

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vliv selenu na lymfatický systém králíků

Ing. Roman Konečný

2012

Školitel:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Školitel specialista:

prof. MVDr. František Jelínek, CSc. Dipl. ECVP

Veterinární histopatologická laboratoř Praha

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....
Ing. Roman Konečný

V Českých Budějovicích dne.....

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1	Imunitní systém králíka	12
2.1.1	Thymus	13
2.1.2	Apendix	15
2.1.3	Sacculus rotundus	17
2.1.4	Mízní uzliny.....	17
2.1.5	Slezina	19
2.1.6	Lymfatická tkáň sliznic	23
2.1.6.1	Lymfatická tkáň gastrointestinálního traktu (GALT)	23
2.1.6.2	Lymfatická tkáň dutiny nosní (NALT)	24
2.1.6.3	Mandle.....	24
2.1.6.4	Lymfatická tkáň bronchů (BALT)	25
2.2	Selen a jeho biologické vlastnosti	26
2.2.1	Selen	26
2.2.2	Absorpce a metabolismus selenu	26
2.2.3	Exkrece selenu	28
2.2.4	Selenoproteiny	28
2.2.5	Selen a imunitní systém.....	34
2.2.5.1	Vliv selenu na funkci fagocytů.....	34
2.2.5.2	Vliv selenu na lymfocyty, NK buňky a LAK buňky.....	34
2.2.5.3	Vliv selenu na lymfatické orgány.....	35
2.2.5.4	Vliv selenu na produkci protilátek	36
2.2.5.5	Vztah selenu k zánětlivému procesu	36
2.2.5.6	Vliv selenu na metabolity kyseliny arachidonové.....	36
2.2.5.7	Vztah selenu k neoplastickým procesům	37
3	CÍL PRÁCE.....	38
4	MATERIÁL A METODY	39
4.1	Experimenty	39
4.2	Odběr krve	39
4.3	Zjišťování živé hmotnosti zvířat.....	39
4.4	Pokusná zvířata a ustájení	39
4.5	Výživa experimentálních zvířat.....	40

4.6	Ukončení pokusu a odběr vzorků k histologickému a imunohistochemickému vyšetření.....	40
4.7	Metody zpracování vzorků biologického materiálu	41
4.7.1	Stanovení koncentrace selenu v krvi	41
4.7.2	Určení celkového počtu leukocytů	41
4.7.3	Určení fagocytární aktivity neutrofilů	41
4.7.4	Vyhodnocení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek	41
4.7.5	Vyhodnocení hmotnosti sleziny	41
4.7.6	Histologické a imunohistochemické vyšetření vzorků.....	42
4.7.6.1	Fixace	42
4.7.6.2	Vlastní histologické zpracování tkání	42
4.7.6.3	Postup použitých barvicích metod	43
4.7.6.4	Imunohistochemické zpracování vzorků.....	44
4.7.6.5	Metody hodnocení histologických nálezů.....	46
4.8	Statistické zpracování dat	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
5.1	Živá hmotnost pokusných zvířat	47
5.2	Koncentrace selenu v krevním séru.....	49
5.3	Histologické nálezy v lymfatických orgánech.....	51
5.3.1	Histologické nálezy v mízních uzlinách.....	51
5.3.1.1	Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách.....	51
5.3.1.2	Histologické nálezy v popliteálních mízních uzlinách.....	55
5.3.1.3	Histologické nálezy v mezenterálních mízních uzlinách	59
5.3.2	Histologické nálezy v Peyerových placích	64
5.3.3	Histologické nálezy v apendixu.....	68
5.3.4	Histologické nálezy ve slezině	72
5.3.5	Histologické nálezy v thymu	77
5.4	Imunohistochemické vyšetření	79
5.4.1	Průkaz CD79 v mízních uzlinách	79
5.4.1.1	Průkaz CD79 v krčních mízních uzlinách.....	79
5.4.1.2	Průkaz CD79 v popliteálních mízních uzlinách.....	80
5.4.2	Průkaz CD79 v Peyerových placích	82
5.4.3	Průkaz CD79 v apendixu.....	82
5.4.4	Průkaz CD79 ve slezině.....	83
5.5	Relativní hmotnost sleziny pokusných králíků.....	85

5.6	Počet leukocytů v krvi	87
5.7	Počet lymfocytů a neutrofilů v krvi.....	89
5.8	Fagocytární aktivita	93
6	SOUHRN A ZÁVĚR	95
7	OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	99
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	117
9	SEZNAM TABULEK.....	134
10	SEZNAM GRAFŮ	136
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	137
12	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	140

ABSTRACT

The present work deals with the effects of organic and inorganic forms of selenium (Se) on lymphatic tissue and organs. Two nine-week experiments were carried out, involving a total of 36 rabbits (three groups of six rabbits per experiment). The animals were supplemented with an inorganic form of selenium as sodium selenite (Na_2SeO_3) in dosages of 0, 0.15 and 9 mg of Se per kg of food (dry matter basis) in the first experiment, and the organic form of Se as selenised algae (*Chlorella*) in dosages of 0.15, 0.3 and 4.3 mg of Se per kg of food (dry matter basis) in the second trial. During the experiment, blood samples were collected on a periodical basis (periods of 0, 4 and 9 weeks) to determine the selenium level in serum, as well as to establish blood immunity parameters. At the end of the experiment, the animals were put down, dissected and sampled for lymphatic organs and tissues for histological and immunohistochemical examination. The samples were processed by standard histological techniques and stained with haematoxylin and eosine.

None of the experiments showed clinical symptoms associated with a deficiency of selenium, or, on the contrary, toxic effects of the same. Macroscopically, we have not seen any pathological changes to internal organs. A clear influence of Se on the monitored parameters of the immune system of rabbits was not shown, more specifically in the histological structure of the thymus, surface and mesenteric lymph nodes, Peyer's patches, appendix and spleen, the representation of CD79^+ cells in the lymphatic organs, the numbers and percentage of the respective types of leukocytes and the phagocytic activity of neutrophils. The activity did not show the effect of selenium on growth intensity in rabbits, while a statistically significant increase in the Se concentration in serum ($P < 0.05$) was only recorded in week 4 of both experiments.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP	apendix
APM	antigen prezentující makrofágy
BALT	lymfatická tkáň bronchů (<i>bronchus associated lymphoid tissue</i>)
BF	burza Fabrici
CD	diferenciační antigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CD4	pomocné T lymfocyty
CD8	cytotoxické T lymfocyty
CD40	antigen prezentující buňky
Cys	cystein
ČP	červená pulpa sleziny
ER	endoplazmatické retikulum
FAE	epitel asociovaný s folikuly (<i>follicule associated epithelium</i>)
GALT	lymfatická tkáň střeva (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GC	germinativní centra
GI	gastrointestinální trakt
GPx4	glutathion peroxidáza 4
HEV	postkapilární venuly s vysokým endotelem (<i>high endothelial venules</i>)
ID	jodthyronin dejodázy
IFO	interfolikulární oblast
IL2	interleukin 2
IL2R	interleukin 2 receptor
LAK buňky	buňky - zabíječi aktivované lymfokinem (<i>lymphokine activated killers</i>)
LN	lymfocytární noduly
LTB₄	leukotrien B ₄
MALT	lymfatická tkáň asociovaná se sliznicemi (<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>)
Met	methionin
MFP	makrofágy fagocytující pigment
NALT	lymfatická tkáň nosní sliznice (<i>nasal associated lymphoid tissue</i>)
NFκB	nukleární faktor kappa B
NK buňky	přirození zabíječi (<i>natural killers cells</i>)
NOS	syntázy oxidu dusnatého
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
PALP	periarteriální lymfatické pláště

PP	Peyerovy plaky
RON	reaktivní metabolity oxidu dusnatého
ROS	reaktivní metabolity kyslíku
SR	sacculus rotundus
SeCys	selenocystein
SECIS	specifická struktura mRNA (<i>selenocystein inserting structure</i>)
SeMet	selenomethionin
SPS2	selenofosfát syntáza 2
TBM	makrofágy fagocytující apoptická tělíska (<i>tingible body macrophages</i>)
Th1	subpopulace pomocných T lymfocytů
Th2	subpopulace pomocných T lymfocytů
TrxR1	thioredoxin reduktáza 1
TrxR2	thioredoxin reduktáza 2
TrxRS	thioredoxin reduktázy
UGA	uracil-guanosin-adenosin
12-HPETE	kyselina 12-hydroper-oxyeikosatetraenová

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval školiteli **prof. Ing. Janu Trávníčkovi, CSc.** nejen za odborné vedení a cenné rady při zpracování disertační práce, **prof. MVDr. Františkovi Jelínkovi, CSc. Dipl. ECVP** za četné konzultace a zasvěcení do histologie a imunohistochemie, **Ing. Martině Staňkové** a **Jitce Richterové** za pomoc při hematologickém zpracování vzorků a děkanovi Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích **prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc.** za vstřícnost a pochopení.

Rovněž bych chtěl poděkovat paní **Pavle Vandasové, Lucii a Petrovi** za pracovní i osobní podporu a drahým rodičům, Zuzaně a dceři Ladě, bratrovi Tomášovi a jeho rodině za podporu a trpělivost.

1 ÚVOD

Selen (Se) se řadí mezi esenciální stopové prvky ve výživě zvířat. O jeho nezbytnosti svědčí skutečnost, že je jediným mikroelementem využívaným organismem na základě genetické informace (Kvíčala, 2003). Prostřednictvím selenoproteinů a dalších metabolitů zasahuje selen do celé řady procesů v organismu, včetně imunitních reakcí. Tento fakt prokázala řada vědeckých studií provedených na hospodářských a laboratorních zvířatech. Pozitivní vliv selenu byl sledován nejen při suplementaci doporučenými dávkami, ale také při dávkách supranutričních. Při nadstandardních dávkách selenu je však od určitých hodnot vysoké riziko toxicity tohoto prvku.

Imunitní systém se skládá jednak z integrovaných struktur v podobě lymfatických orgánů a tkání, jednak z volných buněk, které se podílejí na imunitních reakcích. Dosavadní poznatky o vlivu selenu na stavbu lymfatických orgánů jsou však torzovité. Práce zabývající se tímto problémem byly prováděny zejména na kuřatech. Jak při vysokých, tak i při nízkých dávkách selenu byla pozorována atrofie thymu, Fabriciovy burzy a sleziny (Peng et al., 2009, 2011a, 2011b, 2011c, 2012).

Tato práce usiluje o rozšíření poznatků o vlivu dávky a formy selenu na strukturu lymfatických orgánů a dalších parametrů souvisejících s imunitním systémem u králíků. Práce vychází z předpokladu obdobného efektu vysokých a nízkých dávek selenu prokazaného u jiných hospodářských zvířat (Peng et al., 2009, 2011a, 2011b, 2011c, 2012).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Imunitní systém králíka

Imunitní systém se společně s nervovou a endokrinní soustavou podílí na zajištění integrity organismu a na udržení jeho funkcí ve fyziologických mezích (Jelínek a Jelínek, 2002). Mechanizmy, kterými imunitní systém zajišťuje ochranu organismu proti invazi a poškození ze strany mikroorganismů, cizorodých látek a transformovaných buněk, lze rozdělit do dvou základních, vzájemně komunikujících kategorií: na nespecifické a na antigenně specifické (Junqueira et al., 1999; Hořejší a Bartůňková, 2005; Ross a Pawlina, 2006).

Nespecifické (vrozené, neadaptivní) imunitní mechanizmy jsou prvním a jednoduchým systémem obrany organismu, který nevyžaduje předchozí setkání s antigenem (Kindt et al., 2007). Tento systém je evolučně starší a nemá imunologickou paměť. Nespecifické imunitní mechanizmy tvoří anatomické (kůže, sliznice) a fyzikální bariéry (teplota, nízké pH), chemické mediátory (komplementový systém, interferony, lektiny) a v neposlední řadě buňky (neutrofilny, makrofágy, NK buňky) (Hořejší a Bartůňková, 2005; Kierszenbaum, 2007; Kindt et al., 2007; Toman, 2009).

Specifické (získané, adaptivní) imunitní mechanizmy jsou evolučně mladší a charakterizují je: antigenní specifita, diverzita, imunologická paměť a schopnost rozpoznat vlastní a cizí (Kindt et al., 2007). Mezi tyto mechanizmy řadíme humorální (založenou na protilátkách) a buněčně zprostředkovanou imunitu (založenou na T lymfocytech) (Hořejší a Bartůňková, 2005; Kierszenbaum, 2007; Kindt et al., 2007).

Imunitní systém sestává z buněk formovaných ve specializované lymfatické orgány, a dále z jednotlivých molekul a buněk rozptýlených v různých tkáních celého organismu (Toman, 2009).

Z funkčního hlediska se lymfatické orgány dělí na primární a sekundární (Kindt et al., 2007).

Primární lymfatické orgány jsou místem vzniku, diferenciaci a maturace imunokompetentních buněk (Hořejší a Bartůňková, 2005). U králíků mezi ně řadíme:

- kostní dřev
- thymus
- apendix
- Peyerovy plaky
- sacculus rotundus

Sekundární lymfatické orgány jsou místem, kde probíhají hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí (Hořejší a Bartůňková, 2005). U králíků k nim patří:

- lymfatické uzliny
- slezina
- apendix
- Peyerovy plaky
- sacculus rotundus

2.1.1 Thymus

Thymus je místem, kde progenitory T lymfocytů prodělávají proliferaci, diferenciaci a maturaci, která vede k produkci funkčního T buněčného repertoáru. Největšího rozvoje dosahuje thymus do období puberty, poté následuje involuce (Tichý et al., 2004). Thymus králíků dosahuje největší absolutní váhy od 4. do 5. měsíce věku (Blin, 1973). Involuce thymu je charakterizována postupnou deplecí lymfocytů (obzvláště v kůře), zvětšením počtu epiteloretikulárních buněk a invazí parenchymu adipocyty. U dospělých zvířat pak thymus představuje pouze úzký pruh lymfocytů, v němž převládají epiteloretikulární buňky, obklopený tukovou tkání (Eurell et al., 2006).

Thymus je plochý, laločnatý orgán (Kindt et al., 2007) šedorůžové (žltorůžové) barvy, tuhé konzistence (Jelínek a Jelínek, 2002), uložený v mediastinu, kraniálně před velkými cévami srdce (Haley, 2003).

V porovnání s ostatními lymfatickými orgány, které se v embryonálním vývoji zakládají výlučně z mezenchymu, má thymus dvojí embryonální původ. Lymfocyty thymu jsou odvozeny z mezenchymových buněk pronikajících endodermovým epitelovým základem, jenž vzniká ze třetí a čtvrté faryngální výchlipky (Junqueira et al., 1999).

Na povrchu thymu se nachází tenké vazivové pouzdro, složené z vnitřní a vnější vrstvy, sestávající z kolagenních a retikulárních vláken, mezi nimiž se příležitostně nacházejí shluky lymfocytů. Z vnitřní vrstvy pouzdra odstupují do parenchymu orgánu vazivová septa (Pearse, 2006) dělicí orgán na jednotlivé, v hloubce neúplně oddělené lalůčky (lobuly) (Tichý et al., 2004). Každý z lobulů je složen z periferní tmavé zóny - kůry a z centrální světlé zóny - dřeně (Junqueira et al., 1999).

Vlastní parenchym thymu představuje nosné stroma z epiteloretikulárních buněk (Banks, 1993) a dále volné buňky (Tichý et al., 2004). Epiteloretikulární buňky se dělí do různých populací, které se liší expresí antigenů, ultrastrukturou (De Waal et al., 1997)

a schopností syntetizovat thymické hormony (thymolin, $\alpha 1$ thymosin, $\beta 4$ thymosin, thymopoetin a thymový humorální faktor) (Pearse, 2006). Imunohistochemicky lze tyto buňky rozdělit do čtyř rozdílných subtypů: subkapsulární kortikální, vnitřní kortikální, medulární a Hassalova tělíska (Pearse, 2006).

Jak již bylo zmíněno, parenchym lobulů thymu je rozlišen na kůru (a) a dřeň (b)

a. Kůra thymu

Kůra thymu se skládá z epiteloretikulárních buněk, objemné populace T lymfocytů, malého množství makrofágů a velkých lymfocytů (Junqueira et al., 1999).

Epiteloretikulární buňky jsou hvězdicovité elementy s velkými, světle se barvícími oválnými jádry a dlouhými rozvětvenými cytoplazmatickými výběžky, které obsahují četná intermediární filamenta (Junqueira et al., 1999; Eurell et al., 2006). Tímto uspořádáním výběžků připomínají astrocyty CNS (Samuelson, 2007). Jednotlivé buňky se vzájemně spojují pomocí desmozomů, čímž vzniká cytoretikulum - buněčná síť (Samuelson, 2007). Další epiteloretikulární buňky pak vytvářejí kontinuální vrstvu, oddělující kůru od stromálních elementů, včetně vazivových sept a krevních cév. Podobné buňky oddělují i kůru od dřeně (Samuelson, 2007).

V kůře můžeme pozorovat různá vývojová stádia lymfocytů. V subkapsulární oblasti se nachází velké mitoticky aktivní lymfoblasty (Pearse, 2006). Směrem od vnější kůry ke kortikomedulární junkci se nachází malé, méně mitoticky aktivní buňky (Pearse, 2006). V subkapsulárním regionu a hluboké kůře podléhá většina (95 - 99 %) lymfocytů apoptóze a apoptické buňky jsou následně fagocytovány makrofágy (*tingible body macrophages* - TBM) (Pearse, 2006). Eurell et al. (2006) popisují častý výskyt těchto makrofágů v blízkosti dřeně thymu.

Oblast kortikomedulární junkce je charakterizována hojnými krevními cévami (převládají arterioly) s malým množstvím perivaskulárního vaziva, zralými a nezralými T lymfocyty, dendritickými buňkami, různým počtem perivaskulárních B lymfocytů a plazmatických buněk. S přibývajícím věkem se zvyšuje počet B lymfocytů a plazmatických buněk (Pearse, 2006).

b. Dřeň thymu

Dřeň jednotlivých lobulů splývá ve složitý strom představující centrální, světlou oblast thymu (Novotný et al., 1966). Lymfocyty dřeně jsou větší než jejich kortikální prekurzory a jejich jádro je více vezikulární s výraznými jádérky (Maxie a Jubb, 2007). Většina epiteloretikulárních buněk dřeně vykazuje obdobnou ultrastrukturu jako epiteloretikulární buňky kůry, jiné jsou větší a jejich epitelový původ je více patrný (Eurell et al., 2006).

Pro dřeň thymu jsou typické přibližně kulovité až nepravidelně sférické útvary, tzv. Hassalova tělíska (Novotný et al., 1966). Hassalova tělíska tvoří jedna či více kalcifikovaných nebo degenerovaných velkých centrálních buněk, které jsou obklopeny koncentricky se skládajícími plochými keratizovanými buňkami (Eurell et al., 2006). Buňky Hassalova tělíska jsou spojeny desmozomy a obsahují svazky intermediárních filament (Eurell et al., 2006). Přesná funkce Hassalových tělísek dosud nebyla objasněna (Junqueira et al., 1999).

Dalšími buňkami dřeně jsou dendritické buňky, makrofágy, B lymfocyty, neuroendokrinní buňky, mastocyty a eozinofilní granulocyty (Pearse, 2006).

2.1.2 Apendix

Apendix (AP) králíka je důležitým místem, kde nezralé IgM⁺ B lymfocyty podstupují další diverzifikaci Ig repertoáru (Mage et al., 2006) prostřednictvím somatické hypermutace a genové konverze. Tyto procesy jsou ovlivněny vnějšími antigeny a superantigeny střevní mikroflóry (zejména *Bacteroides spp.* a *Bacillus spp.*) (Becker a Knight, 1990; Weinstein et al., 1994a; Weinstein et al., 1994b; Pospisil a Mage, 1998; Vajdy et al., 1998). Od 9. týdne života až do dospělosti AP králíka prodělává morfologické změny a změny v distribuci B a T lymfocytů (Mage, 1998). Tyto změny korespondují se změnou funkce AP (Weinstein et al., 1994b).

Nezbytnost AP u králíků prokázali Dasso a Howell (1997), kdy po neonatální apendektomii došlo ke snížení hladiny intestinálních IgA, IgM, IgG a téměř ke ztrátě intestinální antigenně specifické odpovědi a redukci plazmatických buněk produkujících IgA.

AP králíka představuje slepě končící výběžek válcovitého tvaru, který odstupuje od hrotu slepého střeva. Délka AP se pohybuje v rozmezí od 7 do 10 cm, průměrná tloušťka

stěny je 3,2 mm, průměrná váha 6,9 g (Enticknap, 1953). AP tvoří přibližně polovinu z celkové gastrointestinální lymfatické tkáně (GALT) králíka (Percy et al., 1968).

Stavba stěny je podobná jiným úsekům tlustého střeva, s převahou lymfatické tkáně, která poskytuje orgánu i typický vzhled (žlutohnědou barvu a výraznou tloušťku stěny) (Percy a Barthold, 2007). Světlost AP je srovnatelná s tenkým střevem (Bockman, 1983).

Ve sliznici se nacházejí Lieberkühnovy krypty (Vacek, 1986). Klky apendixu mají specifický tvar (houbovitý vzhled), který je unikátní pro AP a sacculus rotundus (Mage, 1998). V epitelu sliznice převládají pohárkové buňky (Vacek, 1986). Oblast nad lymfatickými noduly (LN) je kryta specializovaným epitelem – epitel asociovaný s folikuly (*follicule associated epithelium*, FAE), někdy též označovaný jako epitel dómu (Neutra, 1998; Beyaz a Asti, 2004; Magalhaes et al., 2007; Shaykhiev a Bals, 2007).

FAE je tvořen početnými membranózními (M) buňkami, enterocyty, výjimečně pohárkovými a enteroendokrinními buňkami, méně makrofágy a plazmatickými buňkami (Bockman, 1983; Cesta, 2006a; Newberry, 2008).

M buňky jsou důležitým induktorem imunitní odpovědi a diferenciací B buněčného repertoáru. Přes svou tenkou cytoplazmu transportují z lumen apendixu makromolekuly a bakterie a prezentují je lymfatickým buňkám (Bockman, 1983; Neutra, 1998; Hathaway a Kraehenbuhl, 2000; Kucharzik et al., 2000), které vytvářejí bazolaterální invaginace v jejich buněčné stěně.

Lamina propria mucosae apendixu obsahuje četné velké LN prorážející přes slabou, špatně vyvinutou *lamina muscularis mucosae* do *tela submucosa* (Klika, 1986).

Základnu každého LN tvoří bazální LN s germinálním centrem (GC), apikálně odstupuje korona a dóm. Bazální noduly od sebe dělí tenká vazivová trabekula (Waksman et al., 1973). GC velmi připomínají folikulární strukturu Fabriciovy burzy ptáků a Peyerových plaků ilea ovcí (Reynolds a Morris, 1983).

V LN apendixu (především v bazálním LN a dómu) převládají B lymfocyty, jsou zde také četně zastoupeny makrofágy (Bockman, 1983). T lymfocyty v AP tvoří přibližně 7 - 40 % z celkového počtu lymfocytů (Hanoka et al., 1977; Bast et al., 1979).

Četnost T lymfocytů v LN se v průběhu života mění. V GC jsou přítomny již od samého vzniku. Týden po narození je populace CD4⁺ T lymfocytů a v menší míře též CD8⁺ T lymfocytů zastoupena více v dómu a koruně. Později dochází (na rozdíl od oblasti dómu korony) k výraznému zvyšování počtu CD4⁺ T lymfocytů v bazálním LN (Mage,

1998). Také množství CD8⁺ T lymfocytů s věkem přibývá. V dospělosti jsou početnější v oblasti dómu a korony a v interfolikulární oblasti (Mage, 1998; Dasso et al., 2000).

2.1.3 *Sacculus rotundus*

Unikátním orgánem králíků je makroskopicky patrné, silnostěnné rozšíření terminální části ilea, tzv. *sacculus rotundus* (SR), známý též jako *ampulla ilei* nebo ileocekální tonzila (Besoluk et al., 2006). Tento orgán plní zpočátku funkci primárního lymfatického orgánu, v němž progenitory B lymfocytů proliferují, diverzifikují své V(D)J geny prostřednictvím genové konverze (Becker a Knight, 1990; Weinstein et al., 1994a) a somatickou hyperbodovou mutací (Pospisil et al., 1995; Lanning a Knight, 1997). Později podléhá SR podobně jako AP morfologickým změnám (Mage, 1998) a stává se z něho sekundární lymfatický orgán (Wu a Chen, 2007).

Na povrchu má SR světle růžovou barvu, jsou zde makroskopicky patrné polygonální arény (LF jsou velmi blízko *tunica serosa*) a na vnitřní straně nepravidelné projekce (Besoluk et al., 2006).

Jak uvádí Snipes (1978), oproti ileu se SR vyznačuje typickými klky, velkým množstvím krypt a agregovaných LN, silnější stěnou, širším lumen a nevýraznou svalovou vrstvou. Ventrální stěna je tenká s agregovanou lymfatickou tkání, dorzální je velmi silná a lymfatické struktury jsou zde roztroušeny (Alboghobeish a Zabiehy, 1996).

2.1.4 Mízní uzliny

Mízní uzliny jsou různě velké orgány lymforetikulární tkáně, oválného, fazolovitého nebo nepravidelného tvaru vložené do průběhu mízních cév (Novotný et al., 1966). Mízní uzliny vytvářejí v organismu série za sebou propojených filtrů, které hrají zásadní roli v obraně proti mikrobům a rozsevu nádorových buněk (Junqueira et al., 1999).

Velikost mízních uzlin může být v řádu milimetrů až několika centimetrů (Banks, 1993). Mízní uzliny mají část konvexní a na opačné straně jsou opatřeny vkleslinou (hilus), kterou do orgánu vstupují artérie, nervy a opouští jež vény (Junqueira et al., 1999). Na povrchu a na řezu mají šedou, šedobílou, růžovou nebo načervenalou barvu (Novotný et al., 1966).

Mízní uzliny jsou uzavřeny do poměrně silného vazivového pouzdra (Novotný et al., 1966), jehož základem je kolagenní vazivo s obsahem elastinových vláken (Tichý et al., 2004). Z vazivového pouzdra odstupují do nitra orgánu vazivová septa, jejichž

tloušťka závisí na velikosti mízní uzliny. V oblasti hilu se vazivové pouzdro zesiluje a směrem do dřene mízní uzliny se rozpadá ve stroma hilu tvořené spleť vazivových trámů (Novotný et al., 1966).

Vlastní parenchym mízní uzliny sestává z kůry (tzv. superficiální kůra) (a), parakortikální oblasti (b) a ze dřene (c) (Tichý et al., 2004; Kierszenbaum, 2007).

a. Kůra mízní uzliny

Vnější kůra se skládá z primárních a sekundárních LN vzájemně oddělených difúzní lymfatickou tkání (Eurell et al., 2006; Willard-Mack, 2006; Samuelson, 2007). LN jsou kulovité nebo ovoidní útvary (Novotný et al., 1966). Primární LN se skládají převážně z malých lymfocytů s nepravidelným jádrem, kondenzovaným chromatinem a nepatrnou cytoplazmou (Mills, 2007). Podkladem LN je síťovina retikulárního vaziva z retikulárních buněk a vláken (Novotný et al., 1966). Po antigenní stimulaci se z primárního LN stává sekundární LN se světlým GC.

GC vykazují specifickou polaritu ke zdroji antigenu (Maxie a Jubb, 2007). V GC lze rozlišit tři zóny: světlou, tmavou a plášťovou (Eurell et al., 2006). Strukturu a tvar GC tvoří vzájemně spojené diferencované folikulární dendritické buňky, které na svém povrchu zachytávají pomocí komplementového nebo Fc receptoru imunokomplexy a prezentují je B a T buňkám (Wright et al., 2006; Mills, 2007). Tmavou zónu GC tvoří blastické buňky s velkým vezikulárním jádrem, několika malými, zřetelnými nukleoly a pruhem bazofilní cytoplazmy (Mills, 2007). Menší buňky s kondenzovaným chromatinem a nevelkým množstvím cytoplazmy tvoří řidčeji osídlenou světlou zónu. Buňky světlé zóny jsou téměř nerozeznatelné od buněk periferní plášťové zóny (Mills, 2007). V GC můžeme také pozorovat makrofágy, plazmatické buňky, imunoblasty a T lymfocyty (Wright et al., 2006; Mills, 2007).

b. Parakortikální oblast

Pod superficiální kůrou se rozprostírá parakortex (Ross a Pawlina, 2006). Pro tuto oblast jsou typické postkapilární venuly s vysokým endotelem (*high endothelial venules* - HEV), interdigitující dendritické buňky (Mills, 2007) a T lymfocyty (Kierszenbaum, 2007). Hlavním místem migrace lymfocytů do mízní uzliny jsou HEV (Young et al., 2006), které jsou vystlány kubickými až cylindrickými endoteliálními buňkami s poměrně velkými oválnými jádry, vezikulárním chromatinem a s nejasnými nukleoly (Mills, 2007).

V parakortexu jsou četnější malé T lymfocyty ($CD4^+$ nebo $CD8^+$) (Mills, 2007), pomocné T lymfocyty převládají (Kierszenbaum, 2007). V závislosti na reaktivním stavu mízní uzliny se mohou v různém zastoupení vyskytovat T nebo B lymfoblasty (Wright et al., 2006).

c. Dřeň mízní uzliny

Dřeň vyplňuje centrální oblast mízní uzliny (Tichý et al., 2004; Ross a Pawlina, 2006). Lymfatická tkáň odstupuje z parakortexu v podobě medulárních provazců, které se v průběhu dřeně větví a anastomozují. Medulární provazce jsou od sebe odděleny sítí medulárních sinusů a vazivovými trámci (Eurell et al., 2006). Dřeňové provazce sestávají z retikulárních buněk, retikulárních vláken, B lymfocytů, makrofágů a plazmatických buněk (Ross a Pawlina, 2006; Mills, 2007; Samuelson, 2007).

Mízní uzlina je prostoupena systémem vzájemně na sebe navazujících štěrbin - sinusů. Aferentní lymfatické cévy na různých místech mízní uzliny vstoupí do subkapsulárního sinusů mezi vazivovým pouzdrém a superficiální kůrou mízní uzliny (Novotný et al., 1966; Junqueira et al., 1999; Eurell et al., 2006). Subkapsulární sinus je propojen se sinusy dřeně prostřednictvím intermediárních (trabekulárních) sinusů paralelně probíhajících s vazivovými trabekuly pouzdra (Junqueira et al., 1999; Ross a Pawlina, 2006). Medulární sinusy představují síť větvících se a anastomozujících kanálků sbíhajících se směrem k hilu, kde vstupují do eferentních lymfatických cév (Eurell et al., 2006). Tyto poté procházejí vazivovým pouzdrém a opouštějí mízní uzlinu v oblasti hilu (Novotný et al., 1966). Vlastní stěnu sinusů tvoří ploché endotel-like retikulární buňky, které vytvářejí souvislou výstelku v proximální části sinusů v blízkosti pouzdra a vazivových trámců. U parenchymu již výstelka není souvislá. Lumina sinusů jsou prostoupena hustou sítí retikulárních buněk spojených prostřednictvím tenkých výběžků se stěnou sinusů. Makrofágy, lymfocyty a dendritické buňky leží volně v lumen sinusů (Eurell et al., 2006).

2.1.5 Slezina

Slezina představuje největší sekundární lymfatický orgán v těle (Eurell et al., 2006; Kierszenbaum, 2007; McGavin a Zachary, 2007; Toman, 2009), který je vložen do krevního oběhu, obdobně jako mízní uzliny do průběhu cirkulace lymfy (Novotný et al., 1966; Tichý et al., 2004).

Úkolem sleziny je zachycení antigenů z krevního oběhu, zajištění systémové imunitní odpovědi (Toman, 2009), destrukce starých nebo poškozených erytrocytů

a metabolismus hemoglobinu a železa (Banks, 1993). Slezina je také místem produkce lymfocytů (Jelínek a Jelínek, 2002) a u některých druhů hospodářských zvířat slouží i jako depozitum krve (McGavin a Zachary, 2007).

Slezina je uložena v dutině břišní, v levém podžebří a duplikaturou pobřišnice je připojena k velkému zakřivení žaludku (Jelínek a Jelínek, 2002). Tvar a velikost sleziny je mezi domácími zvířaty značně variabilní. Obecně je to plochý, podlouhlý orgán (McGavin a Zachary, 2007). Na příčném řezu má přibližně trojúhelníkový tvar a tmavě červené až modročerné zbarvení (Cesta, 2006b).

Na povrchu slezina je kryta poměrně silným vazivovým pouzdrem (Klika, 1986; Cesta, 2006b; Ross a Pawlina, 2006; Kierszenbaum, 2007; McGavin a Zachary, 2007; Samuelson, 2007), které se skládá z křížících se lamelózně uspořádaných kolagenních vláken s příměsí vláken elastických (Novotný et al., 1966; Tichý et al., 2004). U některých zvířat, zejména v hloubce pouzdra, lze objevit buňky hladké svaloviny (Novotný et al., 1966; Tichý et al., 2004). Z vazivového pouzdra do nitra orgánu odstupují vazivové trámce (Cesta, 2006b; Kierszenbaum, 2007; McGavin a Zachary, 2007; Samuelson, 2007), které člení tkáň sleziny v neúplné oddíly (Junqueira et al., 1999; Jelínek a Jelínek, 2002). Vazivové trámce sleziny králíků nejsou tak četné jako například u přežvýkavců. Ve vazivových trámcích probíhají arterie, vény, lymfatické cévy a nervy (Junqueira a Carneiro, 2005; Eurell et al., 2006; Ross a Pawlina, 2006).

Na rozdíl od jiných lymfatických orgánů není parenchym sleziny organizován v kůru a dřev (Kierszenbaum, 2007; McGavin a Zachary, 2007). Parenchym tvoří dvě strukturálně a funkčně odlišné jednotky - červená pulpa (a) a bílá pulpa (b) (Elmore, 2006a; Eurell et al., 2006; Kierszenbaum, 2007; McGavin a Zachary, 2007; Samuelson, 2007). Na čerstvém nebo fixovaném řezu je možné tyto kompartmenty rozlišit pouhým okem (Junqueira et al., 1999; Jelínek a Jelínek, 2002).

a. Bílá pulpa

Bílá pulpa je tvořena lymfatickou tkání (Novotný et al., 1966; Belko, 1992; Junqueira et al., 1999; Jelínek a Jelínek, 2002; Junqueira a Carneiro, 2005; Eurell et al., 2006), která se skládá z periarteriolárních lymfatických plášťů (PALP), LN (Belko, 1992) a marginální zóny (Cesta, 2006b). U králíků bílá pulpa představuje 35 % z celkové hmoty sleziny (Novotný et al., 1966), proto se v některých publikacích setkáváme s řazením králíků do skupiny zvířat s obranným typem sleziny (Banks, 1993).

Periarteriolární lymfatické pláště (PALP)

V místě, kde vystupují artérie z vazivových trámců, se kumulují lymfocyty a dávají základ PALP (Belko, 1992; Jelínek a Jelínek, 2002). Toto nahromadění se postupně zvětšuje, až vytvoří silnou vrstvu okolo centrální arterie (*arteria centralis*) (Belko, 1992). Nosným substrátem jsou koncentricky uspořádaná retikulární vlákna a ploché retikulární buňky (Satodate et al., 1986).

PALP se skládá z vnitřní a vnější části (Matsuno et al., 1989; Belko, 1992; Van Rees et al., 1996). Ve vnitřní části se nacházejí T lymfocyty (Belko, 1992), zejména $CD4^+$ (Kraus, 2003), menší počet $CD8^+$, interdigitující dendritické buňky a migrující B lymfocyty (Van Rees et al., 1996). Vnější část obsahuje malé a střední lymfocyty (B a T lymfocyty), makrofágy a po antigenní stimulaci také plazmatické buňky (Matsuno et al., 1989; Van Rees et al., 1996).

Lymfatické noduly (LN)

LN se nacházejí v průběhu PALP. Často se vyskytují při větvení centrálních arterií (Ward et al., 1999). Jsou tvořeny převážně B lymfocyty, méně folikulárními dendritickými buňkami, $CD4^+$ T lymfocyty. $CD8^+$ T lymfocyty se zde nevyskytují (Van Rees et al., 1996). Podobně jako u mízních uzlin vznikají po antigenní stimulaci v lymfatických nodulech GC.

Marginální zóna

Na rozhraní mezi červenou a bílou pulpou je lokalizována marginální zóna (Klika, 1986). Marginální zóna je nejčastěji definována jako oblast s charakteristickou buněčnou směsí lymfocytů (B lymfocyty jsou považovány za specifickou skupinu necirkulujících B lymfocytů (Van Rees et al., 1996)), erytrocytů, trombocytů, granulocytů a monocytů (Belko, 1992). Za základ hranice bílé pulpy a marginální zóny pokládá Belko (1992) průběh cirkumferentního retikula a vnější PALP. Od PALP a LN odděluje marginální zónu skupiny makrofágů „*metallophilic macrophages*“ a marginální sinus (Satodate et al., 1986; Mebius a Kraal, 2005). „*Metallophilic macrophages*“ marginální zóny jsou jedinou skupinou makrofágů na vnitřní straně marginální zóny sousedící s PALP a LN (Matsuno et al., 1989; Mebius a Kraal, 2005). Funkce těchto makrofágů není přesně známa (Mebius a Kraal, 2005). Na periferii těchto makrofágů se nachází systém anastomozujících kanálků - marginální sinus (Mebius a Kraal, 2005; Eurell et al., 2006). Do marginálního sinusu se vyprazdňují kapiláry bílé pulpy, ale také terminální kapiláry červené pulpy (Eurell et al.,

2006). Směrem od marginálního sinusu k červené pulpě se nachází poměrně silný prstenec tvořený retikulárními buňkami, makrofágy marginální zóny, dendritickými buňkami a středně velkými B lymfocyty (Mebius a Kraal, 2005). Poté marginální zóna plynule přechází do slezinných provazců červené pulpy (Eurell et al., 2006).

b. Červená pulpa

Červená pulpa tvoří podstatnou část celého orgánu (Novotný et al., 1966). Skládá se z trojrozměrné sítě slezinných (Billrothových) provazců a z venózních sinusů (Cesta, 2006b; Eurell et al., 2006).

Provazce červené pulpy (Billrothovy provazce)

Houbovitá tkáň Billrothových provazců je tvořena retikulárním vazivem, do něhož jsou kromě lymfocytů vloženy fixní a pohyblivé makrofágy, plazmatické buňky, erytrocyty, trombocyty, granulocyty a megakaryocyty (Novotný et al., 1966; Saito et al., 1988; Matsuno et al., 1989; Belko, 1992; Wilkins a Wright, 2000; Tichý et al., 2004; Mebius a Kraal, 2005; Eurell et al., 2006; Ross a Pawlina, 2006; Kierszenbaum, 2007; Samuelson, 2007). Na rozdíl od CD4⁺ T lymfocytů se CD8⁺ T lymfocyty v červené pulpě běžně vyskytují (Wilkins a Wright, 2000).

Venózní sinusy

Druhou složkou červené pulpy jsou venózní sinusy (Novotný et al., 1966). Venózní sinusy jsou nepravidelné, větvcí se a opět anastomozující štěrbinkovité prostory (Tichý et al., 2004). Jejich výstelku tvoří endotelové buňky, které mají protáhlý tvar ve směru dlouhé osy sinusů (Novotný et al., 1966; Klika, 1986; Junqueira et al., 1999; Eurell et al., 2006; Ross a Pawlina, 2006; Samuelson, 2007). Endotelové buňky spočívají na nesouvislé bazální membráně (Klika, 1986; Eurell et al., 2006; Ross a Pawlina, 2006). Zevně od endotelových buněk se nachází vrstva retikulárních vláken, která souvisejí s vlákny slezinných provazců a bílé pulpy (Novotný et al., 1966). Ve stěně sinusů probíhají cirkulárně a kříží se téměř kolmo s buňkami endotelu (Novotný et al., 1966; Junqueira et al., 1999; Eurell et al., 2006). Tato transverzální vlákna spolu s těmi, která jsou orientována podélně, vytvářejí celistvou síť obemykající buňky sinusů a makrofágy, jež zaujímají prostor mezi sousedními endotelovými buňkami (Junqueira et al., 1999).

2.1.6 Lymfatická tkáň sliznic

Slizniční imunitní systém tvoří sliznice dutiny ústní a nosní, dýchacího systému, trávicího a urogenitálního traktu a také sliznice oka, vnitřního ucha, vývodů exokrinních žláz včetně mléčné žlázy (Hořejší a Bartůňková, 2005). Morfologické a funkční zvláštnosti slizničních lymfatických tkání daly vzniknout souhrnnému pojmu, který zahrnuje tato specifika. Mluvíme proto tedy o lymfatické tkáni asociované se sliznicemi (*MALT-mucosa associated lymphoid tissue*) (Toman, 2009). MALT je pak dále označována podle anatomických lokalit: v nosní sliznici NALT (*nasal associated lymphoid tissue*), ve tkáni bronchů BALT (*bronchus associated lymphoid tissue*), ve střevní stěně GALT (*gut associated lymphoid tissue*) (Haley, 2003; Hořejší a Bartůňková, 2005; Cesta, 2006a). Hlavní funkcí MALT je antigenně specifická produkce a sekrece IgA, Th2 závislá imunitní reakce a tvorba imunologické tolerance (Gormley et al., 1998; Haschek et al., 2009). MALT tvoří organizovaná lymfatická tkáň (LN) a difúzně rozptýlené buňky (B a T lymfocyty, makrofágy, neutrofilů, eozinofilů a mastocytů (Hořejší a Bartůňková, 2005)) v epitelu nad bazální membránou, v lamina propria nebo v intersticiu (Bienenstock a Clancy, 2005). Organizovaná lymfatická tkáň je místem indukce imunitní reakce (Hořejší a Bartůňková, 2005; Cesta, 2006a; Toman, 2009), difúzní lymfatická tkáň je pak především efektorovou částí (Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.1.6.1 Lymfatická tkáň gastrointestinálního traktu (GALT)

Imunitní systém sliznice gastrointestinálního traktu (GI) zahrnuje solitární nebo agregované LN, intraepiteální lymfocyty, plazmatické buňky a makrofágy (Eurell et al., 2006).

Organizovaná lymfatická tkáň gastrointestinálního traktu je u králíků představována jednak Peyeroými plaky a dále výše popsanými lymfatickými orgány – appendix a sacculus rotundus (2.1.2; 2.1.3).

Peyerovy plaky

Peyerovy plaky (PP) jsou makroskopicky patrné oválné nebo protáhlé arény agregovaných LN (Junqueira a Carneiro, 2005) náhodně distribuované v mukóze a submukóze GI (Schuurman et al., 1994), orientované podél antimezenterické stěny střeva (Schuurman et al., 1994; Maxie a Jubb, 2007). Velikost, počet, distribuce a složení PP se může druhově nebo geneticky lišit (Cesta, 2006a). Počet PP se stává konstatní před nebo krátce po narození (Cornes, 1965). U králíků se počet PP pohybuje v rozmezí 2 - 10, každý

sestává ze 40-50 LN (Heel et al., 1997). Podobně jako v apendixu LN pokrývá FAE který sestává z enterocytů, mezi nimiž se nachází větší počet M buněk (u králíků 50 % (Haley, 2003)) (Toman, 2009), mononukleárů, nepatrně pohárkových buněk (Ermak a Owen, 1986) a shluky T lymfocytů (Faulk et al., 1969), B lymfocyty se v FAE nevyskytují (MacDonald, 2003). Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že M buňky se nachází v jamkách (Owen a Jones, 1974). FAE od bazálního LN odděluje dóm (Cesta, 2006a). Dóm sestává z lymfocytů, plazmatických, dendritických, centrocyte-like buněk a makrofágů (MacDonald, 2003). CD4⁺ T tvoří souvislou vrstvu pod FAE (Rouse et al., 1982). Po antigenní stimulaci jsou výrazným rysem PP germinální centra s centrocyty a centroblasty (Spencer et al., 1986). LN jsou vzájemně odděleny lymfatickými sinusy (Eurell et al., 2006) a zónou (interfolikulární) bohatou na T lymfocyty, mezi nimiž jsou diseminovány makrofágy a dendritické buňky (Ermak a Owen, 1986). Podobně jako je tomu u mízních uzlin v T dependentní oblasti Peyeroých plaků se nachází HEV, které umožňují recirkulaci lymfocytů (Eurell et al., 2006).

2.1.6.2 *Lymfatická tkáň dutiny nosní (NALT)*

U druhů s dobře vyvinutým BALT zpravidla nebývá úplný Waldeyerův okruh, avšak v dutině nosní, při ústí do hltanu sliznice chová bilaterální symetrickou agregovanou lymfatickou tkáň (Kuper et al., 1992). NALT mírně prominuje do dutiny nosní (Kraal, 2005). Strukturou se velice podobá PP (LN, dóm, interfolikulární oblast a FAE). Na rozdíl od PP, T a B buněčná oblast je přibližně stejné velikosti, intraepiteální lymfocyty jsou méně početné (Sminia a Kraal, 1999). Eferentní lymfatické cévy a HEV odstupují hluboko do interfolikulární oblasti k okraji LN (Sminia a Kraal, 1999; Bienenstock a McDermott, 2005).

Při porovnání s laboratorními hlodavci je NALT králíků rozsáhlejší. Největší zastoupení NALT u králíka je v oblasti 1 - 3,3 cm od hrotu nosu. NALT tvoří zejména pruh lymfatické tkáně na ventromediální straně a na spodu ventrálního nosního průchodu, a na laterální a dorsolaterální straně nosohltanového průchodu (Casteleyn et al., 2010).

2.1.6.3 *Mandle*

Mandle jsou solitérní nebo agregované LN obklopené difúzní lymfatickou tkání v *lamina propria mucosae* sliznice dutiny ústní, *isthmus faucium* a hltanu (Novotný et al., 1966; Bacha a Bacha, 2000; Tichý et al., 2004). Tonzily bývají někdy označovány jako lymfoepitelové orgány (Tichý et al., 2004). Na povrchu mandlí je epitel odpovídající

výstelce příslušné části dutiny ústní nebo hltanu (Novotný et al., 1966; Tichý et al., 2004). Epitel bývá silně prostoupen lymfocyty, neutrofilny a makrofágy (Novotný et al., 1966; Eurell et al., 2006). Povrch mandlí může být relativně hladký nebo může mít povrchové invaginace (*fossulae tonsillares*), které navazují na tonzilární krypty (Novotný et al., 1966; Tichý et al., 2004; Eurell et al., 2006). Od okolí je mandle oddělena poměrně silným vazivovým pouzdem (Novotný et al., 1966). Z pouzdra do nitra orgánu odstupují slabá septa nesoucí krevní a eferentní lymfatické cévy (Tichý et al., 2004). Aferentní lymfatické cévy v mandlích chybí (Tichý et al., 2004; Eurell et al., 2006; Ross a Pawlina, 2006).

2.1.6.4 *Lymfatická tkáň bronchů (BALT)*

Lymfatická tkáň dýchacích cest je vázána na sliznici bronchů (Toman, 2009). BALT je strukturálně a funkčně podobný PP střeva (Gartner a Hiatt, 2007; Toman, 2009), avšak oblasti jsou méně patrné (Bienenstock a Clancy, 2005). BALT není konstitutivní strukturou u všech druhů zvířat (Pabst a Gehrke, 1990). Její četnost se liší, od 100 % u králíků a potkanů, 50 % u morčat, 33 % u prasat, zatímco u zdravých koček, lidí (Pabst a Gehrke, 1990) a psů (Brownstein et al., 1980) se nevyskytuje. U králíků, potkanů, morčat a kuřat BALT můžeme pozorovat makroskopicky (Bienenstock et al., 1973, 1982). Okrsky BALT jsou lokalizovány převážně podél bronchů ve všech plicních lalocích, zejména pak při bifurkacích bronchů a bronchiolů (Cesta, 2006a; Gartner a Hiatt, 2007; Toman, 2009). Epitel pokrývající folikuly BALT je často méně specializovaný, mohutně infiltrován lymfocyty a jsou zde přítomny M buňky (Toman, 2009). M buňky jsou vimentin pozitivní (Gebert a Hach, 1992). Pod epitelem se nachází oblast dómu a LN, který bývá obvykle pouze jeden (Bienenstock et al., 1973; Sminia et al., 1989). Zastoupení jednotlivých populací lymfocytů a jejich uspořádání odpovídá poměrům známým z GALT (Toman, 2009), převládají B lymfocyty (Gartner a Hiatt, 2007). Plazmatické buňky se nachází pouze na periferii BALT (Bienenstock et al., 1973; Milne et al., 1975). Rozlišit perifolikulární oblast je možné pouze po antigenní stimulaci (Bienenstock et al., 1973). Aferentní lymfatické cévy v BALT chybějí (Bienenstock a Clancy, 2005; Gartner a Hiatt, 2007).

2.2 Selen a jeho biologické vlastnosti

2.2.1 Selen

Selen (Se) je esenciální mikroelement ve výživě zvířat i lidí, avšak jeho abundantní přísun působí v organismu toxicky (Johnson et al., 2000). Prostřednictvím selenoproteinů a dalších metabolitů selen reguluje oxidační stres, redoxní a další důležité procesy téměř ve všech tkáních a buněčných typech, včetně buněk nespecifické a specifické imunity (Bainbridge, 1976; Behne et al., 1988; Gromer et al., 2005).

Selen se v přírodě vyskytuje v organické i anorganické formě. Anorganická forma se nachází v různých minerálech v podobě seleničitanu ($^{+4}$), selenanu ($^{+6}$), selenidu ($^{-2}$) i jako elementární (0). Seleničitan a selenan jsou používány jako minerální doplněk ve výživě zvířat i lidí. V organických složkách krmiva je selen integrální součástí aminokyselin selenomethioninu (SeMet), selenocysteinu (SeCys) a selenocystinu, které představují přirozený zdroj selenu (Shils a Shike, 2006; Surai, 2006). V organických sloučeninách se tento mikroelement vyskytuje v redukovaném stavu (Se^{-2}) (Zeng, 2009).

2.2.2 Absorpce a metabolismus selenu

Všechny formy selenu jsou v tenkém střevě snadno absorbovány. Jak uvádějí Gmshinskii a Mazo (2006), je tento prvek vstřebáván z více jak 60 %, v některých případech až ze 100 %. Mezi anorganickým a organickým selenem existují rozdíly v absorpci a následné utilizaci (Reilly, 2006).

Selenan je absorbován aktivním transportem spolu se sodíkovými ionty (podobně jako síra, která má velice podobné fyzikální a chemické vlastnosti (Zeng, 2009)), především v ileu (Arduser et al., 1985; Wolfram et al., 1985; Fairweather-Tait, 1997; Gmshinskii a Mazo, 2006), naproti tomu seleničitan pasivní difúzí v jejunu (Arduser et al., 1985; Fairweather-Tait, 1997; Gmshinskii a Mazo, 2006). Rychlost vstřebávání seleničitanu je nižší než u selenanu (Gmshinskii a Mazo, 2006). Obě anorganické formy při absorpci jsou v kompetici s anorganickými sloučeninami síry (Arduser et al., 1985). SeMet a SeCys je absorbován stejným transportním enzymovým systémem jako methionin (Met) a cystein (Cys) (McConnell a Cho, 1965; 1967; Wolfram et al., 1989), i zde dochází ke kompetici mezi methioninem (Met), cysteinem a selenovými analogy (McConnell a Cho, 1965). Vstřebávání SeMet probíhá lépe než vstřebávání seleničitanu (Daniels,

1996). Míra absorpce selenu ve střevě není závislá na stavu saturace organismu tímto mikroelementem (Hall, 2007).

Po absorpci je seleničitan v erythrocytech redukován na hydrogen selenid (H_2Se), který je selektivně vázán na albumin a transportován do jater nebo ledvin (Suzuki a Ogra, 2002). Na rozdíl od seleničitanu, je selenan přímo transportován do jater nebo vyloučen močí (Shiobara et al., 1999; Kobayashi et al., 2001; Suzuki a Ogra, 2002). Chemická forma selenu určuje, jakou cestou proběhne jeho metabolizace (Finley, 2006). Pro syntézu selenoproteinů musí být veškeré formy absorbovaného selenu transformovány na H_2Se (Kvíčala, 2003). Selenan (SeO_4^{2-}) je redukován přes seleničitan (SeO_3^{2-}), seleno diglutathion (GSSeSG) a glutathion persulfid (GSSeH) na hydrogen selenid (Foster a Sumar, 1997; Finley, 2006). Protože SeMet snadno acyluje Met-tRNA, může být nespecificky inkorporován do proteinů, alternativně v játrech nebo ledvinách katabolizován cestou transsulfurace na SeCys (Finley, 2006; Shils a Shike, 2006). Specifická SeCys β -lyáza degraduje SeCys na alanin a H_2Se (Sunde, 1990; Suzuki et al., 1998; Finley, 2006). Dalším zdrojem H_2Se může být alternativní dráha metabolismu SeMet cestou selenometylselenocysteinu (CH_3SeCys) a metylselenolu (CH_3SeH) (Finley, 2006). H_2Se je postupně metylován S-adenosylmethioninem na CH_3SeH , dimetylselenid a trimetylselenonium (Finley, 2006) nebo fosforylován selenofosfátsyntázou 2 na monoselenofosfát, který je aktivním donorem selenu (Finch a Turner, 1996; Kvíčala, 2003; Hoffmann a Berry, 2005; Xu et al., 2007). Tento makroergický intermediát je použit k selenizaci dříve připraveného serin-tRNA, a ten se pak za působení specifického elongačního faktoru a specifické struktury mRNA nazvané SECIS (*selenocystein inserting structure*) váže na triplet UGA (uracil-guanosin-adenosin) přepisované RNA (Kvíčala, 2003). U jiných bílkovin slouží UGA jako stop kodon (Papp et al., 2007). Jak již bylo výše poznamenáno, SeMet se může nespecificky inkorporovat do orgánů a tkání s vysokou metabolickou aktivitou (kosterní svalovina, erythrocyty, slinivka břišní, játra, ledviny, žaludek a sliznice GI (Hansson a Jacobsso, 1966). V proteinech tvoří nespecificky inkorporovaný SeMet zásobu selenu, která je využita při zvýšené potřebě selenu ve stresových situacích, kdy obvykle dochází ke snížení příjmu krmiva (Pierce a Tappel, 1977).

2.2.3 Exkrece selenu

Selen je z organismu vylučován močí, výkaly i vydechovaným vzduchem. Množství a proporce každého typu závisí na obsahu a formě elementu v dietě (Beath et al., 1934). Exkrece selenu probíhá primárně močí (Yang et al., 1989). Tento způsob exkrece reguluje i homeostázu selenu (Daniels, 1996). U zvířat s adekvátním obsahem selenu v dietě je hlavním metabolitem v moči selenocukr (Kobayashi et al., 2002). Kuehnelt et al. (2005) identifikovali v moči lidí tři selenocukry. Selenocukr 1 (metyl-2-acetamid-2-deoxy-seleno- β -D-galaktopyranosid) a jeho deacylovaný analog selenocukr 3 (metyl-2-amino-2-deoxy-1-seleno- β -D-galaktopyranosid) jsou hlavními složkami. Naproti tomu selenocukr 2 (analog selenocukru 1) se v moči vyskytuje v minimálním množství. Při zvýšeném přísunu selenu se v moči nachází ion trimetylselenonia (Kuehnelt et al., 2005). Při vysoké suplementaci selenu je selen ve formě dimetylselenidu a dalšími metylovanými sloučeninami vylučován plícemi (McConnell a Roth, 1966) a v GI je neabsorbovaná část nadbytečného selenu vyloučena výkaly (Surai, 2006).

2.2.4 Selenoproteiny

Biologický efekt selenu je zprostředkován selenoproteiny, ačkoli u některých sloučenin o nízké molekulární hmotnosti (kyselina metylselenová, metylselenocystein, SeMet, GSSeSG) byly biologické účinky také potvrzeny (např. protinádorová aktivita na zvířecích modelech a *in vitro* studiích) (Papp et al., 2007).

Nejběžnější forma selenu v savcích proteinech je SeCys, který je kotranslačně inkorporován do rostoucího polypeptidového řetězce (Papp et al., 2007).

Mezi další proteiny s obsahem selenu patří:

- a) Proteiny se selenem nescificky inkorporovaným v průběhu translace. Při vysoké obsahu SeMet v dietě, nízkém obsahu Met a nízkém intracelulárním poměru síry a selenu je v proteinech Met nahrazován SeMet (Behne a Kyriakopoulos, 2001; Papp et al., 2007).
- b) Selen vázící proteiny, které váží selen jako kofaktor. V těchto proteinech není selen inkorporován, ale vázán k polypeptidu. Zdá se, že tyto proteiny mají vztah k neoplastickým procesům (Papp et al., 2007). U savců byly identifikovány následující proteiny: 14 kDa, 17 kDa a 56 kDa (SPB1 a SPB2) (Behne a Kyriakopoulos, 2001). SPB1 zasahuje do detoxikačních procesů, regulace

buněčného růstu, transportu proteinů v Golgiho aparátu, stárnutí a metabolismu lipidů. V nádorech byl zjištěn pokles exprese SPB1 i SPB2 při porovnání s normální tkání (Papp et al., 2007).

Pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného (SDS-PAGE) bylo identifikováno více jak 40 selenoproteinů (Reilly, 2006), avšak pouze některé selenoproteiny byly izolovány a blíže specifikovány (Arthur a Beckett, 1994; McKenzie et al., 2002b; Kvičala, 2003).

Na základě umístění SeCys lze selenoproteiny dělit do dvou skupin. V první skupině, kam náleží thioredoxin reduktázy a selenoproteiny S, R, O, I, K, se SeCys nachází v blízkosti C terminálního konce. Druhou skupinu tvoří glutathion peroxidázy, jodthyronin dejodázy, selenoproteiny H, M, N, T, V, W, selenofosfát syntáza 2 (SPS2) a 15 kDa selenoprotein, v nichž je SeCys na N terminálním konci (Papp et al., 2007).

Biologické vlastnosti jednotlivých selenoproteinů shrnuje tabulka 1:

Tabulka 1 Selenoproteiny a jejich funkce

Rodina selenoproteinů	Člen/označení	Lokalizace	Subcelulární lokalizace	Funkce
Glutathion peroxidázy	Glutathion peroxidáza 1 (GPx1, cGPx, GSH-Px)	Všechny buňky	Cytozol, mitochondrie	Antioxidační aktivita Ochrana proti virovým infekcím ^a
	Glutathion peroxidáza 2 (GPx2, GI-GPx)	Epitel GI a jater (vysoká exprese) Epitel plic, kůže, mléčné žlázy ^b	Cytozol, ER	Ochrana GI před oxidačním poškozením
	Glutathion peroxidáza 3 (GPx3, eGPx)	Játra, ledviny, srdce, plíce, štítná žláza, GI, mléčná žláza	Sekret, plasma, extracelulární tekutina	Antioxidační aktivita
	Glutathion peroxidáza 4 (GPx4, PHGPx)	Distribuce v různých tkáních, varlata (vysoká exprese)	Cytozol, mitochondrie, jádro	Antioxidační aktivita, ochrana membrán před oxidační destrukcí, přímá redukce fosfolipidových a cholesterolových hydroperoxidů, ochrana před oxidačním poškozením DNA, regulace dráhy 15 lipoxygenázy a 5-lipoxygenázy, fertilita samců (maturace, motilita spermií)
	Glutathion peroxidáza 6 (GPx6)	Čichový epitel, embryonální tkáň	Není známa	Není známa

upraveno dle: Fairweather-Taita et al. (2010) a Hawkese a Alkana (2010); ^aPapp et al. (2007); ^bBanning et al. (2008); GI – gastrointestinální trakt; ER- endoplazmatické retikulum

pokračování Tabulky 1

Rodina selenoproteinů	Člen/označení	Lokalizace	Subcelulární lokalizace	Funkce
Thioredoxin reduktázy	Thioredoxin reduktáza 1 (TrxR-1, TR1, Txnrd1)	Široká exprese	Cytozol, jádro	Regulace intracelulárního redoxního stavu, redukce thioredoxinu, buněčná signalizace
	Thioredoxin reduktáza 2 (TrxR-2, TR2)	Široká exprese	Mitochondrie	Regulace intracelulárního redoxního stavu, redukce thioredoxinu
	Thioredoxin reduktáza 3 (TrxR-3, TR3)	Varlata (specificky)	Cytozol, jádro, ER	Regulace intracelulárního redoxního stavu
Jodthyronin dejodázy	Jodthyronin -5'-dejodáza, typ I (DIO-1, DI1, 5'IDI)	Ledviny, játra, štítná žláza, hnědá tuková tkáň, hypofýza	Integrální protein plazmatických membrán ^a	Metabolismus thyroïdních hormonů, dejodace thyroxinu (T4) na biologicky aktivní 3,3',5,-trijodothyronin (T3)
	Jodthyronin -5'-dejodáza, typ II (DIO-2, DI2)	Štítná žláza, CNS, hypofýza, hnědá tuková tkáň, kosterní svalovina.	Integrální protein membrán ER ^a	Metabolismus thyroïdních hormonů, dejodace thyroxinu (T4) na biologicky aktivní 3,3',5,-trijodothyronin (T3)
	Jodthyronin -5'-dejodáza, typ III (DIO-3, DI3)	Placenta, CNS, embryo Gravidní děloha ^a	Integrální protein plazmatických membrán ^a	Inaktivace thyroïdních hormonů
Selenoproteiny	Selenoprotein P (SeIP, Sepp1)	Mozek (vysoká exprese), játra a varlata, další tkáně, plazma	Sekret, cytozol	Homeostáza a transport Se, antioxidační aktivita. Ochrana proti neurotoxicitě ^b , pravděpodobně ochrana před kardiovaskulárním onemocněním ^c

upraveno dle: Fairweather-Taita et al. (2010) a Hawkese a Alkana (2010); ^a Baqui et al. (2000), ^b Whanger (2001), ^c Hara et al. (2001)
GI – gastrointestinální trakt; ER- endoplazmatické retikulum

pokračování Tabulky 1

Rodina selenoproteinů	Člen/označení	Lokalizace	Subcelulární lokalizace	Funkce
Selenoproteiny	Selenoprotein W (SelW)	Mozek, srdce, kosterní svalovina, tlusté střevo, prostata. Thymus, burza Fabricii, slezina ^a	Cytozol, méně buněčná membrána ^b (Yeh et al., 1995)	Metabolismus kosterního a srdečního svalstva, antioxidační aktivita
	Selenoprotein N (SelN)	Široká exprese	Membrána ER	Regulace redoxní signalizace, homeostáza vápníku ^c
	Selenoprotein S (SelS)	Široká exprese	Membrána ER, cytoplazmatická membrána	Regulace zánětlivých cytokinů (IL 1 β , IL 6, TNF α), odstranění proteinů s nesprávnou vyšší strukturou z ER
	Selenoprotein K (SelK)	Srdce, kosterní svalovina, pankreas, játra, placenta, ^d Thymus, slezina, mízní uzliny, ^e	Membrána ER ^{d,f} , plazmatická membrána ^g	Předpokládá se antioxidační aktivita
	Selenoprotein R (SelR, MSrB1)	Široká exprese	Cytozol, jádro	Antioxidant, oprava proteinů, metabolismus methioninu
	Selenoprotein H (SelH)	Široká exprese	Jádro	DNA vazebný protein, regulace genů syntézy glutathionu a druhá fáze detoxikace

upraveno dle: Fairweather-Taita et al (2010) a Hawkesa a Alkana (2010);^a Yu et al. (2011);^b Yeh et al. (1995);^c Arbogast a Ferreiro (2010);^d Lu et al., (2006);^e Carlson et al. (2010);^f Verma et al.(2011);^g Kryukov et al. (2003); ER- endoplazmatické retikulum

pokračování Tabulky 1

Rodina selenoproteinů	Člen/označení	Lokalizace	Subcelulární lokalizace	Funkce
Selenoproteiny	Selenoprotein I (SelI)	Není známa	Transmembrána	Není známa
	Selenoprotein M (SelM)	Mírná exprese - srdce, plíce, ledviny, děloha, placenta Vysoká exprese - štítná žláza, mozek ^a	Lumen ER	Antioxidační aktivita, skládání proteinů v ER
	Selenoprotein O (SelO)	Není známa	Není známa	Není známa
	Selenoprotein T (SelT)	Mízní uzliny, thymus, slezina ^b	Membrány ER a Golgiho aparátu ^c	Redoxní regulace, buněčná adheze ^d
	Selenoprotein V (SelV)	Varlata	Lumen ER	Není známa
	15kDa selenoprotein (Sel15)	Vysoká exprese - mozek, plíce, varlata, játra, štítná žláza, ledviny ^e	Lumen ER	Možná regulace apoptózy ^f , skladba glykoproteinů
	Selenofosfát syntáza 2 (SPS2)	Není známa	Cytozol	Syntéza selenoproteinů

upraveno dle: Fairweather-Taita et al (2010) a Hawkesa a Alkana (2010); ^aKorotkov et al. (2002), ^bCarlson et al. (2010), ^cGrumolato et al. (2008), ^dSengupta et al. (2009), ^eKumaraswamy et al. (2000), ^fPapp et al. (2007), ER- endoplazmatické retikulum

2.2.5 Selen a imunitní systém

Řada experimentů prokázala, že adekvátní příjem selenu je nezbytný pro buňkami zprostředkovanou i humorální imunitu (McKenzie et al., 2002b). Mechanizmy, kterými je selen zapojen do velice komplexní sítě procesů, které poskytují ochranu proti patogenům a malignitě, nejsou doposud zcela zřetelné (Arthur et al., 2003).

2.2.5.1 Vliv selenu na funkci fagocytů

Po aktivaci fagocytujících leukocytů dochází k respiračnímu vzplanutí, kdy se zvyšuje produkce reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) (Forman a Torres, 2002; McKenzie et al., 2002b). ROS představují pro organismus dvojsečnou zbraň, kdy na jednu stranu jsou nezbytné pro zvýšení antimikrobiální aktivity fagocytů, intracelulární signalizaci a vzájemnou buněčnou komunikaci, avšak ve vysoké koncentraci poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (McCord, 2000). Rovnováhu mezi pro organismus příznivým a naopak negativním účinkem ROS zabezpečují právě selenoproteiny (Hoffmann, 2007). Dopad nedostatku selenu (selenoproteinů) nespočívá jen v nedostatečné ochraně fagocytujících buněk při respiračním vzplanutí (Arthur et al., 2003), ale má také za následek nedostatečný metabolismus H_2Se , který vede ke ztrátě aktivity membránového enzymového komplexu NADPH oxidázy a tedy supresi respiračního vzplanutí (McKenzie et al., 2002b; Hoffmann, 2007). Kromě ROS disponují fagocyty dalším účinným mikrobicidním prostředkem, metabolity oxidu dusnatého (RON) (Hořejší a Bartůňková, 2005), které syntetizují různé druhy NO syntáz (NOS). Při aktivaci fagocytů dochází k intenzivní syntéze oxidu dusnatého a superoxidového radikálu, které spolu reagují za vzniku vysoce toxického peroxinitritu. Podobně jako u ROS je také nadbytek RON provázen nepříznivými účinky na lipidy, proteiny a DNA (McKenzie et al., 2002b). Při deficitu selenu dochází ke zvýšení exprese indukované NO syntázy (iNOS). Prabhu et al. (2002) tento děj připisují zvýšené aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF κ B). Zvýšení aktivace NF κ B závislé na ROS poté vede k posílení transkripce iNOS (Baek et al., 2000). Selenoproteiny kromě samotné fagocytární aktivity ovlivňují rovněž migraci těchto buněk (viz. dále).

2.2.5.2 Vliv selenu na lymfocyty, NK buňky a LAK buňky

Hlavní imunostimulační účinek selenu je připisován zvýšené regulaci exprese α a β řetězce receptoru pro interleukin 2 (IL2R). IL2R je exprimován na různých imunitních buňkách, zejména na T a B lymfocytech (McKenzie et al., 2002b; McKenzie et al., 2006).

Zvýšení exprese IL2R vede k zvýšené proliferaci a diferenciaci lymfocytů (Hoffmann, 2007) a k aktivaci a proliferaci NK buněk (Kindt et al., 2007). Při vysokých dávkách selenu v dietě Hoffmann et al. (2010) pozorovali zvýšenou expresi interleukinu 2 (IL2) a povrchovou expresi vysoce afinního řetězce IL2R. Naopak ztráta selenoproteinů v T lymfocytech výrazně redukovala expresi IL2R, na sekreci IL2 však neměla žádný vliv (Carlson et al., 2010). Na řízení proliferace T lymfocytů se regulací aktivace NFκB podílí také TrxR1 a TrxR2 (Ueno et al., 2007). Suplementace selenem usměrňuje vývoj prekurzorů CD4⁺ T lymfocytů k fenotypu Th1 (Hoffmann et al., 2010). Dalším účinkem selenu je zvýšení toxicity CD8⁺ buněk, LAK a NK buněk (Kiremidjian-Schumacher a Roy, 1998). NK buňky a CD8⁺ buňky disponují protinádorovým a antimikrobiálním proteinem NK lysinem (Hong et al., 2006). Jelikož TrxR inaktivuje NK lysin, deficit selenu tedy zvyšuje vnímavost buněk k tomuto peptidu (McKenzie et al., 2002b). Vysoké dávky selenu působí toxicky na B lymfocyty (Vega et al., 2007). Larsen (1993) se domnívá, že deficitem selenu a vitamínu E jsou více zasaženy T nežli B lymfocyty, a sice z důvodu vyššího obsahu nenasycených mastných kyselin a větší fluidity membrán.

2.2.5.3 *Vliv selenu na lymfatické orgány*

Marsh et al. (1986) se domnívají, že deficit selenu a vitamínu E postihuje nejvýrazněji primární lymfatické orgány. Ve Fabriciově burze (BF) pozorovali při deficitu selenu postupnou degeneraci epitelu doprovázenou lymfocytodeplecí. V thymu pak byly tyto histopatologické nálezy pozorovány pouze při současném nedostatku selenu a vitamínu E. Peng et al. (2011c) pozorovali u kuřat suplementovaných selen deficitní dietou signifikantní pokles velikosti a relativní hmotnosti thymu a BF za současné lymfocytodeplece a zvýšené frekvence přítomnosti apoptotických buněk v obou orgánech. Jak uvádí Mc Kenzie et al. (2002a), deficit selenu vyvolává apoptózu zvýšením oxidačního stresu a expresí proapoptických genů. Deficit selenu také zpomaluje růst BF zásahem do buněčného cyklu B lymfocytů (Peng et al., 2011c). Při deficitu selenu Peng et al. (2011c) pozorovali zvýšení počtu buněk v G1 fázi a naopak pokles počtu buněk v S fázi buněčného cyklu. U myši ztráta selenoproteinů vede k mírné až těžké atrofii thymu, sleziny a mízních uzlin. Hmotnost těchto orgánů a celularita klesla v rozmezí od 50 % až po 80 % (Carlson et al., 2010).

Nejen deficit, ale také nadměrná suplementace selenem má negativní dopad na lymfatické orgány. Imunitní systém je vysoce senzitivní k toxickému účinku selenu

(Johnson et al., 2000). Při dávce vyšší než 5 mg Se/kg krmiva v anorganické formě (Na_2SeO_3) byla pozorována atrofie a zvýšený počet apoptotických buněk v BF (Peng et al., 2009). Lymfocytodeplece a kongesce thymu byla patrná u kuřat suplementovaných dávkou vyšší než 5 mg Se/kg krmiva (Na_2SeO_3) (Peng et al., 2011a). Příjem 10 - 15 mg Se/kg krmiva (Na_2SeO_3) způsobil ve slezině kuřat lymfocytodepleci PALP a LN, dále zvýšení počtu apoptotických buněk a inhibici buněčného cyklu lymfocytů (Peng et al., 2011b). Podobně Johnson et al. (2000) uvádí sníženou celularitu ve slezině při dávce 9 mg Se/kg krmiva (Na_2SeO_3). Green a Albers (1997) popisují při suplementaci 20 mg Se/kg krmiva (selenomethion) nekrózu lymfocytů a atrofii GALT a sleziny u divokých kachen.

2.2.5.4 *Vliv selenu na produkci protilátek*

Vliv selenu na produkci protilátek je značně variabilní, závisí na antigenu, živočišném druhu, pohlaví, věku, a také na tom, zda je selen podáván v kombinaci s vitamínem E nebo samostatně. Na jednotlivé izotypy imunoglobulinů působí deficit selenu různorodě (Larsen, 1993), např. Spallholz et al. (1973) uvádějí u myši snížení titru IgM, IgG a IgA.

2.2.5.5 *Vztah selenu k zánětlivému procesu*

Regulace aktivace NF κ B je jedním z klíčových kroků řízení zánětlivého procesu (Zhang et al., 2002). Promotory genů mnoha prozánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul vlastní vazebné místo pro tento transkripční faktor (Pan a Mcever, 1993; Read et al., 1997; McKenzie et al., 2002b). Selenoproteiny metabolismem ROS brání aktivaci NF κ B, ale také inhibují nukleární translokaci a vazbu na promotory cílových genů (Brigelius-Flohe et al., 2000; Zhang et al., 2002).

2.2.5.6 *Vliv selenu na metabolity kyseliny arachidonové*

Metabolity kyseliny arachidonové (eikosanoidy) vykazují prozánětlivé i imunosupresní vlastnosti (Calder a Field, 2002). Kyselina arachidonová se pomocí fosfolipázy A2 nebo kombinací fosfolipázy C a diacylglycerol lipázy uvolňuje z fosfolipidových membrán a dále metabolizuje cestou 5- lipoxygenázy na leukotrieny nebo cyklooxygenázou na prostaglandiny (Toman, 2009). Vysoká hladina peroxidu v buňce inhibuje enzym cyklooxygenázu. Při nedostatku selenu byl pozorován pokles biosyntézy leukotrienu B₄ (LTB₄) v alveolárních makrofázích (Gairola a Tai, 1985). Enzym syntetizující LTB₄ vyžaduje redukci 12-HPETE pomocí glutathion peroxidázy 4

(GPx4) nebo dalšími glutathion peroxidázami (Spallholz et al., 1990). Selen také zasahuje do produkce prostacyklinů a tromboxanů. Nedostatek selenu vedl ke snížení syntézy prostacyklinů (Cao et al., 2000) a naopak ke zvýšení syntézy tromboxanů (Zbikowska et al., 1999). Overexprese GPx4 u linie RBL2H3 buněk (užívané jako model pro studium žírných buněk) snížila produkci leukotrienu C₄, LTB₄ a prostaglandinu D₂ při porovnání s kontrolou (Imai et al., 1998). Hoffmann (2007) se domnívá, že mechanismem snížení produkce leukotrienů byla redukce ROS závislé aktivace NFκB.

2.2.5.7 Vztah selenu k neoplastickým procesům

Základní výzkum a klinické studie poukazují na funkci selenu v ochraně proti vzniku neoplastických procesů (Hoffmann, 2007). Protinádorová ochrana selenu je přisuzována obraně před poškozením DNA, zvýšení činnosti imunitního systému, inhibici růstu a apoptóze neoplastických buněk (Ganther, 1999), minimalizování vzniku metastáz a nádorové angiogenezi (McKenzie et al., 2002b). Na druhé straně selenoproteiny (TrxR) mohou propagovat vývoj nádorů (Felix et al., 2004) tím, že zvyšují hladinu autokrinního růstového faktoru nádorových buněk (thioredoxinu) (Powis et al., 2000; Nordberg a Arner, 2001; Powis a Montfort, 2001).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo rozšíření poznatků o vlivu anorganické a organické formy selenu na strukturu lymfatických orgánů a tkání králíků.

Vysoké nebo naopak nízké dávky selenu negativně ovlivňují buňky a orgány imunitního systému (Peng et al., 2009, 2011a, 2011b, 2011c, 2012). Podobné studie nebyly u králíků doposud provedeny. Položená hypotéza zní: suplementace vysokými resp. nízkými dávkami selenu vyvolá u pokusných králíků lymfocytodepleci a atrofii lymfatických orgánů.

Práce zahrnuje následující dílčí cíle:

- Histologické vyšetření lymfatických orgánů a tkání (mízní uzliny, Peyerovy plaky, apendix, slezina, thymus).
- Imunohistochemické vyšetření - průkaz CD79⁺ buněk v lymfatických orgánech a tkáních.
- Sledování koncentrace selenu v krevním séru pokusných zvířat.
- Vyhodnocení vybraných krevních parametrů.
- Posouzení fagocytární aktivity neutrofilů.
- Vyhodnocení dalších souvisejících parametrů (hmotnost živých zvířat, relativní hmotnost sleziny).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Experimenty

Byly uskutečněny dva experimenty:

1. Experiment s anorganickou formou selenu – délka trvání 9 týdnů
2. Experiment s organickou formou selenu – délka trvání 9 týdnů

4.2 Odběr krve

Krev byla za účelem stanovení obsahu selenu v krevním séru, fagocytární aktivity a diferenciálního rozpočtu odebírána standardní technikou z *vena auricularis*.

Odběry krve byly realizovány:

- Experiment s anorganickou formou selenu - 0., 4., 9. týden experimentu
- Experiment s organickou formou selenu - 0., 4., 9. týden experimentu

4.3 Zjišťování živé hmotnosti zvířat

Živá hmotnost zvířat byla zjišťována při každém odběru krve, tj. v obou experimentech třikrát.

4.4 Pokusná zvířata a ustájení

Jednotlivé experimenty byly provedeny na 18-ti králících plemene činčila velká. Zvířata byla zakoupena v akreditovaném chovatelském zařízení (BioTest, s.r.o.). Na základě živé hmotnosti a pohlaví byli králíci rozděleni do tří vyrovnaných skupin (Tabulka 1). Do experimentu byli zařazeni králíci ve věku sedmi měsíců. Zvířata byla ustájena v akreditovaném ustájovacím zařízení Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v normalizovaných klecích odpovídajících požadavkům Vyhlášky o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat č. 207/2004 a Zákona na ochranu zvířat proti týrání č. 77/2004 Sb. v platném znění v době experimentu.

Tabulka 2 Průměrná živá hmotnost zvířat na začátku experimentu a obsah selenu v krmné dávce

Experimentální skupina	EA		EO	
	Hmotnost (kg)	Selen (mg/kg suš.)	Hmotnost (kg)	Selen (mg/kg suš.)
1	2,98 ± 0,21	0	3,01 ± 0,33	0,15
2	3,29 ± 0,24	0,15	3,22 ± 0,15	0,30
3	3,10 ± 0,16	9,0	3,26 ± 0,13	4,3

EA - experiment s anorganickou formou Se; EO - experiment s organickou formou Se, suš – sušina

4.5 Výživa experimentálních zvířat

K výživě zvířat v obou experimentech byla použita kompletní krmná směs shodného složení TM - MaK1 (Mlýn Kocanda) (vojtěškové úsušky, oves, pšenice, ječmen, pšeničné otruby, pšeničné klíčky, sušené odstředěné mléko), do které byl přidán Aminovitan (Biofaktory Praha spol. s.r.o) s rozdílným obsahem a formou selenu.

V experimentu s anorganickou formou selenu byl používán Se ve formě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3).

V experimentu s organickou formou selenu byl selen podáván vázaný v řase rodu *Chlorella* (255 mg/kg sušiny) (Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR v Třeboni). V této řase je selen ze 70 % ve formě selenomethioninu (Fan et al., 1998). Obsah selenu v komponentech krmné směsi byl 0,17 mg/kg sušiny. Voda a krmivo byly zvířatům k dispozici *ad libitum*.

4.6 Ukončení pokusu a odběr vzorků k histologickému a imunohistochemickému vyšetření

Zvířata byla na konci experimentu (9. týden) utracena aplikací T 61 (Intervet, s.r.o.) *i. v.* (*v. auricularis*) v dávce 2 ml/ks. Bezprostředně po usmrcení byla provedena pitva, při které byl posouzen zdravotní stav zvířat. K histologickému a imunohistochemickému vyšetření byly odebrány tyto orgány:

- thymus
- mízní uzliny (krční - retrofaryngeální, mezenteriální, popliteální)
- slezina
- Peyerovy plaky
- apendix

4.7 Metody zpracování vzorků biologického materiálu

4.7.1 Stanovení koncentrace selenu v krvi

Koncentrace selenu v krevním séru ($\mu\text{g/l}$) byla stanovena spektrofluorometricky (Kvíčala et al., 1995) v Endokrinologickém ústavu v Praze.

4.7.2 Určení celkového počtu leukocytů

Celkový počet leukocytů byl stanoven na automatickém hematologickém analyzátoru Alvet 2000 (AL Systeme) v laboratoři Katedry veterinárních disciplín a kvality produktů Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

4.7.3 Určení fagocytární aktivity neutrofilů

Do 0,1 ml heparizované krve bylo přidáno 0,05 ml mikrosférických hydrofilních partikulí (Artim s.r.o.). Po hodinové inkubaci při teplotě 37 °C byl zhotoven krevní nátěr a obarven metodou dle Pappenheima. Jako fagocytující neutrofilily byly hodnoceny buňky s více jak třemi pohlcenými partikulemi. Fagocytární aktivita byla vyhodnocena pomocí mikroskopu Leica DM 2500 (Leica Microsystems) a vyjádřena v %.

4.7.4 Vyhodnocení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek

Po odběru krve byl vyhotoven krevní nátěr, který byl po zaschnutí obarven panoptickou metodou dle Pappenheima. Diferenciace leukocytů byla provedena pomocí mikroskopu Leica DM 2500 (Leica Microsystems) dle normy ON 84 3209. Touto metodou bylo zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých druhů leukocytů.

4.7.5 Vyhodnocení hmotnosti sleziny

Slezina byla po vyjmutí z dutiny břišní zvážena na analytických vahách Kern 440-33 (g^{-1}) (KERN & Sohn GmbH). Zjištěná hmotnost sleziny byla následně relativizována k hmotnosti zvířete zjištěné před pitvou (g/kg).

4.7.6 Histologické a imunohistochemické vyšetření vzorků

4.7.6.1 Fixace

Vzorky tkání odebrané k histologickému a imunohistochemickému vyšetření byly fixovány v 10% formalinu nebo v Davidsonově tekutině.

4.7.6.2 Vlastní histologické zpracování tkání:

- Odvodnění a prosycení tkání parafínem pomocí autotechnikonu AT 4: 70% alkohol – 2.5 hod., 80% alkohol – 2.5 hod., 4 × 96% alkohol – po 3 hod., aceton – 1 hod., směs acetonu a xylenu (1 : 1) – 20 min., parafin – 3 hod., parafin – 2,5 hod.
- Zalití do parafinových bloků
- Nařezání řezů o síle 4 – 6 μm (sáňkový mikrotom REICHERT).
- Přilepení na podložní skla pomocí kamencové želatiny, v případě imunohistochemických reakcí na silanizovaná podložní skla.
- Barvení preparátů.
K barvení preparátů bylo využito třech barvicích metod (HE, PFAS, Ziehl-Neelsen) a jedné primární protilátky proti antigenu CD79 α (Tabulka 3).
- Odvodnění a montování preparátů.
Odvodněné preparáty byly zamontovány do kanadského balzámu.

Tabulka 3 Přehled barvicích metod a použité primární protilátky

Barvení	Orgány						
	Mízní uzlina			Thymus	Slezina	PP	Apendix
	K	M	P				
HE	+	+	+	+	+	+	+
PFAS	+	+	+	+	+	+	+
Ziehl-Neelsen	+	+	+	+	+	+	+
CD79	+	-	+	+	+	+	+

HE – hematoxylin – eozin; K – krční; M – mezenterální; P – popliteální; PP – Peyerovy plaky

4.7.6.3 Postup použitých barvicích metod

Vlastní metodika barvení hematoxylin a eozin

- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min., 2x 96% alkohol – 5 min., 70% alkohol – 5 min.
- Vyprání ve vodovodní vodě.
- Oplach destilovanou vodou.
- Hematoxylin dle Kodžouska – 5 - 7min.
- Alkalizace vodovodní vodou – 10 min.
- Oplach destilovaná vodou.
- Eozin ve vodě rozpustný 0.1 % – 5 min.
- Alkohol 80 % – 1 min.
- Alkohol 96 % – dvě lázně po 1 min.
- Aceton – dvě lázně po 1 min.
- Aceton: xylen (1 : 1) po 1 min.
- Xylen – dvě lázně po 1 min.
- Zamontování do kanadského balzámu.

Vlastní metodika barvení PFAS reakce

- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min., 2x 96% alkohol – 5 min., 70% alkohol – 5 min.
- Prání řezů v destilované vodě.
- Oxidace v roztoku kyseliny permravenčí – 30 min.
- Vyprání ve vodovodní vodě – 5 min.
- Schiffovo reagens – 60 min.
- Vyprání v tekoucí vodě – 15 min.
- Obarvení jader hematoxylinem dle Harrisa – 2 - 10 min.
- Alkohol 80 % – 1 min.
- Alkohol 96 % dvě lázně po 1 min.
- Aceton – dvě lázně po 1 min.
- Aceton: xylen (1 : 1) po 1 min.
- Xylen dvě lázně po 1 min.
- Zamontování do kanadského balzámu.

Vlastní metodika barvení dle Ziehl-Neelsena

- Zředěný hydroxid amonný – 5 min.
- Vyprání ve vodovodní vodě – 5 min.
- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min., 2x 96% alkohol – 5 min., 70% alkohol – 5 min.
- Předbarvení jader železitým hematoxylinem – 10 min.
- Oplach destilovanou vodou – 5 min.
- Barvení karbolfuschinem při 37° – 2 hod.
- Vyprání v tekoucí vodě – 5 min.
- Barvení metylenovou modří – 3 - 5 min.
- Vyprání ve vodě – 3 min.
- Alkohol 96 % – dvě lázně po 1 min.
- Aceton – dvě lázně po 1 min.
- Aceton: xylen (1 : 1) po 1 min.
- Xylen – dvě lázně po 1 min.
- Zamontování do kanadského balzámu.

4.7.6.4 Imunohistochemické zpracování vzorků

Použité protilátky

Primární protilátka

Monoklonální myši proti humánnímu CD79 α cy, clone HM-57 (DAKO).

Sekundární protilátka

Sekundární protilátka byla součástí detekčního systému EnVision (DAKO) a v tomto detekčním systému byla navázána spolu s peroxidázou na polymer.

Použité detekční systémy

K detekci vazby primární protilátky byl u všech protilátek použit detekční systém EnVision (DAKO).

Ředění primární protilátky

Primární protilátka byla ředěna pomocí Antibody diluent (DAKO) v poměru 1:40.

Použité pufrы

Citrátový pufr pH 6,0

Fosfátový pufr pH 7,4 ± 0,1 (Phosphate Buffered Saline Tablets, Diagnostic Biosystems)

Vlastní metodika imunohistochemických reakcí

- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min., 2x 96% alkohol – 5 min., 70% alkohol – 5 min.
- Blokace endogenní peroxidázy (Protein Block, Serum free, DAKO) – 10 min.
- Proplach destilovanou vodou.
- Demaskování antigenu – varem v citrátovém pufru pH 6,0 – 10 min.
- Oplach ve fosfátovém pufru pH 7,4 ± 0,1.
- Inkubace s primární protilátkou po dobu 60 min. při pokojové teplotě (1:40).
- Oplach ve fosfátovém pufru pH 7,4 ± 0,1.
- Detekční systém EnVision – 45 min.
- Oplach ve fosfátovém pufru pH 7,4 ± 0,1.
- Vizualizace reakce – 3,3' diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB, DAKO).
- Oplach vodovodní vodou.
- Obarvení jader hematoxylinem dle Kod'ouska.
- Alkohol 80 % – 1 min.
- Alkohol 96 % dvě lázně po 1 min.
- Aceton – dvě lázně po 1 min.
- Aceton: xylen (1 : 1) po 1 min.
- Xylen dvě lázně po 1 min.
- Zamontování do kanadského balzámu.

Kontroly

Jako negativní protilátkové kontroly bylo využito nahrazení primární protilátky ředícím roztokem. Jako negativní tkáňové kontroly bylo v použitých tkáních použito okolních buněk s předpokládaným negativním výskytem hledaného antigenu.

4.7.6.5 Metody hodnocení histologických nálezů

Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk

Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk bylo získáno posouzením dvouset buněk při objektivu 40.

Histometrie

Stanovení metrických údajů bylo provedeno v pěti zorných polích u tří zvířat v každé pokusné skupině.

Tabulka 4 Hodnocení histologických nálezů (μm)

Medulární trámce m.u.		Medulární sinusy m.u.		Sinusy ČP sleziny	
Úzké	Široké	Úzké	Široké	Úzké	Široké
135,38±40,30	609,99± 237,44	187,26±58,41	600,83±200,13	13±0,50	33,5±2,0

m.u. - mízní uzlina; ČP – červená pulpa

Celulizace

Stanovení celulizace bylo provedeno v ploše 1 mm² v pěti zorných polích u tří zvířat v každé skupině.

Tabulka 5 Hodnocení celulizace - počet buněk v 1 μm^2

Celulizace						
Subkapsulární sinusy m.u.		Medulární trámce m.u.		Medulární sinusy m.u.		Trámce ČP sleziny
Slabá	Výrazná	Slabá	Výrazná	Slabá	Výrazná	Hustá
3,05±1,90	24,3±2,15	8,52±4,16	22,18±5,90	2,29±1,09	21,43±5,20	20,17±4,71

m.u. - mízní uzlina; ČP – červená pulpa

4.8 Statistické zpracování dat

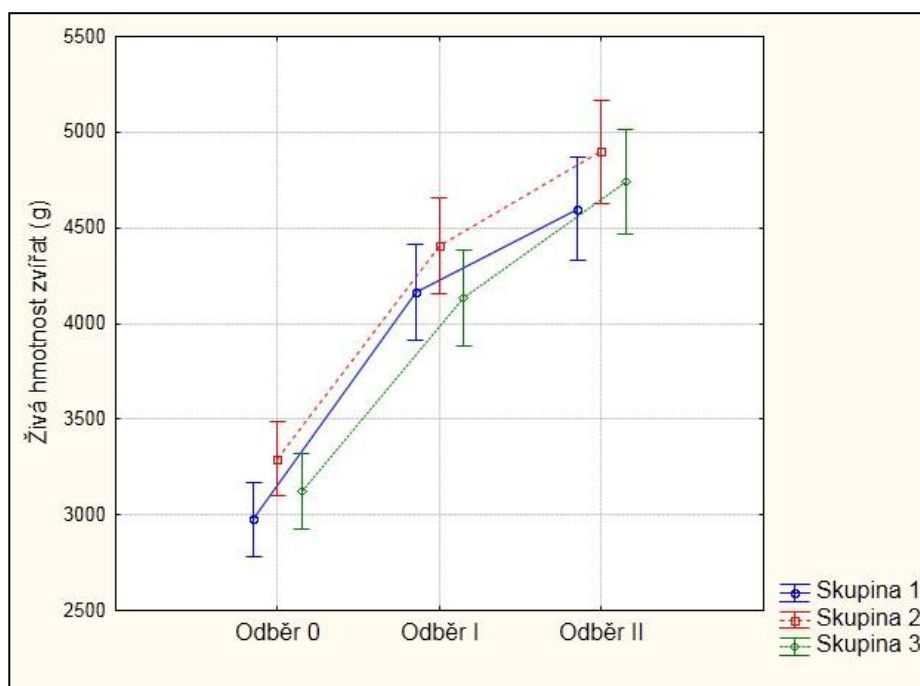
Pro statistické vyhodnocení zjištěných dat byla použita vícefaktorová ANOVA s opakováním (živá hmotnost zvířat, koncentrace Se v krevním séru, počty leukocytů, neutrofilů a lymfocytů, fagocytární aktivita) a jednofaktorová ANOVA (hmotnost sleziny) v programu Statistika 10 (StatSoft. Inc.). Základní statistická průkaznost byla akceptována na hladině významnosti $P < 0,05$.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

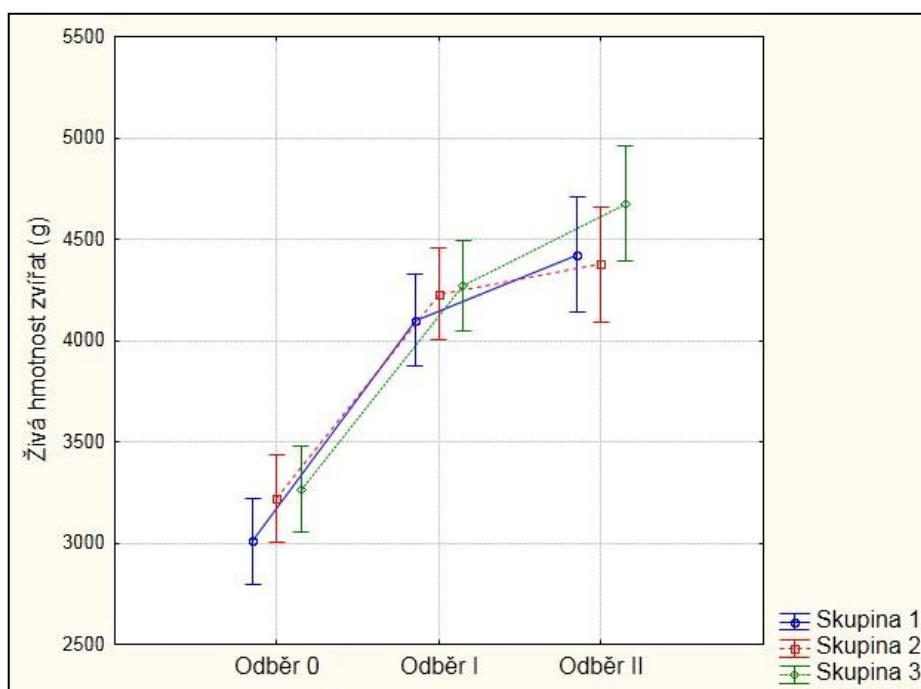
V průběhu našeho experimentu nebyly prokázány žádné klinické příznaky související s deficitem nebo naopak toxickým působením selenu tak, jak je popisují někteří autoři. Kupř. Turan et al. (1997) pozorovali u experimentálních králíků suplementovaných selen deficitním krmivem (9,8 µg Se/kg krmiva) i krmivem s vysokou dávkou selenu (4,2 mg Se/kg krmiva) ztrátu srsti v oblasti hřbetu a končetin. Makroskopicky jsme nezaznamenali patologické změny vnitřních orgánů experimentálních zvířat. U některých jedinců bez rozdílů dávky a formy selenu byly zjištěny histopatologické změny v ledvinách (precipitáty kalcia) a v játrech (mírná akutní venostáza). Jednalo se pouze o jednotlivé, spontánní nálezy nesouvisející s experimentem.

5.1 Živá hmotnost pokusných zvířat

Graf 1 Průměrná živá hmotnost králíků s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



Graf 2 Průměrná živá hmotnost králíků s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se

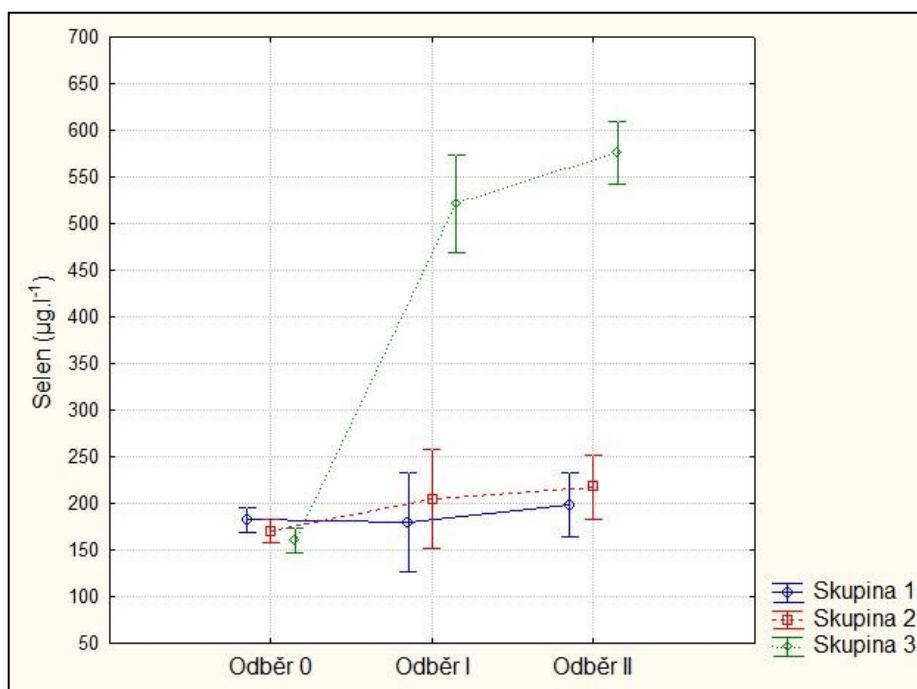


V živé hmotnosti zvířat nebyl mezi jednotlivými skupinami prokázán statisticky významný rozdíl (Graf 1, 2). Podobné výsledky zaznamenali Turan et al. (1997) v experimentu s anorganickou formou Se, kdy byla králíkům po dobu 12-15-ti týdnů podávána Se deficitní dieta (9,8 $\mu\text{g/kg}$ krmiva) a dieta s vysokým obsahem Se (4,2 mg/kg krmiva). Rovněž Muller et al. (2002) po 10-ti týdenní suplementaci králíků Se deficitní dietou (<0,030 mg Se/kg krmiva) a dietou se zvýšeným obsahem Se (0,40 mg/kg krmiva) nepozorovali statisticky významný rozdíl v živé hmotnosti králíků. Autoři Barnes et al. (2009) ve své studii na potkanech uvádějí, že deficit (0,005 $\mu\text{g Se/g}$ krmiva) ani suplementace Se ve formě Na_2SeO_3 (podávané dávky: 0; 0,016; 0,04; 0,06; 0,08; 0,12; 0,16; 0,24; 0,4; 0,8 $\mu\text{g Se/g}$ krmiva) neovlivnily růst zvířat.

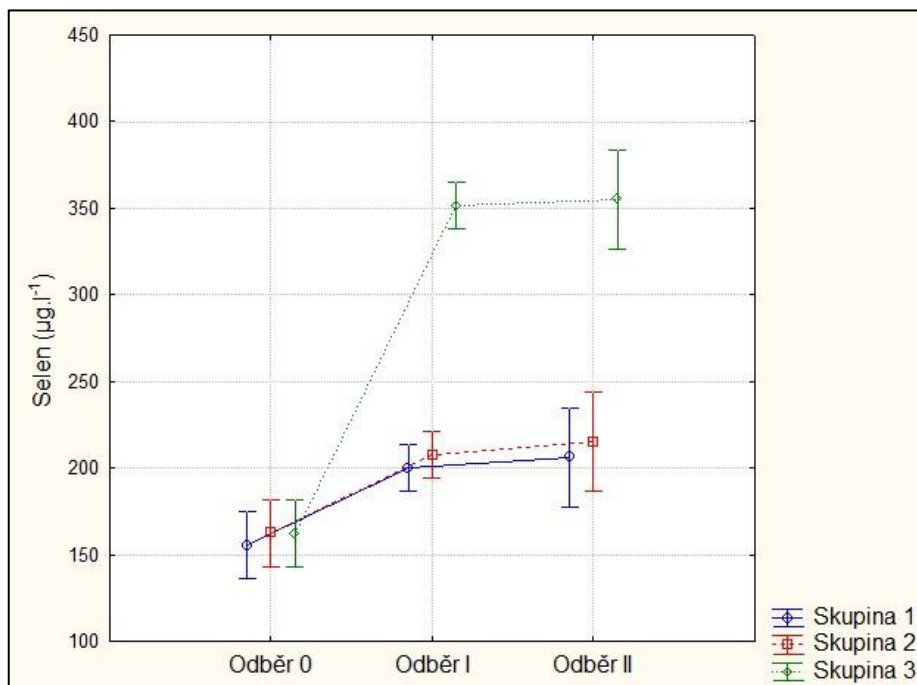
Kim a Mahan (2001) ve svém pokusu s organickou formou Se (kvasnice obohacené Se) a anorganickou formou Se (Na_2SeO_3) uvádějí, že až do dávky 5 mg Se/kg krmiva nepozorovali rozdíl v příjmu krmiva, přírůstcích a tělesné hmotnosti u rostoucích prasat. Rozdíly ve sledovaných parametrech byly patrné až při příjmu nad 10 mg Se/kg krmiva. Tento trend lze zaznamenat i v našem pokusu, kdy při dávce 4,3 mg Se/kg krmiva (selen vázaný v řasách) a 9 mg Se/kg krmiva (Na_2SeO_3) nebyly pozorovány statisticky významné změny v živé hmotnosti králíků.

5.2 Koncentrace selenu v krevním séru

Graf 3 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



Graf 4 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se



Diety s vysokým nebo naopak nízkým obsahem selenu jsou příčinou signifikantních změn koncentrace selenu v krevní plazmě (Hawkes et al., 2001).

Suplementace anorganické formy selenu v dávce 4,2 mg Se/kg krmiva vedla ke statisticky významnému ($P < 0,05$) zvýšení koncentrace selenu v krevní plazmě králíků. V našem experimentu s anorganickou formou selenu došlo u skupiny 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,05$) koncentrace selenu v krevním séru po prvních čtyřech týdnech pokusu (počáteční hodnota $160,08 \pm 11,79 \mu\text{g/l}$, po čtyřech týdnech $521,42 \pm 92,24 \mu\text{g/l}$). Prodloužení zvýšeného přísunu selenu o dalších pět týdnů již nevedlo k jeho významnému zvýšení v krevním séru ($576,13 \pm 55,07 \mu\text{g/l}$).

Po čtyřtýdenní aplikaci organické formy selenu došlo u všech experimentálních skupin k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,05$) jeho koncentrace (Graf 3, 4). Při prodloužení pokusu o dalších pět týdnů byl u sledovaných skupin zaznamenán mírný vzestup selenu v krevním séru, avšak bez statistické významnosti.

Lze konstatovat, že při zkrmování anorganické i organické formy selenu došlo souběžně se vzrůstem selenu v krmné dávce ke zvýšení koncentrace selenu v krevním séru.

U prasat při suplementaci jak organickou, tak anorganickou formou selenu (5; 10; 15 mg Se/kg krmiva) došlo k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,01$) koncentrace selenu v krevní plazmě (Kim a Mahan, 2001). K podobným výsledkům dospěli také Ibeagha et al. (2009) v experimentu prováděném na kravách. Trávníček et al. (2007) zaznamenali obdobné výsledky u březích a laktujících bahnic při podávání organické a anorganické formy selenu. Dieta s organickým selenem se však projevila statisticky významně v obsahu selenu v krevním séru narozených jehňat.

U skupiny 1 (bez suplementace selenem) v experimentu s anorganickou formou selenu došlo k přechodnému poklesu koncentrace selenu z $182,14 \pm 10,19 \mu\text{g/l}$ na $179,50 \pm 5,09 \mu\text{g/l}$. Poté následovalo zvýšení koncentrace selenu v krevním séru ($198,60 \pm 20,64 \mu\text{g/l}$). Lze se domnívat, že toto zvýšení bylo způsobeno uvolněním selenu z tělesných zásob pokusných zvířat.

Pokles koncentrace selenu v krevní plazmě králíků krmených selen deficitním krmivem byl potvrzen i v dalších publikacích (Turan et al., 1997; Muller et al., 2002).

5.3 Histologické nálezy v lymfatických orgánech

5.3.1 Histologické nálezy v mízních uzlinách

5.3.1.1 Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 6)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika různě velkých kompartmentů. V jednom případě (17 %) byla patrná fokální hyperplazie parakortexu (cytologicky pleomorfní, fokální nebo difuzní oblast zesílení, lymfoidní proliferace pod subkapsulárním sinusem, predominance malých lymfocytů a početných TBM). V dalším případě (17 %) se vyskytovala mírná hyperplazie lymfatických nodulů (LN) (zmnožené LN, přítomné sekundární LN v kortexu). Silná celulizace medulárních trámců byla pozorována ve dvou případech (33 %). Medulární sinusy byly v jednom případě (17 %) slabě celulizované a v dalším případě (17 %) naopak silně celulizované. Široké medulární trámce se nacházely ve dvou případech (33 %). Makrofágy fagocytující pigment (MFP) byly patrné u jednoho zvířete (17 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny se skládaly z několika kompartmentů rozdílné velikosti. V mízních uzlinách jednoho zvířete (17 %) byla patrná mírná hyperplazie LN a u dalších třech zvířat (50 %) hyperplazie parakortexu (u dvou zvířat difuzní a u jednoho fokální). Celulizace medulárních sinusů byla ve třech případech (50 %) slabá. Ve dvou případech (33 %) byly medulární trámce široké a silně celulizované.

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika segmentů různé velikosti. V jednom případě (17 %) byla pozorována mírná hyperplazie LN. Slabě celulizované medulární sinusy byly patrné ve dvou případech (33 %), naopak silně celulizované sinusy pouze u jednoho zvířete (17 %). Medulární trámce byly ve dvou případech (33 %) široké a silně celulizované.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly ve výskytu hyperplazie parakortexu a celulizaci medulárních sinusů. Nejčastěji se hyperplazie parakortexu vyskytovala u skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) (tři králíci 50 %), u skupiny 1 (bez suplementace selenem) pouze u jednoho zvířete (17 %). U zvířat skupiny 3 s vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) se hyperplazie parakortexu nevyskytovala. Mírná hyperplazie LN byla ve všech experimentálních skupinách pozorována u jednoho zvířete (17 %). Slabá celulizace medulárních sinusů byla pozorována u tří králíků (50 %) skupiny 2, u dvou králíků (33 %) skupiny 3 a pouze u jednoho zvířete (17 %) skupiny 1.

Tabulka 6 Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách – anorganická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
					Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
	K	PK	LN	PK	Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	^a 0/ ^b 6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	0/6	2/6	0/6	2/6	1/6
2	0/6	0/6	1/6	3/6	3/6	0/6	0/6	2/6	0/6	2/6	0/6
3	0/6	0/6	1/6	0/6	2/6	1/6	0/6	2/6	0/6	2/6	0/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK - parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s - sinusy; t - trámce

Tabulka 7 Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách – organická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
					Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
	K	PK	LN	PK	Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	^a 1/ ^b 6	0/6	1/6	0/6	6/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6
2	1/6	1/6	1/6	0/6	2/6	0/6	1/6	3/6	2/6	0/6	1/6
3	0/6	0/6	3/6	0/6	2/6	0/6	1/6	1/6	3/6	2/6	0/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK – parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s – sinusy; t – trámce

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 7)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika různě velkých kompartmentů. Ve dvou případech (33 %) byla pozorována slabá celulizace subkapsulárních sinusů. V jednom případě (17 %) byla patrná relativně slabá celulizace kůry i parakortexu (sekundární LN byly formovány) (Obr. 9). U jednoho králíka (17 %) část kompartmentů vykazovala normální strukturu, část kompartmentů byla tvořena pouze parakortexem. V jednom případě (17 %) byla pozorována atrofická kůra tvořená pouze atrofickými LN (Obr. 8). V dalším vzorku (17 %) byly některé segmenty tvořeny pouze LN a jiné pouze parakortexem. U šesti králíků (100 %) byly medulární trabekuly silně celulizované. Medulární sinusy byly u šesti zvířat (100 %) slabě celulizované (Obr. 5).

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika segmentů různé velikosti. Celulizace subkapsulárních sinusů byla v pěti případech (83 %) slabá. V jednom případě (17 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. Atrofická kůra byla patrná u jednoho králíka (17 %). U jednoho zvířete (17 %) byla viditelná zúžená kůra s atrofickým parakortexem. Početné MFP byly viditelné na hranici kůry a dřene pouze v jednom případě (17 %) (Obr. 13). Barvením dle Ziehl-Neelsona byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Medulární trabekuly byly ve dvou případech (33 %) zúžené. U třech zvířat (50 %) se vyskytovaly silně celulizované medulární trámce a naopak slabě celulizované trámce byly patrné u jednoho zvířete (17%).

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly tvořeny z několika kompartmentů rozdílné velikosti. Slabá celulizace subkapsulárních sinusů byla patrná ve čtyřech případech (67 %) (Obr. 2). Ve třech případech (50 %) byla patrná mírná hyperplazie LN (v některých kompartmentech se vyskytovaly LN s hypocelulárním okolím). V jednom případě (17 %) byly části kompartmentů tvořeny parakortexem i LN, další části kompartmentů pouze hypocelulárním parakortexem. Ve třech případech (50 %) byly medulární trabekuly úzké a ve dvou případech (33 %) naopak široké. V jednom případě (17 %) byla pozorována slabá a v dalším případě (17 %) silná celulizace medulárních trámců. Široké medulární trámce byly patrné ve dvou případech (33 %).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

V experimentu s organickou formou selenu byly patrné rozdíly ve výskytu mírné hyperplazie LN, v celulizaci medulárních trámců a sinusů a v šířce medulárních trámců. Mírná hyperplazie LN byla pozorována u tří králíků (50 %) skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva), u jednoho králíka (17 %) skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). Atrofie kůry byla pozorována u jednoho zvířete (17 %) skupiny 1 a skupiny 2. Atrofie parakortexu byla viditelná pouze u jednoho králíka (17 %) skupiny 2. Slabě celulizované medulární sinusy byly patrné u šesti zvířat (100 %) skupiny 1. Ve skupinách 2 a 3 byly pozorovány slabě celulizované medulární trámce u dvou králíků (33 %). Silná celulizace medulárních trabekul byla viditelná u šesti zvířat (100 %) skupiny 1, u tří zvířat (50 %) skupiny 2 a u jednoho zvířete (17 %) skupiny 3. Úzké medulární trámce byly viditelné u tří zvířat (50 %) skupiny 3, u dvou zvířat (33 %) skupiny 2. Úzké medulární trámce nebyly pozorovány u skupiny 1. Široké medulární trámce se vyskytovaly pouze u skupiny 3 a to u dvou králíků (33 %).

5.3.1.2 Histologické nálezy v popliteálních mízních uzlinách

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 8)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly rozděleny do několika různě velkých segmentů. V jednom případě (17 %) byla patrná fokální hyperplazie parakortexu, u dalších třech zvířat (50 %) mírná hyperplazie LN. Celulizace medulárních sinusů byla ve dvou případech (33 %) silná a ve třech případech (50 %) slabá. U dvou zvířat (33 %) se vyskytovaly široké a silně celulizované medulární trámce.

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika různě velkých segmentů. Ve dvou případech (33 %) byla pozorována fokální hyperplazie parakortexu. U dalších dvou zvířat (33 %) se vyskytovala mírná hyperplazie LN. Celulizace medulárních sinusů byla ve dvou případech (33 %) slabá a u jednoho zvířete (17 %) silná. V jednom případě (17 %) byla celulizace medulárních trámců slabá, v dalším případě (17 %) naopak silná. Medulární trámce byly u jednoho zvířete (17 %) široké.

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika různě velkých segmentů. Ve dvou případech (33 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. Slabá celulizace medulárních sinusů se vyskytovala ve třech případech (50 %). Silná celulizace medulárních trámců byla pozorována ve dvou případech (33 %). Široké medulární trámce se vyskytovaly u dvou zvířat (33 %).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v mírné hyperplazii LN, hyperplazii parakortexu a celulizaci medulárních sinusů. Mírná hyperplazie LN byla nejčastěji pozorována u skupiny 1 bez suplementace selenem (tři králíci (50 %)), u skupin suplementovaných selenem (skupina 1 a 2) byla mírná hyperplazie LN pozorována u dvou králíků (33 %). Hyperplazie parakortexu byla viditelná u dvou králíků (33 %) skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva), naproti tomu u zvířat suplementovaných vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) nebyla hyperplazie parakortexu patrná. U skupiny 1 se hyperplazie parakortexu vyskytla u jednoho králíka (17 %). Silná celulizace medulárních sinusů byla patrná u dvou zvířat (33 %) skupiny bez suplementace selenem. U skupiny s vysokou dávkou selenu nebyla u žádného zvířete pozorována silná celulizace medulárních sinusů.

Tabulka 8 Histologické nálezy v popliteálních mizních uzlinách – anorganická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
	K	PK	LN	PK	Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
					Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	0/6	0/6	3/6	1/6	3/6	2/6	0/6	2/6	0/6	2/6	0/6
2	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6	1/6	0/6	1/6	0/6
3	0/6	0/6	2/6	0/6	3/6	0/6	0/6	2/6	0/6	2/6	0/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s – sinusy; t – trámce

Tabulka 9 Histologické nálezy v popliteálních mizních uzlinách – organická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
	K	PK	LN	PK	Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
					Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	^a 1/6 ^b	0/6	1/6	1/6	2/6	0/6	1/6	3/6	1/6	0/6	0/6
2	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	1/6	4/6	0/6	0/6
3	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	1/6	5/6	0/6	0/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK – parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s - sinusy; t – trámce

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 9)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly formovány do několika různě velkých kompartmentů. Slabá celulizace subkapsulárních sinusů byla patrná ve dvou případech (33 %). V jednom případě (17 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. V dalším případě (17 %) v segmentech převažoval parakortex s atrofickými LN. V jednom případě (17 %) se ve většině kompartmentů vyskytovaly atrofické LN. U jednoho zvířete (17 %) byla patrná difuzně celulizovaná kůra bez formování LN. Ve dvou případech (33 %) byla také slabá celulizace medulárních sinusů. Ve třech případech (50 %) byly medulární trámce silně celulizované a v jednom případě (17 %) slabě celulizované. Zúžené medulární trabekuly se vyskytovaly u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly tvořeny několika segmenty rozdílné velikosti. Subkapsulární sinusy byly u pěti zvířat (83 %) slabě celulizované. Ve čtyřech případech (67 %) byla část kompartmentů tvořena parakortexem bez LN nebo s atrofickými LN. Další kompartmenty tvořily LN s atrofickým nebo absentujícím parakortexem. V jednom případě (17 %) byla v kompartmentech patrná difuzní celulizace kůry a v části kompartmentů převládaly atrofické LN. U jednoho zvířete (17 %) se v několika segmentech vyskytoval slabě celulizovaný parakortex s atrofickými LN nebo bez LN, v dalších segmentech byla patrná pouze rezidua kůry. Ve čtyřech případech (67 %) byly medulární trabekuly úzké, u tří zvířat (50 %) slabě celulizované (Obr. 3) a u jednoho (17 %) silně celulizované.

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mízní uzliny byly tvořeny z několika kompartmentů různé velikosti. Subkapsulární sinusy byly u čtyř zvířat (67 %) slabě celulizované (Obr. 2). Ve třech případech (50 %) v kompartmentech mízní uzliny převládal parakortex s atrofickými nebo absentujícími LN, u jednoho zvířete (17 %) byl však parakortex hypocelulární. U dvou zvířat (33 %) byly z části kompartmenty tvořeny parakortexem a difuzně celulizovaným nebo do nodulů formovaným kortexem, v části segmentů byly patrné pouze nodulární formace. V pěti případech (83 %) byly medulární trabekuly úzké, u čtyř zvířat (67 %) slabě celulizované a u jednoho zvířete (17 %) silně celulizované.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v uspořádání kompartmentů mízních uzlin, celulizaci medulárních sinusů a trámců a v šířce medulárních trámců. U tří zvířat (50 %) skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a jednoho zvířete (17 %) skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) převládala v kompartmentech mízní uzliny parakortex s atrofickými nebo absentujícími LN. U čtyř zvířat (67 %) skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly některé kompartmenty tvořeny parakortexem s atrofickými nebo absentujícími LN, v dalších kompartmentech převládaly LN s atrofickým nebo chybějícím parakortexem. Slabá celulizace medulárních sinusů byla pozorována pouze u skupiny 1. Medulární trámce byly slabě celulizované u čtyř zvířat (67 %) skupiny 3, u tří králíků (50 %) skupiny 2 a u jednoho zvířete (17 %) skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). Silně celulizované medulární trámce byly patrné zejména ve skupině 1 (tři králíci (50 %)) v dalších skupinách se vyskytovaly pouze u jednoho zvířete (17 %). Široké medulární trámce byly patrné u pěti králíků (83 %) skupiny 3 a u čtyř králíků (67 %) skupiny 2. U skupiny 1 se široké medulární trámce vyskytovaly pouze u jednoho zvířete (17 %).

5.3.1.3 Histologické nálezy v mezenteriálních mízních uzlinách

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 10)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

V jednom případě (17 %) byla patrná mírná hyperplazie LN, v dalším případě (17 %) výrazná hyperplazie LN (zmnožené LN a sekundární LN v kůře i ve dřeni) (Obr. 11). U jednoho zvířete (17 %) se nacházela fokální hyperplazie parakortexu. Medulární trámce byly široké a silně celulizované ve dvou případech (33 %). Ve dvou případech (33 %) byly medulární sinusy slabě celulizované a v dalších dvou případech (33 %) naopak silně celulizované.

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

V jednom případě (17 %) byla patrná mírná hyperplazie LN, v dalším případě (17 %) difuzní hyperplazie parakortexu. Celulizace medulárních sinusů byla ve třech případech (50 %) slabá a ve dvou případech (33 %) silná. MFP se vyskytovaly u dvou zvířat (33 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

Ve dvou případech (33 %) byla patrná mírná hyperplazie LN a v dalším případě (17 %) fokální hyperplazie parakortexu. Medulární trabekuly byly ve třech případech (50 %) silně celulizované a široké. Celulizace medulárních sinusů byla u dvou zvířat (33 %) silná a u jednoho zvířete (17 %) slabá. MFP byly patrné ve třech případech (50 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v celulizaci medulárních sinusů a trámců, v šířce medulárních trámců a výskytu MFP. Mírná hyperplazie LN byla pozorována ve všech pokusných skupinách u jednoho zvířete (17 %). Výrazná hyperplazie LN byla pozorována u jednoho zvířete (17 %) skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny), v dalších experimentálních skupinách nebyla výrazná hyperplazie LN pozorována. Hyperplazie parakortexu byla patrná vždy u jednoho zvířete (17 %) všech experimentálních skupin. Slabě celulizované medulární sinusy byly nejčastěji patrné (tři zvířata; 50 %) ve skupině 2 suplementované 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva, naopak u skupiny 3 s vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) byly viditelné pouze u jednoho (17 %) zvířete. Silně celulizované trabekuly byly patrné u tří zvířat (50 %) skupiny 3, u dvou zvířat bez suplementace selenem (skupina 1). U skupiny 2 nebyla pozorována silná celulizace medulárních trámců. Široké medulární trámce se vyskytovaly u tří zvířat (50 %) skupiny 3, u dvou zvířat (33 %) skupiny 1. Ve skupině 2 nebyly pozorované široké medulární trámce. MFP se nejčastěji vyskytovaly u skupiny s vysokou dávkou selenu (tři zvířata; 50 %). Ve skupině 2 byly MFP pozorované u dvou jedinců a u skupiny bez suplementace selenem nebyly MFP patrné.

Tabulka 10 Histologické nálezy v mezenteriálních mízních uzlinách – anorganická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
					Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
	K	PK	LN	PK	Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	^a 0/6 ^b	0/6	2/6	1/6	2/6	2/6	0/6	2/6	0/6	2/6	0/6
2	0/6	0/6	1/6	1/6	3/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6
3	0/6	0/6	2/6	1/6	1/6	2/6	0/6	3/6	0/6	3/6	3/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK – parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s – sinusy; t – trámce

Tabulka 11 Histologické nálezy v mezenteriálních mízních uzlinách – organická forma Se

Skupina	Atrofie		Hyperplazie		Celulizace				Medulární trámce		MFP
					Medulární s.		Medulární t.		Úzké	Široké	
	K	PK	LN	PK	Slabá	Silná	Slabá	Silná			
1	^a 0/6 ^b	1/6	4/6	0/6	4/6	0/6	0/6	6/6	0/6	1/6	0/6
2	0/6	0/6	5/6	0/6	0/6	3/6	0/6	3/6	2/6	3/6	1/6
3	0/6	1/6	4/6	0/6	0/6	0/6	3/6	1/6	3/6	3/6	0/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; K – kůra; LN – lymfatické noduly; PK – parakortex; MFP – makrofágy fagocytující pigment; s – sinusy; t – trámce

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 11)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Celulizace subkapsulárních sinusů byla ve dvou případech (33 %) slabá (Obr. 1), a v dalších dvou případech (33 %) naopak silná. Ve čtyřech případech (67 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. V jednom případě (17 %) převažovaly difuzně celulizované kompartmenty. U jednoho zvířete (17 %) byla patrná atrofie parakortexu. U šesti králíků (100 %) byla patrná silná celulizace medulárních trámců a u čtyř zvířat (67 %) slabá celulizace medulárních sinusů.

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Subkapsulární sinusy byly v jednom případě (17 %) slabě celulizované. U pěti králíků (83 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. U dvou zvířat (33 %) se vyskytovaly zúžené medulární trabekuly a u dalších třech králíků (50 %) široké. Ve třech případech (50 %) se ve dřeni vyskytovaly silně celulizované trabekuly (Obr. 4). U třech zvířat (50 %) byly patrné silně celulizované medulární sinusy (Obr. 6). MFP byly patrné pouze u jednoho zvířete (17 %) (Obr. 7). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

U dvou zvířat (33 %) se vyskytovaly slabě celulizované subkapsulární sinusy, naopak u jednoho zvířete (17 %) silně celulizované. U čtyř zvířat (67 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. U jednoho zvířete (17 %) byla pozorována atrofie parakortexu. Medulární trámce byly ve třech případech (50 %) úzké a v dalších třech případech (50 %) široké. Celulizace trabekul byla ve dvou případech (33 %) silná a v jednom případě (17 %) slabá.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v celulizaci medulárních sinusů, trámců a v šířce medulárních trámců. Atrofie parakortexu byla patrná pouze u jednoho králíka (17 %) ze skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) a skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva). Mírná folikulární hyperplazie byla nejčastěji pozorována u skupiny 2 dotované 0,3 mg Se/kg sušiny krmiva (pět králíků; 83 %). Ve zbývajících skupinách (1 a 3) byla mírná hyperplazie LN pozorována u čtyř zvířat (67 %). Slabá celulizace medulárních sinusů byla pozorována pouze u zvířat skupiny 1 (čtyři králíci; 67 %). Silná celulizace medulárních sinusů se vyskytovala u tří zvířat (50 % případů) skupiny 2. Slabě

celulizované medulární trámce se vyskytovaly u tří zvířat (50 %) skupiny 3. U skupiny 1 byly u šesti zvířat (100 %) pozorovány silně celulizované medulární trámce. U skupiny 2 se silně celulizované medulární trámce vyskytovaly u tří zvířat (50 %) a u skupiny 3 u jednoho zvířete (17 %). Široké medulární trámce byly pozorovány u tří zvířat (50 %) skupiny 2 a skupiny 3. U skupiny 1 byly patrné široké medulární trámce pouze u jednoho zvířete (17 %). Úzké medulární trámce se vyskytovaly u tří králíků (50 %) skupiny 3, u dvou králíků (33 %) skupiny 2. U skupiny 1 nebyly pozorované úzké medulární trámce.

Shrnutí histologických nálezů v mízních uzlinách

Histologická stavba kůry povrchových (krčních a popliteálních) mízních uzlin často zcela neodpovídala uspořádání u domácích zvířat. V kompartmentech s vyvinutým parakortexem se nejednou vyskytovaly pouze primární nebo atrofické LN, případně LN zcela absentovaly. Tento fenomén byl pozorován zejména v popliteálních mízních uzlinách skupiny s nejvyšší dávkou (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) organické formy selenu (tři králíci; 50 %). U čtyř zvířat (67 %) skupiny se suplementací 0,3 mg Se/kg sušiny krmiva byly některé kompartmenty popliteálních mízních uzlin tvořeny parakortexem s atrofickými nebo absentujícími LN a jiné naopak s LN a atrofickým nebo chybějícím parakortexem. Z uvedených nálezů by bylo možno usuzovat na deficienci koordinace buněčné a imunitní reakce. V některých povrchových mízních uzlinách byla patrná mírná hyperplazie LN a hyperplazie parakortexu, avšak nebyl patrný vztah mezi dávkou a formou selenu. Například v popliteálních mízních uzlinách králíků bez suplementace selenem se mírná hyperplazie LN vyskytovala u tří králíků (50 %), naproti tomu u zvířat suplementovaných selenem (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva) u dvou králíků (33 %). V experimentu s organickou formou selenu byla mírná hyperplazie LN pozorována pouze u jednoho králíka dotovaného 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva. Hyperplazie parakortexu v krčních mízních uzlinách byla nejčastěji pozorována u skupiny suplementované 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva (tři králíci; 50 %). Z uvedených výsledků lze předpokládat, že se jednalo o nespecifickou antigenní stimulaci, protože v experimentu byla použita laboratorní zvířata z konvenčního chovu.

V povrchových mízních uzlinách králíků suplementovaných organickou formou selenu byl pozorován vztah mezi obsahem selenu v krmivu a celulizací a šíří medulárních trámců. V popliteálních mízních uzlinách při zvyšujícím se obsahu selenu v krmivu byly častěji patrné úzké a slabě celulizované medulární trámce. Naproti tomu v krčních mízních uzlinách se vzrůstající dávkou selenu vyskyt hustě celulizovaných medulárních trámců

klesal. Výskyt zúžených medulárních trámců by mohl naznačovat sníženou imunitní transformaci v mízních uzlinách. Při suplementaci anorganické formy selenu nebyly tyto vztahy pozorovány.

V mezenterálních mízních uzlinách přispěla suplementace organické formy selenu ke zvýšení četnosti výskytu mírné hyperplazie LN. Podobně jako v povrchových mízních uzlinách byl také v mezenterálních mízních uzlinách pozorován vztah mezi celulizací a šíří medulárních trámců. Při zvyšující se dávce selenu se zvyšovala četnost výskytu úzkých medulárních trámců a klesala silná celulizace medulárních trámců. Při suplementaci anorganické formy selenu byly v mezenterálních mízních uzlinách častěji pozorovány MFP.

Abdo (1994) pozoroval u myši (B6C3F1) a potkanů (F344/N) suplementovaných 32 mg Na₂SeO₃/l pitné vody snížený počet lymfocytů v mízní uzlině a snížení velikosti LN. V našich experimentech jsme prokázali při suplementaci organické formy selenu nezávisle na dávce atrofii LN a parakotexu, ale vždy pouze u jednoho zvířete z experimentální skupiny. Suplementací vysoké dávky organického i anorganické formy selenu nebyly v mízních uzlinách telat (O'Toole a Raisbeck, 1995) a jehňat (Tiwary et al., 2006) prokázány patologické změny.

5.3.2 Histologické nálezy v Peyerových placích

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 12)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

V pěti případech (83 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň (světlejší germinativní centra se suspektními antigen prezentujícími makrofágy (APM) a makrofágy fagocytující apoptotická tělíska (TBM). Diseminované a agregované MFP byly patrné ve třech případech (50 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla pozorována ve třech případech (50 %).

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

V šesti případech (100 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Agregované MFP byly patrné ve čtyřech případech (67 %) a ve dvou případech (33 %) byly tyto buňky diseminované. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Ve čtyřech případech (67 %) byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu. Depozita hyalinní substance se vyskytovala u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Ve čtyřech případech (67 %) byly diseminované a ve třech případech (50 %) agregované MFP. Barvením dle Ziehl-Neelsona byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. V pěti případech (83 %) byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu. Depozita hyalinní substance byla pozorována u jednoho zvířete (17 %).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami se nevyskytovaly rozdíly v antigenní aktivaci lymfatické tkáně, v četnosti výskytu agregovaných MFP a ve výskytu depozit hyalinní substance. Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň byla pozorována u šesti zvířat (100 %) skupin 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) a 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva). U skupiny 1 (bez suplementace selenem) byla antigenně aktivovaná tkáň pozorována u pěti králíků (83 %). Depozita hyalinní substance byla pozorována u jednoho zvířete (17 %) skupin (2 a 3) suplementovaných selenem. Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla patrná u pěti králíků (83 %) skupiny 3, u čtyř králíků (67 %) skupiny 2. U skupiny bez suplementace selenem byla výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu pozorována u třech pokusných zvířat (50 %). Diseminované MFP se nejčastěji vyskytovaly u skupiny 3 (čtyři králíci; 83 %). U skupiny 1 byly diseminované MFP pozorované u třech zvířat (50 %) a u skupiny 2 u dvou zvířat (33 %).

Tabulka 12 Histologické nálezy v Peyerových placích – anorganická forma Se

Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň	MFP		Depozita hyalinní substance	Exocytóza lymfocytů do epitelu dómu	
	Diseminované	Agregované		Slabá	Výrazná
^a 5/ ^b 6	3/6	3/6	0/6	0/6	3/6
6/6	2/6	4/6	1/6	0/6	4/6
6/6	4/6	3/6	1/6	0/6	5/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; MFP – makrofágy fagocytující pigment

Tabulka 13 Histologické nálezy v Peyerových placích – organická forma Se

Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň	MFP		Depozita hyalinní substance	Exocytóza lymfocytů do epitelu dómu	
	Diseminované	Agregované		Slabá	Výrazná
^a 6/ ^b 6	4/6	4/6	1/6	0/6	3/6
6/6	4/6	4/6	0/6	0/6	3/6
6/6	6/6	6/6	0/6	0/6	3/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; MFP – makrofágy fagocytující pigment

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 13)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Diseminované a agregované MFP byly patrné ve čtyřech případech (67 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin) (Obr. 33). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Ve třech případech (50 %) byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu. Ojedinělá depozita hyalinní substance byla pozorována u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň byla pozorována v šesti případech (100 %). Diseminované a agregované MFP byly patrné ve čtyřech případech (67 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin).

Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Ve třech případech (50 %) byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu.

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla pozorovaná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň (Obr. 4). Diseminované a agregované MFP byly patrné v šesti případech (100 %) (Obr. 15). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán vyšší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány (Obr. 32). Ve třech případech (50 %) byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami se nevyskytovaly rozdíly v antigenní aktivaci lymfatické tkáně, výskytu depozit hyalinní substance a v exocytóze lymfocytů do epitelu dómu. Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň byla pozorována u šesti králíků (100 %) všech experimentálních skupin. Depozita hyalinní substance byla pozorována u jednoho králíka (17 %) skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla patrná u 50 % zvířat všech experimentálních skupin. U skupiny 1 a skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly pozorovány agregované a diseminované MFP u čtyř zvířat (67 %). U skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly diseminované a agregované MFP u šesti zvířat (100 %).

Shrnutí histologických nálezů v Peyerových placích

Peyerovy plaky všech experimentálních zvířat vykazovaly histologickou strukturu odpovídající danému orgánu. Výše dávky ani forma selenu se neuplatnily ve stimulaci ani inhibici aktivace lymfatické tkáně. Ve všech pokusných skupinách obou experimentů byla pozorována nespecifická antigenní aktivace lymfatické tkáně.

Přítomnost MFP nebyla výrazně ovlivněna ani obsahem ani formou selenu v krmivu. MFP se častěji vyskytovaly u jedinců suplementovaných organickou formou selenu. U skupiny s nejvyšší dávkou organické formy selenu (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly MFP patrné u 100 % jedinců. V MFP byl prokázán zvýšený obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Ve většině MFP lze pigment považovat za ceroid. Jeho přítomnost souvisí zejména s deficiencí vitamínu E a se zvýšeným příjmem nenasycených mastných kyselin. Na rozdíl od lipofuscinu, který rovněž patří mezi lipopigmenty, se ceroid vyskytuje i v mitoticky aktivních buňkách, není vázán na vyšší věk, vyskytuje se při

alteraci metabolismu buněk, akumuluje se rychle a bývá přítomen jak intracelulárně, tak i extracelulárně (Jolly et al., 1993). Původ pigmentu je převážně extracelulární. Ceroid je také spojován s oxidačním poškozením buněk (Sitte et al., 2000). Produkce ROS je považována za jeden z možných mechanismů toxického působení selenu (Spallholz, 1997). V našich experimentech nelze přítomnost ceroidu v MFP spojovat s toxickým působením selenu, neboť byl pozorován v MFP u zvířat bez rozdílu dávky selenu.

V Peyerových placích zvířat suplementovaných anorganickou formou selenu byl zjištěn určitý vztah mezi dávkou selenu a množstvím lymfocytů v epitelu dómu. Se vzrůstající dávkou selenu v krmivu rostl výskyt výrazné exocytózy lymfocytů do epitelu dómu. U organické formy selenu tento vztah pozorován nebyl. Tento nález nelze jednoznačně spojit se suplementací selenem. Depozita hyalinní substance byla v experimentu s anorganickou formou selenu pozorována u jednoho zvířete skupiny přijímající selen (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva). V experimentu s organickou formou selenu se depozita hyalinní substance vyskytovala u jednoho zvířete suplementovaného 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva. Depozita hyalinní substance je obtížné interpretovat jak z hlediska etiopatogenetického, tak z hlediska jejich chemické podstaty. Podobné útvary, nazývané Splendore-Hoeppliho fenomén, se vyskytují při některých bakteriálních, parazitárních a houbových infekcích, spojených s tvorbou granulomů, ale také kolem biologicky inertních substancí (Hussein, 2008). Splendore-Hoeppliho fenomén tvoří imunokomplexy, tkáňové zbytky a fibrin (Hussein, 2008). Vzhledem k nepřítomnosti granulomů lze reakci na výše zmíněné typy infekcí v našem experimentu vyloučit.

5.3.3 Histologické nálezy v apendixu

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 14)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

V pěti případech (83 %) byla pozorována antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Ve čtyřech případech (67 %) byly v apendixu agregované a v jednom případě (17 %) diseminované MFP. Barvením dle Ziehl-Neelsona byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Ve třech případech (50 %) byla pozorována výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu.

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

V šesti případech (100 %) byla pozorována antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Agregované MFP byly patrné u šesti zvířat (100 %) a u dvou králíků (33 %) byly tyto buňky diseminované. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla patrná v šesti případech (100 %).

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla pozorována antigenně aktivovaná lymfatická tkáň (Obr. 16). Ve čtyřech případech (67 %) byly patrné agregované MFP. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány (Obr. 31). V pěti případech (83 %) byla pozorována výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu (Obr. 17). U dvou zvířat (33 %) se vyskytovala depozita hyalinní substance.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami se nevyskytovaly rozdíly v antigenní aktivaci lymfatické tkáně a v počtu agregovaných a diseminovaných MFP. U všech zvířat (šest králíků) skupin suplementovaných selenem (2 a 3) byla pozorována antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Ve skupině bez suplementace selenem se vyskytovala antigenně aktivovaná tkáň u pěti zvířat (83 %). Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla pozorována u šesti zvířat (100 %) skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva), u pěti králíků (83 %) skupiny s vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) a u tří zvířat (50 %) skupiny 1 bez suplementace selenem. Depozita hyalinní substance se vyskytovala pouze u dvou zvířat (33 %) skupiny 3.

Tabulka 14 Histologické nálezy v apendixu – anorganická forma Se

Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň	MFP		Depozita hyalinní substance	Exocytóza lymfocytů do epitelu dómu	
	Diseminované	Agregované		Slabá	Výrazná
^a 5/ ^b 6	1/6	4/6	0/6	0/6	3/6
6/6	2/6	6/6	0/6	0/6	6/6
6/6	0/6	4/6	2/6	0/6	5/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; MFP – makrofágy fagocytující pigment

Tabulka 15 Histologické nálezy v apendixu – organická forma Se

Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň	MFP		Depozita hyalinní substance	Exocytóza lymfocytů do epitelu dómu	
	Diseminované	Agregované		Slabá	Výrazná
^a 6/ ^b 6	6/6	6/6	5/6	0/6	6/6
6/6	5/6	5/6	4/6	1/6	5/6
6/6	6/6	6/6	4/6	0/6	6/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; MFP – makrofágy fagocytující pigment

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 15)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Ve všech případech (šest králíků) byly diseminované a místy agregované MFP. V jednom případě (17 %) byly tyto makrofágy početnější. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla pozorována u šesti zvířat (100 %). V pěti případech (83 %) se v apendixu ojediněle vyskytovala depozita hyalinní substance.

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Antigenní aktivace lymfatické tkáně byla patrná v šesti případech (100 %). Ve čtyřech případech (67 %) byly pozorovány diseminované a agregované MFP. V jednom případě (17 %) byly MFP pouze diseminované a v dalším případě (17 %) pouze agregované. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů

(ceroid/lipofuscin) (Obr. 34). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Slabá exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla patrná v jednom případě (17 %), ve zbývajících případech (83 %) byla pozorována naopak výrazná exocytóza do epitelu dómu. Depozita hyalinní substance byla ojediněle pozorována ve čtyřech případech (67 %) (Obr. 18).

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

U šesti zvířat (100 %) byla patrná antigenně aktivovaná lymfatická tkáň. Ve všech případech (šest králíků) byly diseminované a ojediněle agregované MFP. Barvením dle Ziehl-Neelsona byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány. Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla patrná u šesti zvířat (100 %). Depozita hyalinní substance se vyskytovala ve čtyřech případech (67 %).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Různé dávky organické formy selenu nevyvolaly v apendixu experimentálních zvířat rozdíly v histologických nálezech. Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň byla pozorována u šesti králíků (100 %) všech experimentálních skupin. Depozita hyalinní substance byla nejčastěji (pět králíků; 83 %) pozorována u skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). V dalších skupinách 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) se depozita hyalinní substance vyskytovala u čtyř králíků (67 %). Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla pozorována u šesti králíků (100 %) skupin 1 a 3. Ve skupině 2 byla patrná výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu u pěti králíků (83 %). Slabá exocytóza lymfocytů do epitelu dómu byla pozorována u jednoho zvířete (17 %) skupiny 2.

Shrnutí histologických nálezů v apendixu

Podobně jako v Peyerových placích se výše dávky ani forma selenu se neuplatnily ve stimulaci ani v inhibici aktivace lymfatické tkáně apendixu. Green a Albers (1997) pozorovali v GALT divokých kachen suplementovaných vysokou dávkou selenu (20 mg Se/kg krmiva) snížený počet GC a atrofii LN. Podobné změny ve skupinách s vysokými dávkami selenu v našem experimentu potvrzeny nebyly. Četnost MFP nebyla ovlivněna suplementací různých forem a dávek selenu. Oproti Peyerovým plakům v MFP byl patrný nižší obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Suplementace organické formy selenu

přispěla ke zvýšení výskytu hyalinní substance v apendixu. Tato substance byla podobná substanci popisované v Peyerových placích.

5.3.4 Histologické nálezy ve slezině

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 16)

Skupina 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva)

Ve třech případech (50 %) byla patrná mírná a ve dvou případech (33 %) střední hyperplazie periarteriolárních lymfatických plášťů (PALP). Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Ve dvou případech (33 %) byla pozorována na periférii LN a v PALP malá, v dalších dvou případech (33 %) střední a v jednom případě (17 %) výrazná depozita hyalinní substance. Široké sinusy červené pulpy (ČP) byly patrné u dvou zvířat (33 %). Mírná hemosideróza byla pozorována u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Ve čtyřech případech (67 %) byla patrná střední (Obr. 21) a ve dvou případech (33 %) mírná hyperplazie PALP. Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Mírná hyperplazie LN byla pozorována u třech zvířat (50 %). Střední depozita hyalinní substance se vyskytovala na periférii LN a v PALP ve dvou případech (33 %) a malá depozita hyalinní substance ve třech případech (50 %). Mírná extramedulární hemopoieza byla patrná v jednom případě (17 %). Široké sinusy ČP se vyskytovaly u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva)

Střední hyperplazie PALP byla pozorována ve slezině čtyř zvířat (67 %). Mírná hyperplazie PALP a mírná hyperplazie LN byla patrná u jednoho zvířete (17 %). Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Ve dvou případech (33 %) se vyskytovala na periférii LN a v PALP malá, v dalších dvou případech (33 %) střední depozita hyalinní substance. Široké ČP byly patrné u dvou zvířat (33 %).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v četnosti výskytu hyperplazie LN a PALP. V experimentu s anorganickou formou selenu byla pozorována mírná hyperplazie LN pouze u zvířat suplementovaných selenem. Četnější byl výskyt mírné

hyperplazie LN u jedinců skupiny 2 (50 %) s příjmem 0,15 mg Se/kg krmiva. U skupiny 3 dotované vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) byla mírná hyperplazie LN pozorována jen u jednoho zvířete (17 %). Hyperplazie PALP se vyskytovala u zvířat všech pokusných skupin. U skupin králíků suplementovaných selenem převažovala střední hyperplazie (skupiny 2 a 3, v obou případech čtyři králíci ze šesti; 67 %). Ve skupině 1 (0 mg Se/kg sušiny krmiva) byla střední hyperplazie PALP pozorována u dvou králíků (33 %). Mírná hyperplazie PALP byla viditelná u tří králíků (50 %) skupiny 1, ve skupině 2 u dvou zvířat (33 %) a pouze u jednoho zvířete (17 %) náležící do skupiny 3. Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádné z experimentálních skupin. V pokusných skupinách převládal výskyt malých a středních depozit hyalinní substance na periférii LN a v PALP. Malá depozita hyalinní substance byla nejčastěji patrná ve skupině 2 (tři králíci; 50 %). Ve skupině 1 a skupině 3 se malá depozita hyalinní substance vyskytovala u dvou králíků (33 %). Střední depozita hyalinní substance byla viditelná u dvou zvířat (33 %) všech experimentálních skupin. Výrazná depozita hyalinní substance byla pouze u jednoho zvířete (17 %) skupiny 1.

Tabulka 16 Histologické nálezy ve slezině – anorganická forma Se

Skupina	Mírná hyperplazie LN	Hyperplazie PALP		Depozita hyalinní substance			Sinusy ČP	
		Mírná	Střední	Malá	Střední	Výrazná	Zúžené	Široké
1	^a 0/ ^b 6	3/6	2/6	2/6	2/6	1/6	0/6	2/6
2	3/6	2/6	4/6	3/6	2/6	0/6	0/6	1/6
3	1/6	1/6	4/6	2/6	2/6	0/6	0/6	2/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; PALP – periarteriolární lymfatické pláště; ČP – červená pulpa

Tabulka 17 Histologické nálezy ve slezině – organická forma Se

Skupina	Mírná hyperplazie LN	Hyperplazie PALP		Depozita hyalinní substance			Sinusy ČP	
		Mírná	Střední	Malá	Střední	Výrazná	Zúžené	Široké
1	^a 3/ ^b 6	2/6	3/6	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6
2	2/6	2/6	4/6	3/6	0/6	1/6	1/6	0/6
3	3/6	1/6	5/6	2/6	2/6	0/6	0/6	3/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; PALP – periarteriolární lymfatické pláště; ČP – červená pulpa

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 17)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Ve slezině tří zvířat (50 %) byla pozorována střední hyperplazie PALP a u dalších dvou zvířat (33 %) mírná hyperplazie PALP. Mírná hyperplazie LN byla pozorována u tří zvířat (50 %). Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Ve čtyřech případech (67 %) se na periférii LN a v PALP vyskytovala malá depozita hyalinní substance. V jednom případě (17 %) byl pozorován snížený počet LN.

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Střední hyperplazie PALP byla patrná ve čtyřech případech (67 %). Mírná hyperplazie PALP se vyskytovala u dvou zvířat (33 %). Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Mírná hyperplazie LN byla pozorována u jednoho zvířete (17 %). V jednom případě (17 %) se na periférii LN a v PALP vyskytovala výrazná depozita hyalinní substance, v dalších třech případech (50 %) byla tato depozita malá. Hustě celulizované trabekuly ČP byly patrné ve dvou případech (33 %) (Obr. 19). Zúžené sinusy ČP byly pozorovány u jednoho zvířete (17 %).

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Střední hyperplazie PALP byla pozorována ve slezině pěti zvířat (83 %). U jednoho zvířete (17 %) se vyskytovala mírná hyperplazie PALP. Výrazná hyperplazie PALP nebyla pozorována u žádného z pokusných zvířat. Ve slezině tří zvířat (50 %) byla patrná mírná hyperplazie LN. Ve dvou případech (33 %) se vyskytovala na periférii LN a v PALP malá, v dalších dvou případech (33 %) středně velká depozita hyalinní substance. U jednoho zvířete (17 %) byly patrné širší, hustě celulizované trabekuly ČP. Sinusy ČP byly široké ve třech případech (50 %) (Obr. 20).

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami byly patrné rozdíly v četnosti výskytu hyperplazie LN, hyperplazie PALP, depozitech hyalinní substance a v širokých sinusech ČP. Nejčastěji byla mezi zvířaty pozorována střední hyperplazie PALP. U skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) se střední hyperplazie PALP vyskytovala u pěti králíků (83 %), u skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byla patrná u čtyř králíků (67 %) a u skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) u tří králíků (50 %). Mírná hyperplazie PALP byla pozorována u dvou

zvířat (33 %) skupiny 1 a skupiny 2. U skupiny 3 se mírná hyperplazie PALP vyskytovala u jednoho zvířete (17 %). Mírná hyperplazie LN byla pozorována u tří zvířat (50 %) skupiny 1 a skupiny 3. Ve skupině 2 byla patrná mírná hyperplazie LN u dvou jedinců (33 %). Ve slezině králíků převládala na periferii LN a v PALP malá depozita hyalinní substance. Při porovnání mezi jednotlivými skupinami bylo nejméně malých depozit hyalinní substance pozorováno u skupiny 3 (u dvou zvířat; 33 %), naopak nejvíce u skupiny 1 (u čtyř zvířat; 67 %). Ve skupině 2 se depozita hyalinní substance vyskytovala u tří králíků (50 %). Střední depozita hyalinní substance se vyskytovala pouze u skupiny 3 (dva králíci; 33 %) a výrazná depozita hyalinní substance byla patrná pouze u skupiny 2 (jeden králík; 17 %). Široké sinusy ČP byly patrné pouze u tří králíků (50 %) skupiny 3.

Shrnutí histologických nálezů ve slezině

V našich experimentech nebyly prokázány jednoznačné vztahy mezi histologickou stavbou sleziny a formou či dávkou selenu. V experimentu s anorganickou formou selenu byl pozorován zvýšený výskyt střední hyperplazie PALP u zvířat suplementovaných selenem (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva). U organické formy selenu se vzrůstající dávkou (0,15; 0,3 a 4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) rostl výskyt střední hyperplazie PALP. Dané výsledky by mohly poukazovat na pozitivní působení selenu na proliferace T lymfocytů, kterou popisují autoři Hoffmann et al. (2010). V našem případě se však spíše jednalo o nespecifickou antigenní aktivaci.

Peng et al. (2011b) při suplementaci vysokými dávkami anorganické formy selenu (5, 10, 15 mg Se/kg krmiva) popisují depleci lymfocytů v LN, PALP a kongesci ČP. Podobně Johnson et al. (2000) u myši suplementovaných 9 mg Se/kg krmiva (Na_2SeO_3) prokázali sníženou celularitu v bílé pulpě. Abdo (1994) popisuje ve slezině potkanů (F344/N) dotovaných 32 mg Na_2SeO_3 /l (14,6 mg Se/l) pitné vody snížený počet lymfocytů, snížení velikosti LN a PALP. V našem případě jsme u žádného zvířete suplementovaného vysokou dávkou organické (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) i anorganické formy selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) nepozorovali výše zmíněné změny. Získané výsledky se shodují s Tiwaryem et al. (2006), kteří suplementovali ovce vysokými dávkami Na_2SeO_3 (1; 2; 3 a 4 mg Se/kg živé hmotnosti) a selenomethionu (1; 2; 3; 4; 6 a 8 mg Se/kg živé hmotnosti). Rovněž O'Toole a Raisbeck (1995) nepozorovali při suplementaci telat vysokými dávkami (5, 10 a 25 mg Se/kg krmiva) anorganické (Na_2SeO_3) a organické formy selenu (selenomethionin) žádné patologické změny sleziny (atrofii nebo splenomegalii).

Peng et al. (2012) při suplementaci kuřat Se deficitní dietou (0,00342 mg/kg krmiva) potvrdili depleci lymfocytů v LN, PALP a kongesci ČP. Lymfocytodepleci také popisují Felix et al. (2004) u selen deficitních myší. Naše výsledky nejsou ve shodě s těmito autory, u žádného králíka skupiny bez suplementace selenem nebyla pozorována lymfocytodeplece a kongesce ČP.

Na periferii LN a v PALP sleziny experimentálních zvířat se nacházela hyalinní substance podobná substanci popisované v dalších lymfatických orgánech.

5.3.5 Histologické nálezy v thymu

Experiment s anorganickou formou selenu

U žádné skupiny nebyly pozorovány patologické změny

Tabulka 18 Histologické nálezy v thymu – organická forma Se

Skupina	TBM	Mírně hypocelulární		MFP
		Kůra	Dřeň	
1	^a 0/6 ^b	0/6	0/6	0/6
2	1/6	1/6	1/6	1/6
3	2/6	0/6	1/6	4/6

^a počet zvířat s nálezem; ^b celkový počet zvířat; TBM – makrofágy fagocytující apoptotická tělíčka; MFP - makrofágy fagocytující pigment

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 18)

Skupina 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva)

Nebyly pozorovány žádné patologické změny.

Skupina 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

V jednom případě (17 %) se v thymu vyskytovaly TBM, v dalším případě (17 %) byla místy mírně hypocelulární kůra i dřeň thymu. Diseminované MFP byly pozorovány u jednoho zvířete (17 %). Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Skupina 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva)

Mírně hypocelulární dřeh byla patrná u jednoho zvířete (17 %). Ve dvou případech (33 %) byly viditelné suspektní TBM. V jednom případě (17 %) byly ve dřeni diseminované MFP, v dalším případě (17 %) se tyto buňky ve větším počtu vyskytovaly zejména na hranici kůry a dřeh. U dvou zvířat (33 %) se MFP vyskytovaly ojedinele. Barvením dle Ziehl-Neelsova byl v MFP prokázán nízký obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Fosfolipidy nebyly PFAS reakcí prokázány.

Porovnání histologických nálezů mezi skupinami

Mezi jednotlivými skupinami nebyly patrné výrazné rozdíly v histologických nálezech v thymu. Suspektní TBM byly pozorovány u dvou zvířat (33 %) skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a u jednoho zvířete (17 %) skupiny 2 (0,30 mg Se/kg sušiny krmiva). U skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) nebyly TBM pozorovány. Mírně hypocelulární kůra a dřeh thymu byla patrná u jednoho zvířete skupiny 2. U skupiny 3 se u jednoho zvířete (17 %) vyskytovala mírně hypocelulární dřeh. MFP byly patrné u čtyř zvířat (67 %) skupiny 3 a u jednoho zvířete (17 %) skupiny 2.

Shrnutí histologických nálezů v thymu

Peng et al. (2011a) pozorovali u kuřat suplementovaných vysokými dávkami anorganické formy selenu (5, 10 a 15 mg Se/kg krmiva) lymfocytodepleci a kongesci thymu. Autoři dále popisují vztah mezi zvyšující se dávkou selenu a progresí patologických lézí. Podobně Abdo (1994) pozoroval lymfocytodepleci kůry thymu u potkanů (F344/N) a laboratorních myší (B6C3F1) při dotaci 14,6 mg Se/l pitné vody. Dále však uvádí, že při suplementaci nižších dávek (0,9; 1,8; 3,7; 7,3 mg Se/l) nepozoroval výše uvedené změny.

U experimentálních králíků suplementovaných vysokou dávkou anorganické formy selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) nebyly výše popisované léze pozorovány. Naše výsledky se shodují s autory O'Toolem a Raisbeckem (1995), kteří nezaznamenali při vysokých dávkách (5; 10 a 25 mg Se/kg krmiva) organické a anorganické formy selenu patologické změny v thymu. U zvířat suplementovaných organickou formou selenu v dávce 0,3 mg Se/kg sušiny krmiva jsme pozorovali v jednom případě makrofágy fagocytující apoptotická tělíska (TBM), dále mírně hypocelulární kůru a dřeh thymu. Při suplementaci vysoké dávky organické formy selenu (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly pozorovány TBM u dvou experimentálních zvířat a u jednoho zvířete mírně hypocelulární

dřeň thymu. Tyto nálezy nelze jednoznačně dát do souvislosti se suplementací selenem. TBM jsou běžně v thymu pozorovány (De Waal et al., 1997). Na druhé straně oxidační stres vyvolaný vysokými dávkami selenu je předpokládanou příčinou mitochondriálního poškození a zvýšení apoptózy buněk a také zvýšení počtu TBM (Kim et al., 2003; Elmore, 2006b).

Peng et al. (2011a) pozorovali u kuřat dotovaných selen deficitní dietou (0,00342 mg/kg krmiva) lymfocytodepleci kůry a dřeň thymu. K podobným nálezům dospěli Marsh et al. (1986), avšak pouze při současném deficitu selenu a vitamínu E.

U skupiny králíků bez suplementace selenem nebylo pozorováno snížení počtu lymfocytárních buněk. Naše výsledky jsou v souladu s Abdo (1994), který u myši (B6C3F1) a potkanů (F344/N) bez suplementace selenem nepozoroval změny ve stavbě thymu.

5.4 Imunohistochemické vyšetření

5.4.1 Průkaz CD79 v mízních uzlinách

5.4.1.1 Průkaz CD79 v krčních mízních uzlinách

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 19)

CD79⁺ buňky byly patrné v oblasti LN, v medulárních trámčích a medulárních sinusech, ojediněle v parakortexu mízních uzlin. Vysoká intenzita reakce byla pozorována v oblasti plášťové zóny germinativních center (GC) a v primárních LN. GC vykazovala reakci slabou. Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk se lišilo v oblasti medulárních sinusů a medulárních trámců. V medulárních sinusech byla četnost těchto buněk nejvyšší ve skupině 1 (bez suplementace selenem) (25 %), naopak nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk bylo u skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) (15%). Ve skupině 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) CD79⁺ buňky tvořily 20 % buněk medulárních sinusů. V medulárních trámčích skupin 2 a 3 CD79⁺ buňky představovaly 35 % buněčné populace. Nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk bylo pozorováno u skupiny 1 (5 %) (Obr. 22).

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 20)

CD79⁺ buňky byly patrné v oblasti LN, v medulárních trabekulách a medulárních sinusech, ojediněle v parakortexu mízních uzlin. Distribuce CD79⁺ buněk v medulárních sinusech a medulárních trámčích byla rozdílná. V medulárních sinusech skupiny 1 (0,15

mg Se/kg sušiny krmiva) a skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) CD79⁺ buňky představovaly 50 % buněčné populace této oblasti. V medulárních sinusech skupiny 2 (0,3mg Se/kg sušiny krmiva) byl pozorován nepatrně vyšší počet CD79⁺ (60 %). V medulárních trámčích bylo nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk u skupiny 2 (20 %), nejvyšší u skupiny 1 (50 %). Ve skupině 3 CD79⁺ buňky tvořily 40 % buněk medulárních trámců.

5.4.1.2 Průkaz CD79 v popliteálních mízních uzlinách

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 19)

Distribuce CD79⁺ buněk v popliteálních mízních uzlinách byla podobná jako v krčních mízních uzlinách. V medulárních sinusech všech skupin představovaly CD79⁺ buňky 50 % buněčné populace. Nejvyšší (40 %) zastoupení CD79⁺ buněk v medulárních trámčích bylo patrné u skupiny 1 bez suplementace selenem, naopak nejnižší (20 %) u skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). Ve skupině 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) CD79⁺ tvořily 25 % buněk medulárních trámců.

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 20)

CD79⁺ buňky byly patrné v oblasti LN, v medulárních trabekulách a medulárních sinusech, ojediněle v parakortexu mízních uzlin. V medulárních sinusech CD79⁺ tvořily 40 % buněk skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva), 25 % buněk skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a 60 % buněk skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva). V medulárních trámčích bylo pozorováno nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk u skupiny 1 (20 %), nejvyšší zastoupení u 3. skupiny (50 %) a u 2. Skupiny bylo 35 % (Obr. 23, 24).

Tabulka 19 Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk v lymfatických orgánech – anorganická forma Se

Skupina	Apendix		Peyerovy plaky		Křční mízní uzlina		Popliteální mízní uzlina	
	Korona	Dóm	Korona	Dóm	Medulární sinusy	Medulární trámce	Medulární sinusy	Medulární trámce
1	90	50	80	25	25	5	50	40
2	85	45	85	30	15	35	50	20
3	80	40	85	35	20	35	50	25

Tabulka 20 Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk v lymfatických orgánech – organická forma Se

Skupina	Apendix		Peyerovy plaky		Křční mízní uzlina		Popliteální mízní uzlina	
	Korona	Dóm	Korona	Dóm	Medulární sinusy	Medulární trámce	Medulární sinusy	Medulární trámce
1	80	40	80	35	50	50	40	20
2	80	50	80	40	60	20	25	35
3	85	50	85	65	50	40	60	50

5.4.2 Průkaz CD79 v Peyerových placích

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 19)

CD79⁺ buňky se vyskytovaly zejména v oblasti dómu, korony a plášťové zóny GC. Vyšší četnost CD79⁺ buněk byla pozorována v koruně než v dómu. U skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) a skupiny 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) CD79⁺ buňky tvořily 85 % populace buněk korony, u skupiny 1 (bez suplementace selenem) 80 %. Nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk v dómu vykazovala skupina 1 (25 %), naopak nejvyšší zastoupení CD79⁺ buněk bylo patrné u skupiny 3 (35 %). U skupiny 2 CD79⁺ buňky představovaly 30 % buněk dómu. U všech pokusných skupin se v epitelu dómu ojediněle nacházely CD79⁺ buňky. CD79⁻ buňky osídlovaly interfolikulární oblast (IFO) (Obr. 28).

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 20)

CD79⁺ buňky osídlovaly zejména oblast dómu, korony a plášťové zóny GC. Dóm i korona byly tvořeny směsnou populací CD79⁺ a CD79⁻ buněk. U skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) a 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) vykazovalo 80 % buněk pozitivní reakci. U skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) bylo 85 % buněk v oblasti korony CD79⁺. Nejnižší zastoupení (35 %) CD79⁺ buněk v oblasti dómu bylo pozorováno ve skupině 1, naopak nejvyšší (65 %) zastoupení CD79⁺ buněk u skupiny 3. Skupina 2 měla v této oblasti 40 % pozitivních buněk. V epitelu dómu skupiny 1 byl pozorován častý výskyt CD79⁺. CD79⁻ buňky formovaly IFO (Obr. 29).

5.4.3 Průkaz CD79 v apendixu

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 19)

CD79⁺ buňky osídlovaly oblast dómu, korony a plášťové zóny GC. Ve světlé zóně GC bylo zastoupení CD79⁺ buněk nižší. Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk v dómu a koruně se lišilo. V koruně bylo nejnižší (80 %) zastoupení CD79⁺ buněk u skupiny 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva), naopak nejvyšší (90 %) u skupiny 1 (bez suplementace selenem). U skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) tyto buňky představovaly 85 % buněčné populace korony. Oblast dómu se skládala ze směsné populace CD79⁺ a CD79⁻. U skupiny 1 CD79⁺ buňky tvořily 50 %, u skupiny dva 45 % buněk dómu. Nejnižší zastoupení CD79⁺ buněk bylo

pozorováno u skupiny 3 (40 %). CD79⁺ buňky se bez rozdílu skupin ojediněle vyskytovaly v epitelu dómu. CD79⁻ buňky se nacházely v IFO apendixu (Obr. 25).

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 20)

CD79⁺ buňky se nacházely zejména v dómu, koruně a plášťové zóně GC. Ve světlé zóně GC byla reakce slabá. Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk v koruně bylo u skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) a skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) 80 %, u skupiny 2 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) 85 %. Oproti koruně bylo v oblasti dómu zastoupení CD79⁺ nižší. U skupin 2 a 3 CD79⁺ buňky tvořily 50 % a u skupiny jedna 40 % buněčné populace dómu. Ve všech skupinách se ojediněle vyskytovaly CD79⁺ buňky v epitelu dómu. CD79⁻ buňky tvořily IFO (Obr. 26, 27).

5.4.4 Průkaz CD79 ve slezině

Experiment s anorganickou formou selenu (Tabulka 19)

CD79⁺ buňky byly patrné v LN a jako směsná populace s CD79⁻ buňkami v marginální zóně. Vysokou intenzitu reakce vykazovaly primární LN a plášťová zóna GC. V marginální zóně byla intenzita reakce u všech zvířat střední a v GC nízká. CD79⁺ buňky se nevyskytovaly v PALP. Pouze u skupiny 1 (bez příjmu selenu) se ojediněle v ČP vyskytovaly CD79⁺ buňky (Obr. 30).

Experiment s organickou formou selenu (Tabulka 20)

Ve slezině se CD79⁺ buňky vyskytovaly v LN a jako směsná populace s CD79⁻ buňkami v marginální zóně. Primární LN a plášťová zóna GC vykazovaly vysokou intenzitu reakce, střední intenzita reakce byla pozorována v marginální zóně. V GC byla intenzita reakce nízká. PALP byly tvořeny CD79⁻ buňkami.

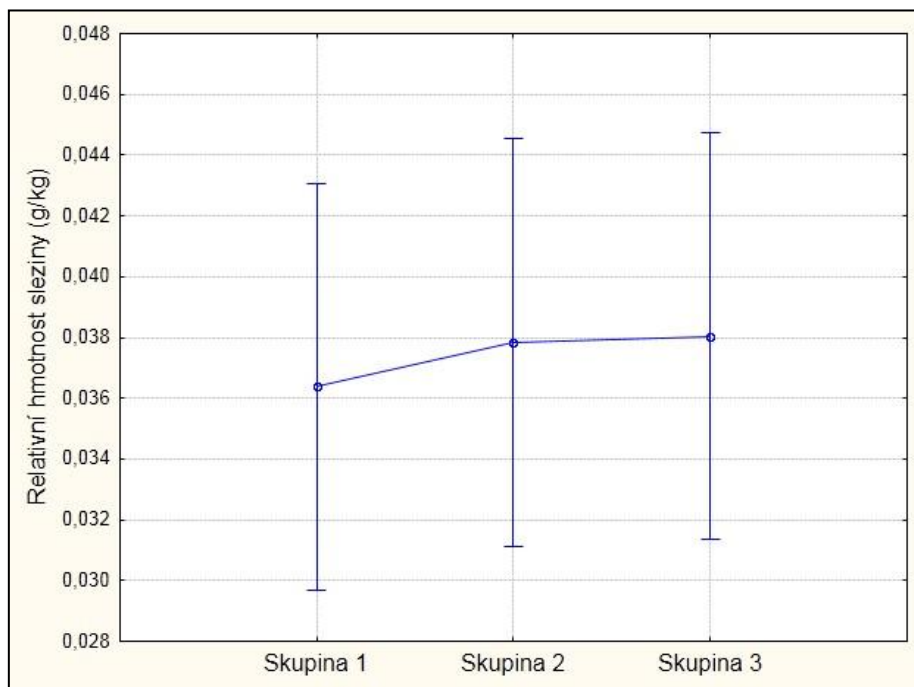
Shrnutí imunohistochemického vyšetření

Pouze v oblasti dómu Peyerových plaků byl pozorován vztah mezi četností CD79⁺ buněk a dávkou selenu. Se zvyšující se dávkou selenu rostl počet CD79⁺ buněk v této oblasti zejména při suplementaci organické formy selenu. Tento nález by mohl nasvědčovat tomu, že při suplementaci organické formy selenu v dávce vyšší nežli je doporučena (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) dochází ke stimulaci transformace buněk B řady. Tento nález je však

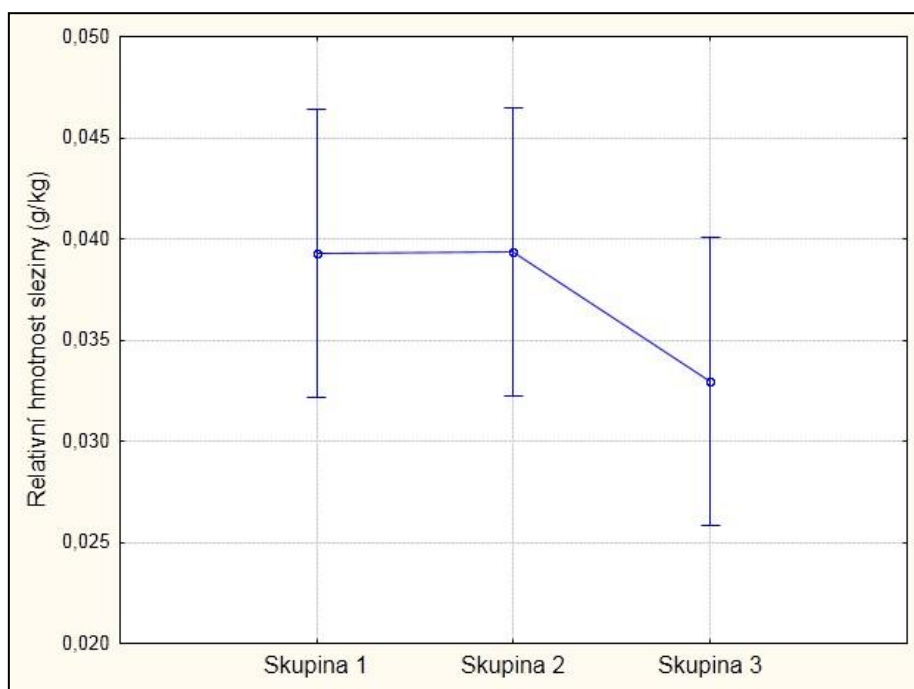
nespecifický, souvisí s nespecifickou antigenní stimulací. V dalších vyšetřovaných lymfatických orgánech nebyl pozorován jednoznačný vztah mezi dávkou a formou selenu a četností CD79⁺ buněk.

5.5 Relativní hmotnost sleziny pokusných králíků

Graf 5 Průměrná relativní hmotnost sleziny s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



Graf 6 Průměrná relativní hmotnost sleziny s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se

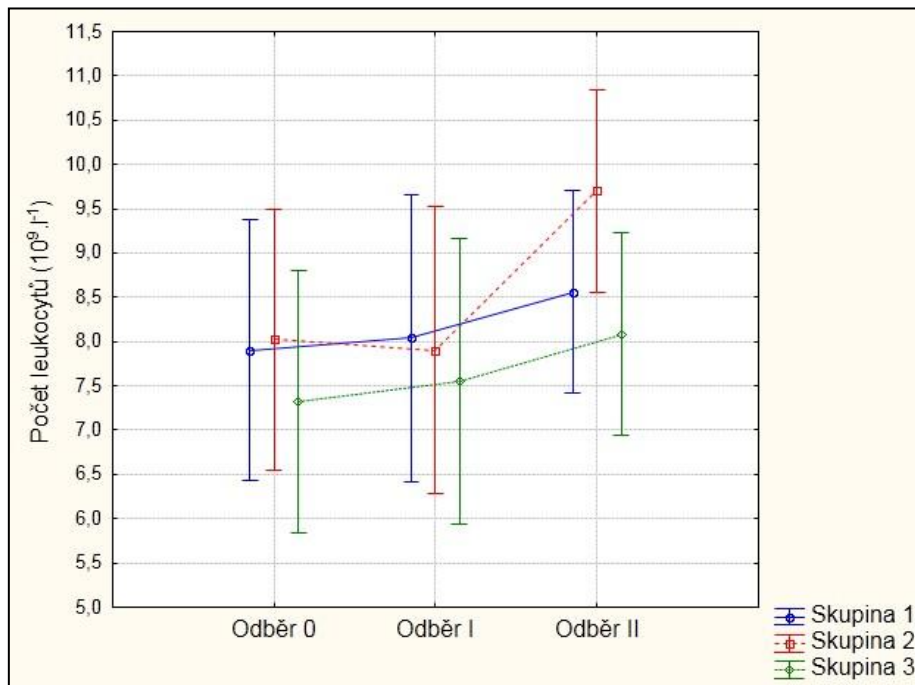


Hmotnost sleziny je považována za citlivý parametr imunotoxicity (Elmore, 2006a). Velmi vysoká a naopak velmi nízká dávka selenu v krmivu vede ke snížení relativní hmotnosti sleziny. Při aplikaci anorganické formy selenu (Na_2SeO_3) v množství vyšším než 5 mg/kg krmiva došlo u kuřat k poklesu relativní hmotnosti sleziny v porovnání s kontrolní skupinou (Peng et al., 2011b). Také Johnson et al. (2000) prokázali u myši při dávce 9 mg Se/l pitné vody signifikantní snížení hmotnosti sleziny. V našem experimentu s anorganickou formou selenu byla u pokusné skupiny s nejvyšším přísunem selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) zaznamenána naopak nejvyšší relativní hmotnost sleziny (Graf 5). V pokusu s organickou formou selenu jsme u skupiny s nejvyšší dávkou selenu (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) prokázali pokles relativní hmotnosti sleziny, který však nebyl statisticky významný (Graf 6). Obdobně, sice malý, ale měřitelný úbytek hmotnosti sleziny zaznamenali u myši s příjmem 0,5 mg Se/kg krmiva Benko et al. (2012). Johnson et al. (2000) vliv zvýšených dávek organické formy selenu (Seleno L methioninu v dávce 1, 3 a 9 mg/l pitné vody) na relativní hmotnost sleziny myši nepotvrdili.

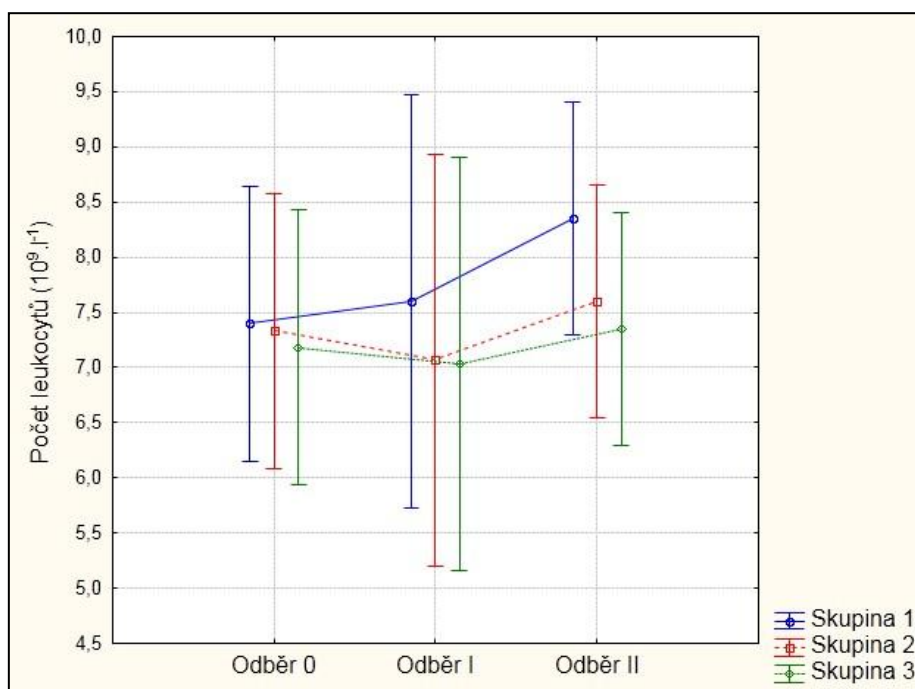
Při zkrmování velmi nízké dávky selenu (0,0342 mg Se/kg krmiva) kuřatům byla zjištěná relativní hmotnost sleziny signifikantně nižší v porovnání se skupinou kontrolní (0,2 mg Se/kg krmiva) (Peng et al., 2011a; Peng et al., 2012). V našem experimentu byly zaznamenány podobné výsledky, kdy skupina bez přídatku selenu měla nižší relativní hmotnost sleziny oproti skupině s doporučeným množstvím selenu (0,15 mg Se/kg sušiny) v krmné dávce. Uvedený pokles relativní hmotnosti sleziny nebyl statisticky významný (Graf 5). V našich experimentech nebylo zvýšení nebo snížení hmotnosti sleziny doprovázeno histologickými změnami ve slezině.

5.6 Počet leukocytů v krvi

Graf 7 Průměrný počet leukocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



Graf 8 Průměrný počet leukocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se



Průměrné počty leukocytů se u všech skupin v obou experimentech nacházely na začátku i v průběhu pokusů v referenčním rozmezí 5,2 – 16,5 $10^9/l$ uváděné Zimmerman et al. (2010).

Dynamika počtu leukocytů v krvi králíků v experimentu se suplementací anorganické formy selenu (Graf 7) byla přes odlišný statisticky nevýznamný počet leukocytů na začátku pokusu u všech skupin obdobná. Po jednoměsíční suplementaci byla zaznamenána nevýznamná změna v podobě mírného poklesu nebo vzestupu nepřevyšující počáteční hodnoty o více než 3 %, a následné, opět statisticky nevýznamné, zvýšení na konci pokusu. Nejvyšší vzestup, a to o 17,3 % oproti počáteční hodnotě, byl u skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny), nejnižší u skupiny 1 bez suplementace selenem (7,8 %). Mezi jednotlivými skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$). Naše výsledky jsou blízké údajům Turana et al. (1997), kteří v experimentu s anorganickou formou selenu nezjistili statisticky významné rozdíly v počtu leukocytů u králíků krmných selen deficitní dietou.

V experimentu s dotací organické formy selenu (Graf 8) byl v počtu leukocytů zaznamenán obdobný trend jako v pokusu s dotací anorganické formy selenu. Vzestup počtu leukocytů nebyl však na konci pokusu tak výrazný jako v předcházejícím experimentu: nejvyšší nárůst počtu leukocytů (12,4 %) byl u skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny), nejnižší (2,2 %) u skupiny 2 (0,3 mg Se/kg sušiny), u skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny) byl pouze 3,6 %. Mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné rozdíly.

Přesto, že v obou pokusech došlo k již zmíněnému mírnému vzestupu počtu leukocytů u všech pokusných skupin, a to bez ohledu na formu a množství selenu v krmivu, byl relativně nejvyšší vzestup zaznamenán u skupin s příjmem 0,15 mg anorganické nebo organické formy selenu v kg sušiny krmiva a naopak, nejnižší vzestup u skupin s vyšším obsahem selenu v krmivu (4,3 a 9 mg/kg). Literární údaje o vlivu selenu respektive různých forem selenu na počty leukocytů nejsou jednoznačné. Například Hawkes et al. (2001) pozorovali 5% snížení počtu leukocytů u skupiny mužů s vysokou dávkou a naopak 10% zvýšení u skupiny s nízkou dávkou selenu. Rampal et al. (2008) uvádějí, že dlouhodobé podávání Na_2SeO_3 (0,1 a 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti) zapříčiňuje u telat progresivní a na dávce selenu závislé snížení počtu cirkulujících leukocytů se současným poklesem cirkulujících neutrofilů. Naopak Hu et al. (1984) nezaznamenali žádné podstatné změny v počtech bílých krvinek u potkanů s příjmem 0,1 mg respektive 1 mg Se/kg sušiny krmiva. Obdobně Písek et al. (2008) nezaznamenali markantní rozdíly v počtu leukocytů u jalových,

březích nebo laktujících bahnic v případě diety obsahující v 1 kg sušiny 0,16 mg Se v organické nebo anorganické formě.

5.7 Počet lymfocytů a neutrofilů v krvi

Následující grafy (Graf 9, 10) znázorňují procentuální zastoupení lymfocytů a neutrofilů (Graf 11, 12) podílejících se rozhodujícím způsobem na celkovém počtu leukocytů.

Přes odlišnou tendenci v relativním zastoupení lymfocytů charakterizovanou v případě anorganické formy selenu nevýznamným poklesem a následně mírným vzestupem ke konci pokusu a v případě organické formy selenu vzestupem v průběhu celého pokusu, je pro oba pokusy společný nález nejnižšího zastoupení lymfocytů u skupin s nejvyšším příjmem selenu. V experimentu s anorganickou formou selenu došlo u skupiny 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) po měsíční suplementaci k poklesu relativního zastoupení lymfocytů o 10,4 % ($p < 0,05$) a o 8,2 % na konci pokusu. Tento pokles však neměl žádný vztah k histologickým nálezům v lymfatických orgánech. V případě organické formy selenu (Graf 12) bylo u skupiny 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) ve srovnání se zbývajícími dvěma skupinami významně nižší zastoupení lymfocytů ($p < 0,05$ resp $p < 0,01$) již měsíc po zahájení pokusu a na konci pokusu dosahoval rozdíl v zastoupení lymfocytů mezi skupinami 8 až 11 %.

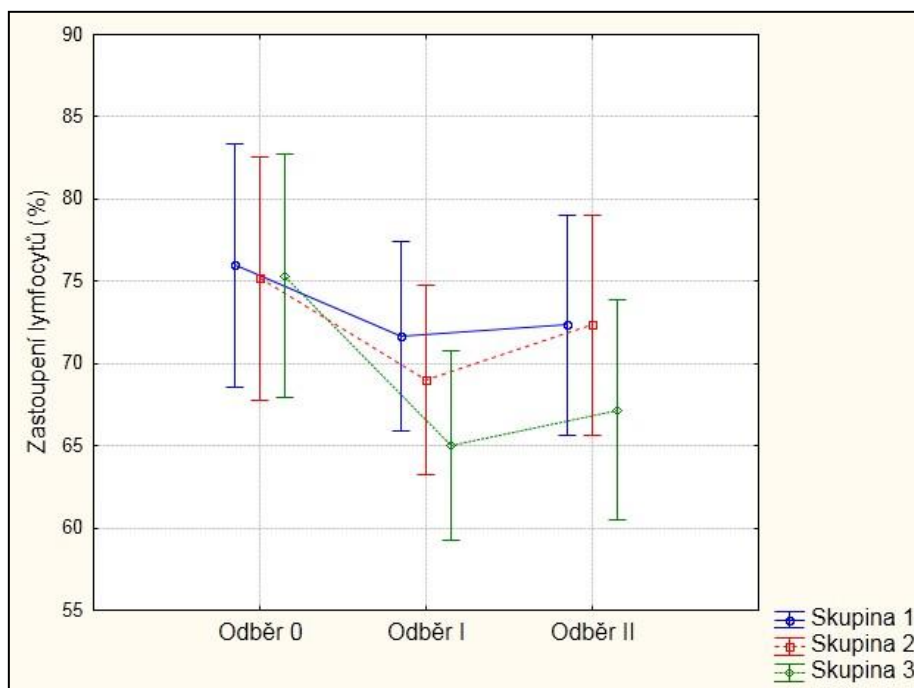
Spíše obrácená tendence byla v relativním podílu neutrofilů: vzestup v případě anorganické formy selenu po měsíční suplementaci, Graf 11 (u skupin 2 a 3 $p < 0,05$) a jeho následující pokles ke konci pokusu a pokles v případě suplementace organické formy selenu v průběhu celého pokusu, Graf 12 (u skupiny 1 $p < 0,05$). Ve srovnání s nejnižším zastoupením lymfocytů u skupin s nejvyšší dotací selenu (Graf 9, 10) bylo zastoupení neutrofilů v průběhu pokusu u těchto skupin naopak nejvyšší.

Většina literárních údajů o vlivu různých dávek selenu na změny v leukogramu spíše referuje o vzestupu nebo přechodném vzestupu lymfocytů a poklesu procentuálního zastoupení neutrofilů. Například Turan et al. (1997) pozorovali u králíků v souvislosti s vysokým obsahem anorganické formy selenu v dietě (4,2 mg/kg krmiva) významný vzestup lymfocytů a pokles neutrofilů. Hawkes et al. (2001) zaznamenali pouze přechodné zvýšení lymfocytů o 17 % u mužů suplementovaných vysokou dávkou selenu a na konci experimentu mírné zvýšení u skupin s vysokou i nízkou suplementací. Rampal et al. (2008) poukazují na vysokou negativní korelaci ($r = 0,94$) mezi koncentrací selenu v krvi a počtem neutrofilů v krvi telat. Naše výsledky korespondují s uvedenými literárními údaji při podávání diety

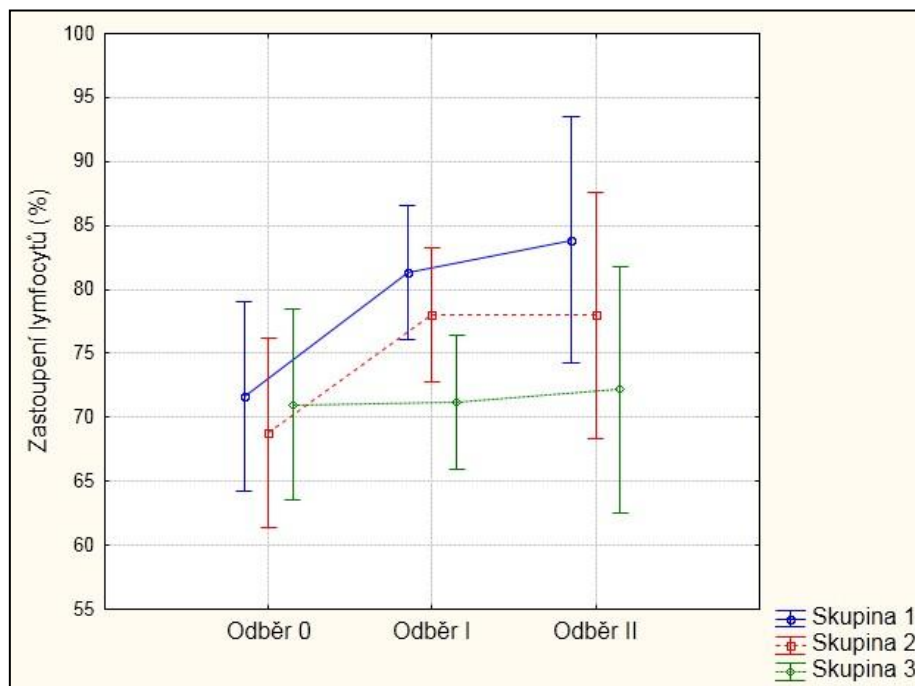
s organickou formou selenu, v případě zkrmování anorganické formy selenu nejsou naše výsledky s literárními odkazy vždy ve shodě.

Ve srovnání s referenčním rozmezím uváděné Zimmermanem et al. (2010) byly námi zjišťované hodnoty lymfocytů spíše vyšší a hodnoty neutrofilů nižší, a to u všech skupin v obou pokusech.

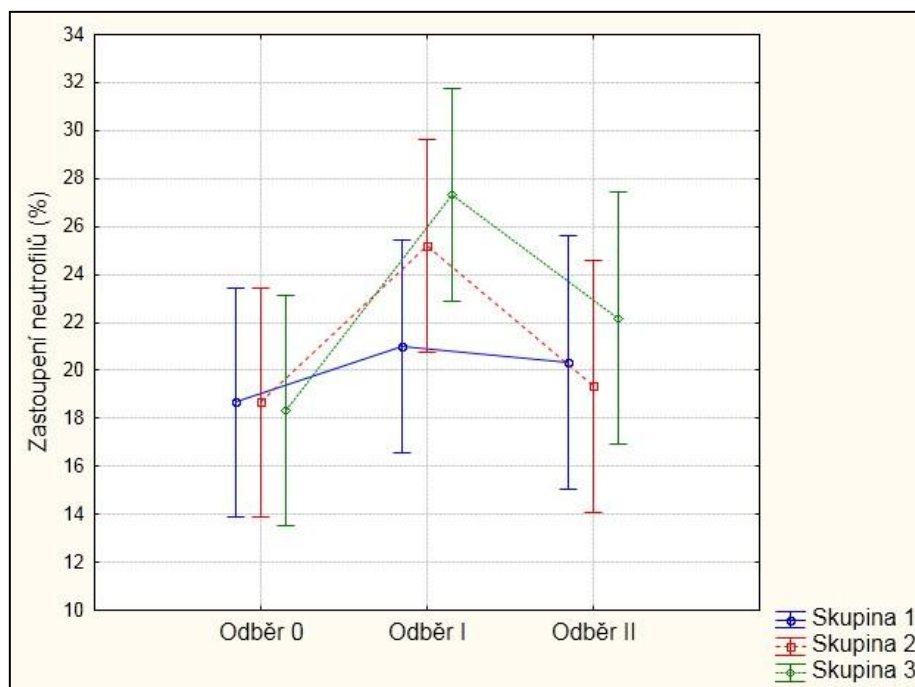
Graf 9 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



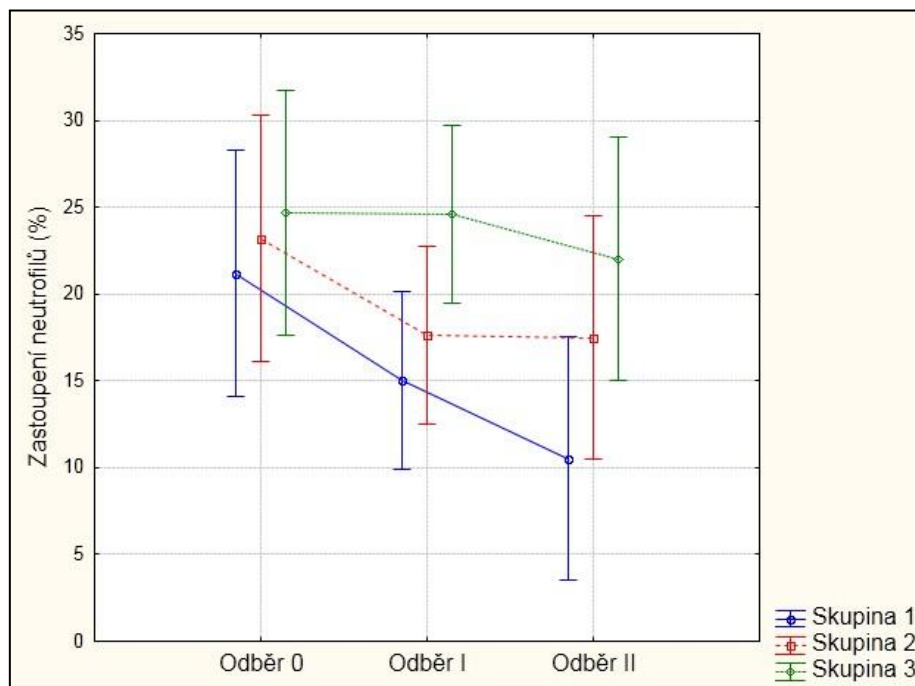
Graf 10 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se



Graf 11 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se

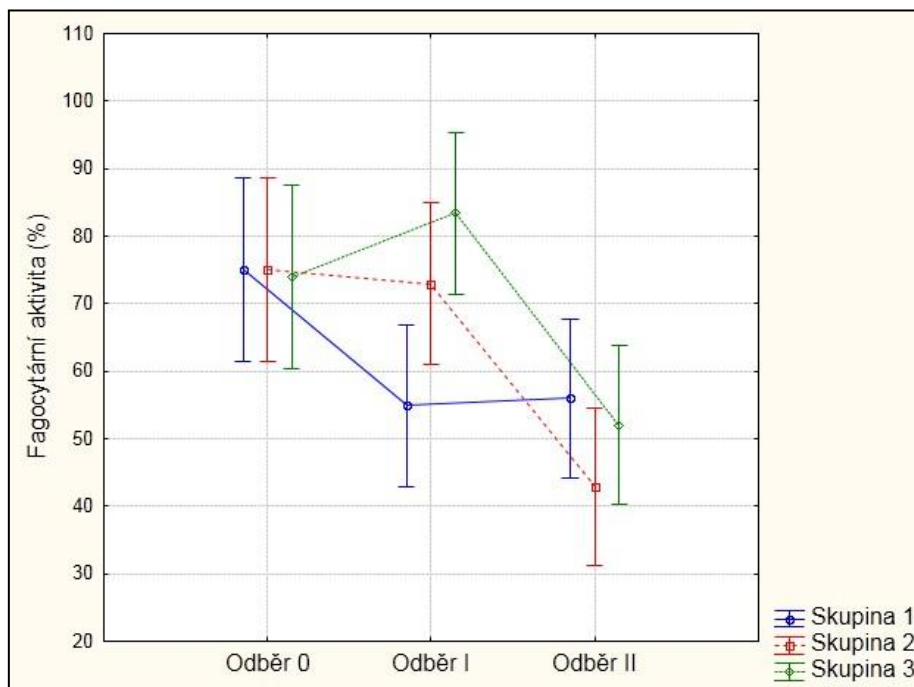


Graf 12 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi s odchylkami (průměr $\pm 0,95$ interval spolehlivosti) – organická forma Se

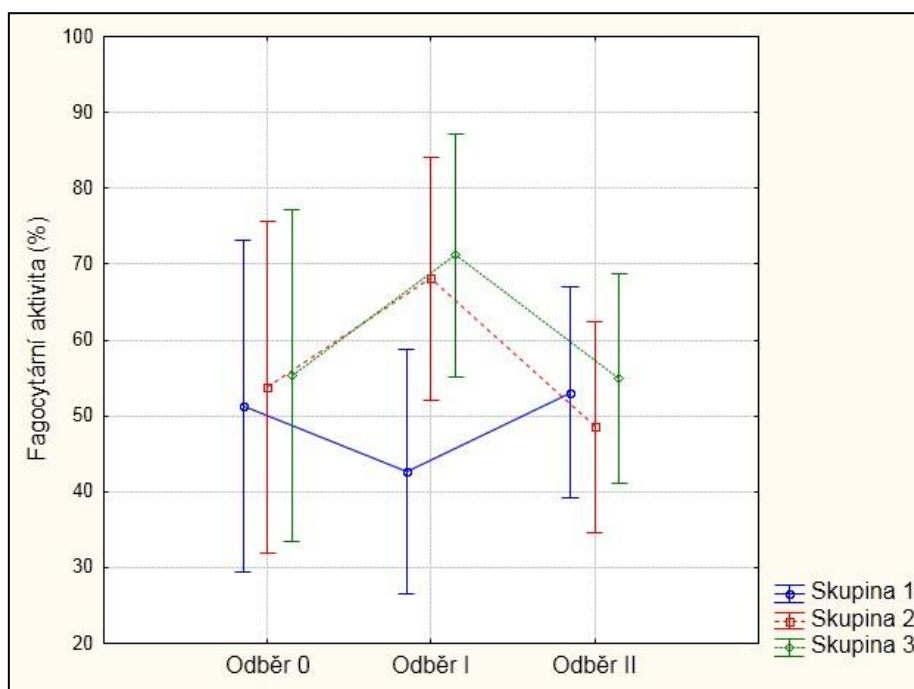


5.8 Fagocytární aktivita

Graf 13 Průměrná fagocytární aktivita s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se



Graf 14 Průměrná fagocytární aktivita s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se



V experimentu s anorganickou formou selenu byl bez ohledu na jeho úroveň v krmné dávce zaznamenán ke konci pokusu viditelný pokles fagocytární aktivity neutrofilů (Graf 13). Tento pokles byl statisticky významný ($P < 0,05$) pouze u skupiny 2 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). U skupiny 3 (9 mg Se/kg sušiny krmiva) byl pozorován přechodný statisticky nevýznamný vzestup a následný statisticky významný ($P < 0,05$) pokles fagocytární aktivity neutrofilů. U zvířat suplementovaných organickou formou selenu (Graf 14) došlo u skupin 2 (0,3 mg Se/kg sušiny krmiva) a 3 (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) ke statisticky nevýznamnému přechodnému vzestupu a následnému mírnému poklesu fagocytární aktivity na konci experimentu. Oproti skupinám 2 a 3 byl u skupiny 1 (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) trend fagocytární aktivity opačný a připomínal průběh fagocytární aktivity u skupiny 1 v experimentu s anorganickou formou selenu.

Vzhledem k velké individuální variabilitě fagocytární aktivity již při zahájení pokusu, nelze její mírný přechodný vzestup (skupina 2 a 3) a pokles hodnotit jako významné ovlivnění fagocytární aktivity neutrofilů aplikací selenu.

Vzhledem k tomu, že výsledky byly dosaženy za použití inertních partikulí, tedy metodou nereceptorově zprostředkované fagocytózy, nelze vyloučit, že při použití metody receptorově zprostředkované fagocytózy budou výsledky odlišné. Pro porovnání s literárními údaji lze uvést výsledky Ibeaghata et al. (2009), kteří nepozorovali statisticky významný rozdíl fagocytární aktivity při použití *E coli* mezi skupinami s anorganickou (0,3 a 0,5 Se/kg sušiny v podobě Na_2SeO_3) a organickou formou selenu (0,3 a 0,5 Se/kg sušiny v podobě Sel-Plexu). Obdobně Boyene a Arthur (1979) nepozorovali rozdíl ve fagocytóze *C. albicans* u selen deficitních a selenem suplementovaných zvířat.

6 SOUHRN A ZÁVĚR

Selen je důležitým faktorem, který stimuluje imunitní systém. Předkládaná disertační práce se zabývala vlivem formy a dávky selenu na strukturu lymfatických orgánů králíků. Sledována byla rovněž koncentrace selenu v krevním séru, celkový počet leukocytů, neutrofilů, lymfocytů a rovněž fagocytární aktivita neutrofilů. Předmětem pozorování byla také hmotnost zvířat v průběhu experimentu.

Byly provedeny dva devítitýdenní experimenty, do nichž bylo zařazeno vždy 18 králíků (tři skupiny po šesti zvířatech) plemene činčila velká z konvečního chovu.

V prvním experimentu byla použita anorganická forma Se v podobě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) v dávkách 0; 0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva, ve druhém experimentu organická forma selenu v podobě selenizované řasy rodu *Chlorella* v dávkách 0,15; 0,3 a 4,3 mg Se/kg sušiny krmiva.

V průběhu experimentu byla v pravidelných intervalech (0, 4 a 9 týden) odebírána krev z *vena auricularis* za účelem stanovení obsahu selenu v krevním séru, (celkový počet leukocytů, počet lymfocytů a neutrofilů) a funkčních parametrů imunitního systému (fagocytární aktivita neutrofilů). Při odběru byli králíci také váženi.

Po uplynutí devíti týdnů byla zvířata utracena, pitvána a odebrány vzorky k histologickému a imunohistochemickému vyšetření (thymus, mízní uzliny (krční - retrofaryngeální, mezenteriální, popliteální), Peyerovy plaky, apendix a slezina), dále byla zjištěna hmotnost sleziny.

Vzorky byly zpracovány běžnou histologickou technikou, obarveny hematoxylinem a eozinem a v indikovaných případech byla provedena PFAS reakce a barvení dle Ziehl-Neelsena. Pro stanovení CD79 buněk bylo využito křížové reaktivity primární monoklonální myší protilátky proti humánímu CD79acy.

V průběhu experimentů nebyly prokázány žádné klinické příznaky související s deficitem nebo naopak toxickým působením selenu.

Koncentrace selenu v krevním séru

Podle předpokladu byl prokázán pozitivní vliv suplementace selenu na koncentraci tohoto prvku v krevním séru. Avšak statisticky významný ($P < 0,05$) nárůst koncentrace selenu byl pozorován pouze po čtyřtýdenní suplementaci, v dalším průběhu pokusů již ke statisticky významnému zvýšení jeho obsahu v krevním séru nedošlo.

Živá hmotnost zvířat

V průběhu experimentu nebyl prokázán statisticky významný vliv použitých dávek a forem selenu na hmotnost králíků. Nezávisle na dávce a formě selenu byl trend růstu a zvyšování hmotnosti obdobný.

Histologická stavba lymfatických orgánů

Makroskopicky jsme nezaznamenali patologické změny vnitřních orgánů experimentálních zvířat. Jednoznačný vliv selenu na histologickou stavbu lymfatických orgánů jsme neprokázali ani v jednom z našich experimentů.

V Peyeroých placích a apendixu nebyl pozorován žádný rozdíl v nespecifické antigenní aktivaci lymfatické tkáně těchto orgánů.

Ve slezině jsme v souvislosti se zvyšující se dávkou selenu pozorovali zvyšující se podíl střední hyperplazie PALP. Také suplementace anorganické formy selenu vedla ke zvýšení výskytu střední hyperplazie PALP. Tyto nálezy jsou však nespecifické, neboť nebyla provedena cílená antigenní stimulace lymfatického systému.

V popliteálních a mezenterálních mízních uzlinách bylo při suplementaci organické formy selenu v souvislosti se zvyšující se dávkou pozorována vyšší četnost zúžených, nízcelykulizovaných medulárních trámčů. Tento nálezy by mohl naznačovat negativní dopad vyšších dávek selenu na transformaci buněk v mízních uzlinách.

Forma ani dávka selenu neměla vliv na strukturu thymu.

Zaznamenali jsme rovněž, že struktura povrchových mízních uzlin často zcela neodpovídala uspořádání u domácích zvířat. Na rozdíl od jiných lymfatických orgánů byl v makrofázích Peyeroých plaků pozorován zvýšený podíl lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Z experimentů bylo také patrné, že suplementace organické formy selenu přispěla ke zvýšení výskytu hyalinní substance v apendixu.

Imunohistochemické vyšetření

Se zvyšující se dávkou organické formy selenu rostl výskyt CD79⁺ buněk v dómu Peyeroých plaků.

Celkový počet leukocytů

Počet leukocytů v krvi se v průběhu experimentů pohyboval v rozmezí referenčních hodnot. Mezi jednotlivými experimentálními skupinami s organickou i anorganickou formou selenu nebyl přes odlišnou dynamiku v průběhu experimentu sledován statisticky významný rozdíl.

Fagocytární aktivita

V experimentu s anorganickou formou selenu byl na konci experimentu pozorován statisticky významný pokles fagocytární aktivity pouze u skupiny s doporučenou dávkou selenu (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva). U skupiny s vysokou dávkou selenu (9 mg Se/kg sušiny) byl pozorován statisticky významný pokles fagocytární aktivity pouze mezi druhým a třetím odběrem. U experimentu s organickou formou selenu nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve fagocytární aktivitě neutrofilů. Fagocytární aktivita byla již na začátku experimentu značně variabilní, proto nelze zjištěné statisticky významné rozdíly považovat při hodnocení působení suplementace selenem na fagocytární aktivitu neutrofilů králíků za relevantní.

Hmotnost sleziny

Relativní hmotnost sleziny nebyla významně ovlivněna ani dávkou ani formou selenu. Tento ukazatel však považujeme za značně nespolehlivý, neboť hmotnost sleziny neovlivňují pouze patologické změny sleziny.

Počty lymfocytů a neutrofilů

Nebyl prokázán statisticky významný vliv selenu na procentuální zastoupení lymfocytů a neutrofilů.

Neprokázali jsme účinek různých forem a dávek selenu v rozmezí 0,15 - 9 mg Se/kg sušiny krmné dávky na imunitní systém králíků ani jeho toxické působení.

Pro další výzkum doporučujeme:

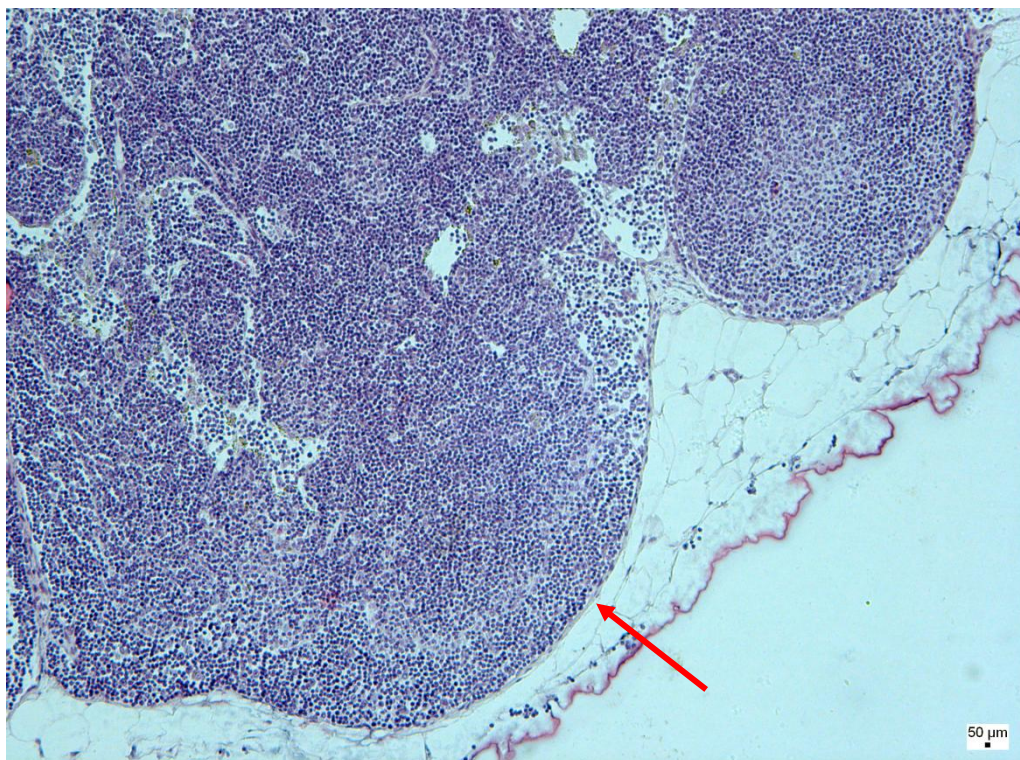
Vzhledem k negativním nálezům v histologické stavbě lymfatických orgánů při daných dávkách selenu, doporučujeme dále se zaměřit na stanovení počtu buněk imunitního systému v buněčné suspenzi lymfatických orgánů za použití průtokové cytometrie.

Průtokovou cytometrií by bylo rovněž možno sledovat jednotlivé populace a subpopulace lymfocytů v krvi v průběhu experimentu.

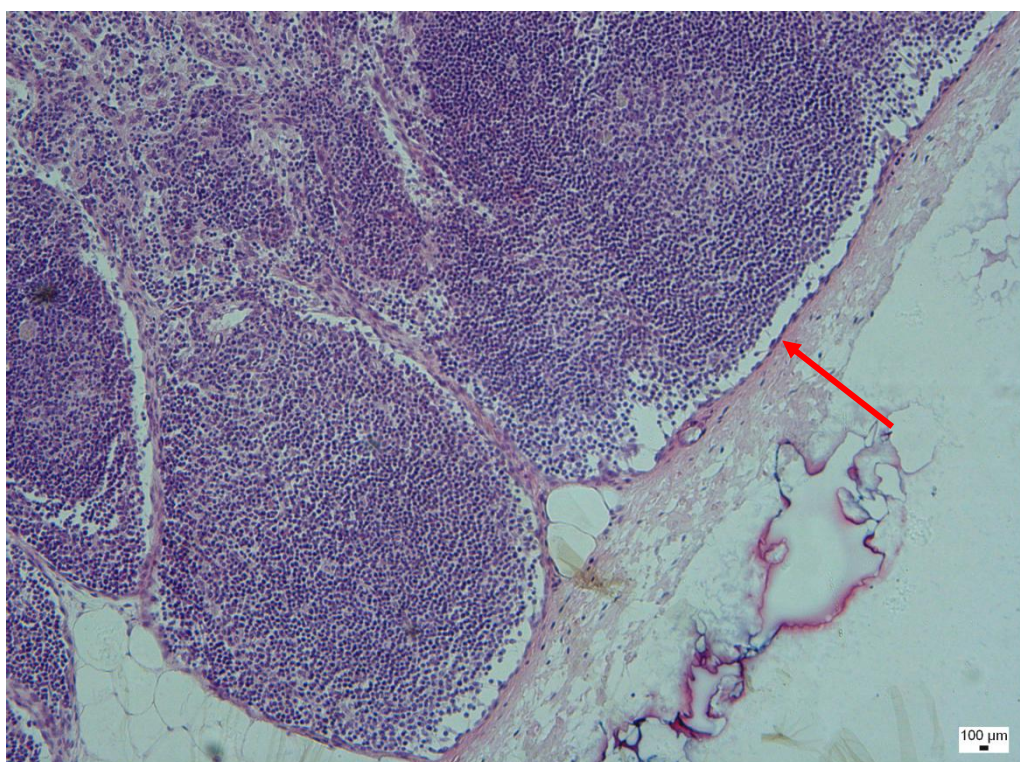
Vzhledem k tomu, že se nepotvrdil účinek různých forem a dávek selenu v rozmezí 0,15 - 9 mg Se/kg sušiny krmné dávky, doporučujeme při studii vlivu selenu na imunitní systém králíků vyšší dávky 10-15mg Se/kg sušiny a do pokusu zařadit více experimentálních zvířat.

Rozdílné výsledky by mohlo přinést použití specifické antigenní stimulace imunitního systému králíků.

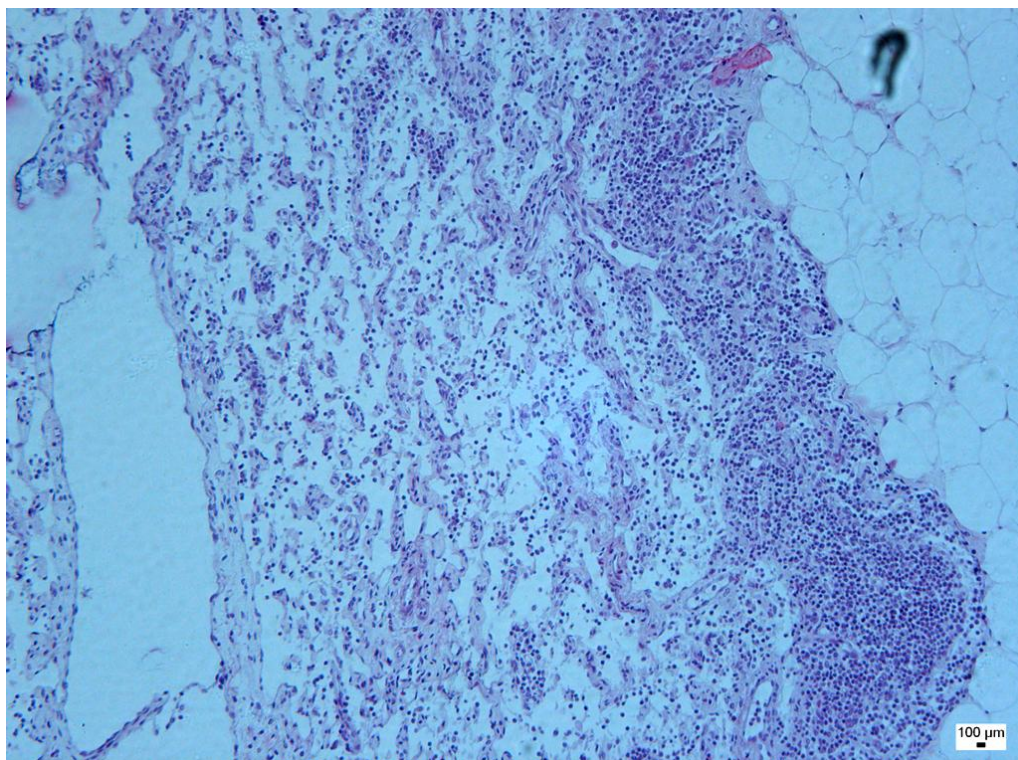
7 OBRAZOVÁ PŘÍLOHA



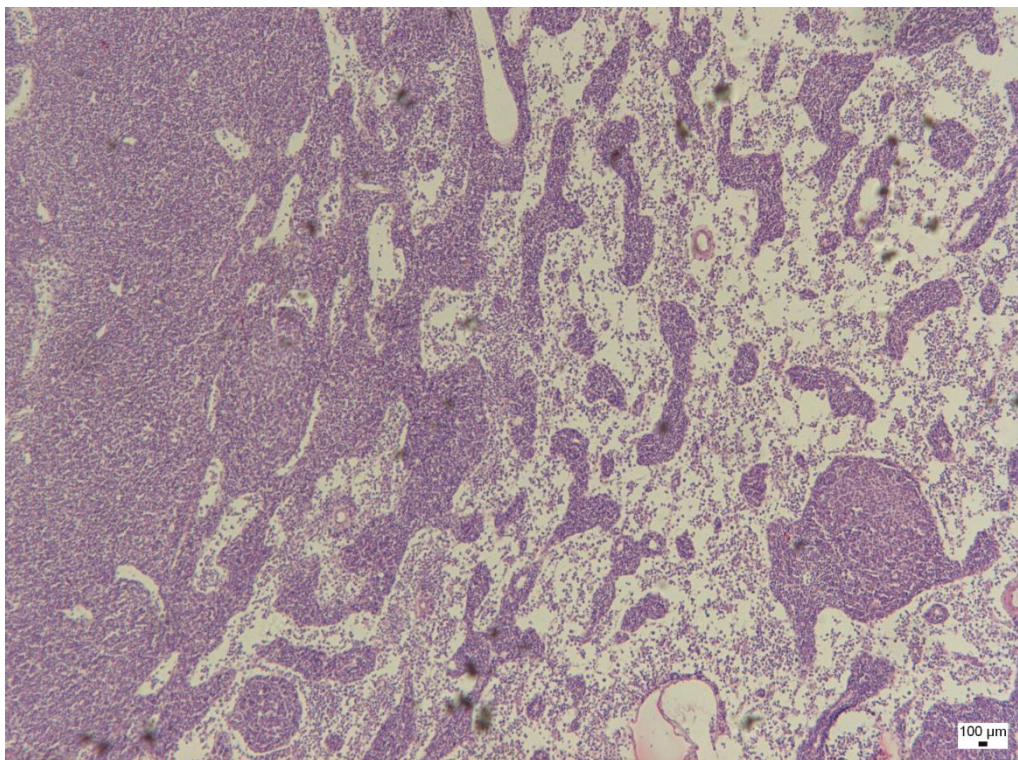
Obr. 1 Výrazná celulizace subkapsulárních sinusů v mezenteriální mizní uzlině (1. skupina – organická forma Se), HE.



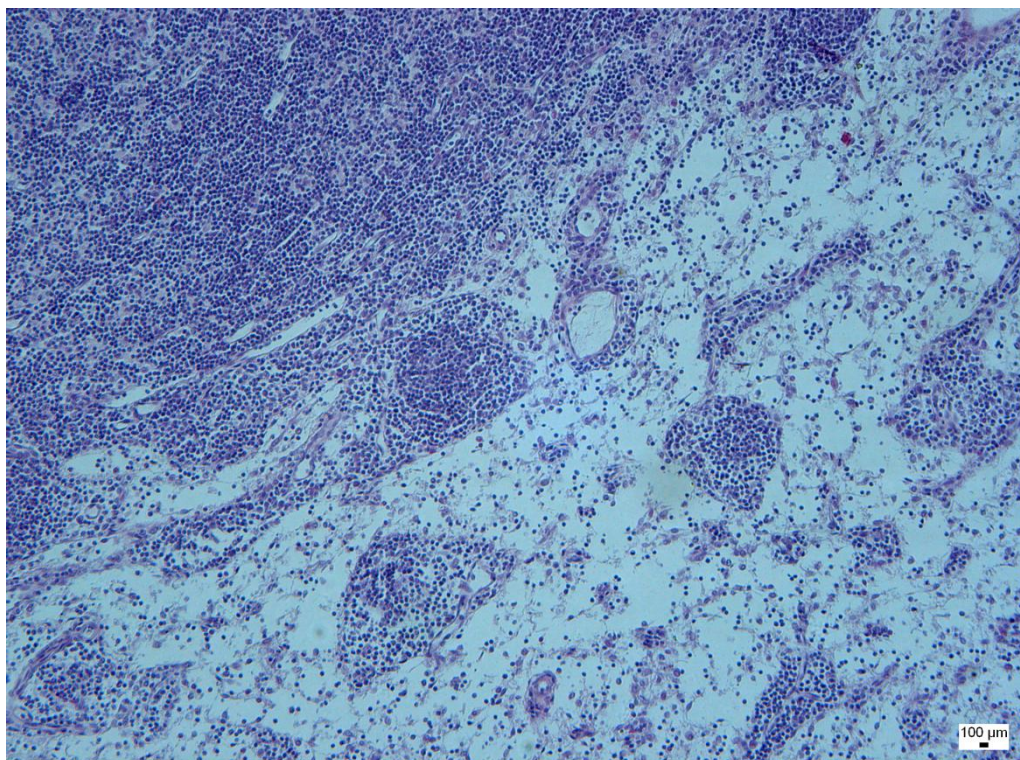
Obr. 2 Slabá celulizace subkapsulárních sinusů v krční mizní uzlině (3. skupina – organická forma Se), HE.



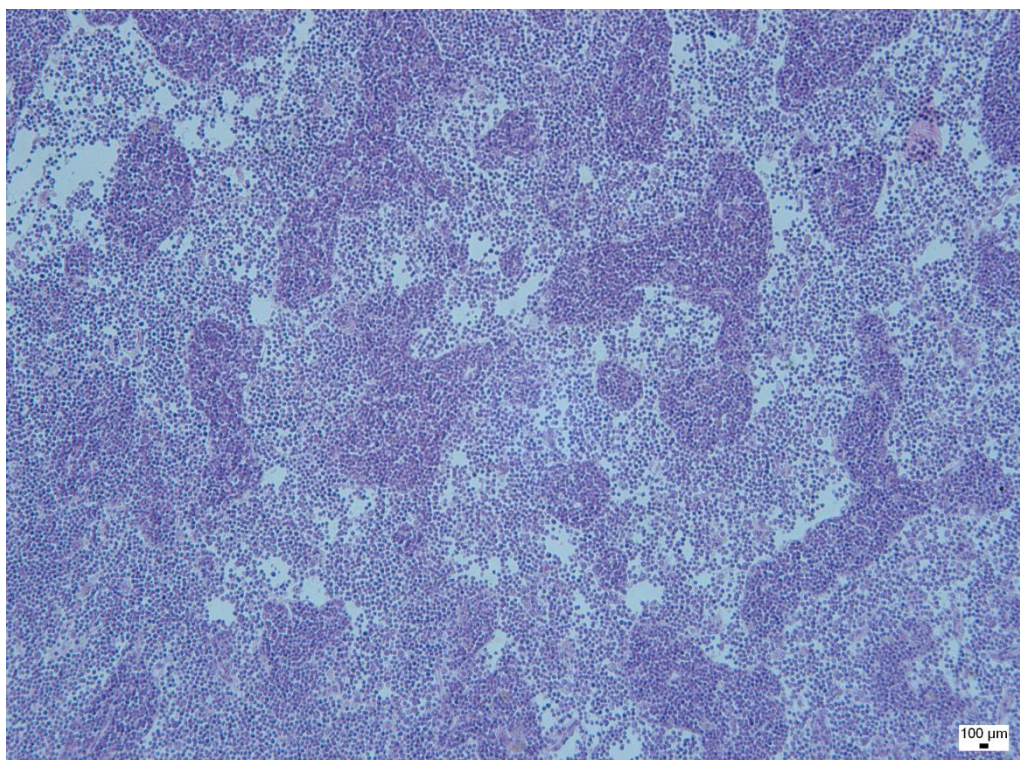
*Obr. 3 Slabá celulizace medulárních trámčů popliteální mízní uzliny
(2. skupina – organická forma Se), HE.*



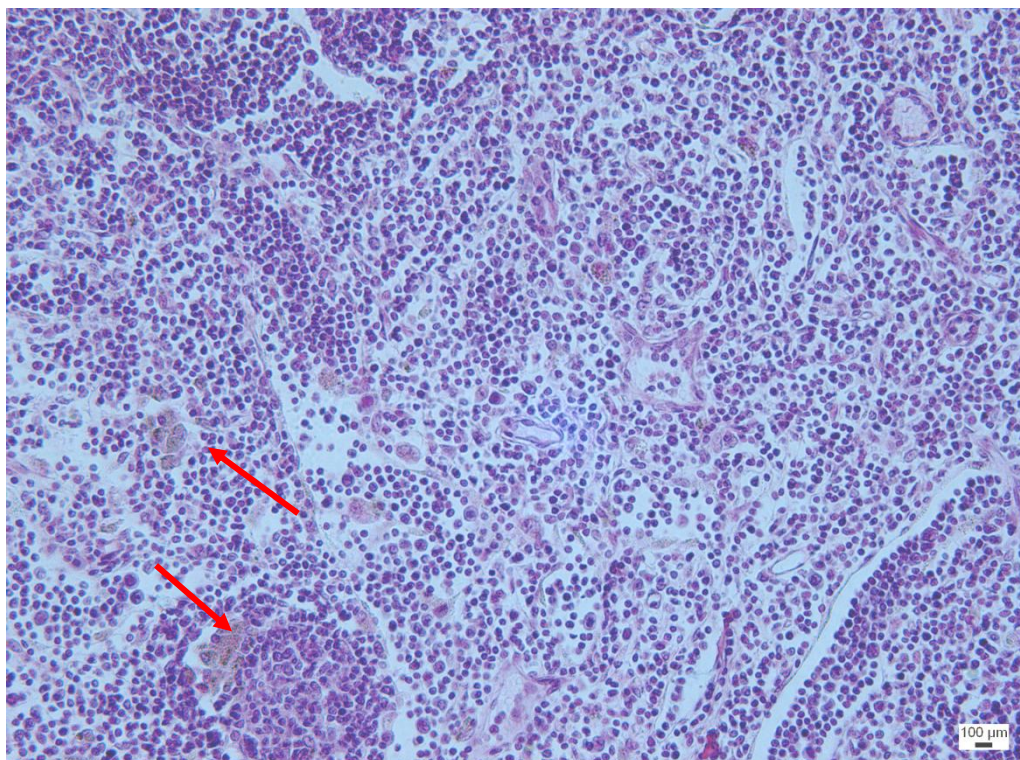
*Obr. 4 Výrazná celulizace medulárních trámčů mezenterické mízní uzliny
(2. skupina – organická forma Se), HE.*



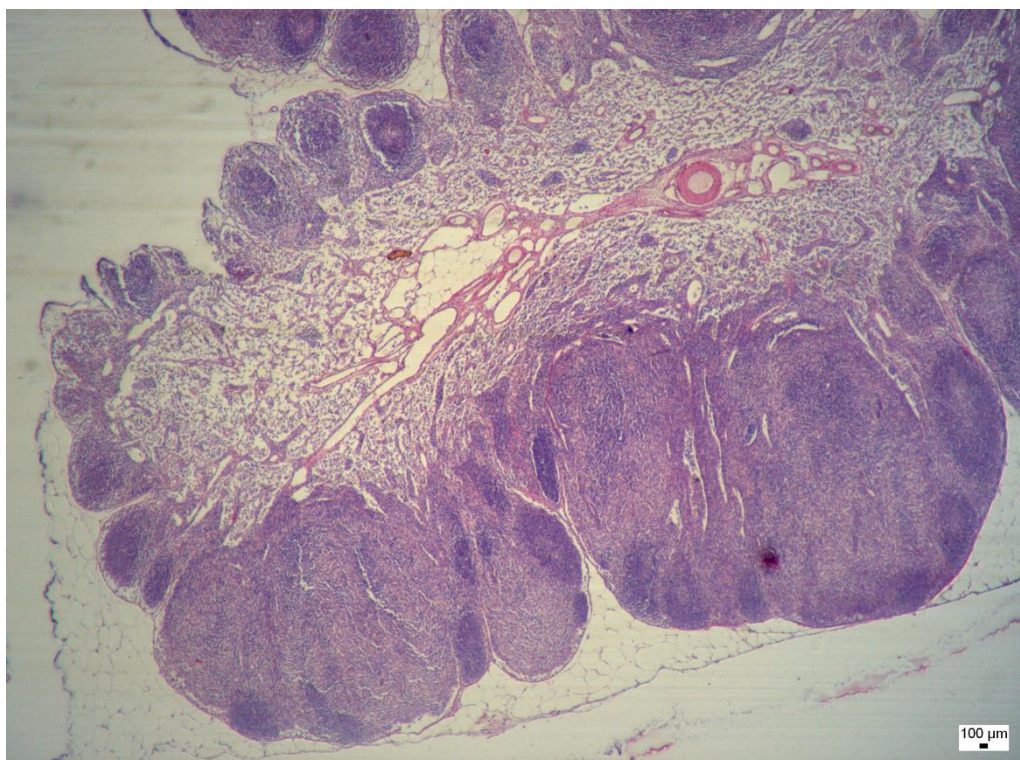
*Obr. 5 Nízká celulizace medulárních sinusů v krční mízní uzlině
(1. skupina – organická forma Se), HE.*



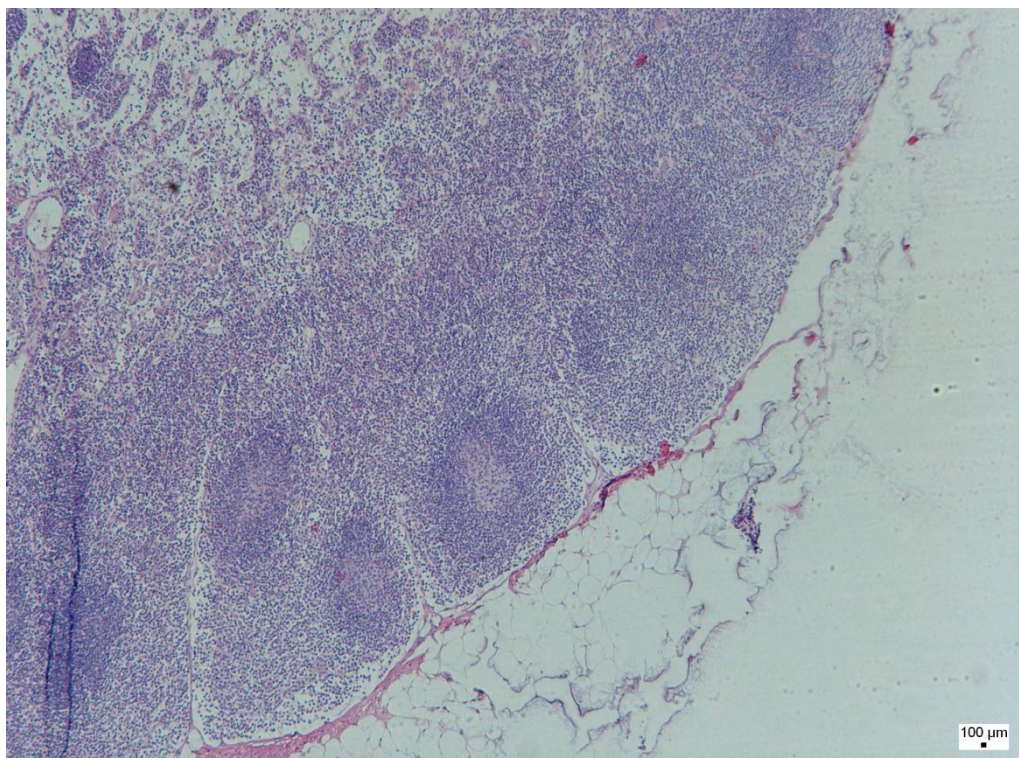
*Obr. 6 Silná celulizace medulárních sinusů v mezenterální mízní uzlině
(2. skupina – organická forma Se), HE.*



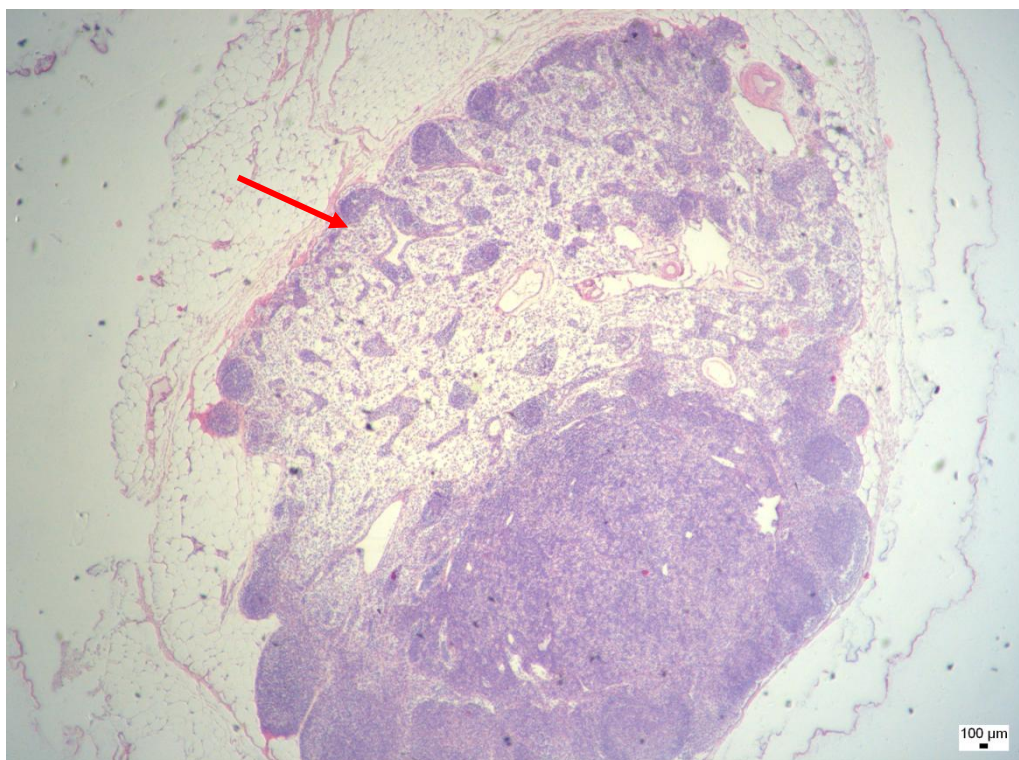
Obr. 7 Makrofágy fagocytující pigment (šipky) v mezenteriální mízní uzlině (2. skupina – organická forma Se), HE.



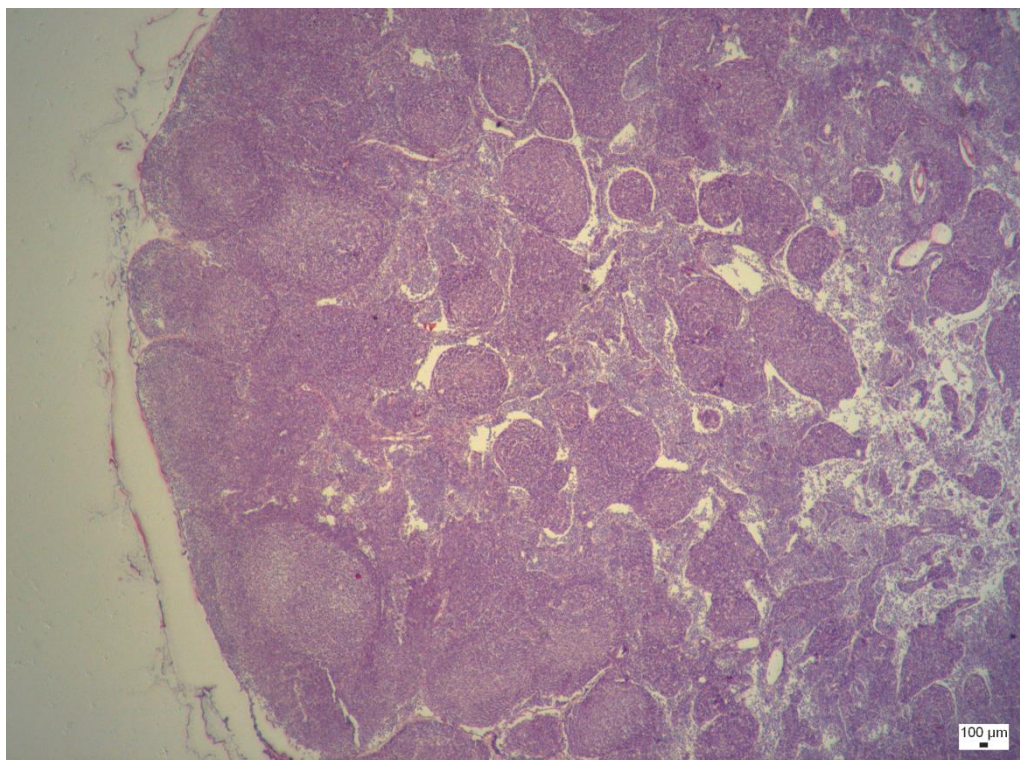
Obr. 8 Snížená celulizace parakortexu a atrofické lymfatické noduly v krční mízní uzlině (1. skupina – organická forma Se), HE.



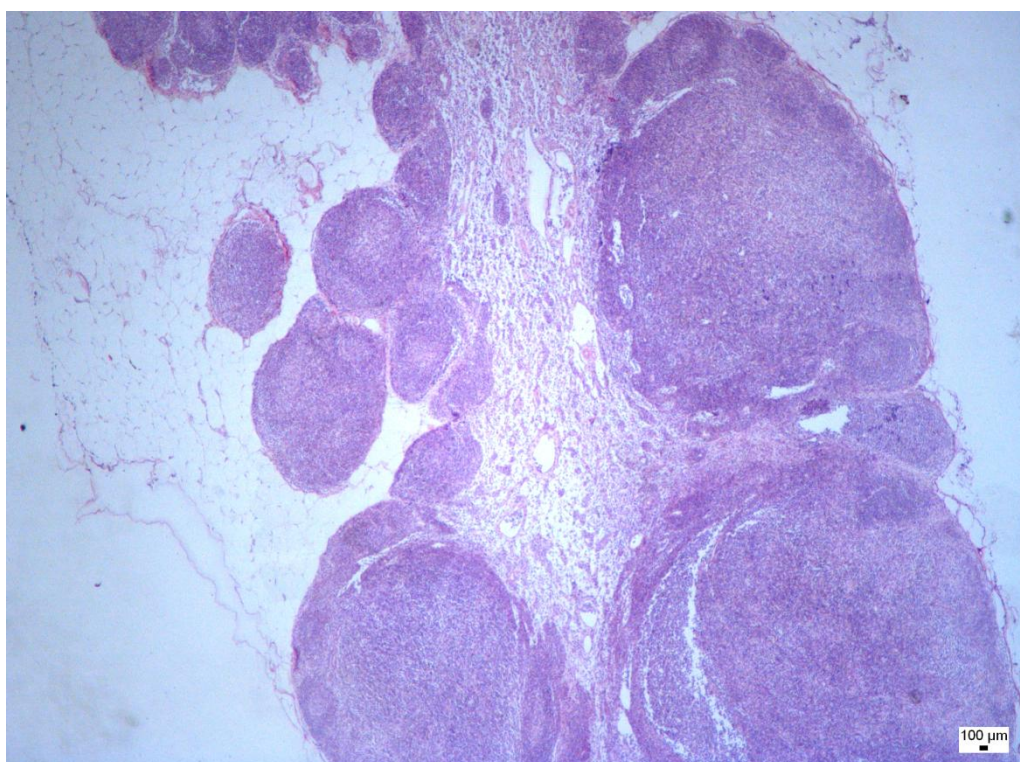
Obr. 9 Relativně slabě celulizovaný zevní kortex a parakortex krční mízní uzliny. Sekundární lymfatické noduly jsou však formovány (2. skupina – organická forma Se), HE.



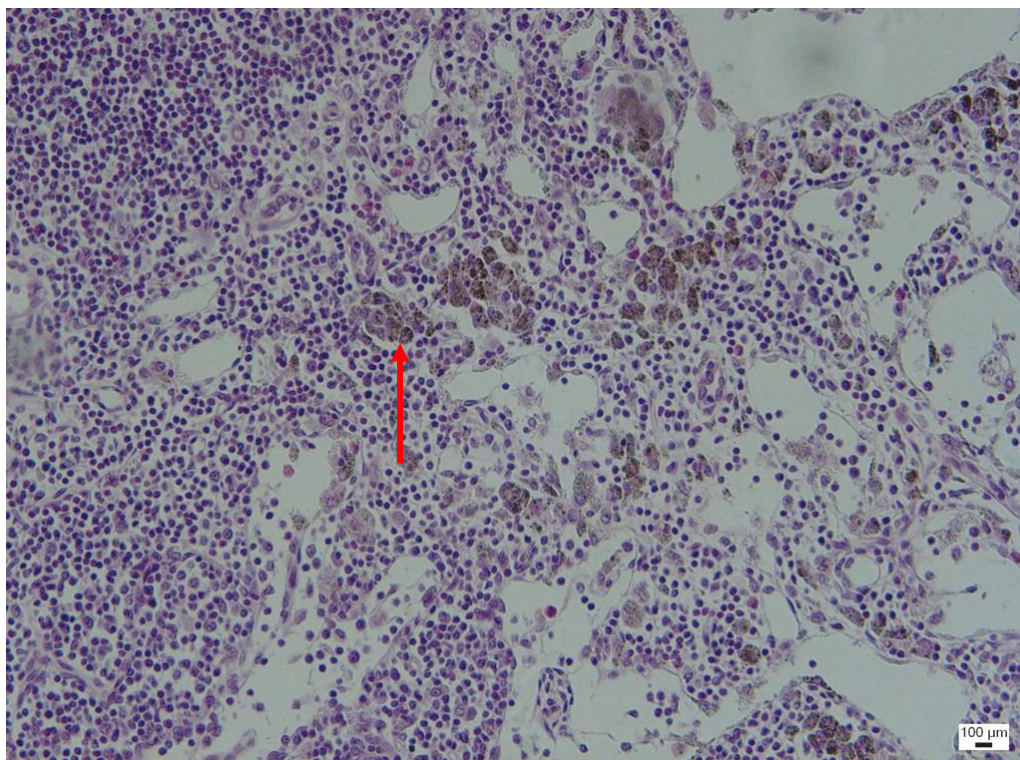
Obr. 10 V části kompartmentů krční mízní uzliny se nachází atrofická kůra tvořená atrofickými lymfatickými noduly (šipka) (1. skupina – organická forma Se), HE.



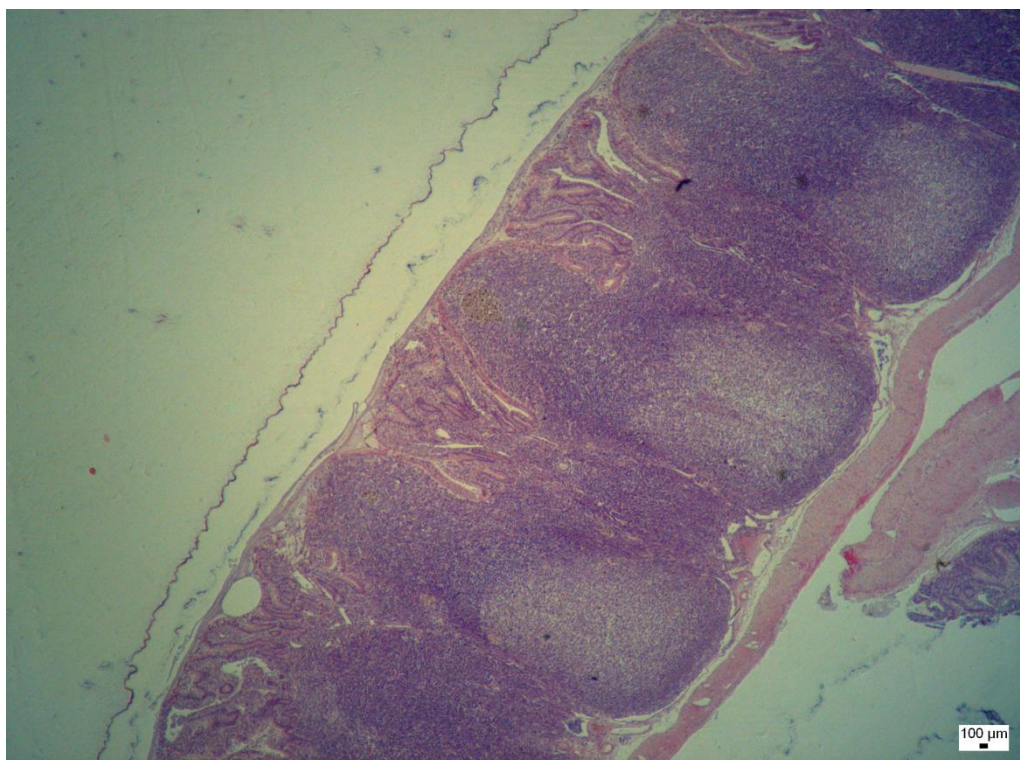
Obr. 11 Výrazná reaktivní hyperplazie (lymfatické noduly v oblasti kortexu a meduly) v mezenterální mízní uzlině (1. skupina – anorganická forma Se), HE.



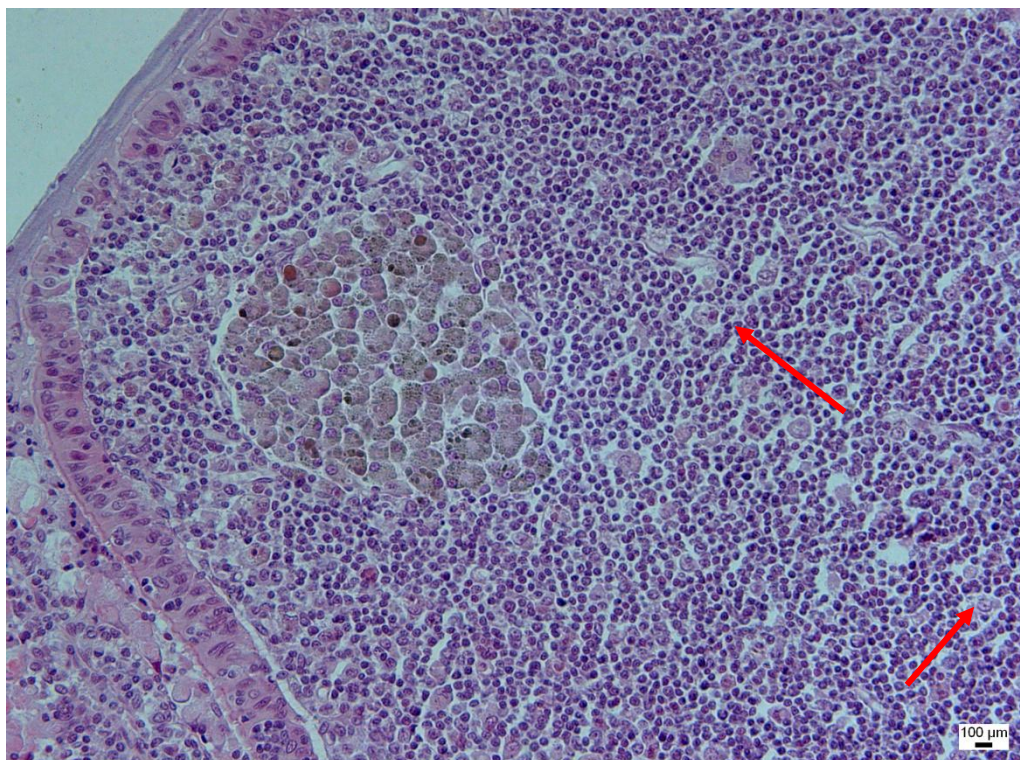
Obr. 12 Snížená celulizace parakortexu a atrofické lymfatické noduly v mezenterální mízní uzlině (3. skupina – anorganická forma Se), HE.



Obr. 13 Makrofágy fagocytující pigment na hranici kůry a dřeně krční mízní uzliny (2. skupina – organická forma Se), HE.



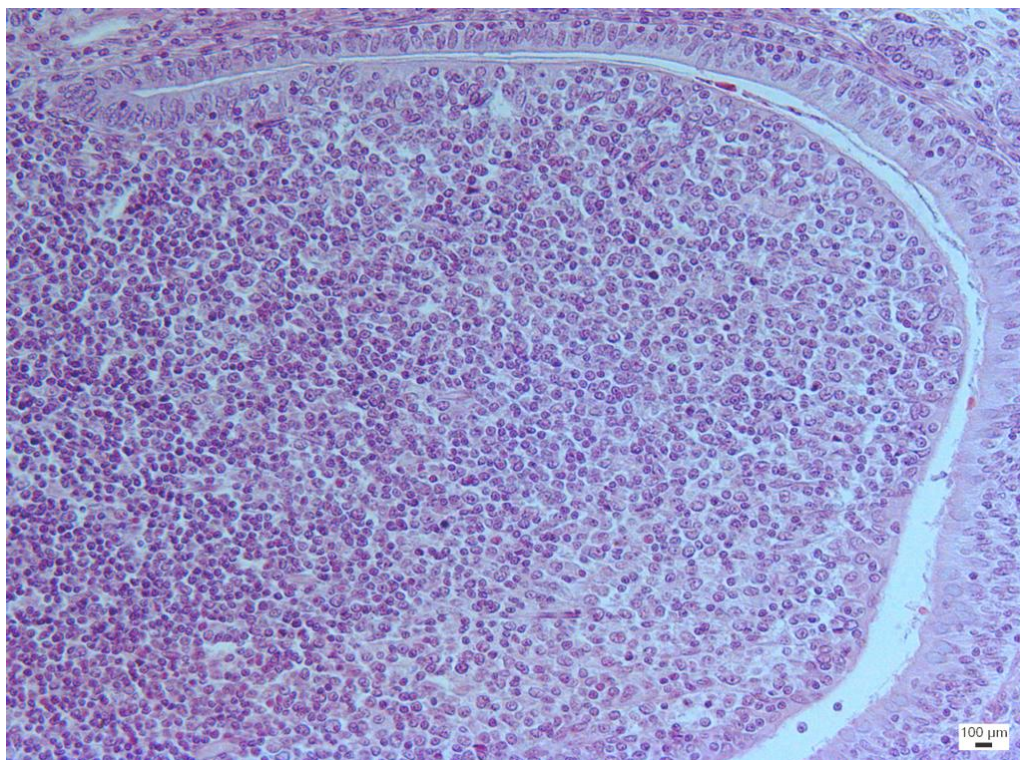
Obr. 14 Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň Peyeroých plaků (3. skupina – organická forma Se), HE.



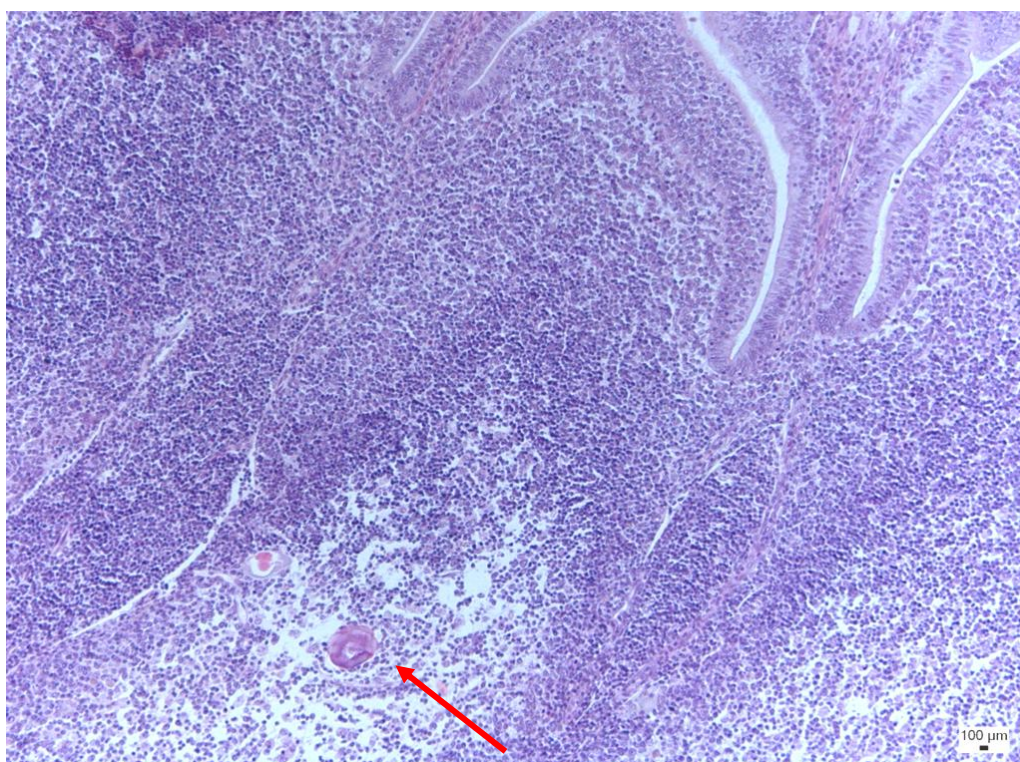
Obr. 15 Agregované a diseminované makrofágy fagocytující pigment (šipky) v oblasti dómu Peyeroých plaků (3. skupina – organická forma Se), HE.



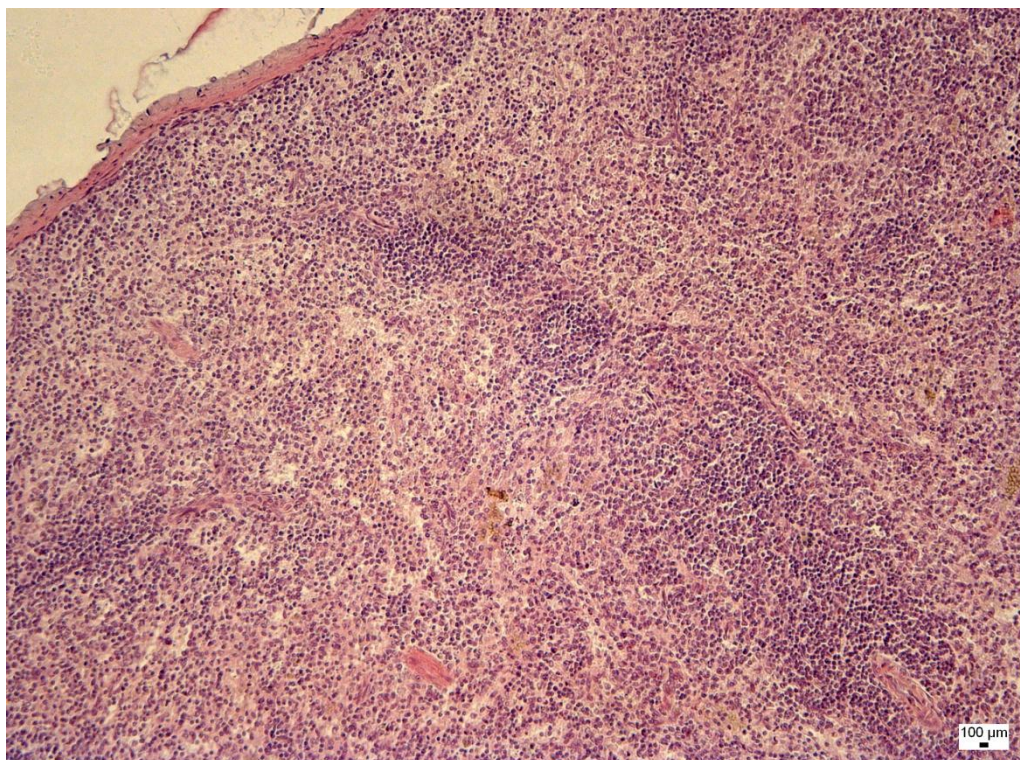
Obr. 16 Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň apendixu (3. skupina – organická forma Se), HE.



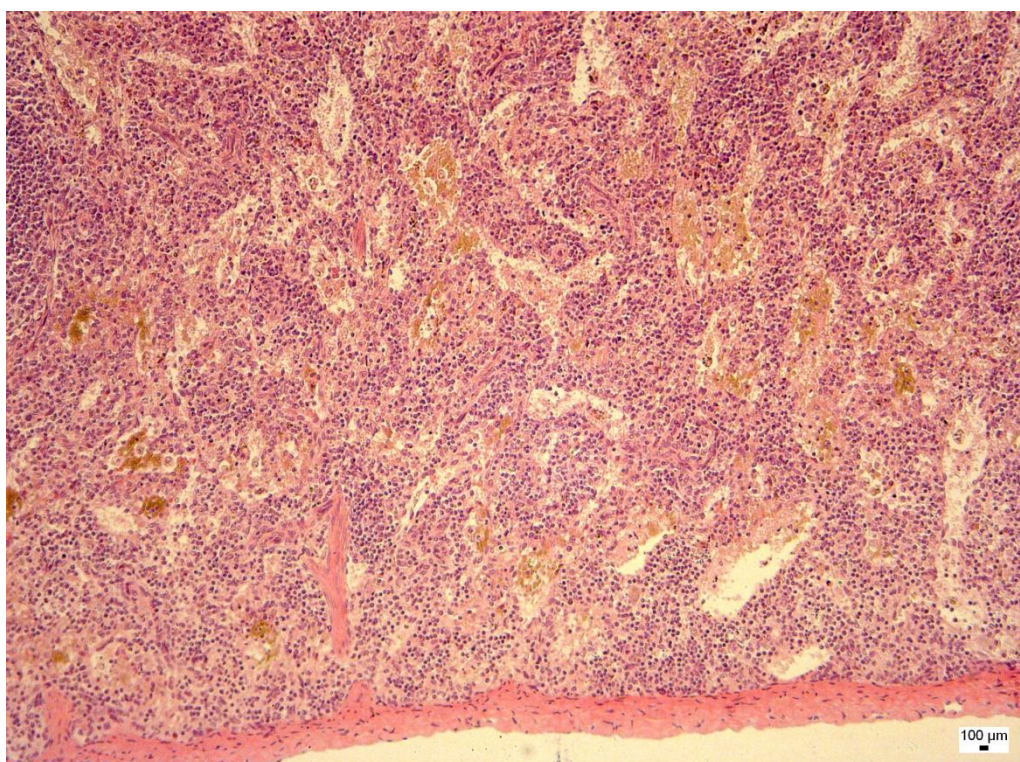
Obr. 17 Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu apendixu (3. skupina – organická forma Se), HE.



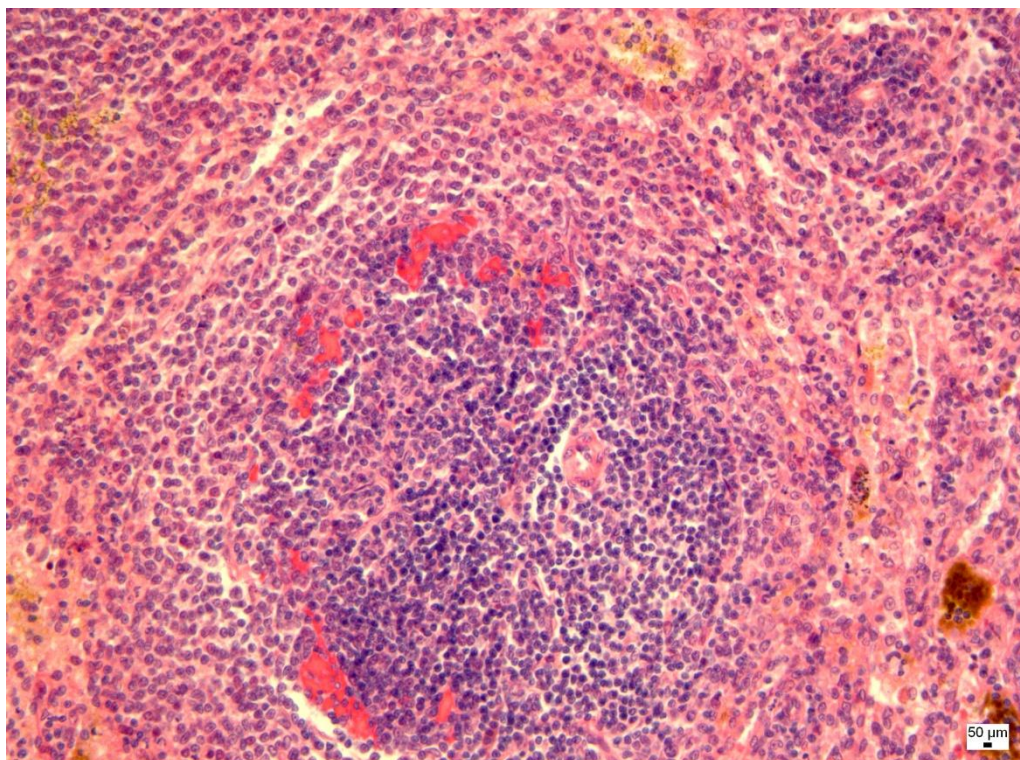
Obr. 18 Splendor-Hoeppliho fenomén v apendixu (šipka) (2. skupina – organická forma Se), HE.



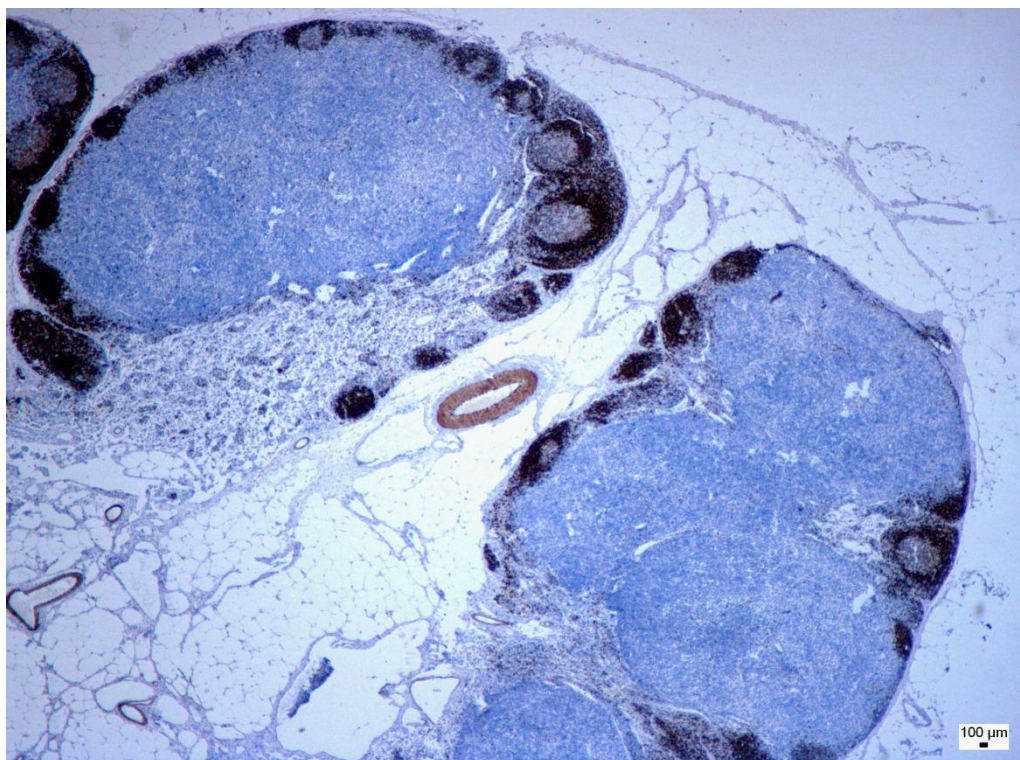
*Obr. 19 Hustě celulizované trámce červené pulpy sleziny
(2. skupina – organická forma Se), HE.*



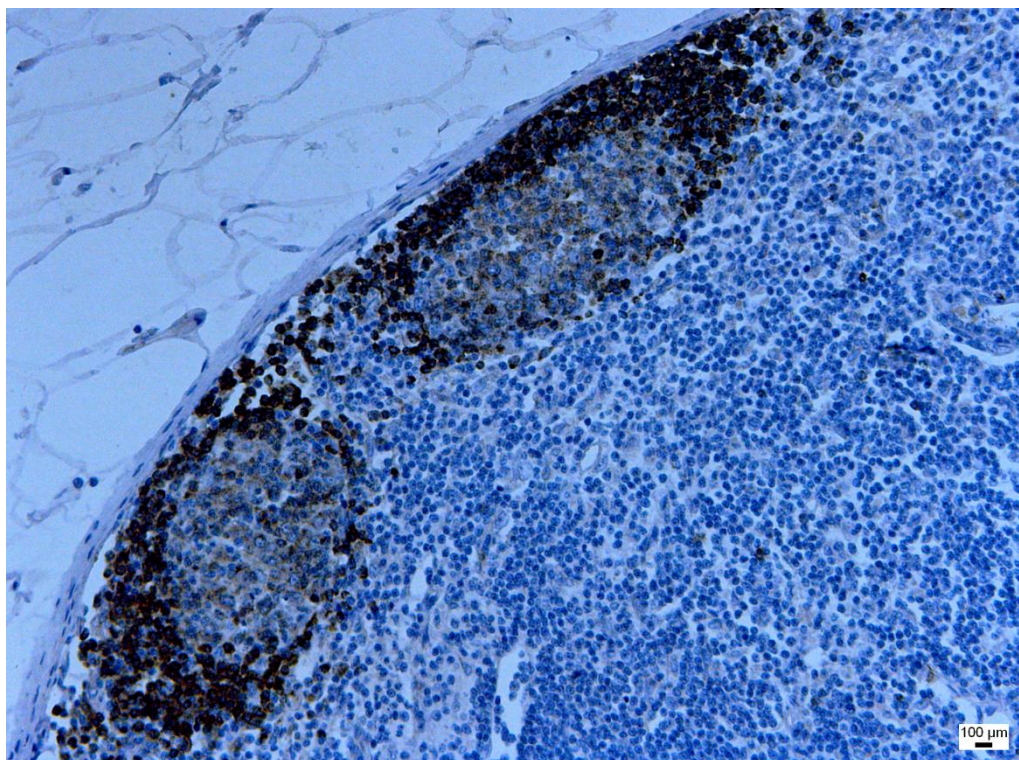
*Obr. 20 Široké sinusy červené pulpy sleziny
(3. skupina – organická forma Se), HE.*



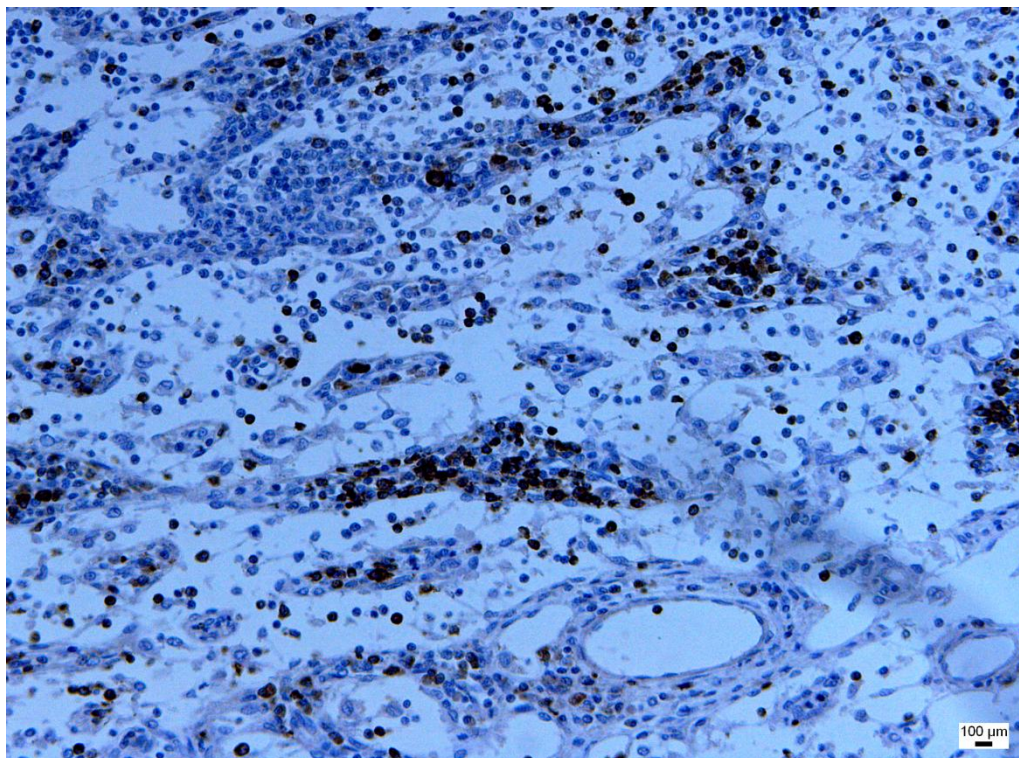
*Obr. 21 Střední depozita hyalinní substance na periferii PALP
(2. skupina – anorganická forma Se), HE.*



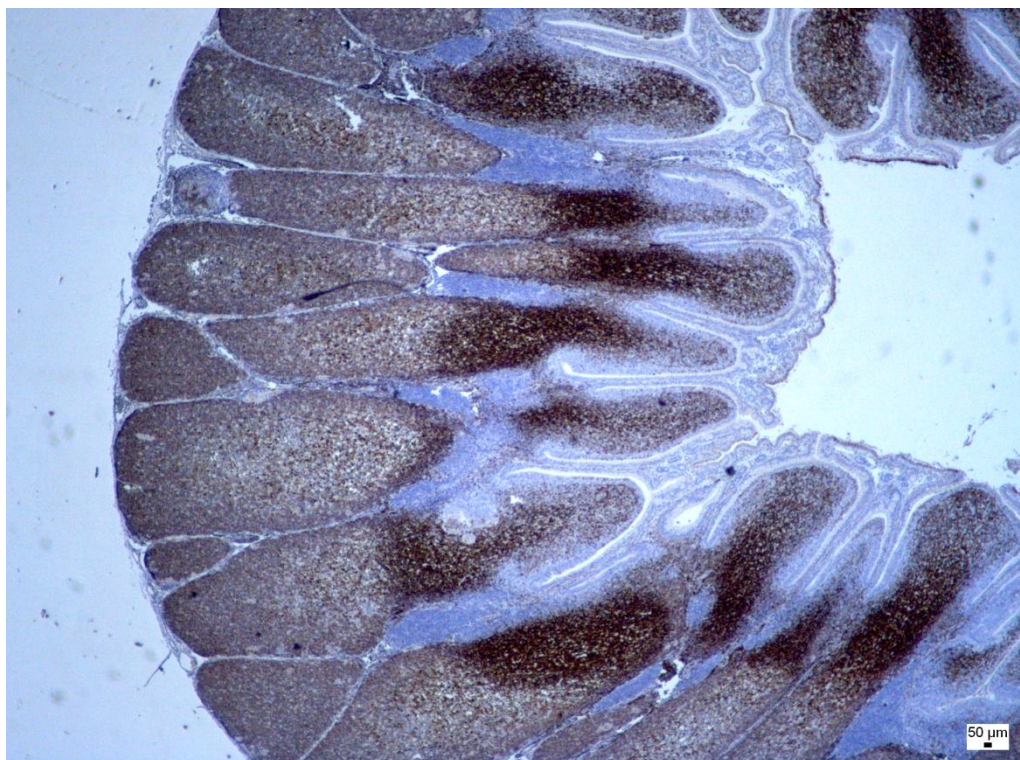
*Obr. 22 CD79⁺ v B dependentní oblasti. CD79⁻ v rozsáhlé T dependentní oblasti
popliteální mízní uzliny (3. skupina – anorganická forma Se),
Anti - Human CD79α.*



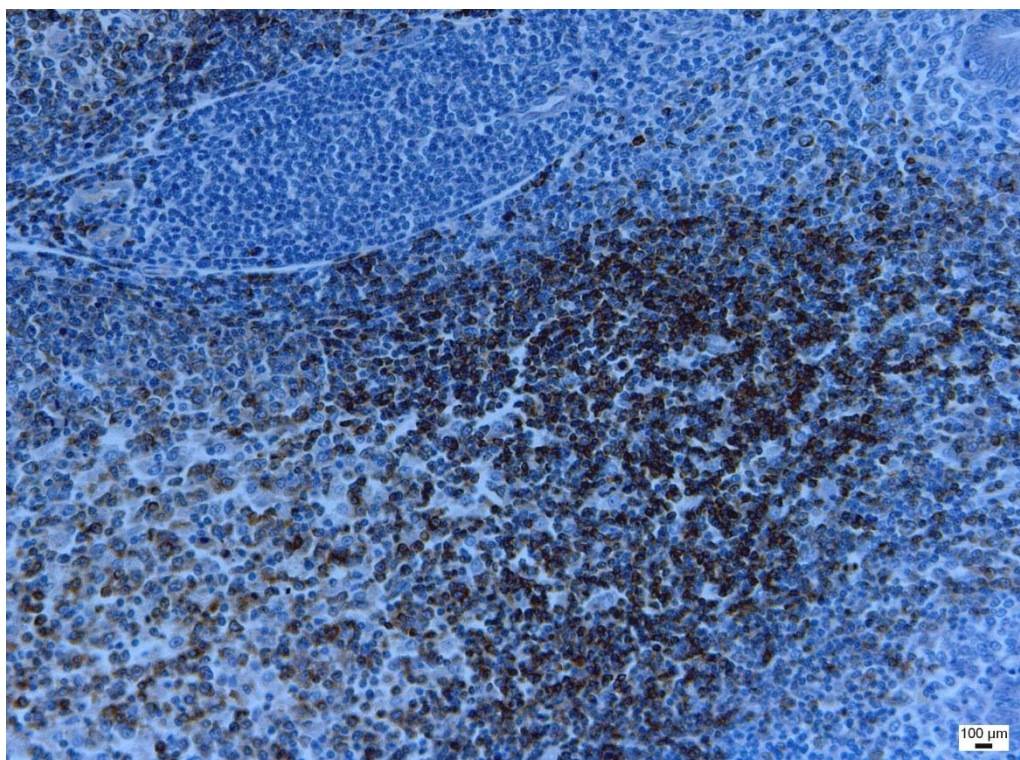
Obr. 23 Vysoce pozitivní CD79⁺ buňky v plášťové zóně germinativního centra a v subkapsulárních sinusech. Slabě pozitivní buňky ve světlé zóně germinativního centra. Ojedinelé CD79⁺ buňky v parakortexu popliteální mízní uzliny (3. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79α.



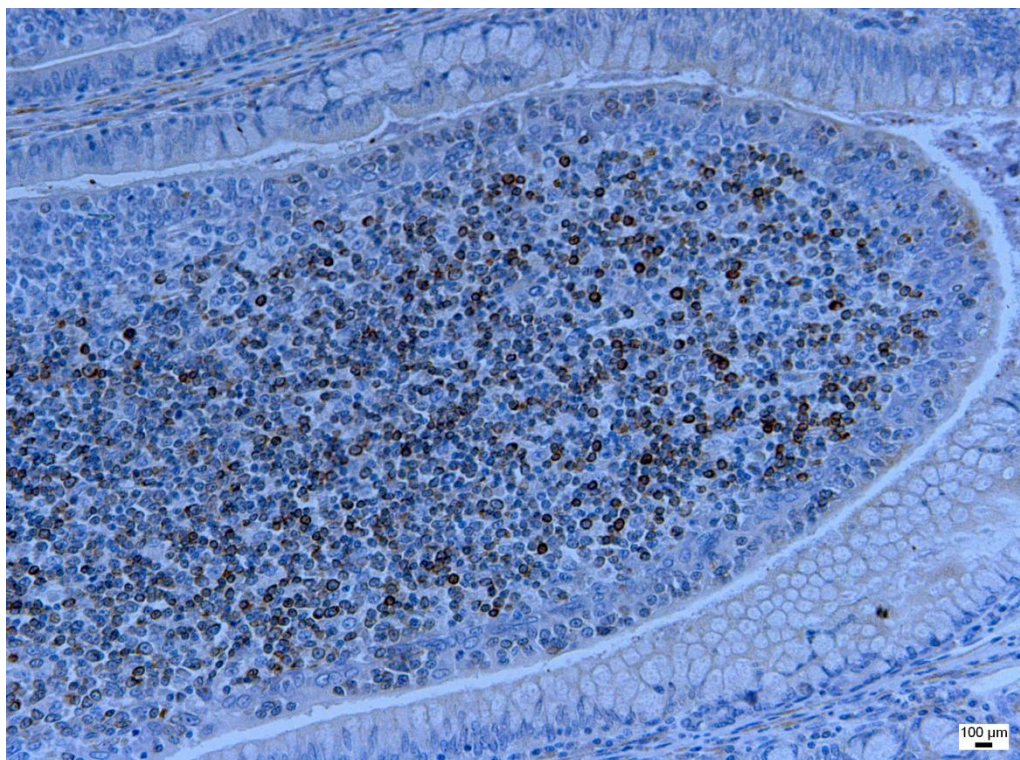
Obr. 24 CD79⁺ buňky v medulárních trámčích a medulárních sinusech popliteální mízní uzliny (3. skupina – organická forma Se), Anti – Human CD79α.



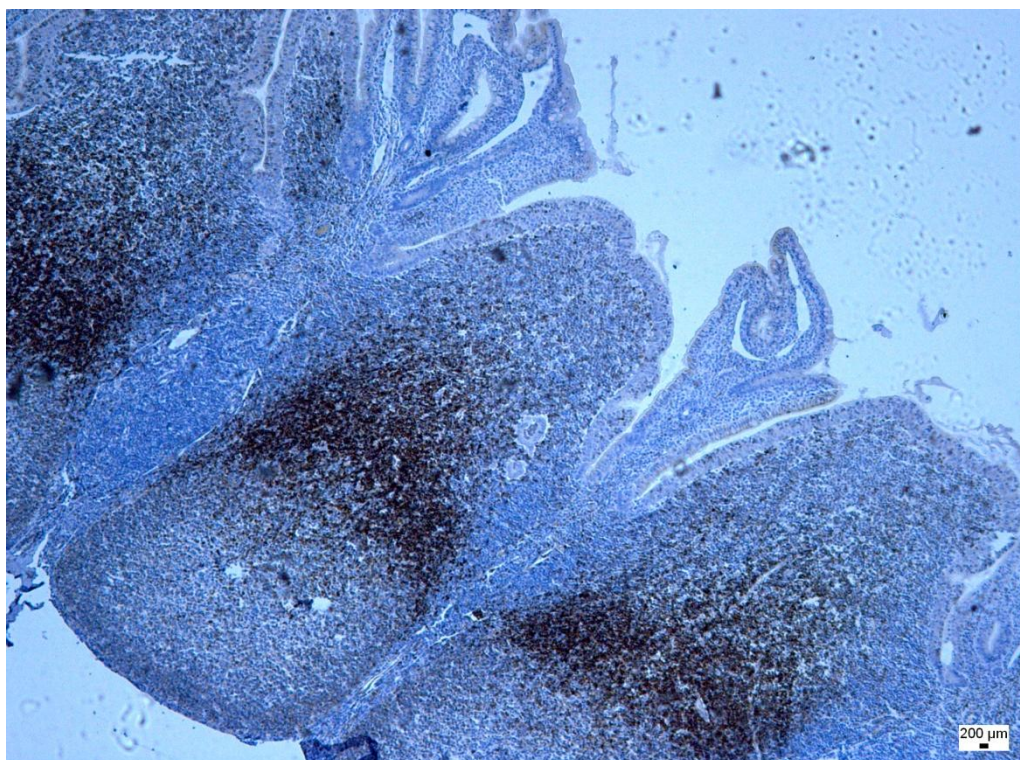
Obr. 25 CD79⁺ buňky v oblasti lymfatických nodulů, oblasti korony a dómu apendixu (2. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79α.



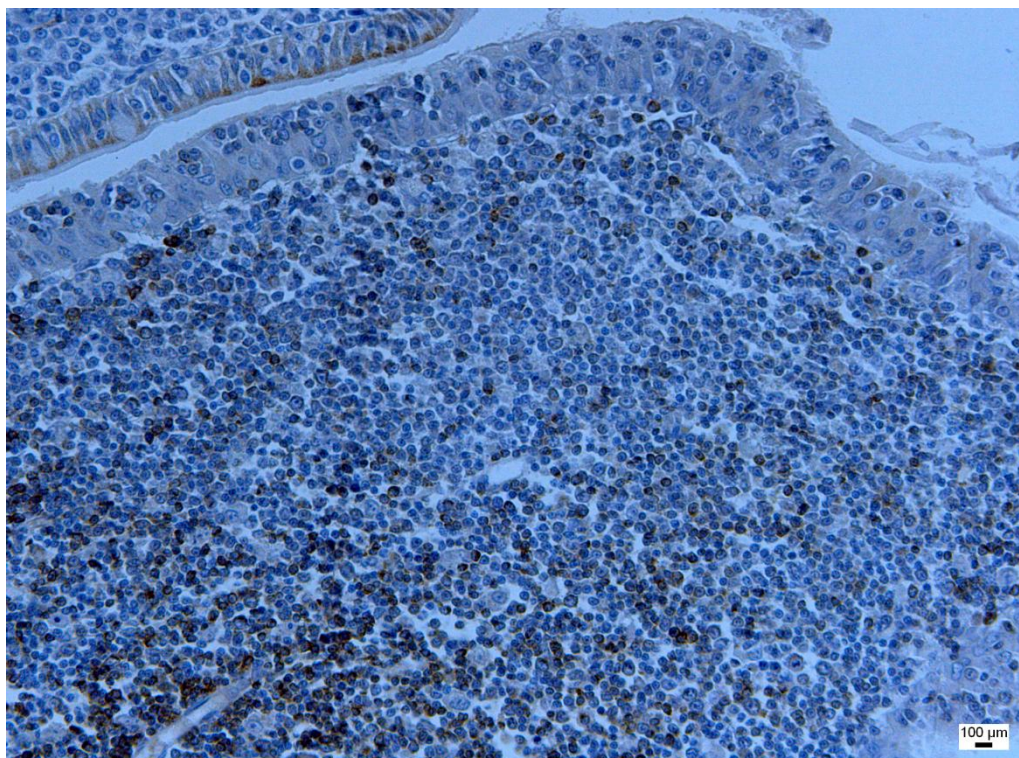
Obr. 26 CD79⁺ buňky v germinativním centru a oblasti korony apendixu. Interfolikulární oblast tvořená CD79⁻ buňkami (2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79α.



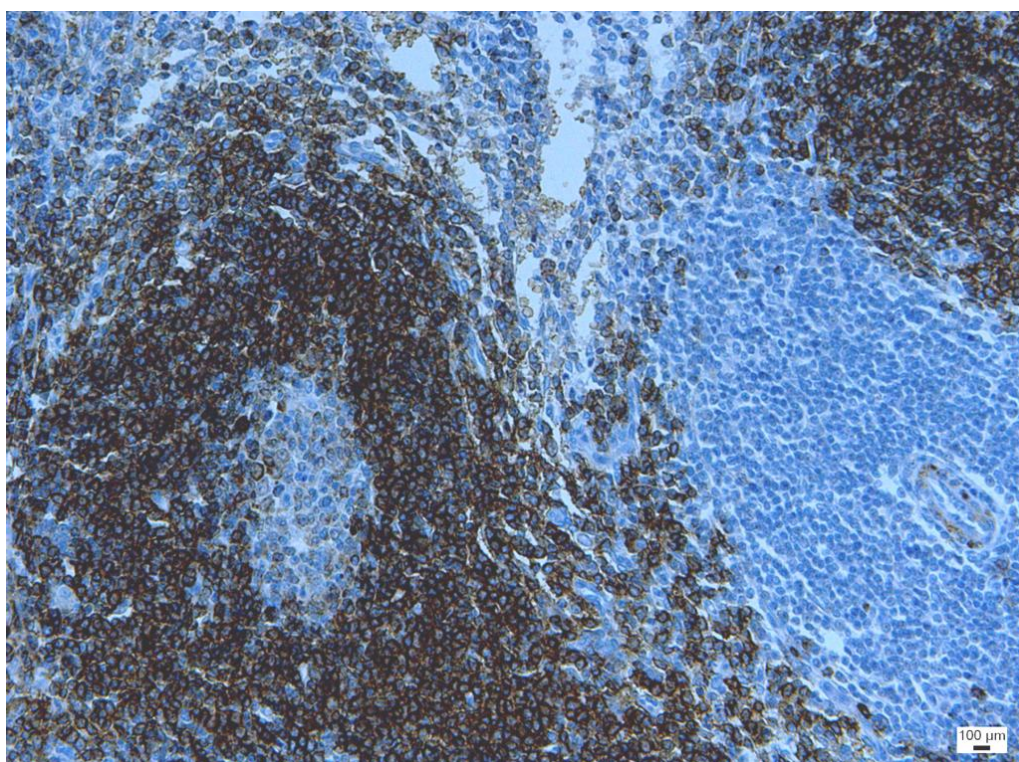
Obr. 27 Směsná populace CD79⁺ a CD79⁻ buněk v oblasti dómu apendixu (2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79α.



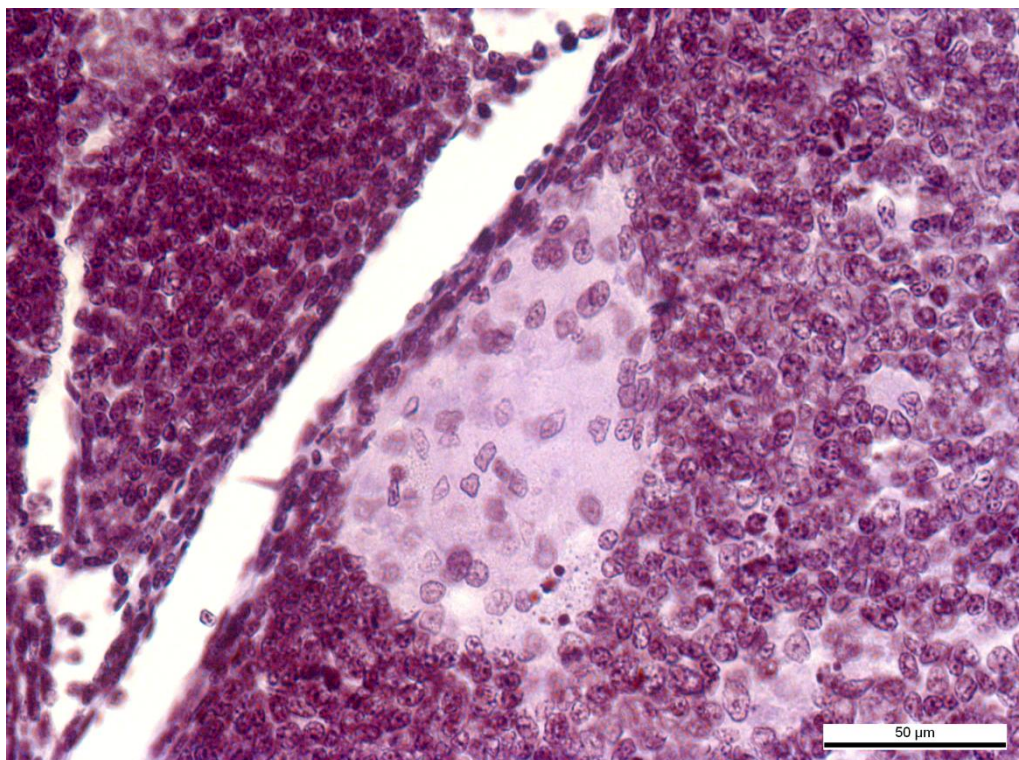
Obr. 28 CD79⁺ buňky v lymfatickém nodulu, koruně a dómu Peyeroých plaků (3. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79α.



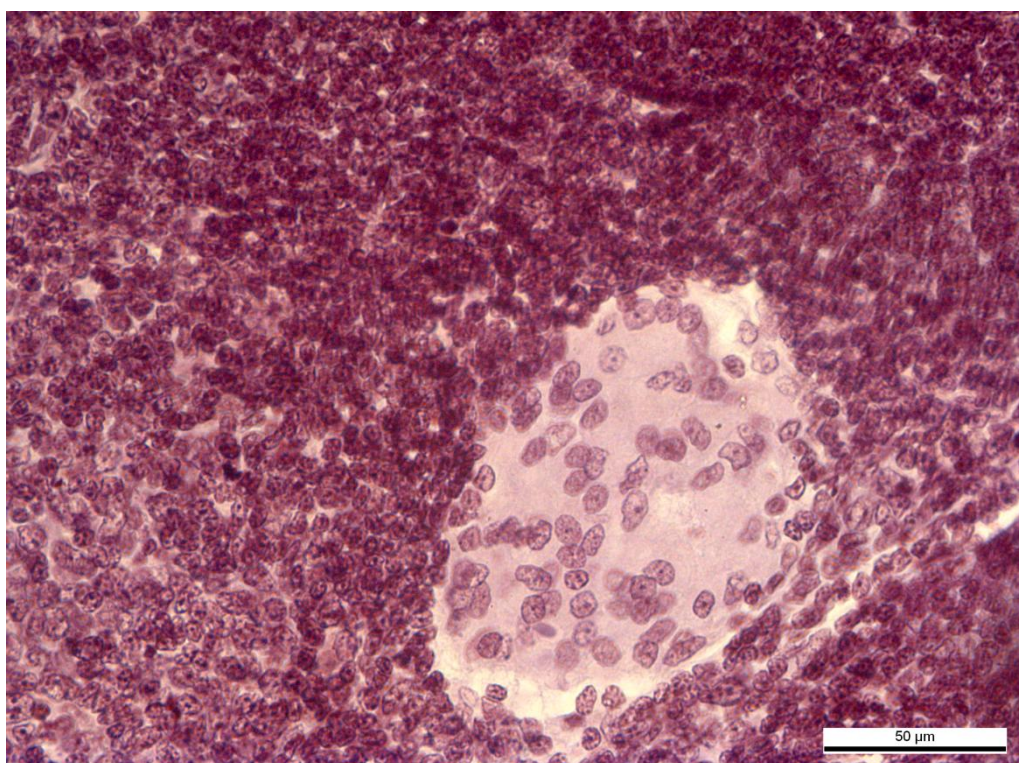
*Obr. 29 CD79⁺ buňky v oblasti dómu Peyeroých plaků
(2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79α.*



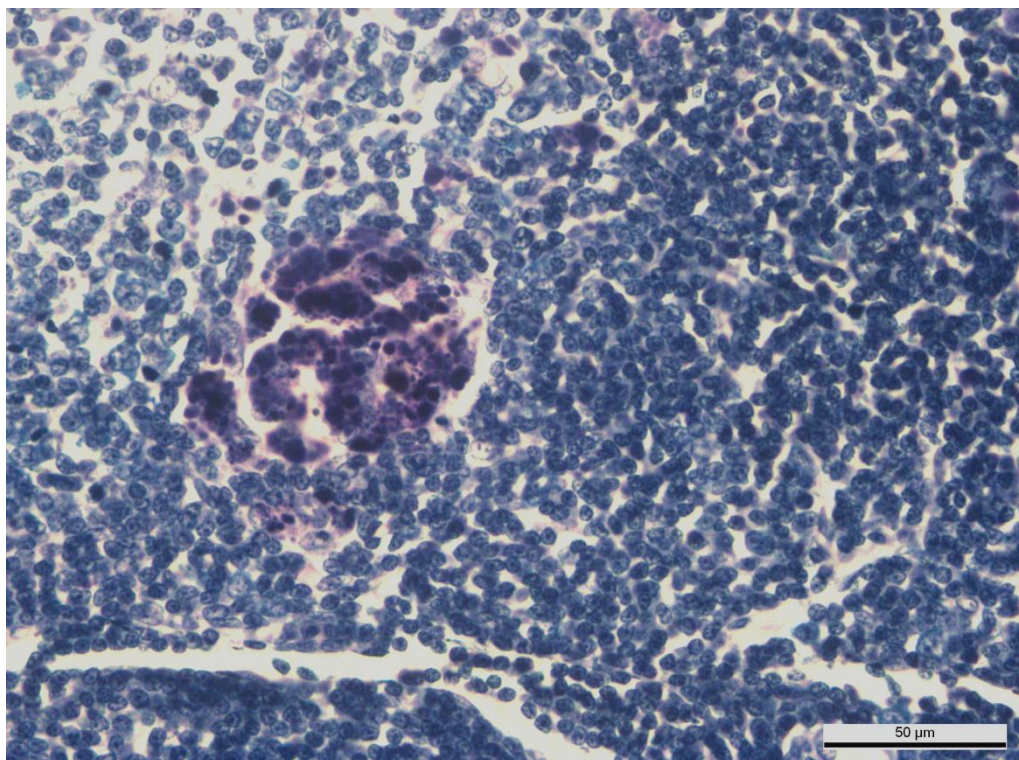
Obr. 30 CD79⁺ buňky v oblasti lymfatických nodulů a marginální zóny. Ve světlé zóně germinativního centra nízká pozitivita buněk. CD79⁺ buňky se nacházejí v oblasti PALP sleziny (2. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79α.



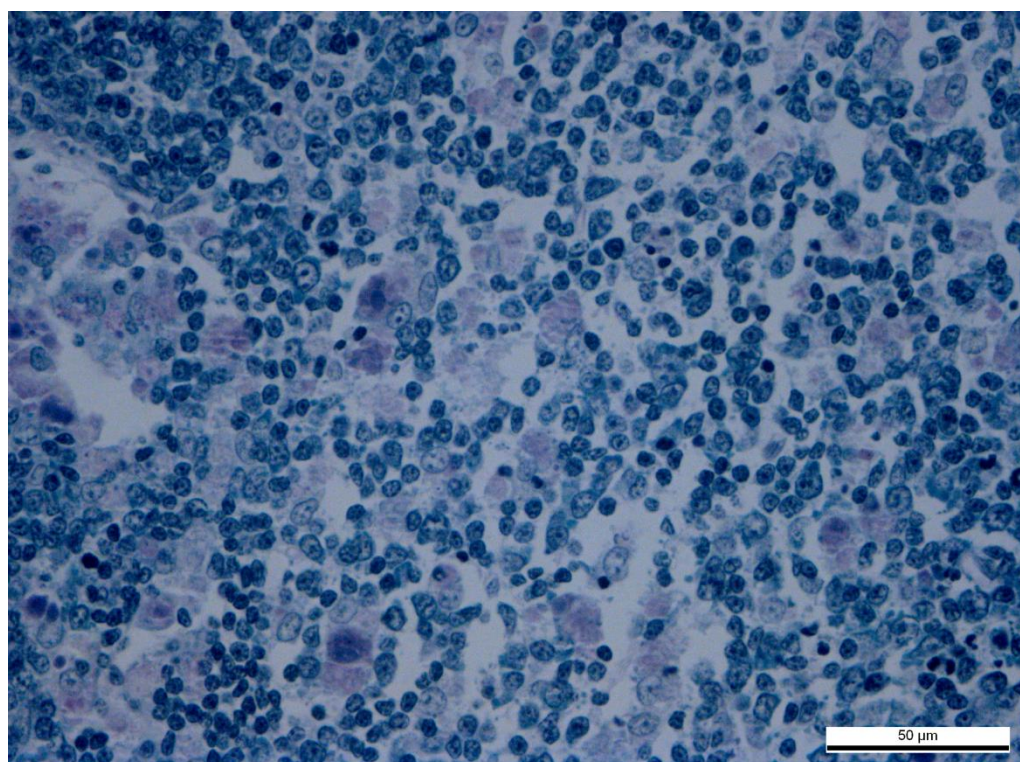
Obr. 31 Negativní průkaz fosfolipidů v makrofázích apendixu (3. skupina – organická forma Se), PFAS.



Obr. 32 Negativní průkaz fosfolipidů v makrofázích Peyeroých plaků (3. skupina – organická forma Se), PFAS.



Obr. 33 Průkaz lipopigmentů. Vysoce pozitivní substance v makrofázích fagocytujících pigment v Peyerových placích (2. skupina – organická forma Se), Ziehl-Neelson.



Obr. 34 Nízce až středně pozitivní substance v makrofázích fagocytujících pigment v apendixu (2. skupina – organická forma Se), Ziehl-Neelson.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdo, M., K. (1994):** NTP Toxicity Studies of Sodium Selenate and Sodium Selenite (CAS Nos. 13410-01-0 and 10102-18-8) Administered in Drinking Water to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser*, 38, 1-55.
- Alboghobeish, N., Zabiehy, G. A. (1996):** Histological study of ileum and cecum with special reference to their lymphoid tissue of le-lapin Albinos rabbit. *Indian J Anim Sci*, Science, 66, 666–669.
- Arbogast, S., Ferreiro, A. (2010):** Selenoproteins and Protection against Oxidative Stress: Selenoprotein N as a Novel Player at the Crossroads of Redox Signaling and Calcium Homeostasis. *Antioxid Redox Sign*, 12, 893-904.
- Arduser, F., Wolfram, S., Scharrer, E. (1985):** Active absorption of selenate by rat ileum. *J Nutr*, 115, 1203-1208.
- Arthur, J. R., Beckett, G. J. (1994):** New Metabolic Roles for Selenium. *P Nutr Soc*, 53, 615-624.
- Arthur, J. R., Mckenzie, R. C., Beckett, G. J. (2003):** Selenium in the immune system. *J Nutr*, 133, 1457-1459.
- Baek, S. H., Kwon, T. K., Lim, J. H., Lee, Y. J., Chang, H. W., Lee, S. J., Kim, J. H., Kwun, K. B. (2000):** Secretory phospholipase A2-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. *J Immunol*, 164, 6359-6365.
- Bacha, W. J., Bacha, L. M. (2000):** *Color atlas of veterinary histology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 336 s. ISBN 0683306189.
- Bainbridge, D. R. (1976):** Use of (75Se) L-Selenomethionine as a label for lymphoid cells. *Immunology*, 30, 135-144.
- Banks, W. J. (1993):** *Applied veterinary histology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 527 s. ISBN 0801666104.
- Banning, A., Kipp, A., Schmitmeier, S., Lowinger, M., Florian, S., Krehl, S., Thalmann, S., Thierbach, R., Steinberg, P., Brigelius-Flohe, R. (2008):** Glutathione Peroxidase 2 Inhibits Cyclooxygenase-2-Mediated Migration and Invasion of HT-29 Adenocarcinoma Cells but Supports Their Growth as Tumors in Nude Mice. *Cancer Res*, 68, 9746-9753.
- Baqui, M. M. A., Gereben, B., Harney, J. W., Larsen, P. R., Bianco, A. C. (2000):** Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine

deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 141, 4309-4312.

- Barnes, K. M., Evenson, J. K., Raines, A. M., Sunde, R. A. (2009):** Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. *J Nutr*, 139, 199-206.
- Bast, B. J., Catty, D., Manten-Slingerland, R., Jansen, J. T., Veldhuis, D. H., Roholl, P., Ballieux, R. E. (1979):** Surface Ig on rabbit lymphocytes. Rabbit B and T cells are distinct populations. *Eur J Immunol*, 9, 997-1003.
- Beath, O. A., Draize, J. H., Eppson, H. F., Gilbert, C. S., McCreary, O. C. (1934):** Certain poisonous plants of Wyoming activated by selenium and their association with respect to soil types. *J Am Pharmaceut Assoc*, 23, 94-97.
- Becker, R. S., Knight, K. L. (1990):** Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell*, 63, 987-997.
- Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., Elger, W. (1988):** Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 966, 12-21.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A. (2001):** Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*, 21, 453-473.
- Belko, I. (1992):** *Slezina*. Martin: Osveta. 247 s. ISBN, 80-217-0295-8.
- Benko, I., Nagy, G., Tanczos, B., Ungvari, E., Sztrik, A., Eszenyi, P., Prokisch, J., Banfalvi, G. (2012):** Subacute toxicity of selenium sources in mice. *Environ Toxicol Chem*.
- Besoluk, K., Eken, E., Sur, E. (2006):** A morphological and morphometrical study on the sacculus rotundus and ileum of the Angora rabbit. *Vet Med-Czech*, 51, 60-65.
- Beyaz, F., Asti, R. N. (2004):** Development of heal Peyer's patches and follicle associated epithelium in bovine foetuses. *Anat Histol Embryol*, 33, 172-179.
- Bienenstock, J., Clancy, R. L. (2005):** Bronchus-Associated Lymphoid Tissue. In: J. Mestecky, J., Ogra, P. L., Mcghee, J. R., Lambrecht, B. N., Strober, W. (Eds.). *Mucosal immunology*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, s. 384-393. ISBN 0124915434.
- Bienenstock, J., Johnston, N., Perey, D. Y. (1973):** Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab Invest*, 28, 686-692.

- Bienenstock, J., Mcdermott, M. R. (2005):** Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev*, 206, 22-31.
- Bienenstock, J., Mcdermott, M. R., Befus, A. D. (1982):** The significance of bronchus-associated lymphoid tissue. *Bull Eur Physiopathol Respir*, 18, 153-77.
- Blin, P. C. (1973):** Croissance postnatale et involution du thymus chez les mammiferes domestiques. *Recl Med Vet*, 149, 301-314.
- Bockman, D. E. (1983):** Functional histology of appendix. *Arch Histol Jpn*, 46, 271-92.
- Brigelius-Flohe, R., Maurer, S., Lotzer, K., Bol, G., Kallionpaa, H., Lehtolainen, P., Viita, H., Yla-Herttuala, S. (2000):** Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 152, 307-316.
- Brownstein, D. G., Rebar, A. H., Bice, D. E., Muggenburg, B. A., Hill, J. O. (1980):** Immunology of the Lower Respiratory-Tract - Serial Morphologic Changes in the Lungs and Tracheo-Bronchial Lymph-Nodes of Dogs after Intra-Pulmonary Immunization with Sheep Erythrocytes. *Am J Pathol*, 98, 499.
- Calder, P. C., Field, C. J. (2002):** Fatty Acids, Inflammation and Immunity. In: Calder, P. C., Field, C. J., Gill, H. S. (Eds) *Nutrition and immune function*. 1st ed. New York: CABI, s. 57-93. ISBN 0851995837.
- Cao, Y. Z., Reddy, C. C., Sordillo, L. M. (2000):** Altered eicosanoid biosynthesis in selenium-deficient endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 28, 381-389.
- Carlson, B. A., Yoo, M. H., Shrimali, R. K., Irons, R., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., Park, J. M. (2010):** Micronutrients and the immune system Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *P Nutr Soc*, 69, 300-310.
- Casteleyn, C., Broos, A. M., Simoens, P., Van Den Broeck, W. (2010):** NALT (nasal cavity-associated lymphoid tissue) in the rabbit. *Vet Immunol Immunopathol*, 133, 212-218.
- Cesta, M. F. (2006a):** Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34, 599-608.
- Cesta, M. F. (2006b):** Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 34, 455-465.
- Cornes, J. S. (1965):** Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut*, 6, 225-229.

- Daniels, L. A. (1996):** Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res*, 54, 185-199.
- Dasso, J. F., Howell, M. D. (1997):** Neonatal appendectomy impairs mucosal immunity in rabbits. *Cell Immunol*, 182, 29-37.
- Dasso, J. F., Obiakor, H., Bach, H., Anderson, A. O., Mage, R. G. (2000):** A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Dev Comp Immunol*, 24, 797-814.
- De Waal, E. J., Schuurman, H. J., Van Loveren, H., Vos, J. G. (1997):** Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(tri-n-butyltin) oxide and cyclosporine on thymus histophysiology. *Crit Rev Toxicol*, 27, 381-430.
- Elmore, S. A. (2006a):** Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 34, 648-655.
- Elmore, S. A. (2006b):** Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol*, 34, 656-665.
- Enticknap, J. B. (1953):** Phagocytosis of intestinal bacteria in the appendix of normal rabbits. *J Comp Pathol*, 63, 7-14.
- Ermak, T. H., Owen, R. L. (1986):** Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat Rec*, 215, 144-152.
- Eurell, J. A. C., Frappier, B. L., Dellmann, H. D. (2006):** *Dellmann's textbook of veterinary histology*. 6th ed. Iowa: Blackwell, 416 s. ISBN 0781741483.
- Fairweather-Tait, S. J. (1997):** Bioavailability of selenium. *Eur J Clin Nutr*, 51, 20-23.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., Hurst, R. (2010):** Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*, 91, 1484-1491.
- Fan, W. M. T., Lane, N. A., Martens, D., Higashi, M. R. (1998):** Synthesis and structure characterization of selenium metabolites. *Analyst*, 123, 875-884.
- Faulk, W. P., McCormic, J., Henry, C., Yoffey, J. M., Fudenber, H. (1969):** Immunobiologic Responses of Peyers Patches. *Pediatr Res*, 3, 354-356.
- Felix, K., Gerstmeier, S., Kyriakopoulos, A., Howard, O. M., Dong, H. F., Eckhaus, M., Behne, D., Bornkamm, G. W., Janz, S. (2004):** Selenium deficiency abrogates inflammation-dependent plasma cell tumors in mice. *Cancer Res*, 64, 2910-2917.
- Finch, J. M., Turner, R. J. (1996):** Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res Vet Sci*, 60, 97-106.
- Finley, J. W. (2006):** Bioavailability of selenium from foods. *Nutr Rev*, 64, 146-151.

- Forman, H. J., Torres, M. (2002):** Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 4-8.
- Foster, L. H., Sumar, S. (1997):** Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37, 211-228.
- Gairola, C., Tai, H. H. (1985):** Selective inhibition of leukotriene B4 biosynthesis in rat pulmonary alveolar macrophages by dietary selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, 132, 397-403.
- Ganther, H. E. (1999):** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20, 1657-1666.
- Gartner, L. P., Hiatt, J. L. (2007):** *Color textbook of histology*. 3rd ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 592 s. ISBN 1416029451.
- Gebert, A., Hach, G. (1992):** Vimentin antibodies stain membranous epithelial cells in the rabbit bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Histochemistry*, 98, 271-273.
- Gmshinskii, I. V., Mazo, V. K. (2006):** Mineral substance in human nutrition. Selenium: absorption and bioavailability. *Vopr Pitan*, 75, 15-21.
- Gormley, P. D., Powell-Richards, A. O., Azuara-Blanco, A., Donoso, L. A., Dua, H. S. (1998):** Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated-lymphoid-tissue after exposure to retinal-S-antigen. *Int Ophthalmol*, 22, 77-80.
- Green, D. E., Albers, P. H. (1997):** Diagnostic criteria for selenium toxicosis in aquatic birds: histologic lesions. *J Wildl Dis*, 33, 385-404.
- Gromer, S., Eubel, J. K., Lee, B. L., Jacob, J. (2005):** Human selenoproteins at a glance. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2414-2437.
- Grumolato, L., Ghzili, H., Montero-Hadjadje, M., Gasman, S., Lesage, J., Tanguy, Y., Galas, L., Ait-Ali, D., Leprince, J., Guerineau, N. C., Elkahloun, A. G., Fournier, A., Vieau, D., Vaudry, H., Anouar, Y. (2008):** Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *Faseb J*, 22, 1756-1768.
- Haley, P. J. (2003):** Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188, 49-71.
- Hall, J. O. (2007):** Selenium. In: Gupta, R. C. (Ed.) *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, s. 453-460. ISBN 978-0-12-370467-2.

- Hanoka, M., Mizumoto, T., Takigawa, M. (1977):** Regulation of IgM anti-bovine gamma-globulin antibody formation by helper and suppressor T cells in rabbits. *Cell Immunol*, 31, 1-12.
- Hansson, E., Jacobsso, S. O. (1966):** Uptake of (75Se) Selenomethionine in Tissues of Mouse Studies by Whole-Body Autoradiography. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 115, 285-293.
- Hara, S., Shoji, Y., Sakurai, A., Yuasa, K., Himeno, S., Imura, N. (2001):** Effects of selenium deficiency on expression of selenoproteins in bovine arterial endothelial cells. *Biol Pharm Bull*, 24, 754-759.
- Haschek, W. M., Wallig, M. A., Rousseaux, C. G. (2009):** *Fundamentals of toxicologic pathology*. 2nd ed. London: Academic, 700 s. ISBN 978-0-12-370469-6.
- Hathaway, L. J., Kraehenbuhl, J. P. (2000):** The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci*, 57, 323-332.
- Hawkes, W. C., Alkan, Z. (2010):** Regulation of redox signaling by selenoproteins. *Biol Trace Elem Res*, 134, 235-251.
- Hawkes, W. C., Kelley, D. S., Taylor, P. C. (2001):** The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. *Biol Trace Elem Res*, 81, 189-213.
- Heel, K. A., Mccauley, R. D., Padadimitriou, J. M., Hall, J. C. (1997):** Peyer's patches. *J Gastroen Hepatol*, 12, 122-136.
- Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., Shafer, L. A., Dow, S., Berry, M. J., Hoffmann, P. R. (2010):** Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4⁺ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J Nutr*, 140, 1155-1161.
- Hoffmann, P. R. (2007):** Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Ex*, 55, 289-297.
- Hoffmann, P. R., Berry, M. J. (2005):** Selenoprotein synthesis: a unique translational mechanism used by a diverse family of proteins. *Thyroid*, 15, 769-775.
- Hong, Y. H., Lellehoj, H. S., Dalloul, R. A., Min, W. G., Miska, K. B., Tuo, W. B., Lee, S. H., Han, J. Y., Lillehoj, E. P. (2006):** Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin. *Vet Immunol Immunop*, 110, 339-347.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. (2005):** *Základy imunologie*. 3 ed. Praha: Triton, 280 s. ISBN 80-7254-686-4.
- Hu, M. L., Chung, C., Spallholz, J. E. (1984):** Hematologic data of selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Inorg Biochem*, 22, 165-173.

- Hussein, M. R. (2008):** Mucocutaneous Splendore-Hoeppli phenomenon. *J Cutan Pathol*, 35, 979-988.
- Ibeagha, A. E., Ibeagha-Awemu, E. M., Mehrzad, J., Baurhoo, B., Kgwatalala, P., Zhao, X. (2009):** The effect of selenium sources and supplementation on neutrophil functions in dairy cows. *Animal*, 3, 1037-1043.
- Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., Nakagawa, Y. (1998):** Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 273, 1990-1997.
- Jelínek, F., Jelínek, K. (2002):** *Morfologie hospodářských zvířat*. 1 ed. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 289 s. ISBN 80-7040-550-3.
- Johnson, V. J., Tsunoda, M., Sharma, R. P. (2000):** Increased production of proinflammatory cytokines by murine macrophages following oral exposure to sodium selenite but not to seleno-L-methionine. *Arch Environ Contam Toxicol*, 39, 243-250.
- Jolly, R. D., Dalefield, R. R., Palmer, D. N. (1993):** Ceroid, lipofuscin and the ceroid-lipofuscinoses (Batten Disease). *J Inherit Metab Dis*, 16, 280-283.
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J. (2005):** *Basic histology*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 479 s. ISBN 3-540-21965.
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Kelley, D. H. (1999):** *Základy histologie*. 7 ed. Jinočany: H&H, 502 s. ISBN 80-85787-37-7.
- Kierszenbaum, A. L. (2007):** *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Mosby, 671 s. ISBN 0323055982.
- Kim, T. S., Yun, B. Y., Kim, I. Y. (2003):** Induction of the mitochondrial permeability transition by selenium compounds mediated by oxidation of the protein thiol groups and generation of the superoxide. *Biochem Pharmacol*, 66, 2301-2311.
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. (2001):** Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*, 79, 942-8.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Kuby, J. (2007):** *Kuby immunology*. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 574 s. ISBN 1429202114.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M. (1998):** Selenium and immune function. *Z Ernährungswiss*, 37, 50-56.
- Klika, E. (1986):** Lymfatický systém. In: Klika, E., Vacek, Z., Dvořák, M., Kapeller, K. (Eds.) *Histologie*. Praha: Avicenum, s. 243-265. ISBN 08-110-86.

- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., Suzuki, K. T. (2002):** Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15932-15936.
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Suzuki, K. T. (2001):** Speciation and metabolism of selenium injected with (82) Se-enriched selenite and selenate in rats. *J Chromatogr B*, 760, 73-81.
- Korotkov, K. V., Novoselov, S. V., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. (2002):** Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Cell Mol Biol*, 22, 1402-1411.
- Kraal, G. (2005):** Nasal-Associated Lymphoid Tissue. In: J. Mestecky, J., Ogra, P. L., Mcghee, J. R., Lambrecht, B. N., Strober, W. (Eds.). *Mucosal immunology*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, s. 415-422. ISBN 0124915434.
- Kraus, M. D. (2003):** Splenic histology and histopathology: an update. *Semin Diagn Pathol*, 20, 84-93.
- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., Gladyshev, V. N. (2003):** Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300, 1439-1443.
- Kuehnelt, D., Kienzl, N., Traar, P., Le, N. H., Francesconi, K. A., Ochi, T. (2005):** Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: a quantitative case study by HPLC/ICPMS. *Anal Bioanal Chem*, 383, 235-246.
- Kucharzik, T., Lugerling, N., Rautenberg, K., Lugerling, A., Schmidt, M. A., Stoll, R., Domschke, W. (2000):** Role of M cells in intestinal barrier function. Epithelial Transport and Barrier Function. *Ann N Y Acad Sci* 915, 171-183.
- Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K. V., Kozyavkin, S., Hu, Y., Kwon, S. Y., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Berry, M. J., Lee, B. J., Hatfield, D. L., Diamond, A. M., Gladyshev, V. N. (2000):** Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene - Possible role of the protein in cancer etiology. *J Biol Chem*, 275, 35540-35547.
- Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Van Breda Vriesman, P. J., Sminia, T. (1992):** The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today*, 13, 219-224.
- Kvíčala, J. (2003):** Zvýšení příjmu mikronutrientu selenu - utopie, fikce, prozřetelnost či nutnost? - I. část. *Interní medicína pro praxi*, 5, 295-300.

- Kvičala, J., Zamrazil, V., Soutorová, M., Tomiška, F. (1995):** Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst*, 120, 959-965.
- Lanning, D. K., Knight, K. L. (1997):** Somatic hypermutation: mutations 3' of rabbit VDJ H-chain genes. *J Immunol*, 159, 4403-4407.
- Larsen, H. J. (1993):** Relations between selenium and immunity. *Norweg J Agr Sci*, 11, 105-119.
- Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., Peng, Y., Hao, W., Xu, J., Yuan, J., Wang, S., Qiang, B., Xu, C., Peng, X. (2006):** Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. *Febs Lett*, 580, 5189-5197.
- Macdonald, T. T. (2003):** The mucosal immune system. *Parasite Immunol*, 25, 235-246.
- Magalhaes, J. G., Tattoli, I., Girardin, S. E. (2007):** The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, 19, 106-115.
- Mage, R. G. (1998):** Lymphoid organs, their anatomical distribution and ontogeny of the immune system. In: (Pastoret, P. P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds.). *Handbook of vertebrate immunology*. 1st ed. San Diego: Academic Press, s. 223-260. ISBN 0125464010.
- Mage, R. G., Lanning, D., Knight, K. L. (2006):** B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol*, 30, 137-153.
- Marsh, J. A., Combs, G. F., Jr., Whitacre, M. E., Dietert, R. R. (1986):** Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chick lymphoid organ development. *Proc Soc Exp Biol Med*, 182, 425-436.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kotani, M. (1989):** Splenic outer periaarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. *Cell Tissue Res*, 257, 459-470.
- Maxie, M. G., Jubb, K. V. F. (2007):** *Pathology of domestic animals*. 5th ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, 770 s. ISBN 0-7020-2786-3.
- Mcconnell, K. P., Cho, G. J. (1965):** Transmucosal Movement of Selenium. *Am J Physiol*, 208, 1191-1205.
- Mcconnell, K. P., Cho, G. J. (1967):** Active transport of L-selenomethionine in the intestine. *Am J Physiol*, 213, 150-156.

- Mcconnell, K. P., Roth, D. M. (1966):** Respiratory excretion of selenium. *Proc Soc Exp Biol Med*, 123, 919-921.
- Mccord, J. M. (2000):** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108, 652-659.
- Mcgavin, M. D., Zachary, J. F. (2007):** *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier, 1788 s. ISBN 0323028705.
- Mckenzie, R. C., Arthur, J. R., Beckett, G. J. (2002a):** Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal*, 4, 339-351.
- Mckenzie, R. C., Arthur, J. R., Miller, S. M., Rafferty, T. S., Beckett, G. J. (2002b):** Selenium and Immune System. In: Calder, P. C., Field, C. J., Gill, H. S. (Eds.) *Nutrition and immune function*. New York: CABI Pub, s. 229-250. ISBN 0851995837.
- Mckenzie, R. C., Beckett, G. J., Arthur, J. R. (2006):** Effects of selenium on immunity and aging. In: Hatfield, D. L., Berry, M. J., Gladyshev, V. N. (Eds.) *Selenium: its molecular biology and role in human health*. 2nd ed. New York: Springer, s. 311-322. ISBN 0387338268.
- Mebius, R. E., Kraal, G. (2005):** Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, 5, 606-616.
- Mills, S. E. (2007):** *Histology for pathologists*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1280 s. ISBN 0781762413.
- Milne, R. W., Bienenstodk, J., Perey, D. Y. (1975):** The influence of antigenic stimulation on the ontogeny of lymphoid aggregates and immunoglobulin-containing cells in mouse bronchial and intestinal mucosa. *J Reticuloendothel Soc*, 17, 361-369.
- Muller, A. S., Pallauf, J., Most, E. (2002):** Parameters of dietary selenium and vitamin E deficiency in growing rabbits. *J Trace Elem Med Biol*, 16, 47-55.
- Neutra, M. R. (1998):** Current Concepts in Mucosal Immunity - V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol-Gastr L*, 37, 785-791.
- Newberry, R. D. (2008):** Intestinal lymphoid tissues: Is variety an asset or a liability?. *Curr Opin Gastroen*, 24, 121-128.
- Nordberg, J., Arner, E. S. (2001):** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31, 1287-1312.

- Novotný, E., Bohm, R., Geilssel, V., Holman, J. (1966):** *Veterinární histologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 637 s.
- O'toole, D., Raisbeck, M. F. (1995):** Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest*, 7, 364-373.
- Owen, R. L., Jones, A. L. (1974):** Epithelial-Cell Specialization within Human Peyers Patches - Ultrastructural Study of Intestinal Lymphoid Follicles. *Gastroenterology*, 66, 189-203.
- Pabst, R., Gehrke, I. (1990):** Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3, 131-135.
- Pan, J. L., Mcever, R. P. (1993):** Characterization of the Promoter for the Human P-Selectin Gene. *J Biol Chem*, 268, 22600-22608.
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K. K. (2007):** From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 9, 775-806.
- Pearse, G. (2006):** Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol*, 34, 504-514.
- Peng, X., Cui, H., Cui, Y., Deng, J., Zuo, Z., Fang, J. (2011a):** Lesions of thymus and decreased percentages of the peripheral blood T-cell subsets in chickens fed on diets excess in selenium. *Hum Exp Toxicol*, 30, 1972-1978.
- Peng, X., Cui, H., Deng, J., Zuo, Z., Lai, W. (2011b):** Histological lesion of spleen and inhibition of splenocyte proliferation in broilers fed on diets excess in selenium. *Biol Trace Elem Res*, 140, 66-72.
- Peng, X., Cui, Y., Cui, W., Deng, J., Cui, H., Yang, F. (2011c):** The cell cycle arrest and apoptosis of bursa of Fabricius induced by low selenium in chickens. *Biol Trace Elem Res*, 139, 32-40.
- Peng, X., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Pan, K., Lai, W., Zhou, Y. (2012):** Low selenium diet alters cell cycle phase, apoptotic population and modifies oxidative stress markers of spleens in broilers. *Biol Trace Elem Res*, 148, 182-186.
- Peng, X., Cui, Y., Cui, W., Deng, J. L., Cui, H. M. (2009):** The Decrease of Relative Weight, Lesions, and Apoptosis of Bursa of Fabricius Induced by Excess Dietary Selenium in Chickens. *Biol Trace Elem Res*, 131, 33-42.
- Percy, D. H., Barthold, S. W. (2007):** *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. 3rd ed. Iowa: Blackwell, 356 s. ISBN 0813821010.

- Perey, D. Y., Cooper, M. D., Good, R. A. (1968):** The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. I. Neonatal extirpation of Peyer's patch-type lymphoepithelial tissues in rabbits: methods and inhibition of development of humoral immunity. *Surgery*, 64, 614-621.
- Pierce, S., Tappel, A. L. (1977):** Effects of Selenite and Selenomethionine on Glutathione Peroxidase in Rat. *J Nutr*, 107, 475-479.
- Pisek, L., Travnicek, J., Salat, J., Kroupova, V., Soch, M. (2008):** Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. *Vet Med Czech*, 53, 255-259.
- Pospisil, R., Mage, R. G. (1998):** Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. *Curr Top Microbiol Immunol*, 229, 59-70.
- Pospisil, R., Young-Cooper, G. O., Mage, R. G. (1995):** Preferential expansion and survival of B lymphocytes based on VH framework 1 and framework 3 expression: "positive" selection in appendix of normal and VH-mutant rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6961-6965.
- Powis, G., Montfort, W. R. (2001):** Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30, 421-455.
- Powis, G., Mustacich, D., Coon, A. (2000):** The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med*, 29, 312-322.
- Prabhu, K. S., Zamamiri-Davis, F., Stewart, J. B., Thompson, J. T., Sordillo, L. M., Reddy, C. C. (2002):** Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. *Biochem J*, 366, 203-209.
- Rampal, S., Kumar, R., Randhawa, C. S., Sood, N. (2008):** Maturation arrest of neutrophils-a possible reason for the leucopenia in sodium selenite induced sub-chronic selenosis in cow calves. *Environ Toxicol Pharmacol*, 25, 39-42.
- Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J., Collins, T. (1997):** Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappa B and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 272, 2753-2761.
- Reilly, C. (2006):** *Selenium in food and health*. 2nd ed. New York: Springer, 222 s. ISBN 038733243.
- Reynolds, J. D., Morris, B. (1983):** The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol*, 13, 627-635.

- Ross, M. H., Pawlina, W. (2006):** *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 906 s. ISBN 0781767903.
- Rouse, R. V., Ledbetter, J. A., Weissman, I. L. (1982):** Mouse lymph node germinal centers contain a selected subset of T cells--the helper phenotype. *J Immunol*, 128, 2243-2246.
- Saito, H., Yokoi, Y., Watanabe, S., Tajima, J., Kuroda, H., Namihisa, T. (1988):** Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *Am J Anat*, 181, 235-252.
- Samuelson, D. A. (2007):** *Textbook of veterinary histology*. 1st ed. St. Louis: Saunders-Elsevier, 560 s. ISBN0721681743.
- Satodate, R., Tanaka, H., Sasou, S., Sakuma, T., Kaizuka, H. (1986):** Scanning electron microscopical studies of the arterial terminals in the red pulp of the rat spleen. *Anat Rec*, 215, 214-216.
- Sengupta, A., Carlson, B. A., Labunskyy, V. M., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2009):** Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol*, 87, 953-961.
- Shaykhiev, R., Bals, R. (2007):** Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *J Leukocyte Biol*, 82, 1-15.
- Shils, M. E., Shike, M. (2006):** *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams a Wilkins, 2146 s. ISBN: 0781741335.
- Shiobara, Y., Ogra, Y., Suzuki, K. T. (1999):** Speciation of metabolites of selenate in rats by HPLC-ICP-MS. *Analyst*, 124, 1237-1241.
- Schuurman, H. J., Kuper, C. F., Vos, J. G. (1994):** Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Toxicology*, 86, 187-212.
- Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W. D., Von Zglinicki, T., Davies, K. J. (2000):** Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J*, 14, 1490-1498.
- Sminia, T., Kraal, G. (1999):** Nasal-associated lymphoid tissue. In: J. Mestecky, J., Ogra, P. L., Mcghee, J. R., Lambrecht, B. N., Strober, W. (Eds.). *Mucosal immunology*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, s. 354-362. ISBN 0124915434.
- Sminia, T., Van Der Brugge-Gamelkoorn, G. J., Jeurissen, S. H. (1989):** Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol*, 9, 119-150.

- Snipes, R. L. (1978):** Anatomy of the rabbit cecum. *Anat Embryol (Berl)*, 155, 57-80.
- Spallholz, J. E. (1997):** Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci*, 10, 260-270.
- Spallholz, J. E., Boylan, L. M., Larsen, H. S. (1990):** Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 587, 123-139.
- Spallholz, J. E., Martin, J. L., Gerlach, M. L., Heinzerling, R. H. (1973):** Immunologic responses of mice fed diets supplemented with selenite selenium. *Proc Soc Exp Biol Med*, 143, 685-689.
- Spencer, J., Finn, T., Isaacson, P. G. (1986):** Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. *Gut*, 27, 405-410.
- Sunde, R. A. (1990):** Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr*, 10, 451-474.
- Surai, P. F. (2006):** Selenium in nutrition and health. Nottingham: Nottingham University Press, 974 s. ISBN 190476116.
- Suzuki, K. T., Ogra, Y. (2002):** Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Addit Contam*, 19, 974-983.
- Suzuki, K. T., Sasakura, C., Yoneda, S. (1998):** Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P. *Biochim Biophys Acta*, 1429, 102-112.
- Tichý, F., Horký, D., Buchtová, M., Gorošová, A., Kociánová, I., Páral, V., Zibrín, M. (2004):** Histologie Mikroskopická anatomie. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 275 s.
- Tiwary, A. K., Stegelmeier, B. L., Panter, K. E., James, L. F., Hall, J. O. (2006):** Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. *J Vet Diagn Invest*, 18, 61-70.
- Toman, M. (2009):** Veterinární imunologie 2edn. Praha: Grada, 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
- Travnicek, J., Pisek, L., Herzig, I., Doucha, J., Kvicala, J., Kroupova, V., Rodinova, H. (2007):** Selenium content in the blood serum and urine of ewes receiving selenium-enriched unicellular alga Chlorella. *Vet Med Czech*, 52, 42-48.
- Turan, B., Zaloglu, N., Koc, E., Saran, Y., Akkas, N. (1997):** Dietary selenium- and vitamin E-induced alterations in some rabbit tissues. *Biol Trace Elem Res*, 58, 237-253.
- Ueno, H., Kajihara, H., Nakamura, H., Yodoi, J., Nakamuro, K. (2007):** Contribution of thioredoxin reductase to T-cell mitogenesis and NF-kappaB DNA-binding promoted by selenite. *Antioxid Redox Signal*, 9, 115-121.

- Vacek, Z. (1986):** Systém trávicí. In: Klika, E., Vacek, Z., Dvořák, M., Kapeller, K. (Eds.). *Histologie*. 1. ed. Praha: Avicenum, s. 286-353. ISBN 08-110-86.
- Vajdy, M., Sethupathi, P., Knight, K. L. (1998):** Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J Immunol*, 160, 2725-2729.
- Van Rees, E. P., Sminia, T., Dijkstra, C. D. (1996):** Structure and Development of the Lymphoid Organs. In: (Mohr, U., Dungworth, D. L., Capen, C. C., Carlton, W. W., Sundberg, J. P., Ward, J. M. (Eds.) *Pathobiology of the Aging Mouse*. Washington: ILSI Press, s. 173-187. ISBN 0944398561.
- Vega, L., Rodriguez-Sosa, M., Garcia-Montalvo, E. A., Del Razo, L. M., Elizondo, G. (2007):** Non-optimal levels of dietary selenomethionine alter splenocyte response and modify oxidative stress markers in female mice. *Food Chem Toxicol*, 45, 1147-1153.
- Verma, S., Hoffmann, F. W., Kumar, M., Huang, Z., Roe, K., Nguyen-Wu, E., Hashimoto, A. S., Hoffmann, P. R. (2011):** Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. *J Immunol*, 186, 2127-2137.
- Waksman, B. H., Ozer, H., Blythman, H. E. (1973):** Appendix and M-antibody formation. VI. The functional anatomy of the rabbit appendix. *Lab Invest*, 28, 614-626.
- Ward, J. M., Mann, P. C., Morishima, H., Frith, C. H. (1999):** Thymus, Spleen, and Lymph Nodes. In: Pathology of the mouse : reference and atlas,(R. R. Maronpot, ed. Vienna, Ill., Cache River Press, pp. 333-360.
- Weinstein, P. D., Anderson, A. O., Mage, R. G. (1994a):** Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by, gene conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunity*, 1, 647-659.
- Weinstein, P. D., Mage, R. G., Anderson, A. O. (1994b):** The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv Exp Med Biol*, 355, 249-253.
- Whanger, P. D. (2001):** Selenium and the brain: A review. *Nutr Neurosci*, 4, 81-97.
- Wilkins, B., Wright, D. H. (2000):** *Illustrated pathology of the spleen*. 1 st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 204 s. ISBN 0521622271.
- Willard-Mack, C. L. (2006):** Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol*, 34, 409-424.

- Wolffram, S., Arduser, F., Scharrer, E. (1985):** In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *J Nutr*, 115, 454-459.
- Wolffram, S., Berger, B., Grenacher, B., Scharrer, E. (1989):** Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs. *J Nutr*, 119, 706-712.
- Wright, D. H., Addis, B. J., Leong, A. S. Y. (2006):** Diagnostic lymph node pathology. London: Hodder Arnold, 184 s. ISBN 0340706090.
- Wu, S. J., Chen, N. H. (2007):** Characteristics of histological location of bursin in sacculus rotundus and gut-associated lymphoid tissues of rabbits. *J Shanghai University*, 11, 189-192.
- Xu, X. M., Carlson, B. A., Zhang, Y., Mix, H., Kryukov, G. V., Glass, R. S., Berry, M. J., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2007):** New developments in selenium biochemistry: selenocysteine biosynthesis in eukaryotes and archaea. *Biol Trace Elem Res*, 119, 234-241.
- Yang, G., Zhou, R., Yin, S., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., Li, X. (1989):** Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, 3, 77-87.
- Yeh, J. Y., Beilstein, M. A., Andrews, J. S., Whanger, P. D. (1995):** Tissue Distribution and Influence of Selenium Status on Levels of Selenoprotein-W. *Faseb J*, 9, 392-396.
- Young, B., Lowe, J. S., Stevens, A., Heath, J. W. Deakin, P. J. (2006):** *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, 448 s. ISBN 044306850X.
- Yu, D., Li, J. L., Zhang, J. L., Gao, X. J., Xu, S. (2011):** Effects of Dietary Selenium on Selenoprotein W Gene Expression in the Chicken Immune Organs. *Biol Trace Elem Res*, 144,678-687.
- Zbikowska, H. M., Wachowicz, B., Krajewski, T. (1999):** Selenium compounds inhibit the biological activity of blood platelets. *Platelets*, 10, 185-190.
- Zeng, H. (2009):** Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules*, 14, 1263-1278.
- Zhang, F., Yu, W., Hargrove, J. L., Greenspan, P., Dean, R. G., Taylor, E. W., Hartle, D. K. (2002):** Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis*, 161, 381-386.

Zimmerman, K. L., Moore, D. M., Smith, S. A. (2010): Hematology of Laboratory Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*). In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, s. 862-869. ISBN 978-0-8138-1798-9.

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Selenoproteiny a jejich funkce	30
Tabulka 2 Průměrná živá hmotnost zvířat na začátku experimentu a obsah selenu v krmné dávce.....	40
Tabulka 3 Přehled barvicích metod a použité primární protilátky	42
Tabulka 4 Hodnocení histologických nálezů (μm)	46
Tabulka 5 Hodnocení celulizace – počet buněk v $1 \mu\text{m}^2$	46
Tabulka 6 Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách – anorganická forma Se.....	53
Tabulka 7 Histologické nálezy v krčních mízních uzlinách – organická forma Se	53
Tabulka 8 Histologické nálezy v popliteálních mízních uzlinách – anorganická forma Se.....	57
Tabulka 9 Histologické nálezy v popliteálních mízních uzlinách – organická forma Se.....	57
Tabulka 10 Histologické nálezy v mezenteriálních mízních uzlinách – anorganická forma Se	61
Tabulka 11 Histologické nálezy v mezenteriálních mízních uzlinách – organická forma Se..	61
Tabulka 12 Histologické nálezy v Peyerových placích – anorganická forma Se.....	66
Tabulka 13 Histologické nálezy v Peyerových placích – organická forma Se	66
Tabulka 14 Histologické nálezy v apendixu – anorganická forma Se	70
Tabulka 15 Histologické nálezy v apendixu – organická forma Se	70
Tabulka 16 Histologické nálezy ve slezině – anorganická forma Se	74
Tabulka 17 Histologické nálezy ve slezině – organická forma Se	74
Tabulka 18 Histologické nálezy v thymu – organická forma Se.....	77
Tabulka 19 Procentuální zastoupení CD79 ⁺ buněk v lymfatických orgánech – anorganická forma Se.....	81

Tabulka 20 Procentuální zastoupení CD79 ⁺ buněk v lymfatických orgánech – organická forma Se.....	81
---	----

10 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Průměrná živá hmotnost králíků s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	47
Graf 2 Průměrná živá hmotnost králíků s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	48
Graf 3 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	49
Graf 4 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	49
Graf 5 Průměrná relativní hmotnost sleziny s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	85
Graf 6 Průměrná relativní hmotnost sleziny s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	85
Graf 7 Průměrný počet leukocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	87
Graf 8 Průměrný počet leukocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	87
Graf 9 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	90
Graf 10 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	91
Graf 11 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	91
Graf 12 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	92
Graf 13 Průměrná fagocytární aktivita s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – anorganická forma Se	93
Graf 14 Průměrná fagocytární aktivita s odchylkami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti) – organická forma Se	93

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Výrazná celulizace subkapsulárních sinusů v mezenteriální mízní uzlině (1. skupina – organická forma Se), HE.	100
Obr. 2 Slabá celulizace subkapsulárních sinusů v krční mízní uzlině (3. skupina – organická forma Se), HE.	100
Obr. 3 Slabá celulizace medulárních trámčů popliteální mízní uzliny (2. skupina – organická forma Se), HE.	101
Obr. 4 Výrazná celulizace medulárních trámčů mezenteriální mízní uzliny (2. skupina – organická forma Se), HE.	101
Obr. 5 Nízká celulizace medulárních sinusů v krční mízní uzlině (1. skupina – organická forma Se), HE.	102
Obr. 6 Silná celulizace medulárních sinusů v mezenteriální mízní uzlině (2. skupina – organická forma Se), HE.	102
Obr. 7 Makrofágy fagocytující pigment v mezenteriální mízní uzlině (2. skupina – organická forma Se), HE.	103
Obr. 8 Snížená celulizace parakortexu a atrofické lymfatické noduly v krční mízní uzlině (1. skupina – organická forma Se), HE.	103
Obr. 9 Relativně slabě celulizovaný zevní kortex a parakortex krční mízní uzliny. Sekundární lymfatické noduly jsou však formovány (2. skupina – organická forma Se), HE.	104
Obr. 10 V části kompartmentů krční mízní uzliny se nachází atrofická kůra tvořená atrofickými lymfatickými noduly (1. skupina – organická forma Se), HE.	104
Obr. 11 Výrazná reaktivní hyperplazie (lymfatické noduly v oblasti kortexu a meduly) v mezenteriální mízní uzlině (1. skupina – anorganická forma Se), HE.	105
Obr. 12 Snížená celulizace parakortexu a atrofické lymfatické noduly v mezenteriální mízní uzlině (3. skupina – anorganická forma Se), HE.	105
Obr. 13 Makrofágy fagocytující pigment na hranici kůry a dřene krční mízní uzliny (2. skupina – organická forma Se), HE.	106
Obr. 14 Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň Peyerových plaků (3. skupina – organická forma Se), HE.	106

Obr. 15 Agregované a diseminované makrofágy fagocytující pigment v oblasti dómu Peyerových plaků (3. skupina – organická forma Se), HE.....	107
Obr. 16 Antigenně aktivovaná lymfatická tkáň apendixu (3. skupina – organická forma Se), HE.....	107
Obr. 17 Výrazná exocytóza lymfocytů do epitelu dómu apendixu (3. skupina – organická forma Se), HE.	108
Obr. 18 Splendor-Hoepliho fenomén v apendixu (2. skupina – organická forma Se), HE..	108
Obr. 19 Hustě celulizované trámce červené pulpy sleziny (2. skupina – organická forma Se), HE.	109
Obr. 20 Široké sinusy červené pulpy sleziny (3. skupina – organická forma Se), HE.....	109
Obr. 21 Střední depozita hyalinní substance na periferii PALP (2. skupina – anorganická forma Se), HE.....	110
Obr. 22 CD79 ⁺ v B dependentní oblasti. CD79 ⁻ v rozsáhlé T dependentní oblasti popliteální mízní uzliny (3. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79 α	110
Obr. 23 Vysoce pozitivní CD79 ⁺ buňky v plášťové zóně germinativního centra a v subkapsulárních sinusech. Slabě pozitivní buňky ve světlé zóně germinativního centra. Ojedinelé CD79 ⁺ buňky v parakortexu popliteální mízní uzliny (3. skupina - organická forma Se), Anti - Human CD79 α	111
Obr. 24 CD79 ⁺ buňky v medulárních trámcích a medulárních sinusech popliteální mízní uzliny (3. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79 α	111
Obr. 25 CD79 ⁺ buňky v oblasti lymfatických nodulů, oblasti korony a dómu apendixu (2. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79 α	112
Obr. 26 CD79 ⁺ buňky v germinativním centru a oblasti korony apendixu. Interfolikulární oblast tvořená CD79 ⁻ buňkami (2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79 α ...	112
Obr. 27 Směsná populace CD79 ⁺ a CD79 ⁻ buněk v oblasti dómu apendixu (2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79 α	113
Obr. 28 CD79 ⁺ buňky v lymfatickém nodulu, koruně a dómu Peyerových plaků (3. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79 α	113
Obr. 29 CD79 ⁺ buňky v oblasti dómu Peyerových plaků (2. skupina – organická forma Se), Anti - Human CD79 α	114

Obr. 30 CD79 ⁺ buňky v oblasti lymfatických nodulů a marginální zóny. Ve světlé zóně germinativního centra nízká pozitivita buněk. CD79 ⁻ buňky se nacházejí v oblasti PALP sleziny (2. skupina – anorganická forma Se), Anti - Human CD79α.....	114
Obr. 31 Negativní průkaz fosfolipidů v makrofázích apendixu (3. skupina – organická forma Se), PFAS.....	115
Obr. 32 Negativní průkaz fosfolipidů v makrofázích Peyeroých plaků (3. skupina – organická forma Se), PFAS.....	115
Obr. 33 Průkaz lipopigmentů. Vysoce pozitivní substance v makrofázích fagocytujících pigment v Peyeroých placích (2. skupina – organická forma Se), Ziehl-Neelson.	116
Obr. 34 Nízce až středně pozitivní substance v makrofázích fagocytujících pigment v apendixu (2. skupina – organická forma Se), Ziehl-Neelson.	116

12 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace v časopisech s IF:

Banoch, T., Fajt, Z., Kuta, J., Kotrbacek, V., **Konecny, R.**, Travnicek, J., Svoboda, M. (2011): Utilisation of iodine from different sources by sows and their progeny. *Neuroendocrinology Letters*, 32 (4). 510 - 517.

Jelinek, F., **Konecny, R.** (2011): Adrenal Glands of Slaughtered Bulls, Heifers and Cows: A Histological Study. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 40, 28 - 34.

Travnicek, J., Kroupova, V., **Konecny, R.**, Stankova, M., Stastna, J., Hasonova, L., Mikulova, M. (2010): Iodine status in ewes with the intake of iodine enriched alga *Chlorella*. *Czech Journal of Animal Science*, 55. 58 - 65.

Šeda, M., Švehla, J., Trávníček, J., Kroupová, V., **Konečný, R.**, Fiala, K., Svozilová, M., Krhovjaková, J. (2012): The effect of volcanic activity of the Eyjafjallajökul volcano on iodine concentration in precipitation in the Czech Republic, *Chemie der Erde - Geochemistry*, 72 (3), 279 - 281.

Dušová, H., Trávníček, J., Svoboda, M., Baňoch, T., Kroupová, V., Peksa, Z., **Konecny, R.** (2012): The impact of high iodine intake on thyroid function in ewes and lambs. *Neuroendocrinology Letters*, 33 (5), 517 - 524.

Publikace v odborných recenzovaných časopisech:

Peksa, Z., Trávníček, J., Dušová, H., **Konečný, R.**, Hasoňová, L. (2011): Morphological and histometric parameters of the thyroid gland in slaughter cattle, *Journal of Agrobiology*, 28, 79 - 84.

Konečný, R., Trávníček, J., Hasoňová, L., Plicka, J., Kroupová, V., Staňková, M., Peksa, Z. (2011): Antibody production in sheep fed a diet containing brown seaweed. *Journal of Agrobiology*, 28, 61 - 65.

Trávníček, J., Kroupová, V., Hanuš, O., Fiala, K., Zelený, J., **Konečný, R.**, Staňková, M. (2011): Nutnost kontinuálního sledování suplementace dojených krav jódem. *Veterinářství*, 61: 273 - 275.

Certifikované metodiky:

Trávníček, J., Kroupová, V., Dušová, H., Krhovjáčková, J., **Konečný, R.** (2011):
Optimalizace obsahu jodu v kravském mléce. Jihočeská univerzita v Č. Budějovicích,
Agrovýzkum s.r.o. Rapotín. Uplatněná certifikovaná metodika. 55 s. ISBN 978-80-7394-
328-8.