–136. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.033 PMID: 24292026
- Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. Toxicol Pathol. 2010; 38(7): 1011–1025. https://doi.org/10.1177/0192623310385140 PMID: 21030683
- Water Framework Directive. Directive 2000/60/EC. European Parliament and of the Council of the European Union (2000).
- Regulation concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Regulation (EC) No 1907/2006. European Parliament and of the Council of the European Union (2006).
- Fonseca AR, Sanches Fernandes LF, Fontainhas-Fernandes A, Monteiro SM, Pacheco FAL. The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. Sci Total Environ. 2017; 599–600: 217–226. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv. 2017.04.196 PMID: 28477478
- Mehinto AC, Hill EM, Tyler CR. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environ Sci Technol. 2010; 44(6): 2176–2182. https://doi.org/10.1021/es903702m PMID: 20175546
- Memmert U, Peither A, Burri R, Weber K, Schmidt T, Sumpter JP, et al. Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. Environ Toxicol Chem. 2013; 32(2): 442–452. https://doi. org/10.1002/etc.2085 PMID: 23325530
- 14. Gundersen HJG, Mirabile R, Brown D, Boyce RW. Chapter 8—Stereological Principles and Sampling Procedures for Toxicologic Pathologists. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). Boston: Academic Press; 2013. pp. 215–286.
- Burkhardt-Holm P. Lectin histochemistry of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill and skin. Histochem J. 1997; 29(11–12): 893–899. https://doi.org/10.1023/a:1026450109620 PMID: 9466157
- Evans DH. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. Environ Health Perspect. 1987; 71: 47–58. https://doi.org/10.1289/ehp.877147 PMID: 3297663
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S. Histopathological alterations of white seabass, Lates calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure. Environ Pollut. 2003; 121(3): 307–320. https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00270-1 PMID: 12685759

- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol Rev. 2005; 85(1): 97–177. https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003 PMID: 15618479
- Barišić J, Dragun Z, Ramani S, Filipović Marijić V, Krasnići N, Čož-Rakovac R, et al. Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (Squalius vardarensis Karaman) as an indicator of river pollution. Ecotoxicol Environ Saf. 2015; 118: 158–166. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04. 027 PMID: 25938696
- Hughes GM. Measurement of gill area in fishes: practices and problems. J Mar Biol Assoc U K. 1984; 64(3): 637–655.
- Monteiro SM, Rocha E, Mancera JM, Fontainhas-Fernandes A, Sousa M. A stereological study of copper toxicity in gills of Oreochromis niloticus. Ecotoxicol Environ Saf. 2009; 72(1): 213–223. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.008 PMID: 18405973
- Nero V, Farwell A, Lee LE, Van Meer T, MacKinnon MD, Dixon DG. The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: gill and liver histopathology. Ecotoxicol Environ Saf. 2006; 65 (2): 252–264. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.009 PMID: 16129489
- Nowak B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. Aquat Toxicol. 1992; 23(1): 65–83.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Apmis. 1988; 96(5): 379–394. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb05320.x PMID: 3288247
- Howard CV, Reed GR. Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy. 2nd ed. Abingdon: Garland Science/BIOS Scientific Publishers; 2005.
- Weibel ER. Stereological Methods: Practical methods for biological morphometry. 1st ed. London: Academic Press; 1979.
- Ochs M, Mühlfeld C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013; 305(1): 15–22. https://doi.org/ 10.1152/ajplung.00429.2012 PMID: 23624789
- Ramage IJ, Howatson AG, McColl JH, Maxwell H, Murphy AV, Beattie TJ. Glomerular basement membrane thickness in children: a stereologic assessment. Kidney Int. 2002; 62(3): 895–900. https:// doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00527.x PMID: 12164871
- Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure.
 Am J Respir Crit Care Med. 2010; 181(4): 394–418. https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1522ST PMID: 20130146
- 30. Madsen KM. The art of counting. J Am Soc Nephrol. 1999; 10(5): 1124–1125. PMID: 10232699
- Pakkenberg B, Olesen MV, Kaalund SS, Dorph-Petersen KA. Editorial: Neurostereology. Front Neuroanat. 2019; 13: 42. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00042 PMID: 31057371
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience. 2005; 130(4): 813–831. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.050 PMID: 15652981
- Hughes GM, Perry SF. Morphometric study of trout gills: a light-microscopic method suitable for the evaluation of pollutant action. J Exp Biol. 1976; 64(2): 447–460. PMID: 932627
- 34. Laurent P. Hebibi N. Gill morphometry and fish osmoregulation. Can J Zool. 1989; 67(12): 3055–3063.
- Mazon ADF, Fernandes MN, Nolasco MA, Severi W. Functional morphology of gills and respiratory area of two active rheophilic fish species, Plagioscion squamosissimus and Prochilodus scrofa. J Fish Biol. 1998; 52(1): 50–61.
- de Moraes MF, Holler S, da Costa OT, Glass ML, Fernandes MN, Perry SF. Morphometric comparison
 of the respiratory organs in the South American lungfish Lepidosiren paradoxa (Dipnoi). Physiol Biochem Zool. 2005; 78(4): 546–559. https://doi.org/10.1086/430686 PMID: 15957109
- da Costa OT, Pedretti AC, Schmitz A, Perry SF, Fernandes MN. Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. J Microsc. 2007; 225(Pt 1): 1–9. https://doi. org/10.1111/j.1365-2818.2007.01710.x PMID: 17286690
- 39. Fernandes MN, da Cruz AL, da Costa OT, Perry SF. Morphometric partitioning of the respiratory surface area and diffusion capacity of the gills and swim bladder in juvenile Amazonian air-breathing fish, Arapaima gigas. Micron. 2012; 43(9): 961–970. https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.018 PMID: 22512942

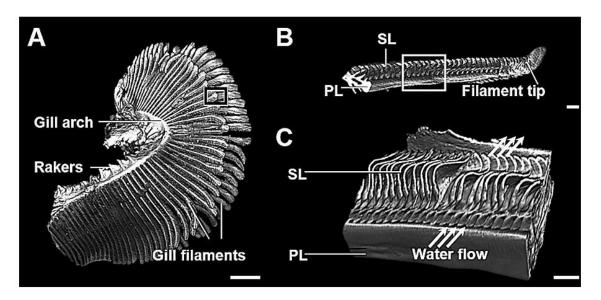
- Phuong LM, Huong DTT, Nyengaard JR, Bayley M. Gill remodelling and growth rate of striped catfish Pangasianodon hypophthalmus under impacts of hypoxia and temperature. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2017; 203: 288–296. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.10.006 PMID: 27768904
- Phuong LM, Huong DTT, Malte H, Nyengaard JR, Bayley M. Ontogeny and morphometrics of the gills and swim bladder of air-breathing striped catfish Pangasianodon hypophthalmus. J Exp Biol. 2018; 221(Pt 3): jeb168658. https://doi.org/10.1242/jeb.168658 PMID: 29191864
- Bell CE, Baldwin LA, Kostecki PT, Calabrese EJ. Comparative response of rainbow trout and rat to the liver mitogen, lead. Ecotoxicol Environ Saf. 1993; 26(3): 280–284. https://doi.org/10.1006/eesa.1993. 1056 PMID: 7507818
- Choi E, Alsop D, Wilson JY. The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquat Toxicol. 2018; 198: 20–29. https://doi.org/10. 1016/j.aquatox.2018.02.007 PMID: 29501010
- Hardy RW, Sullivan CV, Koziol AM. Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (Salmo gairdneri). Fish Physiol Biochem. 1987; 3(3): 133–143. https://doi.org/10.1007/ BF02180415 PMID: 24233441
- Karlsson-Norrgren L, Runn P, C. H, Förlin L. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton–Buchanan), and rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J Fish Biol. 1985: 27(1): 81–95.
- 46. Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck T, Kalbfus W, et al. How estrogenic is nonyl-phenol?: A transgenerational study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) as a test organism. Aquat Toxicol. 2002; 59(3): 177–189.
- Abadie S, Jardet C, Colombelli J, Chaput B, David A, Grolleau JL, et al. 3D imaging of cleared human skin biopsies using light-sheet microscopy: A new way to visualize in-depth skin structure. Skin Res Technol. 2018; 24(2): 294–303. https://doi.org/10.1111/srt.12429 PMID: 29377352
- Becker K, Jährling N, Saghafi S, Dodt HU. Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution. Cold Spring Harb Protoc. 2013; 2013(8): 704– 713. https://doi.org/10.1101/pdb.top076539 PMID: 23906921
- Brede C, Friedrich M, Jordán-Garrote AL, Riedel SS, Bäuerlein CA, Heinze KG, et al. Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution. J Clin Invest. 2012; 122(12): 4439–4446. https://doi.org/10.1172/JCI65100 PMID: 23143304
- Elisa Z, Toon B, De Smedt SC, Katrien R, Kristiaan N, Kevin B. Technical implementations of light sheet microscopy. Microsc Res Tech. 2018; 81(9): 941–958. https://doi.org/10.1002/jemt.22981 PMID: 29322581
- Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat Protoc. 2012; 7(11): 1983–1995. https://doi.org/10.1038/ nprot.2012.119 PMID: 23060243
- Feuchtinger A, Walch A, Dobosz M. Deep tissue imaging: a review from a preclinical cancer research perspective. Histochem Cell Biol. 2016; 146(6): 781–806. https://doi.org/10.1007/s00418-016-1495-7 PMID: 27704211
- Zhao S, Todorov MI, Cai R, Al-Maskari R, Steinke H, Kemter E, et al. Cellular and Molecular Probing of Intact Human Organs. Cell. 2020; 180(4): 796–812. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.030 PMID: 32059778
- Kennel P, Teyssedre L, Colombelli J, Plouraboue F. Toward quantitative three-dimensional microvascular networks segmentation with multiview light-sheet fluorescence microscopy. J Biomed Opt. 2018; 23(8): 1–14. https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.8.086002 PMID: 30120828
- Lugo-Hernandez E, Squire A, Hagemann N, Brenzel A, Sardari M, Schlechter J, et al. 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. J Cereb Blood Flow Metab. 2017; 37(10): 3355–3367. https://doi.org/10. 1177/0271678X17698970 PMID: 28350253
- Candeo A, Sana I, Ferrari E, Maiuri L, D'Andrea C, Valentini G, et al. Virtual unfolding of light sheet fluorescence microscopy dataset for quantitative analysis of the mouse intestine. J Biomed Opt. 2016; 21(5): e56001. https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.5.056001 PMID: 27135065
- Klingberg A, Hasenberg A, Ludwig-Portugall I, Medyukhina A, Männ L, Brenzel A, et al. Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. J Am Soc Nephrol. 2017; 28(2): 452–459. https://doi.org/10.1681/ASN. 2016020232 PMID: 27487796
- Yang L, Feuchtinger A, Möller W, Ding Y, Kutschke D, Möller G, et al. Three-Dimensional Quantitative Co-Mapping of Pulmonary Morphology and Nanoparticle Distribution with Cellular Resolution in Nondissected Murine Lungs. ACS Nano. 2019; 13(2): 1029–1041. https://doi.org/10.1021/acsnano. 8b07524 PMID: 30566327

- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc. 1987; 147(Pt 3): 229–263. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x PMID: 3430576
- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. J Microsc. 1986; 143(Pt 1): 3–45. PMID: 3761363
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc. 2001; 204(Pt 3): 232–246. https://doi.org/10.1046/j. 1365-2818.2001.00958.x PMID: 11903800
- Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. J Microsc. 1986; 142(Pt 3): 259–276. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb04282.x PMID: 3735415
- Blutke A, Wanke R. Sampling Strategies and Processing of Biobank Tissue Samples from Porcine Biomedical Models. J Vis Exp. 2018;(133): e57276. https://doi.org/10.3791/57276 PMID: 29578524
- Schneider JP, Ochs M. Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: a comparison of methods. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014; 306(4): L341–L350. https://doi.org/10.1152/ajplung.00329.2013 PMID: 24375800
- 65. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. Apmis. 1988; 96(10): 857–881. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988. tb00954.x PMID: 3056461
- 66. Knust J, Ochs M, Gundersen HJG, Nyengaard JR. Stereological Estimates of Alveolar Number and Size and Capillary Length and Surface Area in Mice Lungs. The Anatomical Record. 2009; 292(1): 113–122. https://doi.org/10.1002/ar.20747 PMID: 19115381
- Braendgaard H, Gundersen HJ. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. J Neurosci Methods. 1986; 18(1–2): 39–78. https://doi.org/10.1016/0165-0270 (86)90112-3 PMID: 3540470
- Nyengaard JR, Gundersen HJG. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. J Microsc. 1992; 165(Pt 3): 427–431.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie. 1970; 26
 (1): 57–60. PMID: 5530651
- Tschanz S, Schneider JP, Knudsen L. Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. Ann Anat. 2014; 196(1): 3–11. https://doi.org/10.1016/j.aanat. 2013.04.011 PMID: 23769130
- Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. J Am Soc Nephrol. 1999; 10(5): 1100–1123. PMID: 10232698
- 72. Ostrander GK. The laboratory fish. 1st ed. San Diego: Academic Press; 2000.
- 73. Koppang EO, Fischer U, Moore L, Tranulis MA, Dijkstra JM, Köllner B, et al. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. J Anat. 2010; 217(6): 728–739. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01305.x PMID: 20880086
- Wilson JM, Laurent P. Fish gill morphology: inside out. J Exp Zool. 2002; 293(3): 192–213. https://doi. org/10.1002/jez.10124 PMID: 12115897
- Evans DH, Clairborne JB. The physiology of fishes. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006.
- Hughes GM. Morphometrics of fish gills. Respir Physiol. 1972; 14(1): 1–25. https://doi.org/10.1016/ 0034-5687(72)90014-x PMID: 5042155
- Hughes GM, Perry SF, Brown VM. A morphometric study of effects of nickel, chromium and cadmium on the secondary lamellae of rainbow trout gills. Water Res. 1979; 13(7): 665–679.
- Hermanns W, Liebig K, Schulz LC. Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritis using plastic embedded whole joints. Histochemistry. 1981; 73(3): 439–446. https://doi.org/10.1007/BF00495658 PMID: 7035413
- Helander KG. Thickness variations within individual paraffin and glycol methacrylate sections. J Microsc. 1983; 132(Pt 2): 223–227. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04276.x PMID: 6358514
- Matenaers C, Popper B, Rieger A, Wanke R, Blutke A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. PLoS One. 2018; 13(2): e0192879. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192879 PMID: 29444158

- Cressey D. Fish-kill method questioned. Nature. 2014; 506(7589): 419–420. https://doi.org/10.1038/ 506419a PMID: 24572404
- Readman GD, Owen SF, Knowles TG, Murrell JC. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. Sci Rep. 2017; 7(1): 7102–7102. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06917-2 PMID: 28769117
- Chance RJ, Cameron GA, Fordyce M, Noguera P, Wang T, Collins C, et al. Effects of repeated anaesthesia on gill and general health of Atlantic salmon, Salmo salar. J Fish Biol. 2018; 93(6): 1069–1081. https://doi.org/10.1111/jfb.13803 PMID: 30242832
- Deebani A, Iyer N, Raman R, Jagadeeswaran P. Effect of MS222 on Hemostasis in Zebrafish. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2019; 58(3): 390–396. https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000069 PMID: 30925946
- Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, et al. Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models. Toxicol Pathol. 2016; 44(3): 414–420. https://doi.org/10.1177/ 0192623316631023 PMID: 26883152
- Blutke A, Schneider MR, Renner-Müller I, Herbach N, Wanke R, Wolf E. Genetic dissection of IGF1dependent and -independent effects of permanent GH excess on postnatal growth and organ pathology of mice. Mol Cell Endocrinol. 2014; 394(1): 88–98. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.002 PMID: 25017732
- Hampton JA, Lantz RC, Hinton DE. Functional units in rainbow trout (Salmo gairdneri, Richardson) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types. Am J Anat. 1989; 185(1): 58–73. https://doi.org/10.1002/aja.1001850107 PMID: 2782277
- Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Simons JL, Provoost AP. Development of Vascular Pole-Associated Glomerulosclerosis in the Fawn-Hooded Rat. J Am Soc Nephrol. 1998; 9(3): 381–396. PMID: 9513900
- Wanke R, Wolf E, Brem G, Hermanns W. Role of podocyte damage in the pathogenesis of glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions: findings in the growth hormone transgenic mouse model of progressive nephropathy. Verh Dtsch Ges Pathol. 2001; 85: 250–256. PMID: 11894406
- Adams TE, Crabbs TA. Chapter 6—Basic Approaches in Anatomic Toxicologic Pathology. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). Boston: Academic Press; 2013. pp. 149–173.
- Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. J Vis Exp. 2012;(65): e3564. https://doi.org/10.3791/3564 PMID: 22871843
- 92. Braunbeck T, Storch V, Bresch H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in Zebrafish (Brachydanio rerio) and trout (Salmo gairdneri) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. Arch Environ Contam Toxicol. 1990; 19(3): 405–418. https://doi.org/10.1007/BF01054986 PMID: 2353840
- Gernhöfer M, Pawert M, Schramm M, Müller E, Triebskorn R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. J Aquat Ecosyst Stress and Recovery. 2001: 8: 241–260.
- 94. Baatrup E, Danscher G. Cytochemical demonstration of mercury deposits in trout liver and kidney following methyl mercury intoxication: differentiation of two mercury pools by selenium. Ecotoxicol Environ Saf. 1987; 14(2): 129–141. https://doi.org/10.1016/0147-6513(87)90055-8 PMID: 3691368
- Oulmi Y, Negele RD, Braunbeck T. Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. Ecotoxicol Environ Saf. 1995; 32(1): 39–50. https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1083 PMID: 8565876
- Waser WP, Schmitz A, Perry SF, Wobschall A. Stereological Analysis of Blood Space and Tissue Types in the Pseudobranch of the Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiol Biochem. 2005; 31(1): 73–82.
- Olson KR, Fromm PO. Preparation of fish tissues for electron microscopy. J Electron Microsc Tech. 1985; 2(3): 217–228.
- Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. J Microsc. 1999; 193(Pt 3): 199–211.
- Birzle CF. Etablierung und Validierung quantitativ-morphologischer Parameter bei Regenbogenforellen im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen. Doctoral dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München. 2015.
- Mattfeldt T, Mobius HJ, Mall G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. J Microsc. 1985; 139(Pt 3): 279–289. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1985.tb02644.x PMID: 3908688

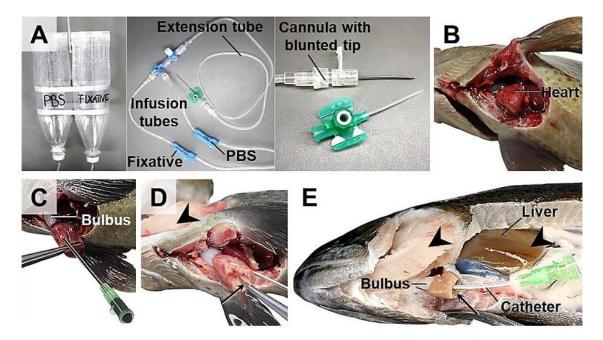
- Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P. Estimation of surface area and length with the orientator. J Microsc. 1990; 159(Pt 3): 301–317. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1990.tb03036.x PMID: 2243364
- 102. Gundersen HJ, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. J Microsc. 1985; 138(Pt 2): 127–142. https://doi.org/10.1111/j. 1365-2818.1985.tb02607.x PMID: 4020857
- 103. Jensen EB, Gundersen HJ, Østerby R. Determination of membrane thickness distribution from orthogonal intercepts. J Microsc. 1979; 115(Pt 1): 19–33. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1979.tb00149. x PMID: 423237
- 104. Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. J Microsc. 1988; 150(Pt 2): 117–136.
- 105. Delesse MA. Procédé mécanique pour determiner la composition des roches. C R Acad Sci. 1847; 25: 544–545.
- Lang G. Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2nd ed. Vienna: Springer;
 2013.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc. 1984; 134(Pt 2): 127–136.
- 108. Hoeflich A, Weber MM, Fisch T, Nedbal S, Fottner C, Elmlinger MW, et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/ IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. FASEB J. 2002; 16(13): 1721–1731. https://doi.org/10. 1096/fj.02-0349com PMID: 12409314
- 109. Hofmann I, Kemter E, Theobalt N, Fiedler S, Bidlingmaier M, Hinrichs A, et al. Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy. Growth Horm IGF Res. 2020; 51: 6–16. https://doi.org/10.1016/j.ghir.2019.12.006 PMID: 31926372
- 110. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microsc. 1977; 111(Pt 2): 219–223.
- 111. Herbach N, Schairer I, Blutke A, Kautz S, Siebert A, Göke B, et al. Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2009; 296(4): F819–F829. https://doi.org/10. 1152/ajprenal.90665.2008 PMID: 19211686
- 112. Rašković B, Cruzeiro C, Poleksić V, Rocha E. Estimating volumes from common carp hepatocytes using design-based stereology and examining correlations with profile areas: Revisiting a nutritional assay and unveiling guidelines to microscopists. Microsc Res Tech. 2019; 82(6): 861–871. https://doi.org/10.1002/jemt.23228 PMID: 30730589
- 113. Bucholtz RH, Tomkiewicz J, Nyengaard JR, Andersen JB. Oogenesis, fecundity and condition of Baltic herring (Clupea harengus L.): A stereological study. Fish Res. 2013; 145: 100–113.
- Blutke A, Schneider MR, Wolf E, Wanke R. Growth hormone (GH)-transgenic insulin-like growth factor 1 (IGF1)-deficient mice allow dissociation of excess GH and IGF1 effects on glomerular and tubular growth. Physiol Rep. 2016; 4(5): e12709. https://doi.org/10.14814/phy2.12709 PMID: 26997624
- 115. Hirose K, Østerby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. Kidney Int. 1982; 21(5): 689–695. https://doi.org/10.1038/ki.1982.82 PMID: 6981023
- 116. Rieger A, Kemter E, Kumar S, Popper B, Aigner B, Wolf E, et al. Missense Mutation of POU Domain Class 3 Transcription Factor 3 in Pou3f3L423P Mice Causes Reduced Nephron Number and Impaired Development of the Thick Ascending Limb of the Loop of Henle. PLoS One. 2016; 11(7): e0158977. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158977 PMID: 27420727
- Corsetti S, Gunn-Moore F, Dholakia K. Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. J Neurosci Methods. 2019; 319: 16–27. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.07.011 PMID: 30048674
- 118. Hong SM, Noë M, Hruban CA, Thompson ED, Wood LD, Hruban RH. A "Clearer" View of Pancreatic Pathology: A Review of Tissue Clearing and Advanced Microscopy Techniques. Adv Anat Pathol. 2019; 26(1): 31–39. https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000215 PMID: 30256228
- 119. Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience. Nat Rev Neurosci. 2020; 21(2): 61–79. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1 PMID: 31896771
- 120. Genina EA, Bashkatov AN, Tuchin VV. Tissue optical immersion clearing. Expert Rev Med Devices. 2010; 7(6): 825–842. https://doi.org/10.1586/erd.10.50 PMID: 21050092
- **121.** Dobosz M, Ntziachristos V, Scheuer W, Strobel S. Multispectral fluorescence ultramicroscopy: threedimensional visualization and automatic quantification of tumor morphology, drug penetration, and

- antiangiogenic treatment response. Neoplasia. 2014; 16(1): 1–13. https://doi.org/10.1593/neo.131848 PMID: 24563615
- 122. Harrison L, Schriever SC, Feuchtinger A, Kyriakou E, Baumann P, Pfuhlmann K, et al. Fluorescent blood-brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. Int J Obes (Lond). 2019; 43(6): 1305–1318. https://doi.org/10.1038/s41366-018-0221-z PMID: 30283080
- 123. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell. 2014; 159(4): 896–910. https://doi.org/10. 1016/j.cell.2014.10.010 PMID: 25417164
- 124. Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Forstner F, Keck T, Becker K, et al. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. Nat Med. 2011; 18(1): 166–171. https://doi.org/10.1038/nm.2600 PMID: 22198277
- 125. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell. 2014; 157(3): 726–739. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042 PMID: 24746791
- 126. Al-Bairuty GA, Shaw BJ, Handy RD, Henry TB. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquat Toxicol. 2013; 126: 104–115. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.005 PMID: 23174144
- Nunes B, Antunes SC, Gomes R, Campos JC, Braga MR, Ramos AS, et al. Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish Gambusia holbrooki: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations. Arch Environ Contam Toxicol. 2015; 68(2): 371–381. https://doi.org/10.1007/ s00244-014-0101-z PMID: 25475590
- 128. Rodrigues S, Antunes SC, Nunes B, Correia AT. Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. Environ Toxicol Pharmacol. 2017; 53: 164–176. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.05.012 PMID: 28599186
- 129. Brown DL. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. J Toxicol Pathol. 2017; 30(3): 183–191. https://doi.org/10.1293/tox.2017-0013 PMID: 28798525
- 130. Cruz AL, Fernandes MN, Perry SF. Effect of histological processing and methacrylate sectioning on the area of gill tissue in teleost. Braz J Biol. 2009; 69(2): 385–387. https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000200022 PMID: 19675943
- **131.** Kayser K, Borkenfeld S, Djenouni A, Kayser G. Texture and object related image analysis in microscopic images. Diagnostic Pathology. 2015.
- 132. Hufnagl P, Zwönitzer R, Haroske G. Guidelines Digital Pathology for Diagnosis on (and Reports of) Digital Images Version 1.0 Bundesverband deutscher Pathologen e.V. (Federal Association of German Pathologist). Diagnostic Pathology. 2018; 4(1).
- 133. Kayser K. Development of Telepathology in Europe-in commemoration of Professor Etienne Martin. Diagnostic Pathology. 2020; 6(1).
- 134. Blutke A, Sun N, Xu Z, Buck A, Harrison L, Schriever SC, et al. Light sheet fluorescence microscopy guided MALDI-imaging mass spectrometry of cleared tissue samples. Sci Rep. 2020; 10(1): 14461. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71465-1 PMID: 32879402
- 135. Tanaka N, Kanatani S, Tomer R, Sahlgren C, Kronqvist P, Kaczynska D, et al. Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. Nat Biomed Eng. 2017; 1(10): 796–806. https://doi.org/10.1038/s41551-017-0139-0 PMID: 31015588



S1 Fig. 3-D architecture of gills demonstrated by laser light sheet microscopy (LSFM) of a solvent-cleared gill.

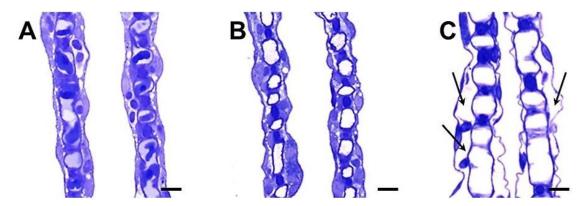
Autofluorescence images of an optically cleared (3DISCO) gill sample are acquired at 520/40 nm excitation range (ex) and 585/40 nm emission range (em). Important morphological structures and the direction of water flow are indicated: **SL**: Secondary lamellae, **PL**: Primary lamellae. **A.** Isolated gill. Note the arrangement of gill filaments in two vertical rows (*i.e.*, hemibranchs). **B.** Detail enlargement of the tip of a gill filament (as indicated in A). **C.** Detail enlargement of a gill filament with secondary lamellae (as indicated in B). Bars = 1 cm in A and = 100 μ m in B and C.



S2 Fig. Cardiac vascular perfusion fixation of rainbow trout gills.

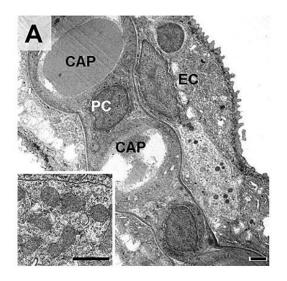
Perfusion fixation with formaldehyde-containing fixation solutions should be performed under a laboratory hood or on a well-ventilated necropsy desk, wearing personal protective gear (lab coat, gloves, goggles, respiratory protective mask). A. Equipment used for vascular perfusion fixation [1]. Two transparent plastic containers (soda-pop bottles) with cut-off bottoms are connected with infusion tubes and 3-way valves. The bottles are labeled appropriately (buffer and fixation solution) and installed approximately 70 cm above the level of the workbench. The buffer container is filled with chilled (~10°C) phosphate buffered saline (310 mosmol PBS, pH 7.4) [2-4], the fixation solution container is filled with neutrally buffered formaldehyde solution and the tubes are vented. A large diameter (17-20 Gauge) intravenous catheter (Braun®Vasofix® safety, B.Braun Melsungen AG, Germany) with a slightly grinded tip (to prevent an unintended penetration of the heart ventricle wall during perfusion) is used as perfusion cannula. To generate a perfusion pressure of approximately 40 mmHg (corresponding to the blood pressure of the ventral aorta [5, 6], the trout is placed approximately 54 cm below the perfusion containers, immediately after euthanasia. B. Ventro-lateral dissection of the heart and the bulbus arteriosus. C. After incision of the transversal septum and the pericard, the heart ventricle is punctured with the perfusion catheter cannula. Care must be taken not to pierce the bulbus or the ventral aorta. D. The cannula is removed and the flexible catheter is carefully pushed forward into the bulbus arteriosus to prevent backflow of buffer and fixative solution. The catheter is then connected to the (buffer-filled) perfusion tube. When perfusion with PBS is started, the heart ventricle is pierced below the entry site of the catheter (arrow in D, E) to create an outflow for the perfusate. PBS-perfusion is continued until the color of gills and liver turns into pale (arrowheads in D, E) and the outflowing perfusate is transparent. Subsequently, the valve of the fixative-solution bearing tube is opened before the valve of the PBS-tube is closed. E. Perfusion with fixation solution is continued for approximately 3 minutes. Gills are then dissected and further fixed by immersion as described in Section 7.

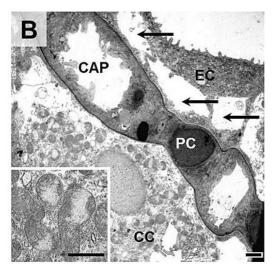
- 1. Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, et al. Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models. Toxicol Pathol. 2016;44(3): 414-420.
- 2. Byrne P, Speare D, Ferguson HW. Effects of a cationic detergent on the gills and blood chemistry of rainbow trout Salmo gairdneri. Dis Aquat Org. 1989;6: 185-196.
- 3. Hille S. A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, Salmo gairdneri Rich. J Fish Biol. 1982;20(5): 535-569.
- 4. Olson KR, Fromm PO. Preparation of fish tissues for electron microscopy. J Electron Microsc Tech. 1985;2(3): 217-228.
- 5. Kiceniuk JW, Jones DR. The Oxygen Transport System in Trout (Salmo Gairdneri) During Sustained Exercise. J Exp Biol. 1977;69(1): 247-260.
- 6. Wood CM, Shelton G. Cardiovascular dynamics and adrenergic responses of the rainbow trout in vivo. J Exp Biol. 1980;87: 247-270.



S3 Fig. Histological perfusion fixation artifacts in rainbow trout gills. A. Histology of secondary gill lamellae of a control trout (non-perfused). Note the presence of nucleated erythrocytes inside the capillaries. B, C. Histology of perfusion-fixed secondary gill lamellae. B. Adequate preservation of the morphology of gills perfused with ~40 mmHg perfusion pressure. C. Severe detachment of the gill epithelium in gills perfused with ~100 mmHg perfusion pressure (arrows). Semithin sections (0.5 μ m thickness). Epon. TB. Bars = 10 μ m.

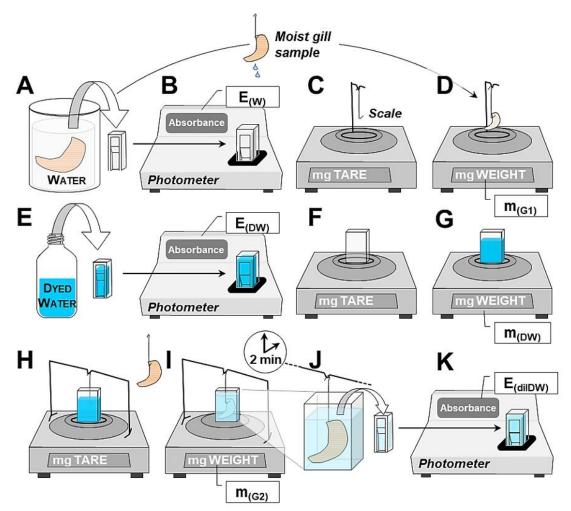
PUBLIKATION



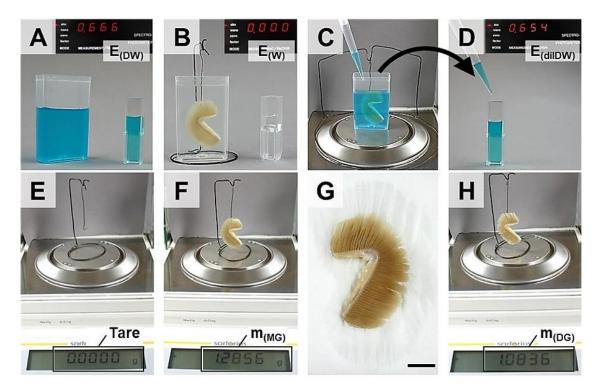


S4 Fig. Ultrastructural perfusion fixation artifacts in rainbow trout gills.

Representative transmission electron microscopic images of secondary lamellae of a control fish ($\bf A$, non-perfused), and of a gill perfused with ~100 mmHg ($\bf B$). Capillary (CAP), pillar cell (PC), epithelial cell (EC), chloride cell (CC). Note the detachment of the gill epithelium in $\bf B$ (arrows). Inset in B shows severely distended and swollen mitochondria of a chloride cell. TEM. Bars = 1 μ m.

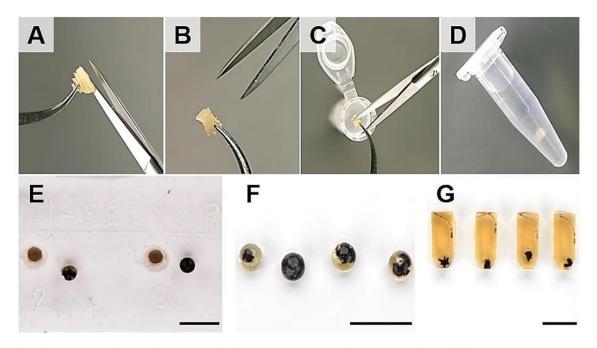


S5 Fig. Determination of the gill volume/density in consideration of the attached liquid volume. The filamentous-lamellar structure of gills favors binding of large amounts of fluid. When determining the weight or the volume of a tissue sample, the volume of liquid attached to the sample will thus bias the measurement results. The liquid volume attached to a sample of gill tissue can be determined by photometric measurement of the concentration of a dyed fluid before and after submersion of the tissue sample. A. The gill tissue sample is transferred to a container with (tab) water. B. The absorbance of the water (E_{nn}) is determined photometrically. C, D. The drained sample weight (including attached water) is measured and recorded (m_(G1)) after taring the scale to the weight of the sample holder. E. The absorbance (E_(DW)) of the submersion liquid, a solution of water dyed with 7.5 mg/l Acid Blue 9 (Alfa Aesar by Thermo Fisher GmbH, Germany) is determined (here: $\mathbf{E}_{(\mathrm{DW})}$ = 0.666 at 630 nm wavelength). F, G. After taring the scale to the weight of the submersion container, the weight of the volume of dyed submersion liquid in the submersion-container is measured ($\mathbf{m}_{(DW)}$). \mathbf{H} . A sample holder is positioned on the scale as indicated, so that the wire used to hold the gill sample is sufficiently submerged in the submersion fluid without touching the sides or the bottom of the container. The scale is then zeroed. Note that the sample holder is not placed on the sensor of the scale. I. The gill tissue sample is attached to the sample holder, so that the tissue is completely submerged in the submersion fluid without touching the sides or the bottom of the container. After equilibration for approximately two minutes, the weight (representing the cumulative weight of the fluid displaced by the submerged tissue and of the liquid that was attached to the gill tissue) is recorded $(\mathbf{m}_{(G2)})$. J. The absorbance $(\mathbf{E}_{(dilDW)})$ of the submersion fluid (diluted by the fluid volume that was attached to the gill tissue sample) is determined by photometric measurement and used to calculate the dye concentration in the fluid according to Lambert-Beer law. The quantity of water attached to the gills is determined from the decrease of the dye concentration in the submersion fluid (S2 Eq).



S6 Fig. Photographic illustration of the determination of the gill volume/density in consideration of attached liquid volume.

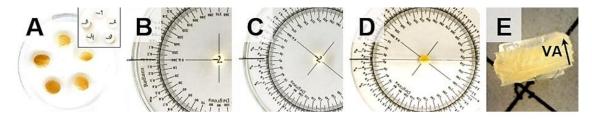
Container with Acid Blue-9 dyed submersion liquid of known concentration (here: 7.5 mg/l). The dyed submersion liquid has an absorbance of 0.666 (E_(DW)) at 630 nm wavelength. B. Gill submerged in water (absorbance of water $\mathbf{E}_{(\mathbf{w})} = 0.000$). **C.** The gill tissue sample is submerged in dyed submersion liquid, which is diluted by the (undyed) water attached to the gill tissue sample. Previously, the weight of the moist gill tissue sample and the weight of the dyed submersion liquid were measured (not shown here, compare to S5 Fig). D. Measurement of the absorbance of the diluted submersion liquid (here: $\mathbf{E}_{\text{(dilDW)}} = 0.654$). The dye concentration of the diluted submersion liquid is calculated according to Lambert-Beer law (S1 Eq). The volume of (undyed) water that is necessary to cause this concentration decrease (i.e., the volume of the water attached to the gill sample prior to submersion in the submersion liquid) is calculated by subtraction of the dyed liquid volume prior to dilution (VP) from the diluted dyed liquid volume (i.e., after submersion) (V_A) , V_A is calculated from the decrease in concentration previously determined by photometric measurement (S2 Eq). E-F. The weight of a moist gill tissue sample (including the liquid adhering to the sample is determined $(\mathbf{m}_{(MG)})$. G-H. The moist gill tissue sample is gently blotted dry on a lab-paper towel for approximately 10 seconds and subsequently weighed (m(pg)). To test the efficacy of the dry-dabbing to remove the water adhering to the gill tissue sample, the volume of the dry-dabbed sample is determined by the submersion method as shown in Fig 7 and compared to the volume of the identical gill tissue sample corrected for the volume of adhering liquid. Note that for demonstration purposes, the images show gills with incompletely removed gill arches. For analyses of quantitative morphological gill parameters, however, it is recommended to determine the weight, density, and volume of gill filament tissue as the appropriate reference compartment (after complete removal of the gill arches from the gills). Bar = 1 cm.



S7 Fig. Processing of a SUR sampled gill filament sample for generation of IUR sections (*Isector* method).

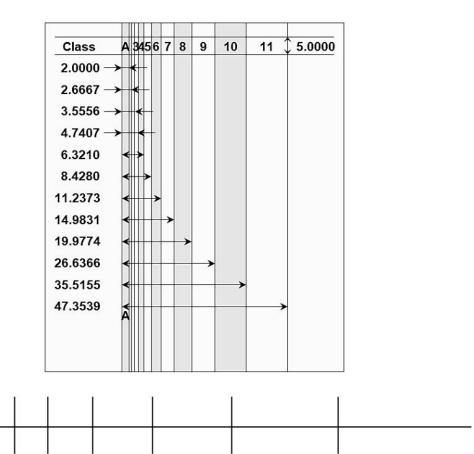
A-D. GF samples are carefully cut to a size of approximately 1 mm³ for subsequent electron microscopic studies. Sharp scissors are used to prevent artificial damage of the fragile secondary gill lamellae. If electron microscopic analyses are scheduled, the samples are postfixed in 2.5% glutaraldehyde dissolved in 0.1 M cacodylate buffer (**D**). **E.** The samples are embedded in Epon, using spherical casting molds. **F.** Polymerized Epon spheres with embedded gill filament tissue samples (compare to **Fig 9**). **G.** After randomization of their orientation, the Epon spheres are embedded in larger Epon blocks for further sectioning of semi- or ultrathin sections. Bars = 1 cm.

PUBLIKATION



S8 Fig. Processing of a SUR sampled gill filament sample for generation of GMA/MMA-embedded VUR sections.

A. SUR sampled specimens of agar-embedded gill filament tissue, excised with a biopsy punch. The numbers of the samples and the 0°-180°-lines are marked on the confetti paper placed on the samples (inset). **B-D.** Systematic uniform random rotation and VUR sectioning of samples. The samples are placed on an equiangular circle, corresponding to the 0°-180°-mark on the confetti paper (here: sample N°2, compare to **Fig 10**) (**B**). A vertical section (parallel to the VA) is cut through the sample at the predefined rotation angle (here: 38°). **E.** Section surface of the gill filament tissue sample (embedded in agar for stabilization). VA is still identifiable.



S9 Fig. Ruler copy templates suitable for analysis of apparent diffusion barrier section profile distances.

10

11

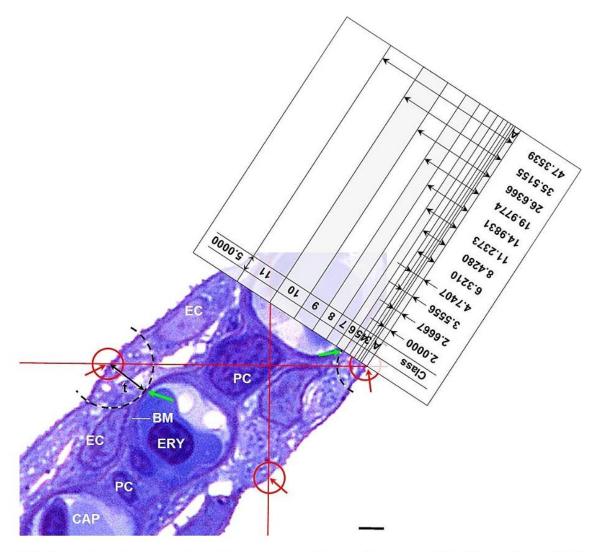
A 123 4 5 6

7

8

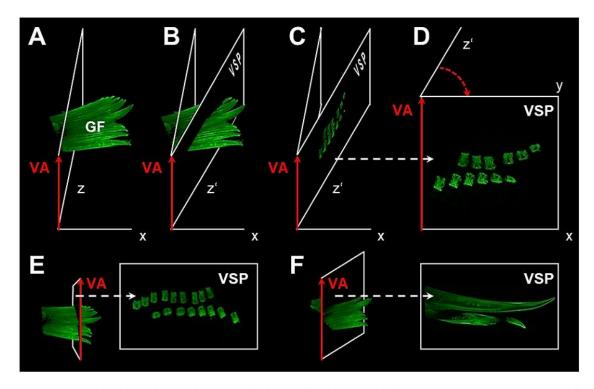
9

Note that the copy template is adjusted to a foil size of 210 mm \times 297 mm (DIN-A4). If transparencies of 8.5 \times 14 inch (US-Legal) are used, the settings of the photocopier have to be adjusted accordingly (on the printed ruler, the classes must have the indicated dimensions).



S10 Fig. Determination of $T_{h(DB)}$ in secondary gill lamellae in semithin IUR sections (light microscopic analysis).

A printed image of a SUR sampled field of view of an IUR semithin section of a SL acquired at 1000x magnification (oil immersion) is superimposed with a test grid of lines (red). Note that the final print magnification of the analyzed images must be determined for calculation of the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness. The transections of the gridlines with the epithelial surface of the SL are marked by red arrows. At these locations, the shortest distance (t, double arrow) between the epithelial surface of the SL and the inner surface of the vascular space of the gill capillary (green arrows) is determined (dashed circles). Along these lines, the diffusion barrier thickness is measured using a superimposed, transparent, logarithmic ruler subdivided into 12 classes. In the shown example, the measured distance falls in class 6. The true harmonic mean of the diffusion barrier thickness is calculated from the number of measurements and the corresponding classes (**Eq 13**). Semithin section (0.5 μ m thickness). Epon. TB. Bar = 2 μ m.



S11 Fig. Appearance of GF profiles in different vertical section planes (VSP) of virtual 3-D GF-reconstructions.

A. 3-D image of GF tissue, reconstructed from LSFM autofluorescence images of a 3DISCO-cleared gill filament sample. The orientation of a (user-defined) vertical axis (VA) relative to the sample is indicated by a red arrow. The directions of the corresponding x- and z-axes are indicated. **B.** The orientation of a random VSP (VA-z' plane) parallel to the VA is indicated. **C.** Section profiles of gill filaments in the VSP. Note that the profile areas are distorted due to the projection to the viewing plane. **D.** Appearance of the perpendicular aspect of the GF-VSP profiles after (virtually) turning the VSP around the VA. **E, F.** Appearance of GF profiles in different VSP orientations (orthogonal (**E**) and parallel (**F**) VSP orientation relative to the longitudinal axis of the gill filaments). Note that the purpose of this figure is only to demonstrate the different appearance of VSP section profiles of GF tissue samples. For quantitative stereological analyses of $S_{V(SL/GF)}$, optical VUR sections must be generated as shown in **Fig 18**.

PUBLIKATION

S1 Table. Dimensions of ruler (divisions equidistant on log reciprocal scale).

Class	Lower Limit, mm	1/Lower Limit, mm	Midpoint, mm
Class A	2.000	0.5000	0.4375
Class 1	2.6667	0.3750	0.3281
Class 2	3.5556	0.2813	0.2461
Class 3	4.7407	0.2109	0.1846
Class 4	6.3210	0.1582	0.1384
Class 5	8.4280	0.1187	0.1038
Class 6	11.2373	0.0890	0.0779
Class 7	14.9831	0.0667	0.0584
Class 8	19.9774	0.0501	0.0438
Class 9	26.6366	0.0375	0.0328
Class 10	35.5155	0.0282	0.0246
Class 11	47.3539	0.0211	0.0211

Class A: The initial division in which no measurement of the diffusion barrier (DB) can be obtained. Class 1-11: Ruler classes. Lower Limit: Begin of the next ruler class in size, measured from ruler origin. Midpoint of classes n: ((1/Lower Limit of Class n) + (1/Lower Limit of Class n+1))/2.

S2 Table. 3DISCO clearing of trout gill tissue (modified according Ertürk et al. [1]).

Chemical	Time	Remarks
Starting material: Form	alin-fixed gill filament tissue san	nples (clear tissue prior to SURS)
Гаb water	1 h	Wash out of fixative
50% THF	1h	
70% THF	1h	
30%THF	1h	
100% THF	1h	
100% THF	over night	
100% THF	1 h	
100% DCM	30 min ^a	^a until tissue sample sinks
BABB	20	
BABB	≥3h	

Store in BABB in the dark at 4-8°C. Use BABB as medium for LSFM analysis and allow for temperature equilibration of the sample before starting image acquisition.

SURS: Systematic uniform random sampling; **THF**: Tetrahydrofuran; **DCM**: Dichloromethane; **BABB**: Benzyl alcohol-benzyl benzoate.

^{1.} Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat Protoc. 2012;7(11): 1983-1995.

S1 Video. 3-D reconstruction of rainbow trout gills.



Das Video ist abbrufbar unter: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462.s014

S1 Experimental Data

A. Comparison of V_{V(SL/GF)} in left and right gills.

In a preliminary test, we compared the estimated volume densities of secondary lamellae in the gill filaments ($V_{V(SL/GF)}$) of the right and left gills of a healthy rainbow trout (body weight ~1100 g). The estimated values for $V_{V(SL/GF)}$ of the left and right gills (0.278 ± 0.01) (MEAN ± SD) did not differ significantly (p = 0.200, paired t-test).

B. Sample number for quantitative morphological analyses of rainbow trout gills.

The recommended sample numbers represent orientation values based on previous studies [1] and unpublished preliminary experiments. For example, we compared the values of $V_{V(SL/GF)}$ obtained by analysis of VUR sections of variable numbers of SURS gill filament tissue samples of a rainbow trout of ~1300 g body weight. The $V_{V(SL/GF)}$ values estimated in 18, 15, 12, 9, 6 and 3 SUR samples did not differ significantly (p = 0.845, Kruskal-Wallis-Test), indicating the adequacy of 5 samples per fish for analysis of this parameter with a total coefficient of variance (CV) of 1.7%.

C. Examination of gill filament tissue shrinkage during GMA/MMA-embedding.

The extent of tissue shrinkage during GMA/MMA-embedding was examined in 12 SUR sampled, cylindrical (2 mm diameter) specimens of formalin-fixed rainbow trout gill filament tissue samples, exactly as described in **Fig 14**. The volume of the samples (prior to embedding) was determined from their weight and density (referring to **Section 8**). After embedding, the GMA/MMA block was exhaustively serially sectioned with a nominal section thickness of 1.5 μ m (1437 sections in total). The factual mean individual section thickness (1.386 \pm 0.19 μ m) was determined by spectral reflectance measurement (F20, Filmetrics®, USA) [2]. The volume of the GMA/MMA-embedded tissue samples was determined according to the Cavalieri principle from the gill tissue section profile areas measured in every 40th section of the series (36 sections in total).

D. Estimation of $V_{V(SL/GF)}$ in VUR sections of SUR sampled gill filament tissue samples.

Using the approach described in **Section 12**, a mean $V_{V(SL/GF)}$ of 0.286 \pm 0.01 (MEAN \pm SD) was determined in healthy rainbow trout (n = 2) of ~1100-1300 g body weight.

E. Determination of the sufficient number of points hitting section profiles of gill tissue (in all examined fields of view in all sections of all samples per case) to achieve an estimate of $V_{V(SL/GF)}$ with an expected relative error probability of 5% of the mean $V_{V(SL/GF)}$.

Using the described procedures, we estimated the volume densities and total volumes of secondary gill lamellae in the gill filaments of a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight. 4 SURS samples of the gill filament tissue compartment were taken and processed for generation of VUR GMA/MMA-sections, as described in **Sections 9** and **10**. At 100x microscopic magnification, 46 test field areas were SUR sampled in the VUR sections per case, using a microscopy and stereology system with newCASTTM software (Version 3.6.2.0, Visiopharm, Denmark) and overlaid with a 8x8 point grid. 1338 points were counted hitting section profiles of the GF reference compartment, and 392 points hitting SL section profiles per case. The $V_{V(SL/GF)}$ accounted for 0.293 and the $V_{(SL,GF)}$ for 0.832 cm³. A reduction of the examined test fields (and of the correspondingly counted points) to 15 (with 421 points hitting GF section profiles) did not significantly alter the estimates of $V_{V(SL/GF)}$ (p = 0.976, Kruskal-Wallis-Test), confirming that a total number of ~600 points hitting the reference compartment per case and analysis of a section area sampling fraction of approximately 10% of the total gill tissue section area is sufficient.

F. Estimation of $S_{V(SL/GF)}$ and $S_{(SL,GF)}$ in VUR sections of SUR sampled GMA/MMA-embedded gill filament tissue samples.

Applying the described method, we estimated $S_{V(SL/GF)}$ in VUR sections of 4 SUR sampled, GMA/MMA-embedded gill filament tissue samples taken from a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight. 55 test fields were SUR sampled and photographed at 100x microscopic magnification. The images were enlarged to a final magnification of 300x and digitally overlaid with a stereological test system of 70 points and 35 cycloids (i.e., 2 points per cycloid test arch, cycloid test arch length is calculated from the rectangular frame width as I = 1/10 frame width), aligned to the vertical axis of the VUR gill filament tissue section. 2145 points hitting gill filament tissue section profiles, and 580 intersections between cycloid test lines and the epithelial surface of the secondary lamellae were counted. A (shrinkage-corrected) $S_{V(SL/GF)}$ of 333.53 cm²/cm³ and, correspondingly, a $S_{(SL,GF)}$ of 947.24 cm² was estimated. A 80% reduction of the examined test fields (and of the correspondingly counted points and intercepts) did not significantly alter the estimates of $S_{V(SL,GF)}$ (p = 0.918, Kruskal-Wallis-Test), confirming that a section area sampling fraction of approximately 10% (i.e., a total number of ~15-20 test field areas at 100x microscopic magnification) was sufficient in this example.

G. Estimation of $N_{V(EC/SL)}$, $V_{V(EC/SL)}$ and $\overline{v}_{(EC,SL)}$ in IUR sections of SUR sampled Eponembedded gill filament tissue samples using the physical disector method.

In a previous study [1], we used the described disector method for estimation of the number and mean cellular volume of epithelial cells in the secondary gill lamellae of 5 healthy rainbow trout of 269.4 \pm 29.0 g body weight. 186 \pm 19 Q- were counted on 22 disectors. $N_{V(EC/SL)}$ was estimated as $808.42 \pm 87.39 \times 1/10^6 \ \mu m^3$, with a mean volume density $V_{V(EC/SL)}$ of 0.514 ± 0.01 and mean cellular SL-EC volume $\overline{V}_{(EC,SL)}$ of $643.60 \pm 70.67 \ \mu m^3$.

H. Determination of the sufficient number of points hitting section profiles of gill tissue (in all examined fields of view in all sections of all samples per case) to achieve an estimate of $V_{V(EC/SL)}$ with an expected relative error probability of 5% of the mean $V_{V(EC/SL)}$.

Using the described procedures, we estimated $V_{V(EC/SL)}$ of a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight. 5 SURS samples of the gill filament tissue compartment were taken and processed for generation of VUR GMA/MMA-sections, as described in **Sections 9** and **10**. At 200x microscopic magnification, 15 test field areas (counting frame area of 150 μ m x 100 μ m) were SUR sampled in the VUR sections per case, using a microscopy and stereology system with newCASTTM software (Version 3.6.2.0, Visiopharm, Denmark) and overlaid with a 8x8 point grid. 287 points were counted hitting section profiles of the SL reference compartment, and 151 points hitting EC section profiles per case. The $V_{V(EC/SL)}$ accounted for 0.526. A reduction of the examined test fields (and of the correspondingly counted points) from 44 (with 885 points hitting SL section profiles) to 15 did not significantly alter the estimates of $V_{V(EC/SL)}$ (p = 0.280, Kruskal-Wallis-Test), confirming that a total number of ~280 points hitting the reference compartment (SL) per case and a grid of 10x10 points per counting frame is sufficient.

I. Estimation of $T_{h(DB)}$ in IUR (ultrathin) sections of SUR sampled Epon-embedded gill filament tissue samples (TEM).

Using the described method in a previous study [1], we analyzed the true harmonic mean of the diffusion barrier thickness in 5 healthy rainbow trout of 269.4 \pm 29.0 g body weight (performing 263 \pm 30 measurements in 14.7 \pm 0.8 SUR sampled fields of view per case), yielding an average $T_{h(DB)}$ of 3.06 \pm 0.12 μ m.

J. Examination of gill filament tissue shrinkage during 3DISCO clearing.

We analyzed the extent of clearing-related gill filament tissue shrinkage by measuring the volumes of 8 individual samples of formalin-fixed gill filament tissue prior to and after 3DISCO clearing. Volumetry was performed using the submersion method described in **Section 8**, with 20°C 0.9% saline ($\rho = 1.0046 \text{ g/cm}^3$) or, respectively, BABB ($\rho = 1.0756 \pm 0.017 \text{ g/cm}^3$) as submersion liquid. On the average, a 3DISCO-associated 3-D volume shrinkage of $50.72 \pm 2.88\%$ was determined (referring to a corresponding linear tissue shrinkage factor f_s of 0.79 ± 0.01).

K. Estimation of $V_{V(SL/GF)}$ and $V_{(SL,GF)}$ as well as (shrinkage-corrected) $S_{V(SL/GF)}$ and $S_{(SL,GF)}$ using SUR sampled virtual optical VUR gill filament tissue sections.

 $V_{V(SL/GF)}$ was analyzed by LSFM at 100x final magnification, using SUR sampled virtual optical VUR sections acquired in 8 SUR sampled specimens of 3DISCO-cleared gill filament tissue samples, derived from a healthy rainbow trout of ~1300 g body weight. Within the digital images of the virtual optical VUR sections, 63 fields of view were SUR sampled. In these images, $V_{V(SL/GF)}$ was estimated by point counting, using a cross grid of 10x10 points (**Fig 22**). In total, 3030 points hitting the reference compartment were counted. $V_{V(SL/GF)}$ was thus determined as 0.288 and $V_{(SL,GF)}$ as 0.818 cm³ for a total gill filament volume of $V_{(GF)} = 2.84$ cm³. A reduction of the examined test fields (and of the correspondingly counted points) to 12 (546 points hitting the digital gill filament tissue section profiles) did not significantly alter the estimates of $V_{(SL,GF)}$ (p = 0.891, Kruskal-Wallis-Test), confirming that a total number of ~600 points hitting the reference compartment per case is sufficient.

 $S_{V(SL/GF)}$ was analyzed in the same (virtual) optical VUR sections (**Fig 23**) used for estimation of $V_{V(SL/GF)}$. The images were enlarged to a final magnification of 300x (i.e., the true physical factor of magnification of the (printed) image) and overlaid with a test system combining 35 cycloid arches and 70 test points. Per case, 3080 points hitting the gill filament tissue and 951 intersections of the cycloids with the epithelial surface of the secondary gill lamellae were counted. $S_{V(SL/GF)}$ was thus determined as (shrinkage-corrected) 346.24 cm²/cm³, and $S_{(SL,GF)}$ as 983.32 cm². A reduction of the examined VUR section images (and correspondingly counted points) to 8 (and 411 points hitting the digital gill filament tissue section profiles) did not significantly affect the estimates of $S_{(SL,GF)}$ (p = 0.796, Kruskal-Wallis-Test), confirming the robustness of the applied sampling designs and analysis approaches.

Birzle CF. Etablierung und Validierung quantitativ-morphologischer Parameter bei Regenbogenforellen im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen. Doctoral dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München. 2015.

^{2.} Matenaers C, Popper B, Rieger A, Wanke R, Blutke A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. PLoS One. 2018;13(2): e0192879.

PUBLIKATION

S1 Eq. Concentration determination by Lambert-Beer Law.

 $c = E_{\lambda}/(\mathcal{E}_{\lambda} \times d)$

c Concentration of the absorbing substance in the liquid $E_{\lambda} \qquad \qquad \text{Absorbance of the material for light of wavelength } \lambda$

 \mathbf{E}_{λ} Extinction coefficient at the wavelength λ

d Path length of the cuvette

S2 Eq. Determination of dyed liquid volume after dilution.

$V_A = V_P \times c_P/c_A$	
V _A	Volume of the dyed liquid volume after submersion ($\it i.e.$, diluted by the liquid attached to the wet gill filament sample)
V_P	Volume of the dyed liquid prior to submersion of the (wet) gill filament sample
СР	Concentration of the dyed submersion liquid prior to submersion of the (wet) gill filament sample
CA	Concentration of the dyed submersion liquid after submersion of the (wet) gill filament sample (i.e., diluted)

5 DISKUSSION

Diskrepanzen von in unterschiedlichen ökotoxikologischen Studien ermittelten Endpunkten, wie die der an Regenbogenforellen mittels histopathologischer Kiemenanalyse in verschiedenen Toxizitätstests ermittelten NOECs von Diclofenac die Notwendigkeit der Etablierung standardisierter. [13,17-20], belegen repräsentativer, reproduzierbarer und somit vergleichbarer Analyseverfahren für die Untersuchung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter in ökotoxikologischen Studien. Die Variabilität der ermittelten Endpunkte einzelner Toxizitätsstudien kann in Faktoren des experimentellen Designs begründet liegen, wie beispielsweise in Unterschieden in den Expositionsbedingungen [13]. Diese lassen sich durch die Durchführung von Expositionsversuchen unter gleichen Expositionsbedingungen vermeiden, z. B. durch den Einsatz von ökotoxikologischen Expositionsanlagen, welche die Umgebungsparameter (Wassertemperatur, -leitfähigkeit, gelöster Sauerstoff im Wasser, Tageslichtlänge, etc.) kontinuierlich überwachen und konstant halten [57,108]. Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen einzelner histopathologischer Studien können zudem von den verwendeten Sektions- und Probennahmeverfahren und der Probenprozessierung herrühren [16,20]. Mit der bedeutendste Faktor ist jedoch die subjektive und daher bisweilen stark voneinander abweichende Interpretation morphologischer Gewebsalterationen durch verschiedene untersuchende Personen [16,20,21,113].

Die Ermittlung akkurater quantitativ-morphologischer Parameter mittels stereologischer erwartungstreuer design-basierter Probennahmeund Analyseverfahren erlaubt eine objektive Darstellung verschiedener morphologischer Gewebeeigenschaften sowie die statistische Auswertung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [22,23,34,35]. Gerade für die Detektion subtiler histomorphologischer Gewebsalterationen eignen sich quantitativ-stereologische Methoden in besonderem Maße, da sie deren akkurate Messung ermöglichen. Der qualitativen oder auch semiquantitativen histopathologischen Analyse hingegen fehlt die notwendige Sensitivität für deren Detektion und/oder Beurteilung [22-24]. Auch (oder gerade) subtile morphologische Veränderungen können jedoch hinweisend sein auf nachteilige, potenziell irreversible Effekte von Schadstoffen [22].

Die vorliegende Dissertation behandelt die Anwendung quantitativ-stereologischer Methoden in der histopathologischen Analyse der Kiemen in von ökotoxikologischen Studien als Testorganismen eingesetzten Regenbogenforellen. Das in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] präsentierte Protokoll berücksichtigt sämtliche für die akkurate Erhebung erwartungstreuer quantitativ-morphologischer Parameter obligaten Aspekte der quantitativ-stereologischen Untersuchung von Kiemen als komplexe, sensitive Indikatororgane in der ökotoxikologischen Forschung [16,25,121,159]. Es werden erwartungstreue quantitativ-stereologische Methoden vorgestellt, etablierten, modernen, modellunabhängigen repräsentativen Stichprobennahmeund Analyseverfahren beruhen [23,33,34]. Diese haben ihre allgemeine Eignung für quantitativ-morphologische Analysen an zahlreichen Organen und Geweben von Säugetieren unter Beweis gestellt [36-40,207]. Sie wurden zudem bereits teilweise an Fischen verschiedener Arten und Körpergrößen für die Ermittlung quantitativmorphologischer Kiemenparameter herangezogen [17,31,41-47].

Allerdings geht die Durchführung der klassischen modellunabhängigen quantitativstereologischen Verfahren aufgrund der Ausrichtung auf die licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung histologischer Gewebeschnitte mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand einher [23]. Daher wurde im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes die Eignung der Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) optisch geklärter Kiemenproben für die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter untersucht. Dieses moderne Bildgebungsverfahren dient der Abbildung tiefer Gewebeprobenareale (deep tissue imaging) und ermöglicht die Anfertigung optischer, fluoreszenzbasierter Schnitte intakter dreidimensionaler und optisch geklärter Gewebeproben [58]. Bei der Ermittlung quantitativ-morphologischer Parameter hat sich das Verfahren der LSFM als effektives, elegantes und zügiges Verfahren erwiesen [59-63,65]. Bezüglich der spezifischen qualitativen oder quantitativen Analyse optisch geklärter Kiemenproben von Regenbogenforellen mittels LSFM liegen bislang keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen vor. Die publizierte Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation [66] präsentiert somit das erste umfassende Protokoll für die Durchführung des optischen Clearings von Regenbogenforellen-Kiemenproben und deren LSFM-Analyse für die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter.

In der Ermittlung und Quantifizierung toxischer Effekte von Umweltschadstoffen an den Kiemen als sensitive Indikatororgane gewährleisten die dargestellten klassischen sowie auf moderner LSFM basierenden Protokolle reproduzierbare, akkurate Ergebnisse. Die Anwendung modellunabhängiger quantitativ-Probennahmeund Analysemethoden ermöglicht stereologischer die Vergleichbarkeit der ermittelten Endpunkte sowohl innerhalb als auch zwischen einzelnen ökotoxikologischen Studien. Sie leistet einen wesentlichen Beitrag zu der Qualität und Zuverlässigkeit der ermittelten ökotoxikologischen Endpunkte und der darauf basierenden Umweltrisikobewertung von Gewässerschadstoffen. unnötige Wiederholungsversuche vermieden werden können, tragen präsentierten Protokolle zudem zu der Reduktion der Anzahl der in Toxizitätstests als Testorganismen eingesetzten Fische bei.

5.1 Diskussion des allgemeinen experimentellen Designs

Regenbogenforellen stellen als weitverbreitete, umfassend erforschte und äußerst sensitive Fischart eine der am häufigsten in Toxizitätstests eingesetzten Fischspezies dar [5,6,10,120]. Die in der dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Publikation präsentierten Protokolle sind an die Kiemen von Regenbogenforellen mit einem Körpergewicht von 300-2000 g angepasst [66]. Die beschriebenen Methoden sind jedoch auf andere Fischarten mit vergleichbarer Größe und Kiemenstruktur übertragbar (z. B. andere Salmoniden-Spezies wie die Bachforelle (*Salmo trutta fario*) (unpublizierte eigene Daten)). Dies ermöglicht deren breite Anwendung in klassischen design-basierten quantitativ-stereologischen Untersuchungen und LSFM-basierten quantitativ-morphologischen Analysen an in der ökotoxikologischen Forschung eingesetzten Fischen.

Regenbogenforellen der in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] untersuchten Größenordnung werden der ökotoxikologischen Forschung häufig als Testorganismen in Toxizitätstests eingesetzt [51-57]. Die Verwendung von Regenbogenforellen entsprechender Größe erleichtert die Entnahme der Kiemen, insbesondere unter Anwendung des beschriebenen kiemenschonenden Sektionsprotokolls (siehe Abbildung 6 der Publikation [66]), sowie deren Handhabung in der anschließenden Probennahme und -prozessierung. Die bei kleineren Fischarten zu beobachtende iatrogene Schädigung der Kiemen während der Entnahme (und die darauf zurückzuführende verminderte Qualität der histologischen Darstellung der Kiemenmorphologie) wird auf diese Weise vermieden [16].

Die Verwendung von Regenbogenforellen zwischen 300-2000 g Körpergewicht erhöht nicht nur die Praktikabilität der illustrierten Methoden, sondern erleichtert auch die Durchführung operativer Eingriffe (z. B. die postmortale vaskuläre Perfusionsfixierung) [5]. Es steht zudem ausreichend Kiemengewebe für die quantitativ-stereologische Kiemenanalyse und ergänzende Untersuchungen (z. B. molekular, biochemisch oder analytisch-chemisch) zur Verfügung. Verbleibendes Gewebe kann für erweiterte, oder sich aus den Studienergebnissen neu ergebende, Fragestellungen zurückbehalten und aufbewahrt werden. Im Gegensatz zu vielen anderen standardmäßig in Toxizitätstests eingesetzten Fischarten (z. B. dem Zebrabärbling (*Danio rerio*) [10]) erlaubt die Verwendung von

Regenbogenforellen dieser Größenordnung neben der Beprobung der Kiemen auch die Entnahme einer Vielzahl an Proben weiterer Organe und Gewebe [5]. Dies ermöglicht die Erhebung zusätzlicher, ergänzender Daten. Potenzielle Zielorgane und -gewebe eines untersuchten Umweltschadstoffes können ermittelt werden, ebenso wie ein breites Spektrum an molekularen, biochemischen oder analytischchemischen Parametern. Diese haben das Potenzial, Aussagekraft und Effizienz histopathologischer Diagnosen zu steigern, da die Toxizität eines potenziellen Schadstoffes nicht anhand eines einzelnen Endpunktes ermittelt werden kann [16,20,21].

Die dargestellte tierschutzkonforme Tötungsmethode (siehe Abschnitt 5 der publizierten Originalarbeit der vorliegenden Dissertation [66]) wurde so gewählt, dass sie keinen Einfluss auf die Kiemenmorphologie nimmt (z. B. durch Blutungen infolge eines Kopfschlages). Das Protokoll sieht zudem die Entnahme der Kiemen anhand eines kiemenschonenden und effizienten Sektionsverfahrens sowie die unverzügliche Immersionsfixierung vor (siehe Abschnitt 7 der Publikation [66]). latrogene Schäden und die postmortale Autolyse der fragilen Kiemenlamellen, welche die Qualität der histologischen Schnitte beeinträchtigen können [16], werden so vermieden.

Eine Methode der kardiovaskulären Perfusionsfixierung der Organe und Gewebe der Regenbogenforelle wurde entwickelt und anschaulich dargestellt (siehe Abschnitt 6 und Abbildung S2 der Publikation [66]). Die präsentierte Methode erlaubt die Perfusion des gesamten Gefäßsystems der Fische [263]. Die vaskuläre Perfusionsfixierung dient der Ergänzung zahlreicher quantitativ-stereologischer Analysen und wird auch in quantitativ-morphologischen Kiemenuntersuchungen eingesetzt [42,220,264-267]. Neben einer schnellen, effizienten in situ Fixierung des Gewebes dient sie der Entfernung zellulärer Blutbestandteile aus dem Blutgefäßsystem [268,269]. Letzteres ist prinzipiell auch für die Durchführung von LSFM-Analysen von Interesse, da die Entfernung zellulärer Blutbestandteile aus dem Gefäßsystem die Lichtabsorption innerhalb der Gewebeprobe während der Aufnahme optischer Schnitte reduziert [58], auch wenn die Bestimmung der in der vorliegenden Arbeit analysierten quantitativ-morphologischen Kiemenparameter problemlos an nicht perfusionsfixierten Kiemenproben durchgeführt werden kann. Das präsentierte Protokoll für die kardiovaskuläre Ganzkörper-Perfusionsfixierung wurde gezielt an die physiologischen Parameter der Regenbogenforelle angepasst [66]. Die Anwendung des Protokolls führt bei fachgerechter Durchführung zu einer adäguaten Fixierung des Kiemengewebes und der Entfernung der Erythrozyten aus den Gefäßräumen der Sekundärlamellen. Die Verwendung eines zu hohen Perfusionsdruckes kann jedoch zu Artefakten an den Sekundärlamellen führen (siehe Abbildungen S3 und S4 der Publikation [66]). Alle relevanten quantitativmorphologischen Kiemenparameter lassen sich zuverlässig an nicht perfusionsfixierten Kiemengewebeproben bestimmen, zudem gewährleistet das in der veröffentlichten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation [66] verwendete 3DISCO-Clearing-Verfahren [240] eine effiziente optische Klärung Kiemengewebes auch ohne vorangehende Perfusionsfixierung. Die kardiovaskuläre Perfusionsfixierung wird daher primär empfohlen, wenn das Studiendesign zusätzliche Untersuchungen vorsieht, welche von der Durchführung einer Perfusionsfixierung profitieren.

Die vorliegende Arbeit legt den Fokus auf die quantitativ-stereologische Analyse der Kiemen. Diese haben nicht nur zahlreiche physiologische Schlüsselfunktionen inne [131], sondern stellen als Hauptzielorgan für im Wasser gelöste Umweltschadstoffe eines der bedeutendsten Organe für die Beurteilung von Gewässerbelastungen dar [25-27,159,160]. Die dreidimensionale Gewebearchitektur der Kiemen ist äußerst komplex und hochgradig anisotrop [8,28,135]. Dies stellt die erwartungstreue der Umweltschadstoffen Quantifizierung Effekte von mittels quantitativstereologischer Methoden vor besondere Herausforderungen, da die histologische Darstellung der Kiemenstrukturen stark von der Schnittebenenorientierung abhängig ist und die Ermittlung bestimmter relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter eine Randomisierung der Schnittebenenorientierung erfordert [8,33]. Dennoch ist die Anwendung quantitativ-stereologischer Methoden gerade in der Untersuchung von Kiemenläsionen in Expositionsversuchen von größter Wichtigkeit, da schadstoffbedingte Kiemenläsionen subtil sein können und bis zu einem gewissen Schweregrad leicht übersehen werden oder ohne spezielle Untersuchungstechniken nur schwer zu identifizieren sind (z. B. Veränderungen des Durchmessers von Blutgefäßen in den Kiemen) [27].

Das Gesamtvolumen der Kiemen (bzw. der Kiemenfilamente (gill filaments (GF¹)) (V_(GF)), das Volumen der Sekundärlamellen der Kiemen (V_(SL,GF)), die Oberfläche der Sekundärlamellen der Kiemen (S(SL,GF)), das Volumen der Epithelzellen der Sekundärlamellen (V(EC.SL)), die Anzahl der Epithelzellen der Sekundärlamellen (N_(EC.SL)), das mittlere Volumen der Epithelzellen der Sekundärlamellen (V_(EC.SL)) und die Diffusionsbarrierendicke (das wahre harmonische Mittel der Diffusionsdistanz (T_{h(DB)})) dienen der effektiven Beschreibung der wichtigsten morphologischen Charakteristika der Kiemen bzw. der Sekundärlamellen als funktionelle respiratorische Grundeinheit der Kiemen [28]. Die in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] beschriebenen Probennahme- und Analyseprotokolle wurden auf die Analyse dieser quantitativ-morphologischen Kiemenparameter ausgerichtet, sind jedoch so konzipiert, dass sie für die präzise und erwartungstreue Ermittlung weiterer quantitativ-morphologischer Kiemenparameter herangezogen oder angepasst werden können, falls dies für die Quantifizierung spezifischer Effekte von Umweltschadstoffen erforderlich ist.

_

¹Der Kiemenbogen wird vor der Volumetrie unter Schonung der Kiemenfilamente entfernt, um eine anschließende Prozessierung ohne Entkalkung des Gewebes zu ermöglichen. Für die Volumetrie und nachfolgende quantitativ-stereologische Analysen stehen somit die Kiemenfilamente (gill filaments, GF) (Primärlamellen und Sekundärlamellen), teilweise eingebettet in das interbranchiale Septum, zur Verfügung. Für die bessere Lesbarkeit wird jedoch weiterhin der Begriff Kiemen und Kiemenproben anstelle von Kiemenfilamenten und Kiemenfilament-Proben verwendet.

5.2 Diskussion der quantitativ-stereologischen Analyse der Kiemen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie

Die in der publizierten Originalarbeit zu der vorliegenden Dissertation [66] präsentierten Probennahme-, Probenprozessierungs- und Analyseverfahren (Volumetrie, Anzahl der zu entnehmenden Gewebeproben, Randomisierung der Schnittebene, Ermittlung der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung und die Anwendung der stereologischen Testsysteme) garantieren die erwartungstreue Ermittlung quantitativ-stereologischer Schätzwerte [23,33,34,179]. Das Protokoll für die quantitativ-stereologische Analyse der Kiemen von Regenbogenforellen basiert auf umfassender Literaturrecherche, praktischer Erprobung und umsichtiger Studienplanung und ermöglicht die Erhebung zuverlässiger Analyseergebnisse ohne redundanten Arbeits- und Zeitaufwand. Die detaillierte Beschreibung der anzuwendenden Verfahren erhöht nicht nur deren Praktikabilität, sie entspricht auch den Forderungen zahlreicher Fischpatholog_innen nach einer detaillierten Methodenbeschreibung, um so die Reproduzierbarkeit histopathologischer Daten von Fischen zu gewährleisten [16].

Ein Großteil der in vorangegangenen Studien publizierten quantitativmorphologischen Kiemenanalysen erfordert die vollständige Einbettung der für die Untersuchung herangezogenen Kiemen, unter anderem für die Bestimmung des Referenzkompartimentvolumens mit der Cavalieri-Methode [41-45,47]. Gegensatz dazu ermöglicht das in der veröffentlichten Originalarbeit zu der vorliegenden Dissertationsschrift [66] vorgestellte Volumetrieund Probennahmeverfahren neben der quantitativ-stereologischen Analyse Durchführung ergänzender Untersuchungen der Kiemen. Auf diese Weise kann die Ermittlung morphologischer und z. B. molekularer Parameter von denselben Probelokalisationen erfolgen [270].

Die akkurate Volumenbestimmung des Referenzkompartiments hat in quantitativstereologischen Studien höchste Relevanz [179,196]. Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurden detaillierte Untersuchungen durchgeführt, um eine praktikable und präzise Volumetriemethode von Kiemen bzw. Kiemenproben zu etablieren, die die Intaktheit der Kiemen ermöglicht [41] und keine Einbettung in ein Kunststoffmedium erfordert [42-44,47]. Mittels photometrischer Messungen und der Verwendung eines Indikatorfarbstoffes konnte nachgewiesen werden, dass die

Entfernung der an (feuchten) Kiemen anhaftenden Flüssigkeit durch das kurze, vorsichtige Abtupfen der Kiemenproben mit einem Labortuch in ausreichendem Maße gewährleistet wird (siehe Abbildungen S5 und S6 der Publikation [66]). Dies grundlegende Voraussetzung für die präzise **Bestimmung** ist Kiemenprobengewichts und für die erwartungstreue Volumenbestimmung der Kiemenprobe anhand ihres Gewichts und der kiemenspezifischen Gewebedichte (ermittelt anhand der Submersionsmethode, siehe Abschnitt 8 der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation [66]) [205,206]. Auf diese Weise wurde für formalinfixierte Kiemen (bzw. Kiemenfilamente) von Regenbogenforellen eine durchschnittliche Gewebedichte von 1,07 ± 0,02 g/cm³ ermittelt [66]. Da bisher keine veröffentlichten Daten bezüglich der Dichte von Kiemengewebe vorliegen, kann dies als Orientierungswert für nachfolgende (quantitativ-stereologische) Untersuchungen dienen.

Die Generierung repräsentativer Proben ist in der Untersuchung der Kiemen auf potenzielle toxische Effekte von Umweltschadstoffen von größter Bedeutung. Die verschiedenen Zellarten der Primär- und teilweise auch Sekundärlamellen sind nicht gleichförmig verteilt [139,141]. Des Weiteren werden nicht alle Areale der Kiemen zu jeder Zeit in vollem Umfang und gleichförmig durchblutet [28,131,148,149]. Pathomorphologische Kiemenveränderungen infolge einer Schadstoffexposition können, abhängig von Stoffgruppe und Expositionsdauer, in unterschiedlichen Verteilungsmustern und/oder an unterschiedlichen Zielstrukturen/-zellen auftreten Gewebsalterationen [28]. infolge einer Schadstoffexposition können daher an willkürlich ausgewählten Kiemenproben nicht repräsentativ für die gesamten Kiemen quantifiziert werden. Das in der dieser Dissertation zugrunde liegenden Veröffentlichung für die Generierung der Kiemenproben illustrierte systematisch zufällige Probennahmeverfahren (SURS) (siehe Abschnitt 9 der Publikation [66]) stellt die Methode der Wahl für eine einfache, effektive Generierung repräsentativer (Kiemen)proben dar [23]. Die Agareinbettung erhält die Orientierung der Kiemenstrukturen und verhindert den Verlust einzelner Primärlamellen. Anhand der Schätzung der Volumendichte der Sekundärlamellen an den Kiemen (V_{V(SL/GF)}) und der Ermittlung Variationskoeffizienten (Coefficient of Variation (CV)) von 1,7 % (Streuungsmaß bezüglich der Messwerte in Bezug auf den Mittelwert) [23,33,38,207] wurde aufgezeigt, dass die Entnahme von fünf Kiemenproben der vier Kiemen einer Körperseite für eine effiziente, erwartungstreue Schätzung der relevanten quantitativ-stereologischen Kiemenparameter als ausreichend bewertet werden kann [66]. Es wurde zudem untersucht, inwiefern sich die Kiemen der rechten und linken Körperseite in ihrer Histoarchitektur unterscheiden. Für V_{V(SL/GF)} konnte nachgewiesen werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen rechten und linken Kiemen besteht [66].

Aufgrund der hochkomplexen, anisotropen Organarchitektur der Kiemen ist die Darstellung die Repräsentation verschiedenen histologische und der Kiemenstrukturen stark abhängig von der Orientierung der Schnittebene (siehe Abbildung 3 der Publikation [66]) [16]. Anisotrope Strukturen bedürfen spezieller Methoden, um eine isotrope, erwartungstreue Schätzung von Oberflächen und Längen zu gewährleisten [24,33,179]. Die in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation dargestellten Methoden für die Generierung histologischer Schnitte mit randomisierter Schnittebene illustrieren effiziente Verfahren für die Erzeugung von VUR- und IUR-Schnitten (siehe Abschnitt 10 der Publikation [66]).

VUR-Schnitte erhalten die "vertraute" Histomorphologie und sind optimal geeignet für die Generierung randomisierter Schnitte von den Kiemen [23,197]. Die Ermittlung der Oberflächendichte der Sekundärlamellen an den Kiemen (Sv(SL/GF)) an VUR-Schnitten mittels Zykloidbogenraster [197] stellt somit die Methode der Wahl dar (siehe Abbildungen 10 und 13 der Publikation [66]). Die Stabilisierung der Kiemen mithilfe von Agar erleichtert die Probeneinbettung in GMA/MMA (Glycolmethacrylat/Methylmethacrylat) und gewährleistet dank der lichtmikroskopisch identifizierbaren Schnittkanten die eindeutige Erkennbarkeit der vertikalen Achse während der gesamten Analyse.

Das Isector-Verfahren ist optimal geeignet für die einfache Generierung von IUR-Schnitten kleiner Gewebeproben [23,208] und wurde bereits in der Studie von Birzle (2015) [17] erfolgreich an Kiemenproben von Regenbogenforellen angewendet. IUR-Schnitte haben gegenüber VUR-Schnitten den Vorteil, dass sie eine effiziente Ermittlung aller quantitativ-morphologischen (Kiemen)parameter erlauben [23].

Die dreidimensionale Gewebeschrumpfung der Kiemenproben im Zusammenhang mit der Einbettung in histologische Kunststoff-Einbettungsmedien muss bei der Analyse schrumpfungssensitiver Kiemenparameter ($S_{V(SL/GF)}$, $N_{V(EC/SL)}$ und $\overline{V}_{(EC,SL)}$)

berücksichtigt werden [23,180]. In der veröffentlichten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation wurde daher ein erwartungstreues Analyseverfahren verwendet, um das Ausmaß der Volumenschrumpfung des Kiemengewebes von Regenbogenforellen im Zusammenhang mit der GMA/MMA-Einbettung (siehe Abschnitt 11 der Publikation [66]) zu ermitteln (sowie mit dem 3DISCO-Clearing-Verfahren, siehe Abschnitt 5.3). Die Volumina von Kiemenproben vor der Einbettung wurden anhand der Submersionsmethode bestimmt [179,205,206]. Nach der Einbettung in GMA/MMA wurden die Volumina der Proben mit der Methode nach Cavalieri an histologischen Serienschnitten bekannter Schnittdicke mittels spektraler Reflexionsmessung [215]) ermittelt (siehe (gemessen Abbildung 11 der Publikation [66]) [38,179,202]. Der für das in GMA/MMA eingebettete Kiemengewebe errechnete lineare Schrumpfungsfaktor f_s = 0,87 entspricht einer Volumenschrumpfung von ~34,31 % [66] und damit weitgehend auch dem Ausmaß der Gewebeschrumpfung, welches bei der GMA/MMA-Einbettung anderer biologischer Gewebeproben zu beobachten ist [220,271]. Die Ermittlung der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung anhand des präsentierten Analyseverfahrens muss für unterschiedlich prozessierte Kiemenproben individuell erfolgen, da das Ausmaß der dreidimensionalen Gewebeschrumpfung in Abhängigkeit von den verwendeten histologischen Einbettungsmedien sowie der Größe und Prozessierung der Kiemenproben variiert [23,212,213]. Dies wird deutlich anhand einer Studie, laut derer das Ausmaß der dreidimensionalen Gewebeschrumpfung von Kiemenproben eines Fisches aus der Familie der Harnischwelse (Pterygoplichthys anisitsi) nach Fixierung mit Glutaraldehyd und Einbettung in Glycol-Methacrylat vernachlässigbar sein soll ieder quantitativ-stereologischen Studie muss daher die einbettungsbedingte Gewebeschrumpfung an einer angemessenen Anzahl repräsentativer Proben mithilfe geeigneter Analyseverfahren ermittelt und entsprechend berücksichtigt werden.

Die in der publizierten Originalarbeit der vorliegenden Dissertationsschrift [66] für den jeweiligen quantitativ-morphologischen Kiemenparameter verwendete lichtund elektronenmikroskopische Gesamtvergrößerung und die Maße der
angewandten stereologischen Testsysteme/Sonden (*probes*), also die Größe der
Punkte- und Zykloidbogenraster, die Flächen der erwartungstreuen Testfelder
(*unbiased counting frames*) und die Höhe des (physikalischen) Disektors, sind

gezielt an die Untersuchung der Kiemen von Regenbogenforellen zwischen 300-2000 g angepasst. Die angegebene Anzahl der zu zählenden Punkte oder Partikel (Q-) gewährleistet akkurate quantitativ-stereologische Schätzwerte akzeptabler relativer Fehlerwahrscheinlichkeit (d. h. mit bekannter. Schätzwertes) [180,203]. Den individuellen Anforderungen der verschiedenen Kiemenparameter hinsichtlich der Randomisierung der Schnittebene und der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung wird durch die Generierung von VURoder IUR-Schnitten und der sorgfältigen Auswahl adäquater Einbettungsmedien Rechnung getragen. Die Praktikabilität und Durchführbarkeit der beschriebenen quantitativ-stereologischen Analysemethoden wurde durch ihre Anwendung an repräsentativen Kiemenproben von Regenbogenforellen im Rahmen des präsentierten Dissertationsprojektes und zum Teil in einer früheren Studie von Birzle (2015) [17] bestätigt.

V_{V(SL/GF)} stellt (unter Annahme einer isotropen, gleichförmigen Schrumpfung) einen von der einbettungsbedingten Schrumpfung der Gewebeproben unabhängigen Parameter dar, dessen Ermittlung keiner Schnittebenenrandomisierung bedarf [33,180]. Daher sieht das Protokoll die Ermittlung von V_{V(SL/GF)} an willkürlich orientierten SURS-Serienschnitten von systematisch zufällig entnommenen FF-PE (formalin-fixed and paraffin-embedded) Kiemenproben vor (siehe Abschnitt 12 und Abbildung 12 der Publikation [66]). Bei der Ermittlung zusätzlicher quantitativmorphologischer Parameter kann V_{V(SL/GF)}, im Hinblick auf Effizienz und Praktikabilität, ebenso an allen weiteren in der vorliegenden Arbeit dargestellten repräsentativen Gewebeschnitten (VUR oder IUR, Paraffin- oder Kunststoff-Einbettung) von SURS Kiemenproben ermittelt werden [23,33,197].

Die in vorangegangenen Publikationen angewandte Methode für die quantitativstereologische Schätzung von Oberflächendichten an VUR-Schnitten mittels Zykloidbogenraster erfordert die vollständige Kiemeneinbettung [42-45,47] und ist subjektiv für größere Kiemen nicht optimal geeignet. Zudem können quantitativmorphologische Parameter, deren Bestimmung einer IUR-Schnittebene bedarf, nicht adäquat ermittelt werden. Das in der vorliegenden Arbeit dargestellte Verfahren für die Schätzung von S_{V(SL/GF)} demonstriert eine Methode für die Ermittlung von Oberflächen an VUR-Schnitten von SURS Kiemenproben (siehe Abschnitt 13 der Publikation [66]) [33,197], die keiner vollständigen Einbettung der Kiemen bedarf.

Die Schätzung des mittleren Zellvolumens von Chloridzellen wurde bereits in der Studie von Monteiro et al. (2009) [31] mittels der Nucleator-Methode [273] demonstriert. Der physikalische Disektor [198] für die Ermittlung der numerischen Volumendichte der Epithelzellen an den Sekundärlamellen (Ny(EC/SL)) und des mittleren Zellvolumens der Epithelzellen der Sekundärlamellen (V(EC,SL)) wurde in einer vorangegangenen Studie von Birzle (2015) [17] an den Kiemen von Regenbogenforellen angewendet. Die genannten Studien berücksichtigen jedoch nicht alle für die akkurate Schätzung von Partikelzahlen und mittlerem Zellvolumen obligaten Aspekte einer quantitativ-stereologischen Analyse. Das in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] illustrierte Verfahren zur erwartungstreuen Schätzung von Partikelzahlen und dem mittleren Zellvolumen an SURS Kiemenproben berücksichtigt hingegen die Verwendung eines für die Anfertigung dünner, gleichmäßiger Schnitte geeigneten Plastik-Einbettungsmediums [23,215] sowie die einbettungsbedingte Gewebeschrumpfung [180,222]. Dadurch wird die erwartungstreue Anwendung des physikalischen Disektors für die akkurate Schätzung von N_{V(EC/SL)}, N_(EC,SL) und von ∇_(EC,SL) (über die indirekte Schätzung anhand des Verhältnisses der Volumendichte der Epithelzellen in den Sekundärlamellen zu deren numerischer Volumendichte) demonstriert [33]. Für die Schätzung von N_V(EC/SL), N_(EC,SL) und ∇_(EC,SL) hat sich der physikalische Disektor als praktikable Methode erwiesen (siehe Abschnitt 14 und Abbildung 14 der Publikation [66]), dessen Durchführung gilt jedoch als technisch anspruchsvoll. Die erwartungstreue Ermittlung von Partikelzahlen und dem mittleren Zellvolumen kann daher auch anhand alternativer design-basierter quantitativ-stereologischer Verfahren erfolgen, wie beispielsweise dem optischen Disektor, dem physikalischen und optischen Fractionator. dem Selector oder dem Nucleator [23,33,199,203,221,222,273].

Die Ermittlung der Sauerstoff-Diffusionsbarrierendicke erfolgt in den meisten der bisher veröffentlichten quantitativ-stereologischen Studien der Kiemen an VUR-Schnitten als harmonisches Mittel der Diffusionsbarrierendicke (nach Weibel und Knight (1964) [189]) [43-45,47]. Die in der veröffentlichten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation präsentierte Methode für die Bestimmung der wahren harmonischen mittleren Dicke (Th) mittels der orthogonalen Schnittpunktmethode [218,219] an IUR-Schnitten repräsentativer Gewebeproben (siehe Abschnitt 15 und Abbildung 15 der Publikation [66]) stellt jedoch den Goldstandard für die Ermittlung

der Dicke biologischer Barrieren (z. B. der glomerulären Basalmembran [217]) dar [23]. Sie hat sich auch bei der Ermittlung der Sauerstoff-Diffusionsbarrierendicke der Kiemen von Regenbogenforellen mittels Lichtmikroskopie durch Birzle (2015) [17] als Methode der Wahl erwiesen.

5.3 Diskussion der quantitativ-stereologischen Analyse der Kiemen mittels Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie

Die präsentierten klassischen modellunabhängigen quantitativ-stereologischen Methoden stellen den Goldstandard für quantitativ-morphologische Analysen verschiedener Organe dar [8,40,207,217,274]. Allerdings ist die praktische Umsetzung dieser Methoden aufgrund der Probennahmeund Probenprozessierungsverfahren, die mit einer erwartungstreuen quantitativstereologischen Analyse verbunden sind, zeitaufwendig und arbeitsintensiv [23]. Daher präsentiert die vorliegende Arbeit die LSFM optisch geklärter Kiemenproben als modernen, schnellen und eleganten Ansatz für die Durchführung quantitativmorphologischer Kiemenanalysen. Wissenschaftliche Veröffentlichungen bezüglich der spezifischen qualitativen oder quantitativen Analyse optisch geklärter Kiemenproben mittels LSFM liegen bislang nicht vor. Die LSFM wurde jedoch bereits in anderen Studien genutzt, um bestimmte quantitativ-morphologische Parameter wie die Anzahl und das Volumen von Adipozyten [63], die Anzahl von Glomerula in der Niere [60] oder die Gefäßdurchmesser und Längendichte kleinkalibriger Blutgefäße im Gehirn [62] zu bestimmen.

Die Anwendung der dreidimensionalen LSFM an mittels 3DISCO-Verfahren [240] geklärten Kiemenproben der Regenbogenforelle stellt eine Methode für die Bestimmung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter an optischen Schnitten Bildgebungsverfahren bedarf [66]. Dieses daher keiner zeitarbeitsintensiven Anfertigung (willkürlich randomisiert oder orientierter) physikalischer Gewebeschnitte. Das in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation präsentierte 3DISCO-Clearingprotokoll Bildgebung mittels LSFM (siehe Abschnitt 16 der Publikation [66]) sind schnell und einfach durchzuführen und ermöglichen eine dreidimensionale Visualisierung der komplexen mikroskopischen Kiemenarchitektur anhand der inhärenten Autofluoreszenz der geklärten Kiemenprobe (siehe Abbildung 17 der Publikation [66]). Das vorgestellte Verfahren bedarf somit keiner zusätzlichen (in oder ex vivo) Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Kiemenproben.

Die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter mittels LSFM wird an Kiemenproben durchgeführt, die nach der Bestimmung von V_(GF) mittels systematisch zufälliger Probennahmeverfahren (SURS) entnommen werden. Die

Ermittlung von Vv(SL/GF) und Sv(SL/GF) erfolgt anhand der gleichen stereologischen Testsysteme und Sonden, die auch in den klassischen Protokollen zum Einsatz kommen (siehe Abschnitt 5.2). Ihre Anwendung erfolgt jedoch an digitalen Bildern virtueller, optischer, auf Autofluoreszenzsignalen basierender Schnitte der optisch geklärten (transparenten) Kiemenproben (siehe Abbildungen 19 und 20 der Publikation [66]). Da die Gewebeproben während der LSFM-Analyse intakt bleiben. können (virtuelle) optische Schnitte mit beliebiger Orientierung (transversal, sagittal, horizontal, VUR oder IUR) von der identischen Probe angefertigt werden. Dies erfolgt entweder durch eine entsprechende Positionierung der Probe innerhalb des Probenbehälters und der Aufnahme von Bildstapeln in der gewünschten Orientierung [249] oder anhand der Rotation der dreidimensionalen Rekonstruktion der Gewebeprobe und der Anfertigung virtueller Schnittebenen mithilfe einer LSFM-Software [58,64]. In der vorliegenden Arbeit wird die Erzeugung einer digitalen VUR-Schnittebene anhand eines drehbaren Probenhalters demonstriert (siehe Abbildung 18 der Publikation [66]). Der präsentierte Ansatz dient der Vermeidung einer Verzerrung (fehlender Maßstabstreue) der zweidimensionalen optischen VUR-Schnitte. Diese kann virtuell der dreidimensionalen an aus Probenrekonstruktion berechneten VUR-Schnitten auftreten, wenn virtuelle Schnittebenen betrachtet/analysiert werden, die nicht parallel zu den x-y-, x-z- oder z-y-Achsen der aufgenommenen optischen Schnittbilder orientiert sind. Zusätzlich müssen Streckungs-/Stauchungsartefakte in der rekonstruierten dreidimensionalen Darstellung der Probe, die aufgrund der sphärischen Aberration (SA) entstehen können, vermieden bzw. korrigiert werden (siehe unten).

In der Analyse virtueller optischer Schnittbilder muss die während des Gewebeclearings auftretende Volumenschrumpfung der Kiemenproben ebenfalls berücksichtigt werden (siehe Abbildung 16 der Publikation [66]). Das Clearing von 3DISCO-Protokoll Kiemenproben mit dem [240] geht mit einer Volumenschrumpfung des Gewebes von etwa 50 % (50,72 ± 2,88 %) einher [66]. Auch für andere Gewebeproben ist eine Volumenschrumpfung infolge des 3DISCO-Clearingprotokolls aufgrund der Dehydratation der Gewebeproben beschrieben [63,240,242]. Diese kann durch die Verwendung von Clearingverfahren vermieden werden, welche das Volumen der Gewebeprobe nicht oder nur geringfügig beeinflussen, z. B. SeeDB [244], Zimtsäureethylester (ethyl cinnamate (ECi)) [60] oder Adipo-Clear [247,275]. Die Gewebeschrumpfung lässt sich jedoch durch die

Volumenbestimmung von Kiemenproben vor und nach dem Gewebeclearing mittels Submersionsmethode [205,206,276] präzise und effektiv messen [66]. Sie erfolgt reproduzierbar und ermöglicht somit die Ermittlung des linearen Schrumpfungsfaktors für die (schrumpfungskorrigierte) Schätzung von Sv(SL/GF) bzw. S(SL,GF) als schrumpfungssensitive Parameter [180,183]. Das angewandte Clearingverfahren hat neben einer zufriedenstellenden Transparenz der Proben zudem den positiven Aspekt, dass die solide Konsistenz der geklärten Gewebeproben [239,240] einer mechanischen Deformation der fragilen Kiemenstrukturen entgegenwirkt und diese auch über längere Zeit gut erhalten bleiben.

Für die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter muss, zusätzlich zu der clearingbedingten Gewebeschrumpfung und potenzieller mechanischer Einflüsse auf die Kiemenmorphologie, die proben- und hardwareassoziierte SA berücksichtigt werden. Diese kann stauchungs- oder streckungsbedingte Artefakte in der virtuellen dreidimensionalen Rekonstruktion hervorrufen und damit zu einer unpräzisen Bestimmung von Volumina und weiteren quantifizierbaren Parametern führen [261]. Zur Vermeidung von SA-Artefakten wurden in der publizierten Originalarbeit der vorliegenden Dissertationsschrift [66] die optisch geklärten Kiemenproben während der LSFM-Aufnahme von demselben Immersionsmedium (BABB) umgeben, welches auch für die optische Klärung des Gewebes verwendet wurde. Die SA aufgrund sich unterscheidender Refraktionsindices (RI) der Probe und des umgebenden Mediums [261] konnte dadurch umgangen werden. In gleicher Weise wurde durch die Verwendung eines Tauchaufsatzes (dipping cap) über dem Objektiv des Mikroskops das Auftreten von SA-Artefakten vermieden, die durch RI-Unterschiede zwischen dem Immersionsmedium und der Objektivlinse (bzw. zwischen dem Immersionsmedium, einem weiteren Medium anderer optischer Dichte (Luft) und der Objektivlinse) verursacht werden können [227,261]. Die Verwendung RI-optimierter und SA-korrigierter Linsen (speziell für RI-Bereiche der in der LSFM verwendeten Immersionsmedien) trug zusätzlich zu einer reduzierten Verzerrung der virtuellen dreidimensionalen Rekonstruktion bei. Die in dem in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation [66] präsentierten LSFM-Bildgebungsverfahren eingesetzte technische Ausstattung und optischen Systeme sowie die verwendete Immersionslösung wurden durch die quantitative Analyse von Mikropartikeln als Testobjekte unter Verwendung der

gleichen Geräteeinstellungen in der Studie von Theobalt *et al.* (2021) [63] validiert. So konnten Präzision und Maßstabstreue des verwendeten LSFM-Bildgebungsverfahrens bestätigt werden.

5.4 Diskussion der Ergebnisse

Die anhand der klassischen modellunabhängigen quantitativ-stereologischen Verfahren ermittelten Schätzwerte dienten der Evaluation der Ergebnisse, die mittels quantitativ-morphologischen LSFM-Analyse optisch Kiemenproben erzielt wurden. Die Ergebnisse der quantitativ-morphologischen Analyse mittels LSFM unterscheiden sich nicht signifikant von den Schätzwerten, die mit klassischen quantitativ-stereologischen Analyseverfahren an identischen Kiemen erhalten wurden [66]. Dies demonstriert erstmals die Anwendbarkeit der LSFM für die quantitativ-morphologische Kiemenanalyse unter Beachtung repräsentativer (systematisch zufälliger) Stichprobenverfahren. Die in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation [66] ermittelten relativen und absoluten Werte der untersuchten quantitativ-stereologischen Kiemenparameter dienen jedoch nicht als Referenzwerte für die Kiemen der Regenbogenforelle im Allgemeinen, da diese Parameter in Abhängigkeit von Körpergewicht, Population oder Umweltbedingungen der untersuchten Fische erheblich variieren können [135,136,277,278].

Die akkurate Ermittlung der Absolutwerte quantitativ-morphologischer Parameter erfordert die Bestimmung des Gesamtvolumens des Referenzkompartiments sowie die Anwendung repräsentativer (systematisch zufälliger) Probennahmeverfahren [23,179,196]. Dies gilt auch für die quantitativ-morphologische LSFM-basierte Analyse der Kiemen anhand der in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] vorgestellten Methoden. Allerdings stellt die vergleichsweise deutliche Reduzierung der erforderlichen Probenprozessierung und des damit verbundenen Arbeits- und Zeitaufwandes sowie die subjektiv einfachere Durchführung der Zähl- und Messprozesse einen erheblichen Vorteil des LSFM-basierten Ansatzes für die quantitativ-morphologische Kiemenanalyse dar.

Die Anfertigung von VUR- und IUR-Schnitten in der klassischen quantitativmorphologischen Kiemenanalyse ist bedeutend zeitaufwendiger als in der LSFM.
Dies gilt auch für die Ermittlung der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung von
Kiemengewebeproben, welche neben dem zeitintensiven Einbettungsprozess die
Anfertigung und Auswertung von histologischen Serienschnitten erfordert (siehe
Abbildung 11 der Publikation [66]). Die clearingbedingte Volumenreduktion der
Kiemenproben hingegen kann schnell und präzise mithilfe der

Submersionsmethode [205,206,276] ermittelt werden. Das Einbetten der Kiemenproben in GMA/MMA sowie die anschließende Anfertigung histologischer Schnitte nimmt in der Regel drei oder mehr Tage in Anspruch. Das Gewebeclearing der Kiemenproben mit dem 3DISCO-Protokoll und das anschließende Bildgebungsverfahren mittels LSFM ist innerhalb von ein bis zwei Tagen abgeschlossen. Werden die nicht unerheblichen Anschaffungskosten für die Hardund Softwarekomponenten der LSFM nicht mit einberechnet, bewegt sich der Kostenaufwand für die benötigten Chemikalien und Labormaterialien beider Ansätze in einem vergleichbaren Rahmen.

5.5 Relevanz und Limitation der Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie in quantitativ-morphologischen Untersuchungen von Kiemen

In Kombination mit einer qualitativen histopathologischen Beurteilung von mit systematisch zufälligen Probennahmeverfahren entnommenen FF-PE-Kiemenproben können LSFM-basierte Analysen wesentlich zu einer schnellen, zuverlässigen und akkuraten Analyse quantitativ-morphologischer Kiemenparameter von in Expositionsversuchen als Testorganismen verwendeten Regenbogenforellen beitragen. Dies ist insbesondere für ökotoxikologische Studien mit einer großen Anzahl an Testorganismen und Proben essenziell, wie beispielsweise in chronischen Toxizitätstests mit Erhebung von NOECs, die der Untersuchung von Kontrollgruppen bedürfen [2]. Zudem kann die LSFM von 3DISCO-geklärten Gewebeproben mit ergänzenden histotechnischen Analysen kombiniert werden. Optisch geklärte Proben können im Anschluss an die LSFM für nachfolgende histologische, immunhistochemische sowie bildgebende massenspektrometrische Analysen eingebettet und prozessiert werden. Umgekehrt ist es ebenso möglich, LSFM-Untersuchungen an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (nach Entparaffinierung und Gewebeclearing) durchzuführen [64,253,279,280]. Die Analyse von mit (systematisch) zufälligen Stichproben-Kiemengewebeproben verfahren gewonnenen aus vorangegangenen histologischen Standarduntersuchungen oder LSFM-Analysen ermöglicht im ökotoxikologischer Untersuchungen die Ermittlung Endpunkte. Diese können eine wichtige Ergänzung bereits erhobener Daten darstellen und zudem zu einer Reduktion von den als Testorganismen eingesetzten Fischen führen, wenn Wiederholungsversuche durch die Verwendung bereits gewonnener Gewebeproben verzichtbar werden.

Für die LSFM-Analyse optisch geklärter Gewebeproben stehen verschiedene, zum Teil kommerzielle Softwareprogramme für die dreidimensionale Bildrekonstruktion und digitale Bildanalyse zur Verfügung, welche die quantitative Analyse spezieller Gewebestrukturen oder Zellarten ermöglichen [58]. In Kombination mit geeigneten Probennahmeverfahren können diese Softwareprogramme gezielt für die schnelle digitale Analyse quantitativ-morphologischer Parameter eingesetzt werden, z. B. für die Ermittlung von Adipozytenvolumen und -anzahl [63] oder der Längen und Durchmesser von Gefäßen [62].

Während die Kiemenparameter V_{V(SL/GF)} und S_{V(SL/GF)} anhand der auf Autofluoreszenz basierenden virtuellen optischen Schnitte akkurat ermittelt werden können [66], ist die LSFM-basierte Analyse anderer relevanter quantitativ-morphologischer Parameter, welche eine spezifische Markierung bestimmter Kiemenstrukturen bzw. -zelltypen erfordern, mittels automatischer digitaler Bildanalyse nicht möglich, solange keine Fluoreszenzmarker für spezifische Zielstrukturen (in Kombination mit den auf sie abgestimmten Clearingverfahren und Untersuchungsprotokollen) für die LSFM-Analyse der Kiemen zur Verfügung stehen.

Aktuell sind weder die in der LSFM verwendete technische Ausstattung und Hardwarekonfiguration noch die verschiedenen digitalen LSFM-Plattformen standardisiert. Unterschiede einzelner Labore in den angewandten Clearingverfahren und Immersionsmedien, den verwendeten Objektiven, den Laser-Lichtblattdimensionen und -wellenlängenbereichen (Laserlichtquellen) sowie den Geräteeinstellungen und Kameraeigenschaften können zu Abweichungen in Bildqualität, Auflösungsvermögen und möglicherweise zu Bildartefakten (SA) Erhebung führen. Dies kann die präziser LSFM-basierter morphologischer Daten erschweren, ebenso wie deren Reproduktion mit verschiedenen LSFM-Systemen. Um die Reproduzierbarkeit der Studienergebnisse innerhalb einer Studie sowie zwischen verschiedenen Laboren und/oder Studien zu gewährleisten, sollten die Analysen an identisch prozessierten Gewebeproben unter Verwendung derselben technischen-, Hard- und Softwareausstattung und mit denselben Kamera- und Geräteeinstellungen vollzogen werden. Zudem sollten geeignete Versuchsansätze zur Kontrolle der Messgenauigkeit der erhaltenen Daten (z. B. durch die Verwendung von Prüf-/Kontrollkörpern mit definierten morphologischen Eigenschaften wie Form, Volumen, Oberfläche, etc.) durchgeführt werden [63]. Zusätzlich müssen alle entsprechenden relevanten Daten gemeinsam mit den Studienergebnissen veröffentlicht werden.

5.6 Ausblick

Das Potenzial und die Relevanz der Erhebung quantitativ-morphologischer Parameter in der ökotoxikologischen Forschung sind hinlänglich bekannt, dennoch werden quantitativ-stereologische Kiemenanalysen bisher nur selten in der Erhebung histopathologischer Endpunkte in Expositionsversuchen an Fischen eingesetzt [8]. Das liegt vermutlich darin begründet, dass quantitativ-stereologische Methoden mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden sind und gerade die Kiemenanalyse die quantitative Stereologie vor besondere Herausforderungen stellt [8,23]. Durch die in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] etablierten umfassenden und anwenderfreundlichen Protokolle für die erwartungstreue Analyse relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter von in der ökotoxikologischen Forschung verwendeten Regenbogenforellen mittels klassischer und moderner Bildgebungsverfahren wird eine Grundlage für deren breite Anwendung in der ökotoxikologischen Forschung geschaffen. Beide präsentierten Ansätze ermöglichen eine standardisierte, objektive und effiziente Quantifizierung der Effekte von Umweltschadstoffen auf die Kiemen als sensitive Indikatororgane.

Die praktikablen, detaillierten Protokolle für die Anwendung der klassischen designbasierten quantitativ-stereologischen Analyseverfahren bedürfen besonderen Laborausstattung. Ihre Anwendung setzt weder umfassende Kenntnisse im Bereich der quantitativen Stereologie noch im Bereich der Fischpathologie oder pathologischen Toxikologie voraus, wodurch sie in Expositionsversuchen Quantifizierung für die von schadstoffbedingten Kiemenalterationen von Wissenschaftler_innen verschiedener Fachrichtungen herangezogen werden können. Die erwartungstreue Quantifizierung morphologischer Kiemenalterationen anhand der präsentierten Protokolle entspricht zudem den Anforderungen an eine verlässliche und reproduzierbare Erhebung von Daten, die für deren Berücksichtigung in der ökotoxikologischen Risikobewertung erforderlich ist [77,114,115].

Es ist jedoch zu beachten, dass die in der publizierten Originalarbeit zur vorliegenden Dissertationsschrift [66] präsentierten quantitativ-stereologischen Probennahme- und Analysemethoden, trotz ihrer Effizienz und Praktikabilität, mit einem nicht zu vernachlässigenden Zeit- und Arbeitsaufwand einhergehen. Ihre

Anwendung ist daher explizit für ökotoxikologische Studien bestimmt, die gezielt die Untersuchung der Kiemen als Indikatororgane für Umweltbelastungen vorsehen. Für die routinemäßige histopathologische Untersuchung ist ihre Anwendung nicht empfohlen. Dies gilt auch für die Anwendung der LSFM als modernes Bildgebungsverfahren für die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter in Toxizitätstests. Gerade für wissenschaftliche Einrichtungen und Labore, die Expositionsversuche in großem Umfang und/oder mit einer hohen Zahl an Regenbogenforellen als Testorganismen durchführen, ist die LSFM aufgrund der Zeitersparnis als die Methode der Wahl anzusehen, zumal sich die Kosten bezüglich der verwendeten Materialien und Chemikalien nicht wesentlich von denen der klassischen quantitativ-stereologischen Untersuchungsprotokolle unterscheiden.

Solange noch keine Fluoreszenzmarker (und entsprechend abgestimmte Clearingverfahren und Untersuchungsprotokolle) für die guantitativ-morphologische Untersuchung spezifischer Kiemenstrukturen und -zellen zur Verfügung stehen, ist das Potenzial der LSFM nicht annähernd ausgeschöpft. Die akkurate Ermittlung der Kiemenparameter V_(SL,GF) und S_(SL,GF) beweist jedoch die Eignung angewendeten Probennahme-, Clearing-, Schrumpfungsbestimmungsund Bildgebungsverfahren für die erwartungstreue Schätzung morphologischer Parameter [66] und lässt die Annahme zu, dass mit der Entwicklung spezifischer Fluoreszenzmarker für die LSFM-Analyse weitere quantitativ-morphologische Kiemenparameter ebenso schnell und akkurat ermittelt werden können. Gerade in Kombination mit der digitalen Bildanalyse stellt die LSFM einen vielversprechenden Ansatz für eine effiziente, schnelle und elegante quantitativ-morphologische Kiemenanalyse in der ökotoxikologischen Forschung dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Regenbogenforellen werden in ökotoxikologischen Expositionsversuchen häufig als empfindliche Testorganismen eingesetzt, um potenzielle Gewässerschadstoffe hinsichtlich ihrer nachteiligen oder toxischen Effekte zu untersuchen. Die Kiemen gelten als sensitive Hauptindikatororgane für zahlreiche Umweltschadstoffe, deren Auswirkungen sich in morphologischen Kiemenalterationen äußern. Diese sind mit der qualitativen histopathologischen Analyse häufig nicht zuverlässig detektieren. Zudem kann die qualitative histopathologische Interpretation von Kiemenläsionen aufgrund ihres subjektiven Charakters zu Diskrepanzen zwischen einzelnen Untersucher innen und Studien führen. Sensible und effiziente Methoden für eine akkurate Quantifizierung schadstoffbedingter morphologischer Kiemenveränderungen sind daher eine wesentliche Voraussetzung für deren und objektive Interpretation sowie für die Beurteilung Schweregrades. Verfahren für die quantitativ-stereologische Kiemenanalyse sind in der ökotoxikologischen Forschung bislang jedoch nicht breit etabliert.

Die vorliegende Arbeit präsentiert praktikable, standardisierte und detaillierte Protokolle für die modellunabhängige quantitativ-stereologische Kiemenanalyse und die Erhebung relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter der Regenbogenforelle. Die präsentierten Protokolle sind an Regenbogenforellen zwischen 300-2000 g Körpergewicht angepasst und lassen sich auf andere Fischarten ähnlicher Größe und Kiemenmorphologie übertragen. Sie umfassen etablierte repräsentative Probennahmeverfahren und moderne modellunabhängige quantitativ-stereologische Analysemethoden für die Ermittlung (funktionell) relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter wie dem Gesamtvolumen der Kiemen, dem Sekundärlamellenvolumen, der Sekundärlamellenoberfläche, der Anzahl und dem mittleren Zellvolumen der Epithelzellen der Sekundärlamellen sowie der Dicke der Diffusionsbarriere der Sekundärlamellen. Mit den dargestellten Methoden für die adäquate Volumenbestimmung des Referenzkompartiments, der effizienten systematisch zufälligen Probennahme, der Generierung Kiemengewebeschnitten mit randomisierter Schnittebenenorientierung, der Bestimmung der einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung sowie der Verwendung effizienter stereologischer Testsysteme und Sonden können erwartungstreue quantitativ-stereologische Analysen histologischer

ZUSAMMENFASSUNG

Gewebeschnitte für die akkurate Ermittlung relevanter quantitativ-morphologischer Kiemenparameter reproduzierbar durchgeführt werden.

design-basierte (modellunabhängige) quantitativ-stereologische Analyse zweidimensionaler Gewebeschnitte gilt heute als der Goldstandard für die objektive, akkurate Erhebung quantitativ-morphologischer Gewebeparameter, geht jedoch mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand einher. Daher wird in der vorliegenden Arbeit ein modernes Laser-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie-Verfahren (LSFM) von optisch geklärten Kiemenproben für die quantitativ-stereologische Kiemenanalyse präsentiert. Unter Berücksichtigung der clearingbedingten Gewebeschrumpfung erzielt die Ermittlung quantitativ-morphologischer Kiemenparameter an virtuellen optischen Schnitten optisch geklärter, intakter dreidimensionaler Gewebeproben Ergebnisse, die sich von denen der konventionellen guantitativ-stereologischen Kiemenanalyse nicht signifikant unterscheiden. Die LSFM dient somit als innovatives, schnelles und elegantes Verfahren für die quantitativ-morphologische Analyse der Kiemen von in ökotoxikologischen Studien verwendeten Regenbogenforellen. Die publizierte Originalarbeit zur vorliegenden Dissertation stellt die erste wissenschaftliche Veröffentlichung dar, die sich spezifisch mit der Untersuchung optisch geklärter Kiemenproben von Regenbogenforellen mittels LSFM auseinandersetzt. Die etablierten Protokolle wurden im Jahr 2020 in der Fachzeitschrift PLoS ONE publiziert [66].

Die präsentierten Protokolle stellen die Grundlage für die standardisierte, objektive quantitativ-morphologische Analyse der Kiemen von in der ökotoxikologischen Forschung verwendeten Regenbogenforellen dar. Ihre breite Anwendung in der Quantifizierung schadstoffbedingter Kiemenalterationen in Expositionsversuchen wird einen wesentlichen Beitrag zu der Repräsentativität, Genauigkeit und Vergleichbarkeit histopathologischer Endpunkte innerhalb sowie zwischen einzelnen ökotoxikologischen Studien leisten. Sie tragen damit erheblich zu der dringend erforderlichen Zuverlässigkeit der in Expositionsversuchen ermittelten Endpunkte und der Umweltrisikobewertung bei, welche die Grundlage für gesetzliche Beschränkungen gewässerrelevanter und potenziell gefährlicher Stoffe darstellt. Darüber hinaus kann die Anwendung der beschriebenen Protokolle zu einer Reduktion der in ökotoxikologischen Studien als Testorganismen eingesetzten Fische dienen, da unnötige Versuchswiederholungen vermieden werden können.

7 SUMMARY

Rainbow trout are commonly used as sensitive test organisms in ecotoxicological exposure studies to examine potential aquatic pollutants with respect to their adverse or toxic effects. The gills are considered delicate major indicator organs for numerous environmental contaminants, whose effects are manifested in morphological gill tissue alterations. These often cannot be reliably detected by qualitative histopathological analysis. In addition, qualitative histopathological interpretation of gill lesions can lead to discrepancies between individual investigators and studies due to its subjective nature. Sensitive and efficient methods for accurate quantification of pollutant-induced morphological gill alterations are therefore an essential prerequisite for their detection and objective interpretation as well as for the assessment of their severity. However, methods for quantitative stereological gill analysis are not yet widely established in ecotoxicological research.

The present study presents feasible, standardized and detailed protocols for the model-free quantitative stereological gill analysis and the estimation of relevant quantitative morphological gill parameters of rainbow trout. The protocols presented are adapted to rainbow trout between 300-2000 g body weight and are transferable to other fish species of comparable size and gill morphology. They include established representative sampling procedures and modern model-free quantitative stereological analysis methods for the determination of (functionally) relevant quantitative morphological gill parameters, such as total gill volume, volume of the secondary lamellae, surface area of the secondary lamellae, number and mean volume of the epithelial cells in the secondary lamellae, and diffusion barrier thickness in the secondary lamellae. With the methods presented for adequate estimation of the reference compartment volume, efficient systematic random sampling, generation of gill tissue sections with randomized section plane orientation, determination of the embedding-related tissue shrinkage, and use of efficient stereological test systems and probes, unbiased quantitative stereological analyses of histological tissue sections can be reproducibly performed for accurate determination of relevant quantitative morphological gill parameters.

Design-based (model-free) quantitative stereological analysis of two-dimensional tissue sections is now considered the gold standard for the objective, accurate

SUMMARY

estimation of quantitative morphological tissue parameters, but it is accompanied by high time and labor requirements. Therefore, this study presents a modern laser light sheet fluorescence microscopy (LSFM) method of optically cleared gill samples for quantitative stereological gill analysis. Considering the clearing-related tissue shrinkage, the determination of quantitative morphological gill parameters on virtual optical sections of optically cleared intact three-dimensional tissue samples achieves results that do not significantly differ from those of conventional quantitative stereological gill analysis. Thus, LSFM serves as an innovative, fast, and elegant method for quantitative morphological analysis of the gills of rainbow trout used in ecotoxicological studies. The published original paper for this thesis represents the first scientific publication specifically addressing the examination of optically cleared gill samples of rainbow trout using LSFM. The established protocols were published in the scientific journal PLoS ONE in 2020 [66].

The protocols presented provide the basis for the standardized, objective quantitative morphological analysis of the gills of rainbow trout used in ecotoxicological research. Their broad implementation in the quantification of pollutant-related gill lesions in exposure studies will contribute significantly to the representativity, accuracy and the comparability of histopathological endpoints within as well as between individual ecotoxicological studies. Thus, they contribute significantly to the urgently required reliability of the endpoints acquired in exposure studies and of the environmental risk assessment, which is the basis for legal restrictions on water-relevant and potentially hazardous substances. In addition, the application of the described protocols can serve to reduce the number of fish used as test organisms in ecotoxicological studies, since unnecessary repetitions of experiments can be avoided.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Rand G M, Wells P G, McCarty L S (1995). Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand G M, ed. Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. 2nd ed. Taylor & Francis, Washington D. C., pp. 3-67.
- 2. Adams W J, Rowland C D (2003). Aquatic Toxicology Test Methods. In: Hoffman D J, Rattner B A, Burton Jr G A, Cairns Jr J, eds. Handbook of Ecotoxicology. 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 19-43.
- 3. van Leeuwen C J, Bro-Rasmussen F, Feijtel T C J, Arndt R, Bussian B M, Calamari D, Glynn P, Grandy N J, Hansen B, Van Hemmen J J, Hurst P, King N, Koch R, Müller M, Solbé J F, Speijers G A B, Vermeire T (1996). Risk assessment and management of new and existing chemicals. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2(4):243-299.
- 4. Umweltbundesamt (2020). Umweltrisikobewertung. Dessau-Roßlau. Aufrufbar unter: https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/biozide/umweltrisikobewertung#wie-werden-umweltrisiken-ermittelt [21.07.2021].
- 5. Thorgaard G H, Bailey G S, Williams D, Buhler D R, Kaattari S L, Ristow S S, Hansen J D, Winton J R, Bartholomew J L, Nagler J J, Walsh P J, Vijayan M M, Devlin R H, Hardy R W, Overturf K E, Young W P, Robison B D, Rexroad C, Palti Y (2002). Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 133(4):609-646.
- 6. Depiereux S, Liagre M, Danis L, De Meulder B, Depiereux E, Segner H, Kestemont P (2014). Intersex Occurrence in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Male Fry Chronically Exposed to Ethynylestradiol. PLoS One. 9(7):e98531.
- 7. Yancheva V, Velcheva I, Stoyanova S, Georgieva E (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: A review. Applied Ecology and Environmental Research. 14(1):47-75.
- 8. Rašković B, Poleksić V (2017). Fish Histopathology as Biomarker in Ecotoxicology. In: Berillis P, ed. Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health. 1st ed. Bentham Science Publishers, Sharjah, pp. 155-181.
- 9. Reddy P B, Rawat S S (2013). Assessment of Aquatic Pollution Using Histopathology in Fish as a Protocol. International Research Journal of Environment Sciences. 2(8):79-82.
- 10. OECD (2014). Fish Toxicity Testing Framework OECD Series on Testing and Assessment, No. 171. OECD Publishing, Paris.

- Amiard J-C, Amiard-Triquet C (2015). Conventional Risk Assessment of Environmental Contaminants. In: Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Mouneyrac C, eds. Aquatic Ecotoxicology - Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. 1st ed. Academic Press, London, pp. 25-49.
- 12. Metcalfe C D (2000). Chapter 37 Toxicology. In: Ostrander G K, ed. The Laboratory Fish. 1st ed. Academic Press, San Diego, pp. 617-630.
- 13. Wolf J C (2021). A Critical Review of Morphologic Findings and Data From 14 Toxicological Studies Involving Fish Exposures to Diclofenac. Toxicologic Pathology. 49(5):1024-1041.
- 14. Küster A, Bachmann J, Brandt U, Ebert I, Hickmann S, Klein-Goedicke J, Maack G, Schmitz S, Thumm E, Rechenberg B (2009). Regulatory demands on data quality for the environmental risk assessment of pharmaceuticals. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 55(3):276-280.
- 15. Przybylak K R, Madden J C, Cronin M T D, Hewitt M (2012). Assessing toxicological data quality: basic principles, existing schemes and current limitations. SAR and QSAR in Environmental Research. 23(5-6):435-459.
- Wolf J C, Baumgartner W A, Blazer V S, Camus A C, Engelhardt J A, Fournie J W, Frasca S, Jr., Groman D B, Kent M L, Khoo L H, Law J M, Lombardini E D, Ruehl-Fehlert C, Segner H E, Smith S A, Spitsbergen J M, Weber K, Wolfe M J (2015). Nonlesions, Misdiagnoses, Missed Diagnoses, and Other Interpretive Challenges in Fish Histopathology Studies: A Guide for Investigators, Authors, Reviewers, and Readers. Toxicologic Pathology. 43(3):297-325.
- 17. Birzle C F (2015). Etablierung und Validierung quantitativ-morphologischer Parameter bei Regenbogenforellen im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 18. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele R D (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquatic Toxicology. 68(2):141-150.
- 19. Memmert U, Peither A, Burri R, Weber K, Schmidt T, Sumpter J P, Hartmann A (2013). Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. Environmental Toxicology and Chemistry. 32(2):442-452.
- 20. Wolf J C, Ruehl-Fehlert C, Segner H E, Weber K, Hardisty J F (2014). Pathology working group review of histopathologic specimens from three laboratory studies of diclofenac in trout. Aquatic Toxicology. 146:127-136.
- 21. Crissman J W, Goodman D G, Hildebrandt P K, Maronpot R R, Prater D A, Riley J H, Seaman W J, Thake D C (2004). Best Practices Guideline: Toxicologic Histopathology. Toxicologic Pathology. 32(1):126-131.

- 22. Boyce R W, Dorph-Petersen K-A, Lyck L, Gundersen H J G (2010). Design-based Stereology: Introduction to Basic Concepts and Practical Approaches for Estimation of Cell Number. Toxicologic Pathology. 38(7):1011-1025.
- 23. Gundersen H J G, Mirabile R, Brown D, Boyce R W (2013). Stereological Principles and Sampling Procedures for Toxicologic Pathologists. In: Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, eds. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd ed. Academic Press, London, pp. 215-286.
- 24. Brown D L (2017). Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. Journal of Toxicologic Pathology. 30(3):183-191.
- 25. Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases. 22(1):25-34.
- Daoust P-Y, Wobeser G, Newstead J D (1984). Acute Pathological Effects of Inorganic Mercury and Copper in Gills of Rainbow Trout. Veterinary Pathology. 21(1):93-101.
- 27. Mallatt J (1985). Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 42(4):630-648.
- 28. Speare D J, Ferguson H W (2006). Gills and pseudobranchs. In: Ferguson H W, ed. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. 2nd ed. Scotian Press, London, pp. 25-63.
- 29. Nowak B (1992). Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. Aquatic Toxicology. 23(1):65-83.
- 30. Nero V, Farwell A, Lee L E J, van Meer T, MacKinnon M D, Dixon D G (2006). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology. Ecotoxicology and Environmental Safety. 65(2):252-264.
- 31. Monteiro S M, Rocha E, Mancera J M, Fontaínhas-Fernandes A, Sousa M (2009). A stereological study of copper toxicity in gills of Oreochromis niloticus. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72(1):213-223.
- 32. Hughes G M, Perry S F (1976). Morphometric study of trout gills: a light-microscopic method suitable for the evaluation of pollutant action. Journal of Experimental Biology. 64(2):447-460.
- 33. Howard C V, Reed M G (2005). Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 2nd ed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, Abingdon.
- 34. Wanke R (2016). Quantifizierung in der Morphologie Wozu und wie? Nova Acta Leopoldina. NF 121(409):59-81.

- 35. Wanke R (2002). Stereology benefits and pitfalls. Experimental and Toxicologic Pathology. 54(2):163-164.
- 36. Mühlfeld C, Hegermann J, Wrede C, Ochs M (2015). A review of recent developments and applications of morphometry/stereology in lung research. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology. 309(6):L526-536.
- 37. Schmitz C, Hof P R (2005). Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience. 130(4):813-831.
- 38. Nyengaard J R (1999). Stereologic Methods and Their Application in Kidney Research. Journal of the American Society of Nephrology. 10(5):1100-1123.
- 39. Kamp S, Jemec G B E, Kemp K, Kjeldsen C R, Stenderup K, Pakkenberg B, Dam T N (2009). Application of stereology to dermatological research. Experimental Dermatology. 18(12):1001-1009.
- 40. Hsia C C W, Hyde D M, Ochs M, Weibel E R (2010). An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 181(4):394-418.
- 41. Dalum A S, Griffiths D J, Valen E C, Amthor K S, Austbø L, Koppang E O, Press C M, Kvellestad A (2016). Morphological and functional development of the interbranchial lymphoid tissue (ILT) in Atlantic salmon (Salmo salar L). Fish and Shellfish Immunology. 58:153-164.
- 42. de Moraes M F P G, Höller S, da Costa O T F, Glass M L, Fernandes M N, Perry S F (2005). Morphometric Comparison of the Respiratory Organs in the South American Lungfish Lepidosiren paradoxa (Dipnoi). Physiological and Biochemical Zoology. 78(4):546-559.
- 43. da Costa O T F, Pedretti A C E, Schmitz A, Perry S F, Fernandes M N (2007). Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. Journal of Microscopy. 225(Pt 1):1-9.
- 44. Fernandes M N, da Cruz A L, da Costa O T F, Perry S F (2012). Morphometric partitioning of the respiratory surface area and diffusion capacity of the gills and swim bladder in juvenile Amazonian air-breathing fish, Arapaima gigas. Micron. 43(9):961-970.
- 45. Phuong L M, Huong D T T, Nyengaard J R, Bayley M (2017). Gill remodelling and growth rate of striped catfish Pangasianodon hypophthalmus under impacts of hypoxia and temperature. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology. 203:288-296.
- 46. Phuong L M, Huong D T T, Malte H, Nyengaard J R, Bayley M (2018). Ontogeny and morphometrics of the gills and swim bladder of air-breathing striped catfish Pangasianodon hypophthalmus. Journal of Experimental Biology. 221(Pt 3):jeb168658.

- 47. da Cruz A L, Fernandes M N (2016). What is the most efficient respiratory organ for the loricariid air-breathing fish Pterygoplichthys anisitsi, gills or stomach? A quantitative morphological study. Zoology. 119(6):526-533.
- 48. Dang M, Pittman K, Bach L, Sonne C, Hansson S V, Søndergaard J, Stride M, Nowak B (2019). Mucous cell responses to contaminants and parasites in shorthorn sculpins (Myoxocephalus scorpius) from a former lead-zinc mine in West Greenland. Science of the Total Environment. 678:207-216.
- 49. Dang M, Pittman K, Sonne C, Hansson S, Bach L, Søndergaard J, Stride M, Nowak B (2020). Histological mucous cell quantification and mucosal mapping reveal different aspects of mucous cell responses in gills and skin of shorthorn sculpins (Myoxocephalus scorpius). Fish & Shellfish Immunology. 100:334-344.
- 50. Haddeland S, Lazado C C, Merkin G V, Myre O J, Okubamichael M A, Pedersen L-F, Pittman K (2021). Dynamic morphometrics of mucous cells reveal the minimal impact of therapeutic doses of peracetic acid on Atlantic salmon gill health. Aquaculture. 534:736315.
- 51. Bell C E, Baldwin L A, Kostecki P T, Calabrese E J (1993). Comparative Response of Rainbow Trout and Rat to the Liver Mitogen, Lead. Ecotoxicology and Environmental Safety. 26(3):280-284.
- 52. Choi E, Alsop D, Wilson J Y (2018). The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquatic Toxicology. 198:20-29.
- 53. Karlsson-Norrgren L, Runn P, Haux C, Förlin L (1985). Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan), and rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. Journal of Fish Biology. 27(1):81-95.
- 54. Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck T, Kalbfus W, Negele R D (2002). How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) as a test organism. Aquatic Toxicology. 59(3):177-189.
- 55. Danion M, Le Floch S, Pannetier P, van Arkel K, Morin T (2018). Transchem project Part I: Impact of long-term exposure to pendimethalin on the health status of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss L.) genitors. Aquatic Toxicology. 202:207-215.
- 56. Domoradzki J Y, Sushynski J M, Thackery L M, Springer T A, Ross T L, Woodburn K B, Durham J A, McNett D A (2017). Metabolism of ¹⁴C-octamethylcyclotetrasiloxane ([¹⁴C]D₄) or ¹⁴C-decamethylcyclopentasiloxane ([¹⁴C]D₅) orally gavaged in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Toxicology Letters. 279(Suppl 1):115-124.

- 57. Geiger T (2021). Untersuchungen zur Wirkung oral aufgenommener PVC-Mikroplastikpartikel bei Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 58. Feuchtinger A, Walch A, Dobosz M (2016). Deep tissue imaging: a review from a preclinical cancer research perspective. Histochemistry and Cell Biology. 146(6):781-806.
- 59. Candeo A, Sana I, Ferrari E, Maiuri L, D'Andrea C, Valentini G, Bassi A (2016). Virtual unfolding of light sheet fluorescence microscopy dataset for quantitative analysis of the mouse intestine. Journal of Biomedical Optics. 21(5):e56001.
- 60. Klingberg A, Hasenberg A, Ludwig-Portugall I, Medyukhina A, Männ L, Brenzel A, Engel D R, Figge M T, Kurts C, Gunzer M (2017). Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. Journal of the American Society of Nephrology. 28(2):452-459.
- 61. Kennel P, Teyssedre L, Colombelli J, Plouraboué F (2018). Toward quantitative three-dimensional microvascular networks segmentation with multiview light-sheet fluorescence microscopy. Journal of Biomedical Optics. 23(8):e86002.
- 62. Lugo-Hernandez E, Squire A, Hagemann N, Brenzel A, Sardari M, Schlechter J, Sanchez-Mendoza E H, Gunzer M, Faissner A, Hermann D M (2017). 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 37(10):3355-3367.
- 63. Theobalt N, Hofmann I, Fiedler S, Renner S, Dhom G, Feuchtinger A, Walch A, Hrabě de Angelis M, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2021). Unbiased analysis of obesity related, fat depot specific changes of adipocyte volumes and numbers using light sheet fluorescence microscopy. PLoS One. 16(3):e0248594.
- 64. Blutke A, Sun N, Xu Z, Buck A, Harrison L, Schriever S C, Pfluger P T, Wiles D, Kunzke T, Huber K, Schlegel J, Aichler M, Feuchtinger A, Matiasek K, Hauck S M, Walch A (2020). Light sheet fluorescence microscopy guided MALDI-imaging mass spectrometry of cleared tissue samples. Scientific Reports. 10(1):14461.
- 65. Yang L, Feuchtinger A, Möller W, Ding Y, Kutschke D, Möller G, Schittny J C, Burgstaller G, Hofmann W, Stoeger T, Razansky D, Walch A, Schmid O (2019). Three-Dimensional Quantitative Co-Mapping of Pulmonary Morphology and Nanoparticle Distribution with Cellular Resolution in Nondissected Murine Lungs. ACS Nano. 13(2):1029-1041.

- 66. Fiedler S, Wünnemann H, Hofmann I, Theobalt N, Feuchtinger A, Walch A, Schwaiger J, Wanke R, Blutke A (2020). A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in ecotoxicological studies. PLoS One. 15(12):e0243462.
- 67. Truhaut R (1977). Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1(2):151-173.
- 68. Hoffman D J, Rattner B A, Burton Jr G A, Cairns Jr J (2003). Introduction. In: Hoffman D J, Rattner B A, Burton Jr G A, Cairns Jr J, eds. Handbook of Ecotoxicology. 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 1-15.
- 69. Boudou A, Ribeyre F (1997). Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels. Environmental Health Perspectives. 105(Suppl 1):21-35.
- 70. Kolkwitz R, Marsson M (1908). Ökologie der pflanzlichen Saprobien. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft. 26a:505-519.
- 71. Kolkwitz R, Marsson M (1909). Ökologie der tierischen Saprobien. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrogeographie. 2(1-2):126-152.
- 72. Bartsch A F (1970). Water pollution An ecological perspective. Research journal of the Water Pollution Control Federation. 42(5):819-823.
- 73. Lam P K S, Gray J S (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Marine Pollution Bulletin. 46(2):182-186.
- 74. Lam P K S (2009). Use of biomarkers in environmental monitoring. Ocean & Coastal Management. 52(7):348-354.
- 75. Peakall D B, Walker C H (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. Ecotoxicology. 3(3):173-179.
- Goodfellow Jr W L (2005). The aquatic environment. In: Thompson K C, Wadhia K, Loibner A P, eds. Environmental Toxicity Testing. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 131-162.
- 77. Ågerstrand M, Breitholtz M, Rudén C (2011). Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: a case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances. Environmental Sciences Europe. 23:17.
- 78. European Environment Agency (1998). Concepts, Principles and Uses. In: Fairman R, Mead C D, Williams W P, eds. Environmental Risk Assessment Approaches, Experiences and Information Sources. EEA, Kopenhagen, pp. 15-39.
- 79. Connell D W (1999). Ecological Risk Assessment. In: Connell D W, Lam P, Richardson B, Wu R, eds. Introduction to Ecotoxicology. 1st ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 145-155.

- 80. Umweltbundesamt (2020). Chemische Qualitätsanforderungen und Bewertung. Dessau-Roßlau. Aufrufbar unter: https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/gewaesser/fluesse/ueber wachung-bewertung/chemisch#chemische-bewertungssysteme [31.07.2021].
- 81. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.
- 82. Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten.
- 83. Richtlinie 2001/83/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel.
- 84. Committee for medicinal products for human use (2006). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. European Medicines Agency, Amsterdam.
- 85. Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik.
- 86. Richtlinie 2008/105/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien des Rates 82/176/EWG, 83/513/EWG, 84/156/EWG, 84/491/EWG und 86/280/EWG sowie zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG.
- 87. Expert Group of the European Commission (2018). Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards Guidance Document No. 27, Updated version 2018. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

- 88. Arle J, Blondzik K, Claussen U, Duffek A, Grimm S, Hilliges F, Kirschbaum B, Kirst I, Koch D, Koschorreck J, Lepom P, Leujak W, Mohaupt V, Naumann S, Pirntke U, Rechenberg J, Schilling P, Ullrich A, Wellmitz J, Werner S, Wolter R (2017). Gewässer in Deutschland: Zustand und Bewertung. Umwelbundesamt, Dessau-Roßlau.
- 89. Richtlinie 2013/39/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik.
- 90. European Chemicals Agency (2008). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. ECHA, Helsinki.
- 91. Umweltbundesamt (2020). Produktzulassung. Dessau-Roßlau. Aufrufbar unter: https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/biozide/rechtliche-regelungen/produktzulassung#wie-lauft-die-zulassung-eines-biozidproduktes-ab [18.08.2021].
- 92. van Gestel C A M, van Brummelen T C (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology. 5(4):217-225.
- 93. Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle P M, Bergman H L, Dickson K L, Fava J A, McCarthy J F, Parrish R, Dorn P B, McFarland V, Lahvis G (1992). Introduction. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 1-3.
- 94. Kroon F, Streten C, Harries S (2017). A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. PLoS One. 12(4):e0174762.
- 95. International Programme on Chemical Safety (1993). Environmental Health Criteria 155 Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. World Health Organization, Geneva.
- 96. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13(2):57-149.
- 97. Fossi M C, Leonzio C, Peakall D B (1994). The Use of Nondestructive Biomarkers in the Hazard Assessments of Vertebrate Populations. In: Fossi M C, Leonzio C, eds. Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. 1st ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-34.
- 98. Sanchez W, Porcher J-M (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. Trends in Analytical Chemistry. 28(2):150-158.

- 99. National Research Council (1987). Biological Markers in Environmental Health Research, by the Committee on Biological Markers of the National Research Council. Environmental Health Perspectives. 74:3-9.
- 100. Schlenk D (1999). Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. Marine Pollution Bulletin. 39(1-12):48-53.
- 101. Stegeman J J, Brouwer M, Di Giulio R T, Förlin L, Fowler B A, Sanders B M, van Veld P A (1992). Enzyme and Protein Synthesis as Indicators of Contaminant Exposure and Effect. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 235-335.
- 102. Mayer F L, Versteeg D J, McKee M J, Folmar L C, Graney R L, McCume D C, Rattner B A (1992). Physiological and Nonspecific Biomarkers. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 5-85.
- 103. Shugart L R, Bickham J, Jackim G, McMahon G, Ridley W, Stein J, Steinert S (1992). DNA Alterations. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 125-153.
- 104. Weeks B A, Anderson D P, DuFour A P, Fairbrother A, Goven A J, Lahvis G P, Peters G (1992). Immunological Biomarkers to Assess Environmental Stress. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 211-234.
- 105. Hinton D E, Baumann P C, Gardner G R, Hawkins W E, Hendricks J D, Murchelano R A, Okihiro M S (1992). Histopathologic Biomarkers. In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L, eds. Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. 1st ed. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 155-209.
- 106. Teh S J, Adams S M, Hinton D E (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquatic Toxicology. 37(1):51-70.
- 107. Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebskorn R (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. 6(1):75-86.

- 108. Wünnemann H, Weiß K, Arndt D, Baumann M, Weiß R, Ferling H, Scholz-Göppel K, Bucher K, Feick C, Hartmann G, Kitzing P, Szyja M, Schwaiger J (2020). Umweltqualitätsnormen für Binnengewässer: Überprüfung der Gefährlichkeit neuer bzw. prioritärer Substanzen. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.
- 109. Wester P W, van der Ven L T M, Vethaak A D, Grinwis G C M, Vos J G (2002). Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. Environmental Toxicology and Pharmacology. 11(3-4):289-295.
- 110. Fonseca A R, Sanches Fernandes L F, Fontainhas-Fernandes A, Monteiro S M, Pacheco F A L (2017). The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. Science of the Total Environment. 599-600:217-226.
- 111. Handy R D, Galloway T S, Depledge M H (2003). A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. Ecotoxicology. 12(1-4):331-343.
- 112. Wolf J C, Maack G (2017). Evaluating the credibility of histopathology data in environmental endocrine toxicity studies. Environmental Toxicology and Chemistry. 36(3):601-611.
- 113. Wolf J C (2018). Fish toxicologic pathology: the growing credibility gap and how to bridge it. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 38(2):51-64.
- 114. Ågerstrand M, Küster A, Bachmann J, Breitholtz M, Ebert I, Rechenberg B, Rudén C (2011). Reporting and evaluation criteria as means towards a transparent use of ecotoxicity data for environmental risk assessment of pharmaceuticals. Environmental Pollution. 159(10):2487-2492.
- 115. Moermond C T A, Kase R, Korkaric M, Ågerstrand M (2016). CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry. 35(5):1297-1309.
- 116. Christophe M, Rachid A, Mario L (2015). Fish as Reference Species in Different Water Masses. In: Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Mouneyrac C, eds. Aquatic Ecotoxicology - Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. 1st ed. Academic Press, London, pp. 309-331.
- 117. Di Giulio R T, Hinton D E (2008). Introduction. In: Di Giulio R T, Hinton D E, eds. The Toxicology of Fishes. 1st ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-7.
- 118. Cossins A R, Crawford D L (2005). Fish as models for environmental genomics. Nature Reviews Genetics. 6(4):324-333.
- 119. Janz D M (2000). Chapter 13 Endocrine System. In: Ostrander G K, ed. The Laboratory Fish. 1st ed. Academic Press, San Diego, pp. 189-217.

- 120. Wolf K, Rumsey G (1985). The Representative Research Animal: Why Rainbow Trout (Salmo gairdneri Rich.)? Journal of Applied Ichthyology. 1(3):131-138.
- 121. Yancheva V, Velcheva I, Stoyanova S, Georgieva E (2015). Fish in Ecotoxicological Studies. Ecologia Balkanica. 7(1):149-169.
- 122. Song Y, Salbu B, Heier L S, Teien H-C, Lind O-C, Oughton D, Petersen K, Rosseland B O, Skipperud L, Tollefsen K E (2012). Early stress responses in Atlantic salmon (Salmo salar) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium. Aquatic Toxicology. 112-113:62-71.
- 123. Burkhardt-Holm P (1997). Lectin histochemistry of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill and skin. The Histochemical Journal. 29(11-12):893-899.
- 124. Buhler D R, Wang-Buhler J-L (1998). Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 121(1-3):107-137.
- 125. Petala M, Kokokiris L, Samaras P, Papadopoulos A, Zouboulis A (2009). Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. Water Research. 43(20):5063-5074.
- 126. Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, Eno N C, Tyler C R, Sumpter J P (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chemistry and Ecology. 8(4):275-285.
- 127. Kleinow K M, Melancon M J, Lech J J (1987). Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. Environmental Health Perspectives. 71:105-119.
- 128. Fischer W J, Hitzfeld B C, Tencalla F, Eriksson J E, Mikhailov A, Dietrich D R (2000). Microcystin-LR Toxicodynamics, Induced Pathology, and Immunohistochemical Localization in Livers of Blue-Green Algae Exposed Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). Toxicological Sciences. 54(2):365-373.
- 129. Lavado R, Schlenk D (2011). Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and coho salmon (Oncorhynchus kisutch): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity. Aquatic Toxicology. 101(1):57-63.
- 130. Ašmonaitė G, Sundh H, Asker N, Carney Almroth B (2018). Rainbow Trout Maintain Intestinal Transport and Barrier Functions Following Exposure to Polystyrene Microplastics. Environmental Science & Technology. 52(24):14392–14401.

- 131. Evans D H, Piermarini P M, Choe K P (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. Physiological Reviews. 85(1):97-177.
- 132. Hildebrandt J-P, Bleckmann H, Homberg U (2021). Penzlin Lehrbuch der Tierphysiologie. 9te Aufl. Springer Spektrum, Berlin.
- 133. Yasutake W T, Wales J H (1983). Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas. 1st ed. United States Deptartment of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- 134. Roberts R J, Ellis A E (2012). The Anatomy and Physiology of Teleosts. In: Roberts R J, ed. Fish Pathology. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 17-61.
- 135. Olson K R (2000). Chapter 9 Respiratory System. In: Ostrander G K, ed. The Laboratory Fish. 1st ed. Academic Press, San Diego, pp. 151-159.
- 136. Graham J B (2006). Aquatic and Aerial Respiration. In: Evans D H, Claiborne J B, eds. The Physiology of Fishes. 3rd ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 85-117.
- 137. Rombough P J (1999). The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure? Journal of Fish Biology. 55(Suppl A):186-204.
- 138. González M E, Blánquez M J, Rojo C (1996). Early Gill Development in the Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Morphology. 229(2):201-217.
- 139. Wilson J M, Laurent P (2002). Fish Gill Morphology: Inside Out. Journal of Experimental Zoology. 293(3):192-213.
- 140. Koppang E O, Fischer U, Moore L, Tranulis M A, Dijkstra J M, Köllner B, Aune L, Jirillo E, Hordvik I (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. Journal of Anatomy. 217(6):728-739.
- Olson K R (2000). Chapter 21 Respiratory System. In: Ostrander G K, ed. The Laboratory Fish. 1st ed. Academic Press, San Diego, pp. 357-367.
- 142. Stoskopf M K (1993). Fish Histology. In: Stoskopf M K, ed. Fish Medicine. 1st ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 31-47.
- Eckert R, Randall D, Burggren W, French K (2002). Tierphysiologie. 4te Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 144. Olson K R (2000). Chapter 10 Circulatory System. In: Ostrander G K, ed. The Laboratory Fish. 1st ed. Academic Press, San Diego, pp. 161-171.
- 145. Gros G (2010). Atmung. In: von Engelhardt W, ed. Physiologie der Haustiere. 3te Aufl. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 241-280.

- 146. Stohrer M (2000). Physiologie und funktionelle Anatomie. In: Ahne W, Liebich H-G, Stohrer M, Wolf E, eds. Zoologie. 1ste Aufl. Schattauer, Stuttgart, pp. 85-167.
- 147. Hildebrand M, Goslow G E (2004). Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere. 1ste Aufl. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- 148. Booth J H (1979). The effects of oxygen supply, epinephrine, and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. Journal of Experimental Biology. 83(1):31-39.
- 149. Sundin L, Nilsson G E (1997). Neurochemical mechanisms behind gill microcirculatory responses to hypoxia in trout: in vivo microscopy study. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 272(2):R576-585.
- 150. Olson K R (2002). Gill Circulation: Regulation of Perfusion Distribution and Metabolism of Regulatory Molecules. Journal of Experimental Zoology. 293(3):320-335.
- 151. Marshall W S, Grosell M (2006). Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. In: Evans D H, Claiborne J B, eds. The Physiology of Fishes. 3rd ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 177-230.
- Bowser P R (1993). Clinical pathology of salmonid fishes. In: Stoskopf M K, ed. Fish Medicine. 1st ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 327-332.
- 153. Skadhauge E (2010). Exkretion bei Vögeln und Osmoregulation bei Fischen. In: von Engelhardt W, ed. Physiologie der Haustiere. 3te Aufl. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 321-324.
- 154. Gäbel G (2010). Säure-Basen-Haushalt. In: von Engelhardt W, ed. Physiologie der Haustiere. 3te Aufl. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 281-291.
- 155. Claiborne J B, Edwards S L, Morrison-Shetlar A I (2002). Acid-Base Regulation in Fishes: Cellular and Molecular Mechanisms. Journal of Experimental Zoology. 293(3):302-319.
- 156. Heisler N (1984). Acid-Base Regulation in Fishes. In: Hoar W S, Randall D J, eds. Fish Physiology, 10 A. 1st ed. Academic Press, New York, pp. 315-401.
- 157. Evans D H (1987). The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. Environmental Health Perspectives. 71:47-58.
- 158. Daglish R W, Nowak B F (2002). Rainbow Trout Gills Are a Sensitive Biomarker of Short-Term Exposure to Waterborne Copper. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 43(1):98-102.

- 159. Poleksić V, Mitrović-Tutundžić V (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller R, Lloyd R, eds. Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. 1st ed. Fishing News Books Ltd, Oxford, pp. 339-352.
- 160. Barron M G (2003). Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms. In: Hoffman D J, Rattner B A, Burton Jr G A, Cairns Jr J, eds. Handbook of Ecotoxicology. 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 877-892.
- 161. Laurent P, Perry S F (1991). Environmental Effects on Fish Gill Morphology. Physiological Zoology. 64(1):4-25.
- 162. Rodrigues S, Antunes S C, Nunes B, Correia A T (2019). Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species Oncorhynchus mykiss. Ecotoxicology and Environmental Safety. 181:1-10.
- 163. Brunelli E, Mauceri A, Maisano M, Bernabò I, Giannetto A, de Domenico E, Corapi B, Tripepi S, Fasulo S (2011). Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, Thalassoma pavo L., exposed to cadmium. Acta Histochemica. 113(2):201-213.
- 164. Hughes G M (1972). Morphometrics of fish gills. Respiration Physiology. 14(1):1-25.
- 165. Hughes G M, Perry S F, Brown V M (1979). A morphometric study of effects of nickel, chromium and cadmium on the secondary lamellae of rainbow trout gills. Water Research. 13(7):665-679.
- 166. Hughes G M (1984). Measurement of gill area in fishes: practices and problems. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 64(3):637-655.
- 167. Laurent P, Hebibi N (1989). Gill morphometry and fish osmoregulation. Canadian Journal of Zoology. 67(12):3055-3063.
- Mazon A d F, Fernandes M N, Nolasco M A, Severi W (1998). Functional morphology of gills and respiratory area of two active rheophilic fish species, Plagioscion squamosissimus and Prochilodus scrofa. Journal of Fish Biology. 52(1):50-61.
- 169. Al-Bairuty G A, Shaw B J, Handy R D, Henry T B (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquatic Toxicology. 126:104-115.
- 170. Monteiro S M, Rocha E, Fontaínhas-Fernandes A, Sousa M (2008). Quantitative histopathology of Oreochromis niloticus gills after copper exposure. Journal of Fish Biology. 73(6):1376-1392.

- 171. Nunes B, Antunes S C, Gomes R, Campos J C, Braga M R, Ramos A S, Correia A T (2015). Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish Gambusia holbrooki: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 68(2):371-381.
- 172. Rodrigues S, Antunes S C, Nunes B, Correia A T (2017). Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. Environmental Toxicology and Pharmacology. 53:164-176.
- 173. van Heerden D, Vosloo A, Nikinmaa M (2004). Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) levels in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquatic Toxicology. 69(3):271-280.
- 174. Santos D, Falcão A, Luzio A, Fontaínhas-Fernandes A, Monteiro S M (2015). Neuroendocrine and Eosinophilic Granule Cells in the Gills of Tilapia, Oreochromis niloticus: Effects of Waterborne Copper Exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 69(4):566-576.
- 175. Pane E F, Haque A, Goss G G, Wood C M (2004). The physiological consequences of exposure to chronic, sublethal waterborne nickel in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): exercise vs resting physiology. Journal of Experimental Biology. 207(Pt 7):1249-1261.
- 176. Pane E F, Haque A, Wood C M (2004). Mechanistic analysis of acute, Niinduced respiratory toxicity in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): an exclusively branchial phenomenon. Aquatic Toxicology. 69(1):11-24.
- 177. Li G, Lv X, Zhou J, Shen C, Xia D, Xie H, Luo Y (2018). Are the surface areas of the gills and body involved with changing metabolic scaling with temperature? Journal of Experimental Biology. 221(Pt 8):jeb174474.
- 178. Mbanga B, van Dyk C, Maina J N (2018). Morphometric and morphological study of the respiratory organs of the bimodally-breathing African sharptooth catfish (Clarias gariepinus): Burchell (1822). Zoology. 130:6-18.
- 179. Tschanz S, Schneider J P, Knudsen L (2014). Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. Annals of Anatomy. 196(1):3-11.
- 180. Weibel E R (1979). Stereological Methods: Practical Methods for Biological Morphometry. 1st ed. Academic Press, London.
- 181. Haug H (1987). The first ten years after the foundation of the international society for stereology in 1961. Acta stereologica. 6(Suppl 2):35-42.
- 182. Delesse M A (1847). Procédé mécanique pour determiner la composition des roches. Comptes rendus de l'Académie des sciences. 25:544-545.

- 183. Mattfeldt T (1990). Stereologische Methoden in der Pathologie. 1ste Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart.
- 184. Baak J P A, ten Kate F J W, Offerhaus G J A, van Lanschot J J, Meijer G A (2002). Routine morphometrical analysis can improve reproducibility of dysplasia grade in Barrett's oesophagus surveillance biopsies. Journal of Clinical Pathology. 55(12):910-916.
- 185. Franzén L E, Ekstedt M, Kechagias S, Bodin L (2005). Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. Modern Pathology. 18(7):912-916.
- 186. Wanke R (1996). Charakterisierung der renalen Alterationen Wachstumshormon-transgener Mäuse. Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 187. Abercrombie M (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. The Anatomical Record. 94(2):239-247.
- 188. Dunnill M S (1962). Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. Thorax. 17(4):320-328.
- 189. Weibel E R, Knight B W (1964). A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. Journal of Cell Biology. 21(3):367-384.
- 190. Weibel E R, Gomez D M (1962). A principle for counting tissue structures on random sections. Journal of Applied Physiology. 17:343-348.
- 191. Weibel E R (1963). Morphometry of the Human Lung. 1st ed. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 192. Samuel T, Hoy W E, Douglas-Denton R, Hughson M D, Bertram J F (2007). Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. Journal of Anatomy. 210(5):578-582.
- 193. West M J (2012). Introduction to Stereology. Cold Spring Harbor Protocols. 2012(8):843-851.
- 194. Weibel E R, Hsia C C W, Ochs M (2007). How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. Journal of Applied Physiology. 102(1):459-467.
- 195. Gundersen H J G (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. Journal of Microscopy. 111(Pt 2):219-223.
- 196. Brændgaard H, Gundersen H J G (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. Journal of Neuroscience Methods. 18(1-2):39-78.

- 197. Baddeley A J, Gundersen H J G, Cruz-Orive L M (1986). Estimation of surface area from vertical sections. Journal of Microscopy. 142(Pt 3):259-276.
- 198. Sterio D C (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. Journal of Microscopy. 134(Pt 2):127-136.
- 199. Gundersen H J G, Bagger P, Bendtsen T F, Evans S M, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard J R, Pakkenberg B, Sørensen F B, Vesterby A, West M J (1988). The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 96(10):857-881.
- 200. Gundersen H J G, Bendtsen T F, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard J R, Pakkenberg B, Sørensen F B, Vesterby A, West M J (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 96(5):379-394.
- 201. Cruz-Orive L M, Weibel E R (1981). Sampling designs for stereology. Journal of Microscopy. 122(Pt 3):235-257.
- 202. Gundersen H J G, Jensen E B (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. Journal of Microscopy. 147(Pt 3):229-263.
- 203. Gundersen H J G (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. Journal of Microscopy. 143(Pt 1):3-45.
- 204. Gundersen H J G, Østerby R (1981). Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. Journal of Microscopy. 121(Pt 1):65-73.
- 205. Scherle W (1970). A Simple Method for Volumetry of Organs in Quantitative Stereology. Mikroskopie. 26(1):57-60.
- 206. Blutke A, Wanke R (2018). Sampling Strategies and Processing of Biobank Tissue Samples from Porcine Biomedical Models. Journal of Visualized Experiments. (133):e57276.
- 207. Ochs M, Mühlfeld C (2013). Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology. 305(1):L15-22.
- 208. Nyengaard J R, Gundersen H J G (1992). The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. Journal of Microscopy. 165(Pt 3):427-431.

- 209. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P (1990). Estimation of surface area and length with the orientator. Journal of Microscopy. 159(Pt 3):301-317.
- 210. Mattfeldt T, Möbius H-J, Mall G (1985). Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. Journal of Microscopy. 139(Pt 3):279-289.
- 211. Michel R P, Cruz-Orive L M (1988). Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. Journal of Microscopy. 150(Pt 2):117-136.
- 212. Dorph-Petersen K-A, Nyengaard J R, Gundersen H J G (2001). Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. Journal of Microscopy. 204(Pt 3):232-246.
- 213. Schneider J P, Ochs M (2014). Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: A comparison of methods. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology. 306(4):L341-350.
- 214. Helander K G (1983). Thickness variations within individual paraffin and glycol methacrylate sections. Journal of Microscopy. 132(Pt 2):223-227.
- 215. Matenaers C, Popper B, Rieger A, Wanke R, Blutke A (2018). Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. PLoS One. 13(2):e0192879.
- 216. Thomson E (1930). Quantitative Microscopic Analysis. The Journal of Geology. 38(3):193-222.
- 217. Ramage I J, Howatson A G, McColl J H, Maxwell H, Murphy A V, Beattie T J (2002). Glomerular basement membrane thickness in children: A stereologic assessment. Kidney International. 62(3):895-900.
- 218. Jensen E B, Gundersen H J G, Østerby R (1979). Determination of membrane thickness distribution from orthogonal intercepts. Journal of Microscopy. 115(Pt 1):19-33.
- 219. Hirose K, Østerby R, Nozawa M, Gundersen H J G (1982). Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. Kidney International. 21(5):689-695.
- 220. Herbach N, Schairer I, Blutke A, Kautz S, Siebert A, Göke B, Wolf E, Wanke R (2009). Diabetic kidney lesions of GIPR^{dn} transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. American Journal of Physiology: Renal Physiology. 296(4):F819-829.
- 221. Cruz-Orive L M (1987). Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. Journal of Microscopy. 145(Pt 2):121-142.

- 222. Slomianka L (2021). Basic quantitative morphological methods applied to the central nervous system. The Journal of Comparative Neurology. 529(4):694-756.
- 223. Hofmann I, Kemter E, Fiedler S, Theobalt N, Fonteyne L, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2021). A new method for physical disector analyses of numbers and mean volumes of immunohistochemically labeled cells in paraffin sections. Journal of Neuroscience Methods. 361:109272.
- 224. Dodt H-U, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch C P, Deininger K, Deussing J M, Eder M, Zieglgänsberger W, Becker K (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. Nature Methods. 4(4):331-336.
- 225. Susaki E A, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe T M, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda H R (2014). Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. Cell. 157(3):726-739.
- 226. Robertson R T, Levine S T, Haynes S M, Gutierrez P, Baratta J L, Tan Z, Longmuir K J (2015). Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. Histochemistry and Cell Biology. 143(2):225-234.
- 227. Richardson D S, Lichtman J W (2015). Clarifying Tissue Clearing. Cell. 162(2):246-257.
- 228. Whitehead L W, McArthur K, Geoghegan N D, Rogers K L (2017). The reinvention of twentieth century microscopy for three-dimensional imaging. Immunology and Cell Biology. 95(6):520-524.
- 229. Elisa Z, Toon B, De Smedt S C, Katrien R, Kristiaan N, Kevin B (2018). Technical implementations of light sheet microscopy. Microscopy Research and Technique. 81(9):941-958.
- 230. Scherf N, Huisken J (2015). The smart and gentle microscope. Nature Biotechnology. 33(8):815-818.
- 231. Siedentopf H, Zsigmondy R (1902). Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikoskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. Annalen der Physik. 315(1):1-39.
- 232. Fuchs E, Jaffe J S, Long R A, Azam F (2002). Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography. Optics Express. 10(2):145-154.
- 233. Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer E H (2004). Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. Science. 305(5686):1007-1009.

- 234. Hong S-M, Noë M, Hruban C A, Thompson E D, Wood L D, Hruban R H (2019). A "Clearer" View of Pancreatic Pathology: A Review of Tissue Clearing and Advanced Microscopy Techniques. Advances in Anatomic Pathology. 26(1):31-39.
- 235. Weissleder R (2001). A clearer vision for in vivo imaging. Nature Biotechnology. 19(4):316-317.
- 236. Genina E A, Bashkatov A N, Tuchin V V (2010). Tissue optical immersion clearing. Expert Review of Medical Devices. 7(6):825-842.
- 237. Ertürk A, Bradke F (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). Experimental Neurology. 242:57-64.
- 238. Tainaka K, Kubota S I, Suyama T Q, Susaki E A, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H, Ueda H R (2014). Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization. Cell. 159(4):911-924.
- 239. Ueda H R, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, Keller P J (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. Nature Reviews Neuroscience. 21(2):61-79.
- 240. Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch C P, Hojer C D, Egen J G, Hellal F, Bradke F, Sheng M, Dodt H-U (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nature Protocols. 7(11):1983-1995.
- 241. Bossolani G D P, Pintelon I, Detrez J D, Buckinx R, Thys S, Zanoni J N, De Vos W H, Timmermans J-P (2019). Comparative analysis reveals Ce3D as optimal clearing method for in toto imaging of the mouse intestine. Neurogastroenterology and Motility. 31(5):e13560.
- 242. Vigouroux R J, Belle M, Chédotal A (2017). Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. Molecular Brain. 10(1):33.
- 243. Kuwajima T, Sitko A A, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C (2013). Clear^T: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. Development. 140(6):1364-1368.
- 244. Ke M-T, Fujimoto S, Imai T (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nature Neuroscience. 16(8):1154-1161.
- 245. Ke M-T, Imai T (2014). Optical Clearing of Fixed Brain Samples Using SeeDB. Current Protocols in Neuroscience. 66(2.22):1-19.
- 246. Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman A S, Davidson T J, Mirzabekov J J, Zalocusky K A, Mattis J, Denisin A K, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature. 497(7449):332-337.

- 247. Gómez-Gaviro M V, Sanderson D, Ripoll J, Desco M (2020). Biomedical Applications of Tissue Clearing and Three-Dimensional Imaging in Health and Disease. iScience. 23(8):101432.
- 248. Corsetti S, Gunn-Moore F, Dholakia K (2019). Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. Journal of Neuroscience Methods. 319:16-27.
- 249. Greger K, Swoger J, Stelzer E H K (2007). Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. Review of Scientific Instruments. 78(2):023705.
- 250. Becker K, Jährling N, Saghafi S, Dodt H-U (2013). Ultramicroscopy: Light-Sheet-Based Microscopy for Imaging Centimeter-Sized Objects with Micrometer Resolution. Cold Spring Harbor Protocols. 2013(8):704-713.
- 251. Pampaloni F, Chang B-J, Stelzer E H K (2015). Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues. Cell and Tissue Research. 360(1):129-141.
- 252. Jährling N, Becker K, Dodt H-U (2009). 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy. Organogenesis. 5(4):227-230.
- 253. Dobosz M, Ntziachristos V, Scheuer W, Strobel S (2014). Multispectral Fluorescence Ultramicroscopy: Three-Dimensional Visualization and Automatic Quantification of Tumor Morphology, Drug Penetration, and Antiangiogenic Treatment Response. Neoplasia. 16(1):1-13.
- 254. Harrison L, Schriever S C, Feuchtinger A, Kyriakou E, Baumann P, Pfuhlmann K, Messias A C, Walch A, Tschöp M H, Pfluger P T (2019). Fluorescent blood-brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. International Journal of Obesity. 43(6):1305-1318.
- 255. Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A (2014). A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. Cell Reports. 9(4):1191-1201.
- 256. Feng G, Mellor R H, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen Q T, Wallace M, Nerbonne J M, Lichtman J W, Sanes J R (2000). Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. Neuron. 28(1):41-51.
- 257. Dynes J L, Ngai J (1998). Pathfinding of Olfactory Neuron Axons to Stereotyped Glomerular Targets Revealed by Dynamic Imaging in Living Zebrafish Embryos. Neuron. 20(6):1081-1091.
- 258. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 263(5148):802-805.
- 259. Menzel R (2011). Ultramicroscopy imaging a whole animal or a whole brain with micron resolution. Frontiers in Neuroscience. 5:11.

- 260. Azaripour A, Lagerweij T, Scharfbillig C, Jadczak A E, Willershausen B, van Noorden C J F (2016). A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 51(2):9-23.
- 261. Diel E E, Lichtman J W, Richardson D S (2020). Tutorial: avoiding and correcting sample-induced spherical aberration artifacts in 3D fluorescence microscopy. Nature Protocols. 15(9):2773-2784.
- 262. Hell S, Reiner G, Cremer C, Stelzer E H K (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. Journal of Microscopy. 169(Pt 3):391-405.
- 263. Olson K R (1985). Preparation of Fish Tissues for Electron Microscopy. Journal of Electron Microscopy Technique. 2(3):217-228.
- 264. Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2016). Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models. Toxicologic Pathology. 44(3):414-420.
- 265. Blutke A, Schneider M R, Renner-Müller I, Herbach N, Wanke R, Wolf E (2014). Genetic dissection of IGF1-dependent and -independent effects of permanent GH excess on postnatal growth and organ pathology of mice. Molecular and Cellular Endocrinology. 394(1-2):88-98.
- 266. Wanke R, Wolf E, Brem G, Hermanns W (2001). Role of podocyte damage in the pathogenesis of glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions: findings in the growth hormone transgenic mouse model of progressive nephropathy. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. 85:250-256.
- 267. Waser W P, Schmitz A, Perry S F, Wobschall A (2005). Stereological analysis of blood space and tissue types in the pseudobranch of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiology and Biochemistry. 31(1):73-82.
- 268. Adams T E, Crabbs T A (2013). Chapter 6 Basic Approaches in Anatomic Toxicologic Pathology. In: Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, eds. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd ed. Academic Press, London, pp. 149-173.
- 269. Gage G J, Kipke D R, Shain W (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. Journal of Visualized Experiments. (65):e3564.
- 270. Abbott A (2015). Inside the first pig biobank. Nature. 519(7544):397-398.
- 271. Blutke A, Schneider M R, Wolf E, Wanke R (2016). Growth hormone (GH)-transgenic insulin-like growth factor 1 (IGF1)-deficient mice allow dissociation of excess GH and IGF1 effects on glomerular and tubular growth. Physiological Reports. 4(5):e12709.

LITERATURVERZEICHNIS

- 272. Cruz A L, Fernandes M N, Perry S F (2009). Effect of histological processing and methacrylate sectioning on the area of gill tissue in teleost. Brazilian Journal of Biology. 69(2):385-387.
- 273. Gundersen H J G (1988). The nucleator. Journal of Microscopy. 151(1):3-21.
- 274. Madsen K M (1999). The Art of Counting. Journal of the American Society of Nephrology. 10(5):1124-1125.
- 275. Chi J, Crane A, Wu Z, Cohen P (2018). Adipo-Clear: A Tissue Clearing Method for Three-Dimensional Imaging of Adipose Tissue. Journal of Visualized Experiments. (137):e58271.
- 276. Dorph-Petersen K-A, Pierri J N, Perel J M, Sun Z, Sampson A R, Lewis D A (2005). The Influence of Chronic Exposure to Antipsychotic Medications on Brain Size before and after Tissue Fixation: A Comparison of Haloperidol and Olanzapine in Macaque Monkeys. Neuropsychopharmacology. 30(9):1649-1661.
- 277. Hughes G M, Morgan M (1973). The structure of fish gills in relation to their respiratory function. Biological Reviews. 48(3):419-475.
- 278. Palzenberger M, Pohla H (1992). Gill surface area of water-breathing freshwater fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2(3):187-216.
- 279. Tanaka N, Kanatani S, Tomer R, Sahlgren C, Kronqvist P, Kaczynska D, Louhivuori L, Kis L, Lindh C, Mitura P, Stepulak A, Corvigno S, Hartman J, Micke P, Mezheyeuski A, Strell C, Carlson J W, Fernández Moro C, Dahlstrand H, Östman A, Matsumoto K, Wiklund P, Oya M, Miyakawa A, Deisseroth K, Uhlén P (2017). Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. Nature Biomedical Engineering. 1(10):796-806.
- 280. Garvalov B K, Ertürk A (2017). Seeing whole-tumour heterogeneity. Nature Biomedical Engineering. 1(10):772-774.

9 PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFT-LICHEN FACHTAGUNGEN

Publikationen in Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren:

- 1. **Fiedler S**, Wünnemann H, Hofmann I, Theobalt N, Feuchtinger A, Walch A, Schwaiger J, Wanke R, Blutke A (2020). A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies. PLoS One. 15(12):e0243462.
- 2. Hofmann I, Kemter E, Theobalt N, **Fiedler S**, Bidlingmaier M, Hinrichs A, Aichler M, Burkhardt K, Klymiuk N, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2020). Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy. Growth Hormone and IGF Research. 51:6-16.
- 3. Theobalt N, Hofmann I, **Fiedler S**, Renner S, Dhom G, Feuchtinger A, Walch A, Hrabě de Angelis M, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2021). Unbiased analysis of obesity related, fat depot specific changes of adipocyte volumes and numbers using light sheet fluorescence microscopy. PLoS One. 16(3):e0248594.
- 4. Hofmann I, Kemter E, **Fiedler S**, Theobalt N, Fonteyne L, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2021). A new method for physical disector analyses of numbers and mean volumes of immunohistochemically labeled cells in paraffin sections. Journal of Neuroscience Methods. 361:109272.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeitrag anlässlich der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (Fulda, März 2019) und als zitierfähiger Abstract veröffentlicht:

Fiedler S, Wünnemann H, Schwaiger J, Feuchtinger A, Walch A, Hofmann I, Theobalt N, Wanke R, Blutke A (2019). Quantitative Stereologie der Kiemen von Regenbogenforellen. Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere. 47(03):202. (1. Posterpreis der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)).

Zitierfähige Abstracts weiterer Posterpräsentationen anlässlich der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (Fulda, März 2019):

- 1. Eddicks L, Matiasek K, Nolff M, Pieper K, Meyer-Lindenberg A, **Fiedler S**, Majzoub-Altweck M (2019). Pylorusstenose, multiple intestinale Atresien sowie Atresia ani bei einem Old-English-Bulldog-Welpen. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere. 47(03):212.
- 2. Theobalt N, Renner S, Feuchtinger A, Walch A, Hofmann I, **Fiedler S**, Wanke R, Blutke A (2019). Quantitative Stereologie des Fettgewebes. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere. 47(03):217.

Zitierfähige Abstracts wissenschaftlicher Vorträge anlässlich der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (Fulda, März 2019):

- 1. Blutke A*, Hofmann I, Theobald N, **Fiedler S**, Feuchtinger A, Walch A, Wanke R (2019). Lichtblattmikroskopie in der quantitativ morphologischen Analyse von Gewebeproben. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere. 47(03):210.
- 2. Hofmann I*, Theobalt N, **Fiedler S**, Wolf E, Wanke R, Blutke A (2019). Quantitativ-morphologische Untersuchungen der Hypophyse in einem porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere. 47(03):211.

(*vortragende Person)

10 DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt allen voran meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke (Professur für Molekulare und Experimentelle Pathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, LMU München), für seine Bereitschaft, die Betreuung dieses Dissertationsprojektes zu übernehmen, die durchwährende allumfassende Unterstützung, das Teilen seines breiten Wissens im Fachbereich der quantitativen Stereologie und den stets bereichernden Austausch.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Andreas Parzefall (Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München), der die Idee zu diesem Dissertationsprojekt hatte und mir die Gelegenheit gab, in diesem interessanten Themenbereich zu promovieren. Er betreute mich bis zu seinem Wechsel an das Helmholtz Zentrum München als Doktorvater und stand mir auch danach als engagierter Betreuer allumfassend und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Für seine Begeisterungsfähigkeit, Denkanstöße, das Teilen seines breiten Fachwissens und praktischen Erfahrungen sowie für sein stets offenes Ohr und seine lösungsorientierten Ratschläge danke ich ihm von Herzen.

Herzlichst möchte ich mich bei Frau Dr. Julia Schwaiger und Frau Dr. Hannah (Bayerisches Landesamt für Umwelt, Referat 73: Aquatische Ökotoxikologie, mikrobielle Ökologie, Wielenbach) für die Möglichkeit zu einer und bereichernden Kooperation im Rahmen spannenden dieses Dissertationsprojektes bedanken. Mein großer Dank gilt Dr. Julia Schwaiger für die Bereitstellung der in diesem Projekt untersuchten Regenbogenforellen, die allzeit große Unterstützung und den bereichernden fachlichen Austausch. Dr. Hannah Schrader danke ich besonders für ihre praktische Einweisung in Forellenhandling und die Forellensektion, die Zurverfügungstellung ihres breiten Wissens bezüglich der Prozessierung und histopathologischen Untersuchung der Organ- und Gewebeproben von Fischen und ihre stets große Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Annette Feuchtinger und Herrn Prof. Dr. Axel Walch (Abteilung Analytische Pathologie, Helmholtz Zentrum München) möchte ich für Bereitstellung aller Ressourcen danken, die die Durchführung der Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie ermöglichten.

DANKSAGUNG

Ein riesiger Dank gilt meinen Mitdoktorandinnen am Institut für Tierpathologie Frau Natalie Theobalt, Frau Dr. Isabel Hofmann und Frau Alexandra Schubö für ihre Hilfsbereitschaft, die großartige Zusammenarbeit und den einzigartigen Zusammenhalt.

Großer Dank für die hervorragende technische Assistenz gilt Frau Lisa Pichl, Frau Doris Merl, Frau Nadschman Rahimi, Frau Heidrun Schöl, Frau Claudia Mair und Herrn Frank Bodenstaff (Institut für Tierpathologie, LMU München), Herrn Hans-Georg Hartmann und Herrn Christoph Feick (Bayerisches Landesamt für Umwelt, Wielenbach) und Frau Cristina Huebner Freitas, Frau Claudia-Mareike Pfluege, Frau Ulrike Buchholz und Frau Elenore Samson (Helmholtz Zentrum München).

Allen Mitarbeiter_innen des Instituts für Tierpathologie danke ich für die allgegenwärtige Unterstützung fachlicher, praktischer oder persönlicher Natur. Besonders dankbar bin ich für die zahlreichen Möglichkeiten, am Institutsalltag teilzuhaben und mich auf dem Fachgebiet der Tierpathologie weiterbilden zu können. Bei Frau Marjam O'Gorman möchte ich mich ganz besonders für ihre riesige Unterstützung, ihr offenes Ohr und die großartige Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten bedanken.

Dieses Dissertationsprojekt war nur dank der großzügigen Unterstützung der Begabtenförderung der Hanns-Seidel-Stiftung e.V., unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Niedermeier und Frau PD Dr. Jutta Möhringer als seine Nachfolgerin, möglich. Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung und die ideelle Förderung, welche mir neue Blickwinkel und zahlreiche wertvolle Eindrücke ermöglichte. Herrn Dr. Andreas Burtscheidt danke ich herzlich für seine Unterstützung und die Organisation der bereichernden Seminarveranstaltungen im Rahmen der Promotionsförderung. Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Straubinger (Dekan der Tierärztlichen Fakultät, LMU München) für seine wertvolle Tätigkeit als Vertrauensdozent danken.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt zuletzt meiner Augsburger, Münchner und Berliner Familie. Mit eurer Liebe und Unterstützung wart und seid ihr die bestmögliche Begleitung, die ein Mensch sich nur wünschen kann.