JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika
Studijní obor: Zootechnika
Katedra: Zootechnických věd
Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

POSTNATÁLNÍ ZMĚNY SLEZINY KRÁLÍKA

Vedoucí diplomové práce: Ing. Roman Konečný, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Kristýna Štěchová

České Budějovice, 2018

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Kristýna ŠTĚCHOVÁ**
Osobní číslo:	**Z16318**
Studijní program:	**N4103 Zootechnika**
Studijní obor:	**Zootechnika**
Název tématu:	**Postnatální vývoj sleziny králíka**
Zadávající katedra:	**Katedra zootechnických věd**

Zásady pro vypracování:

Slezina je významný sekundární lymfatický orgán, který v průběhu postnatálního období života prodělává vývojové změny. Ve srovnání s jinými laboratorními zvířaty není u králíků o těchto změnách dostatek informací.
Cílem práce je přinést poznatky o morfologii sleziny králíka v rané ontogenezi.
Zpracujete literární přehled o anatomické a histologické stavbě sleziny. V definovaném období postnatálního vývoje králíků provedete odběr sleziny a zjistíte její hmotnost. Odebranou tkáň zpracujete běžnou histologickou technikou. Připravíte a obarvíte histologické řezy, které následně posoudíte. Při vyšetřování histologických řezů se zaměříte na přítomnost lymfatických nodulů, germinativních center a na vývin periarteriálních lymfatických plášťů. Získané výsledky porovnáte s dostupnými literárními zdroji.

Rozsah grafických prací: **2 tabulky, 2 grafy, 6 fotografií**

Rozsah pracovní zprávy: **40 - 50 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Brendolan, A., Rosado, M. M., Carsetti, R., Selleri, L., Dear T. N. (2007): Development and function of the mammalian spleen. BioEssays. 29(2):166-177.
Cesta, M. F. (2006): Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicologic Pathology, 34, 455-465.
Jeklova, E., Leva, L., Faldyna, M. (2007): Lymphoid organ development in rabbits: major lymphocyte subsets. Developmental Comparative Immunology, 31, 632-644.
Parker, G. A., Picut, C. A., Swanson, C, Toot, J. D. (2015): Histologic Features of Postnatal Development of Immune System Organs in the Sprague-Dawley Rat. Toxicologic Pathology, 43(6), 794-815.
Van de Pavert, S. A., Mebius, R. E. (2010): New insights into the development of lymphoid tissues. Nature Immunology Rewie, 10 (9), 664-674.
Elektronické informační zdroje Akademické knihovny JU v Č. Budějovicích (internetové databáze): ISI Web of Knowledge (Web of Science), Pubmed, příslušné odborné a vědecké časopisy.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Konečný, Ph.D.**
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: **27. března 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2018**

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 27. března 2017

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci na téma „Postnatální změny sleziny králíka“ vypracovala samostatně, s použitím zdrojů a literatury uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47 b zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby tutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....

Kristýna Štěchová

V Českých Budějovicích dne……

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, Ing. Romanovi Konečnému, Ph. D., za ochotu, trpělivost, cenné rady a veškerou pomoc, kterou mi při zpracování práce poskytoval.

Diplomová práce vznikla za podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích – GAJU 094/2016/Z.

Abstrakt

Slezina je největší sekundární lymfatický orgán, jehož vývoj probíhá v krátkém postnatálním období. Informace o postnatálním vývoji sleziny králíka jsou v dostupných literárních zdrojích minimální. Předložená diplomová práce se zabývá hmotnostními, morfometrickými a histologickými změnami sleziny králíků ve věku 0, 5, 10, 14, 19, 27, 32 a 39 dní. V průběhu postnatálního vývoje králíků došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení hmotnosti, délky a šířky sleziny. Slezina novorozených králíků představovala relativně drobný orgán o průměrné délce 1,03±0,12 cm, šířce 0,2±0,01 cm a hmotnosti 52,50±9,69 g. Ve stáří 39 dnů odpovídala velikostně a tvarově slezině dospělých jedinců (průměrná délka 4,97±0,73 cm, šířka 0,9±0,18 cm a hmotnost 1078,40±143,35 g). Mezi hmotnostními a morfometrickými parametry byly pozorovány vysoké korelační koeficienty v rozmezí od 0,891 do 0,989. Růst sleziny byl doprovázen zvyšující se celulizací parenchymu, zesilováním vazivového pouzdra (z 8,04±1,50 μm na 31,30±5,51 μm) a postupným výskytem vazivových trámců v parenchymu. U novorozených králíků převládala v parenchymu sleziny červená pulpa s vysokým podílem erytrocytů. Lymfatická tkáň tvořila pouze malé nepravidelné agregace bazofilních mononukleárních buněk okolo nečetných centrálních arterií. Zastoupení bazofilních buněk a cév se v průběhu věku zvyšovalo a docházelo k postupnému formování bílé pulpy. U 14denních králíků byla dobře patrná marginální zóna a prvně formovány primární lymfatické noduly tvořené $CD\ 79^+$ buňkami. Od 14. do 39. dne docházelo ve slezině k postupnému zvyšování četnosti a velikosti jednotlivých kompartmentů, přičemž ojedinělá germinální centra byla pozorována v lymfatických nodulech až 39. den. V celém průběhu pozorování byla ve slezině patrná extramedulární hematopoéza o různé intenzitě.

Klíčová slova: králík, slezina, histologie, imunitní systém, postnatální.

Abstract

Spleen is the largest secondary lymphatic organ which develops in a short postnatal period. Information on postnatal development of rabbit spleen is minimal in available literary sources. This diploma thesis deals with the weight, morphometric and histological changes of the spleen of rabbits at age 0, 5, 10, 14, 19, 27, 32 and 39 days. During postnatal development of rabbits, a statistically significant ($P < 0.01$) increase in the weight, length and width of the spleen occurred. The spleen of newborn rabbits was a relatively small organ with an average length of 1.03±0.12 cm, a width of 0.2±0.01 cm and a weight of 52.50±9.69 g. At age 39 days the size and shape of spleen of adult individuals (average length 4.97±0.73 cm, width 0.9±0.18 cm and weight 1078.40±143.35 g). Between the weight and morphometric parameters, high correlation coefficients were observed in the range of 0.891 to 0.998. Spleen growth was accompanied by increasing cellularisation of the parenchyma, by strengthening the connective tissue (from 8.04±1.50 μm to 31.30±5.51 μm) and the progressive occurrence of connective tissue in the parenchyma. In the newborn rabbits, a red pulp with a high level of erythrocytes prevailed in the spleen parenchyma. Lymphatic tissue consisted only of small irregular aggregations of basophilic mononuclear cells around several central arteries. Basophilic and vascularization increased in the course of the age and the white pulp was gradually formed. In 14 day rabbits, the marginal zone was well-known, and primary lymph nodes formed by $CD79^+$ cells were first formed. From 14th to 39th day the spleen gradually increased the frequency and size of the individual compartments, with rare germinal centers observed in the lymph nodes until the 39th day. Throughout the course of the observation, extramedullary haematopoiesis of different intensity was seen in the spleen.

Keywords: rabbit, spleen, histology, immune system, postnatal development.

Obsah

1. ÚVOD A CÍL 10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 11
2.1 Anatomické uspořádání sleziny 11
2.2 Histologická stavba sleziny 13
2.2.1 Bílá pulpa (BP) 14
2.2.1.1 Periarteriolární lymfatické pláště (PALS) 15
2.2.1.2 Lymfatické noduly (LN) 15
2.2.1.3 Marginální zóna (MZ) 16
2.2.2 Červená pulpa (ČP) 17
2.3 Krevní zásobení sleziny 18
2.4 Inervace sleziny 19
2.5 Embryonální vývoj sleziny 19
3. MATERIÁL A METODY 21
3.1 Experimentální zvířata 21
3.2 Odběr vzorků 21
3.3 Histologické zpracování vzorku 21
3.4 Imunohistochemické vyšetření 22
3.4.1 Použité protilátky 22
3.4.1.1 Primární protilátka 22
3.4.1.2 Sekundární protilátka 22
3.4.2 Použité detekční systémy 22
3.4.3 Ředění primární protilátky 22
3.4.4 Použité pufry 23
3.4.5 Vlastní metodika imunohistochemických reakcí 23
3.4.6 Kontroly 23

3.5 Morfometrická analýza 24
3.6 Statistické zpracování dat 24
4. Výsledky a diskuze 25
4.1 Hmotnost a morfometrické parametry sleziny králíka 25
4.1.1 Hmotnost sleziny 25
4.1.2 Délka a šířka sleziny 27
4.1.3 Plocha řezu sleziny 28
4.2 Histologická analýza a imunohistochemická analýza 29
4.2.1 Histologická stavba sleziny 0. den vývoje 29
4.2.2 Histologická stavba sleziny 5. postnatální den vývoje 30
4.2.3 Histologická stavba sleziny 10. postnatální den vývoje 31
4.2.4 Histologická stavba sleziny 14. postnatální den vývoje 32
4.2.5 Histologická stavba sleziny 27. postnatální den vývoje 34
4.2.6 Histologická stavba sleziny 32. postnatální den 34
4.2.7 Histologická stavba sleziny 39. postnatální den vývoje 35
4.3 Shrnutí histologických nálezů 37
5. Závěr 39
6. SEZNAM OBRÁZKŮ 41
7. SEZNAM TABULEK 41
8. SEZNAM GRAFŮ 41
9. SEZNAM ZKRATEK 42
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 43

1. ÚVOD A CÍL

Slezina je největší sekundární lymfatický orgán, který v organizmu zabezpečuje širokou škálu funkcí, mezi které patří filtrace krevních antigenů, aktivace lymfocytů, tvorba protilátek, odstranění erytrocytů, metabolizmus hemoglobinu a železa. V průběhu fetálního, případně i v krátkém období postnatálního vývoje zde také probíhá hematopoéza.

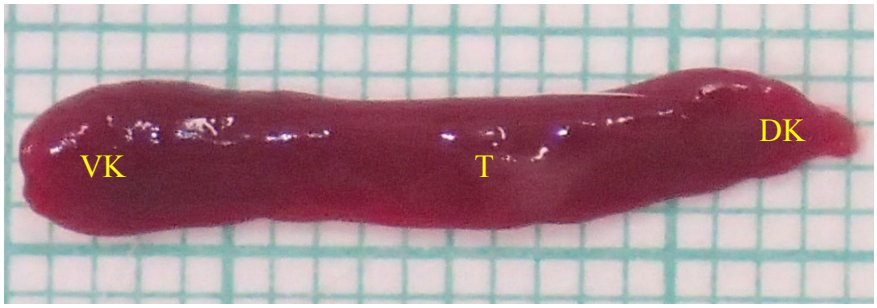
Uvedené funkce probíhají v odlišných kompartmentech sleziny, a to v červené pulpě, bílé pulpě a marginální zóně. Červená pulpa se sestává ze slezinných provazců, které jsou od sebe odděleny krevními siny. Naproti tomu bílou pulpu tvoří periarteriální lymfatické pláště a lymfatické noduly. Z dostupných literárních zdrojů je zřejmé, že slezina v prenatálním a v krátkém postnatálním období prochází několika stupni vývoje. V postnatálním období se jedná zejména o formování bílé pulpy, avšak studie zabývající se vývojem sleziny v tomto období byly věnovány pouze několika vybraným druhům laboratorních zvířat (potkan, myš, křeček) a člověku.

Cílem diplomové práce bylo přinést poznatky o postnatálních změnách sleziny u dalšího druhu laboratorního zvířete, a to králíka.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Anatomické uspořádání sleziny

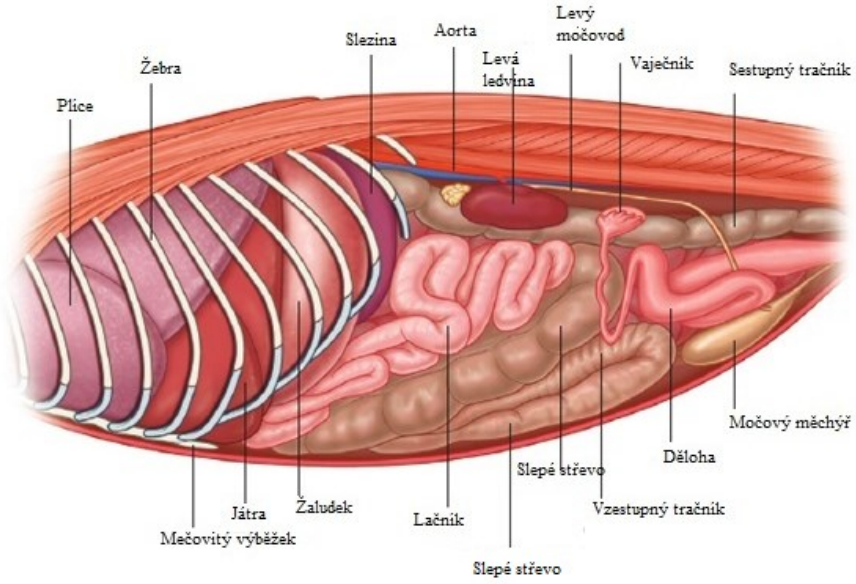
Slezina (*lien*) králíka je tmavě červený orgán protáhlého jazykovitého tvaru, který má na transverzální řezné ploše trojúhelníkovitý tvar (KNOTEK *et al.*, 1999; QASEM *et al.*, 2015; IKEGAMI *et al.*, 2016). Slezinu tvoří ventrální konec, dlouhé tělo a konec dorzální (Obrázek 1) (QASEM *et al.*, 2015). Podobně jako u jiných zvířat je na slezině popisována parietální a viscerální plocha. Parietální plocha sleziny je orientována k bránici a na viscerální, mírně prohloubené ploše se nachází hilus, který se táhne po celé její délce. Hilus tuto plochu dále dělí na dvě nestejnoměrné části (KNOTEK *et al.*, 1999; QASEM *et al.*, 2015).



Obrázek 1: Slezina králíka. VK: ventrální konec, T: tělo sleziny, DK: dorzální konec (KONEČNÝ *et* ŠTĚCHOVÁ, 2017).

Slezina králíka je relativně malý orgán, z důvodu velkého zastoupení lymfatické tkáně v gastrointestinálním traktu (GALT) (PERCY *et* BARTHOLD, 1993). Průměrná délka se pohybuje v rozmezí 3–6 cm, šířka mezi 1–2 cm a tloušťka okolo 0,4 cm. Průměrná hmotnost bývá 0,6 g. Výše uvedené rozměry jsou však ovlivněny řadou faktorů, kterými mohou být věk, tělesná hmotnost, případně různé patologické stavy (MARVAN *et al.*, 1998; KNOTEK *et al.*, 1999; HARCOURT–BROWN, 2002; TICHÝ *et al.*, 2004; CESTA, 2006; MCGAVIN *et* ZACHARY, 2007; REECE, 2011; DIMITROV *et al.*, 2012; QASEM *et al.*, 2015).

Slezina králka je uložena v levé polovině dutiny břišní, na dorzolaterální ploše velkého zakřivení žaludku (Obrázek 2) (KNOTEK *et al.*, 1999; QASEM *et al.*, 2015; IKEGAMI *et al.*, 2016). Její dlouhá osa míří kaudoventrálně (KNOTEK *et al.*, 1999). Na rozdíl od skotu a ovce je slezina králíka připojena pouze k žaludku, a to prostřednictvím *ligamentum gastrolienale* (KNOTEK *et al.*, 1999; JELÍNEK *et* JELÍNEK, 2006).



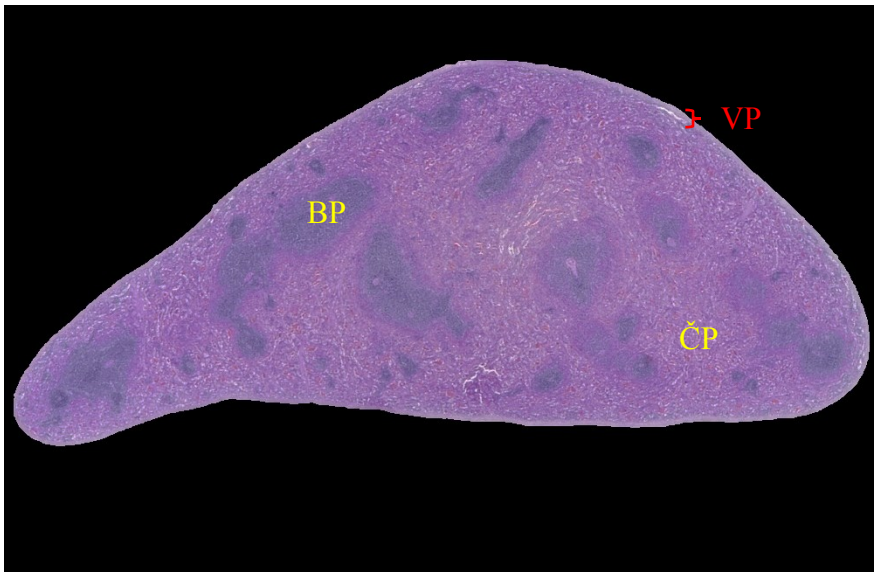
Obrázek 2: Uložení sleziny v dutině břišní. Laterální pohled po odstranění levé stěny dutiny břišní. Upraveno dle BARONE *et al*., 1973.

2.2 Histologická stavba sleziny

Slezina je složena z vaziva, cév a vlastního parenchymu, který je označován jako dřeň sleziny (*pulpa lienis*) (TICHÝ *et al*., 2004).

Povrch sleziny (Obrázek 3) je kryt vazivovým pouzdrem z hustého kolagenního vaziva (*capsula fibrosa lienis*), které je tvořeno z křížících se lamelózně uspořádaných kolagenních vláken a malým množstvím elastických vláken (TICHÝ *et al*., 2004; MEBIUS *et* KRAAL, 2005; CESTA, 2006; SAMUELSON, 2007). Ve vazivovém pouzdře sleziny se vyskytují také myofibroblasty (HEGAB, 2010). Na zevní povrch vazivového pouzdra nasedají ploché mezoteliální buňky serózy, které však v oblasti hilu chybí (TABLIN *et al*., 2002; CESTA, 2006; HEGAB, 2010). Síla vazivové pouzdra není na celém povrchu shodná, největší síly dosahuje v oblasti hilu (JELÍNEK *et al*., 2007). Z vazivového pouzdra odstupují do parenchymu sleziny nečetné, různě silné vazivové trámce (*trabeculae lienis*) obsahující krevní, lymfatické cévy a také nervy (CESTA, 2006). Tyto trámce probíhají zpravidla kolmo od vazivového pouzdra a člení parenchym sleziny na neúplně oddělené oddíly (NOVOTNÝ *et al*., 1966; TICHÝ *et al*., 2004; CESTA, 2006). Jak v pouzdře, tak ve vazivových trámcích je dobře vyvinuta retikulární síť, která přechází do parenchymu sleziny, kde vyplňuje prostor mezi trámci (JELÍNEK *et* JELÍNEK, 2006; HEGAB, 2010). Vazivové pouzdro spolu s vazivovými trámci tvoří podpůrnou trojrozměrnou síť (*stroma lienis)*, která poskytuje slezině určitou rigiditu (MEBIUS *et* KRAAL, 2005).

Parenchym sleziny je tvořen dvěma strukturálně a funkčně odlišnými oblastmi, které od sebe lze odlišit makroskopicky (CESTA 2006; JELÍNEK *et* JELÍNEK, 2006). První oblast je bohatá na erytrocyty, má tedy červenou barvu a nazývá se červená pulpa (ČP) (BACHA *et* BACHA, 2012). Druhá, světlejší oblast je tvořena lymfatickou tkání a nazývá se bílá pulpa (BP) (CESTA, 2006; BACHA *et* BACHA, 2012).



Obrázek 3: Histologický řez slezinou králíka (HE). VP: vazivové pouzdro; BP: bílá pulpa; ČP: červená pulpa (KONEČNÝ *et* ŠTĚCHOVÁ, 2017).

2.2.1 **Bílá pulpa (BP)**

BP tvoří přibližně 35 % z celkové hmoty sleziny králíka (NOVOTNÝ *et al*., 1966). V této oblasti se vyskytují zejména lymfocyty, antigen prezentující buňky, plazmatické buňky a makrofágy, které leží ve specializované retikulární síti složené z koncentrických vrstev specializovaných fibroblastů (TABLIN *et al*., 2002; CESTA, 2006). BP je uspořádána do periarteriolárních lymfatických plášťů, lymfatických nodulů a marginální zóny (STEINIGER *et al*., 2001; MEBIUS *et* KRAAL, 2005; CESTA, 2006; EURELL *et* FRAPPIER, 2006).

2.2.1.1 *Periarteriolární lymfatické pláště (PALS)*

PALS představují soubor lymfocytů, koncentricky uspořádaných retikulárních vláken a plochých retikulárních buněk, které obklopují centrální arterie (CA) pronikající do ČP (DIJKSTRA *et* VEERMAM, 1990). V PALS jsou přítomny zejména T lymfocyty, proto se tato oblast nazývá jako thymodependentní (ROSS *et* PAWLINA, 2011). Dle buněčného zastoupení se PALS dělí na vnitřní a vnější zónu.

Vnitřní zóna je díky přítomnosti malých lymfocytů intenzivněji zbarvena a je v ní zastoupena zejména populace CD 4^+T lymfocytů, v menší míře pak CD 8^+T lymfocytů, interdigitující dendritické buňky a migrující B lymfocyty (CESTA, 2006; STEINIGER, 2006; KUROTAKI *et al*., 2015).

Vnější zóna je tvořena malými a středními T lymfocyty a také B lymfocyty, které migrují z marginální zóny do lymfatických nodulů (VAN REES *et al*., 1996; STEINIGER, 2006).

2.2.1.2 *Lymfatické noduly (LN)*

LN jsou hemisférické struktury, které se obvykle nacházejí v místě bifurkace centrálních arterií (CESTA, 2006; STEINIGER, 2006; KUROTAKI *et al*., 2015). U králíků jsou LN malé a uspořádané do skupin (NOVOTNÝ *et al*., 1966). LN jsou strukturálně tvořeny zejména B lymfocyty, folikulárními dendritickými buňkami, CD 4^+T lymfocyty a makrofágy (CESTA, 2006; STEINIGER, 2006). Podobně jako v mízních uzlinách se ve slezině vyskytují primární a sekundární LN.

Primární LN mají uniformní vnitřní strukturu (STEINIGER, 2006). Skládají se z malých recirkulujících B lymfocytů s nepravidelným jádrem kondenzovaným chromatinem a s malým množstvím cytoplazmy (STEINIGER, 2006; MILLS, 2007; KUROTAKI *et al*., 2015). Dále z CD 4^+T lymfocytů, folikulárních dendritických buněk a makrofágů (STEINIGER, 2006).

Sekundární LN obsahují germinální centra (GC), která jsou obklopena malými recirkulujícími B lymfocyty, tvořící tzv. plášťovou zónu. GC se sestávají z aktivovaných B lymfocytů se světlejším jádrem a hojnou cytoplazmou. Plně rozvinutá GC mají dvě odlišitelné zóny. Tmavá zóna je tvořena centroblasty s velkým jádrem a pruhem bazofilní cytoplazmy (STEINIGER, 2006; MILLS, 2007).

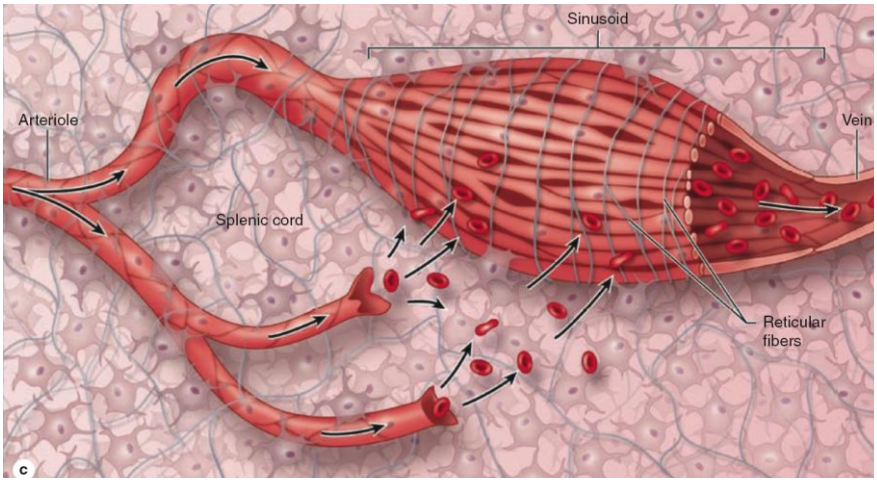
Světlá zóna je orientována k červené pulpě a vyskytují se v ní centrocyty, které mají menší jádro a více cytoplazmy. Mimo B lymfocytů se v GC vyskytují také CD 68^{+} makrofágy (*Tingible body macrophages*) a plazmatické buňky (STEINIGER, 2006; MILLS, 2007; KUROTAKI *et al*., 2015).

2.2.1.3 *Marginální zóna (MZ)*

MZ odděluje PALS a LN od ČP. MZ je při rutinním barvení, oproti PALS a primárním LN, světlejšího vzhledu. Světlé zbarvení je způsobeno přítomností středních a velkých B lymfocytů, které mají světlejší jádro a více cytoplazmy (STEINIGER, 2006). Tato zóna je od PALS oddělena unikátní skupinou makrofágů (*metallophilic*) exprimujících sialoadhesin (CD 169) a marginálním sinem, který představuje systém anastomozujících kanálků přijímající kapiláry BP a také terminální kapiláry ČP (MEBIUS *et* KRAAL, 2005; EURELL *et* FRAPPIER, 2006; STEINIGER, 2006; GORDON *et al*., 2014). Z buněčných populací jsou v MZ přítomny specializované B lymfocyty (CD 27^{+}), migrující folikulární B lymfocyty, granulocyty, plazmatické buňky, makrofágy MZ, dendritické buňky a NKT buňky (JELÍNEK *et al*., 2007; ARNON *et al.,* 2013; BRONTE *et* PITTET 2013; CERUTTI *et al*., 2013).

2.2.2 Červená pulpa (ČP)

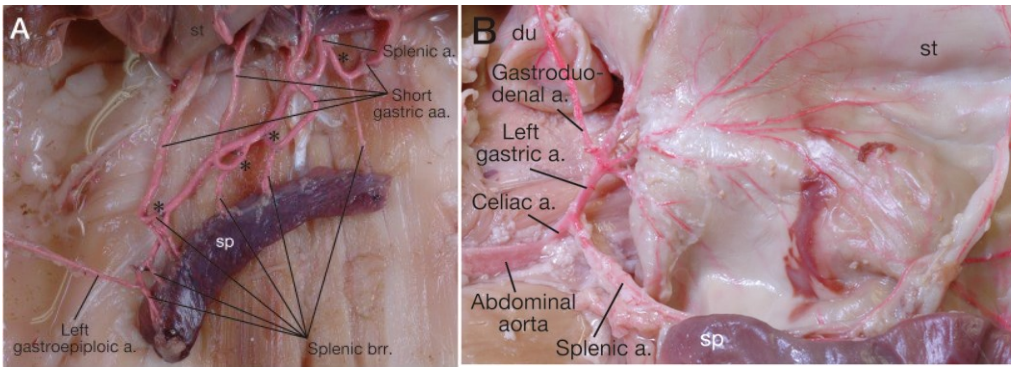
ČP tvoří asi 65 % parenchymu sleziny králíka. Skládá se z trojrozměrné sítě slezinných provazců, které jsou obklopeny venózními siny (CESTA, 2006). Slezinné provazce jsou tvořeny sítí fibroblastů, retikulárních buněk a vláken, ve kterých jsou uloženy lymfocyty, plazmatické buňky, makrofágy, granulocyty, erytrocyty a trombocyty (TICHÝ *et al.*, 2004; STEINIGER, 2006; ARNON *et al.,* 2013; GORDON *et al*., 2014). Venózní siny jsou nepravidelné, větvící se a opět se spojující štěrbinovité prostory, které jsou vystlány specializovanými endotelovými buňkami (STEINIGER *et al*., 2001; TABLIN *et al*., 2002; TICHÝ *et al.*, 2004; EURELL *et* FRAPPIER, 2006). Endotelové buňky nejsou ploché, ale mají protáhlý tvar a nasedají kolmo na nečetná, prstencovitě uspořádaná retikulární vlákna (Obrázek 4) (TABLIN *et al*., 2002; EURELL *et* FRAPPIER, 2006; STEINIGER, 2006; JELÍNEK *et al*., 2007; GORDON *et al*., 2014).



Obrázek 4: Stavba slezinného sinu a způsob ukončení cév v červené pulpě. Převzato od JUNQUEIRA *et al*., 1999.

2.3 **Krevní zásobení sleziny**

Slezina je zásobena krví prostřednictvím slezinné tepny (*arteria lienalis*), která po odstupu z tepny žaludeční oblasti (*arteria coeliaca*) směřuje vlevo podél viscerální plochy k hilu (NOVOTNÝ *et al.,* 1966; JELÍNEK *et al*., 2006; MCGAVIN *et* ZACHARY, 2007; IKEGAMI *et al*., 2016). Po dosažení hilu slezinná tepna probíhá k ventrálnímu konci, za kterým pokračuje k velkému zakřivení žaludku jako levá *arteria gastroepiploica* (IKEGAMI *et al*., 2016) (Obrázek 5A). V průběhu cesty vydává slezinná tepna 3–10 krátkých větví, které odstupují buď samostatně, nebo společně s krátkou žaludeční tepnou (Obrázek 5B) (IKEGAMI *et al*., 2016). Tyto krátké větve pronikají do sleziny, kde se větví na četné trabekulární arterie probíhající ve vazivových trámcích (EURELL *et* FRAPPIER, 2006; MILLS, 2007). Trabekulární arterie o určité světlosti pokračují dále do parenchymu sleziny, kde jsou obaleny lymfatickou tkání a stávají se z nich centrální arterie (CA) (*arteriae centrales*) (SAMUELSON, 2007; BACHA *et* BACHA, 2012). Tyto arterie se v průběhu PALS postupně zužují a odstupují z nich radiální větve, vstupující do LN, které jsou označovány jako nodulární (BANKS, 1993). Nodulární arterie se v oblasti LN větví a jejich větve směřují k MZ, kde končí, nebo probíhají přes MZ až do ČP. Po vstupu do ČP se nodulární arterie dále větví v podobě štětečku (štětičkovitá arterie). Každá větev štětičkovité arterie (*arteriae penicillatae*) se skládá ze tří úseků: arterioly dřeně, opouzdřené arterioly a krátké terminální kapiláry vstupující přímo do krevních sinů, nebo parenchymu ČP (NOVOTNÝ *et al*., 1966; TICHÝ *et al*., 2004; EURELL *et* FRAPPIER, 2006; KIERSZENBAUM, 2007; MILLS, 2007; SAMUELSON, 2007; ROSS *et* PAWLINA, 2011). Krev z krevních sinů je sbíraná do vén ČP, které se postupně spojují a vstupují do vazivových trámců jako trabekulární vény. Spojením trabekulárních vén vzniká slezinná žíla (*vena lienalis*), která odvádí krev do portální žíly (NOVOTNÝ *et al*., 1966; KIERSZENBAUM, 2007; SAMUELSON, 2007).



Obrázek 5: Krevní zásobení sleziny králíka. Převzato od IKEGAMI *et al*., 2016.

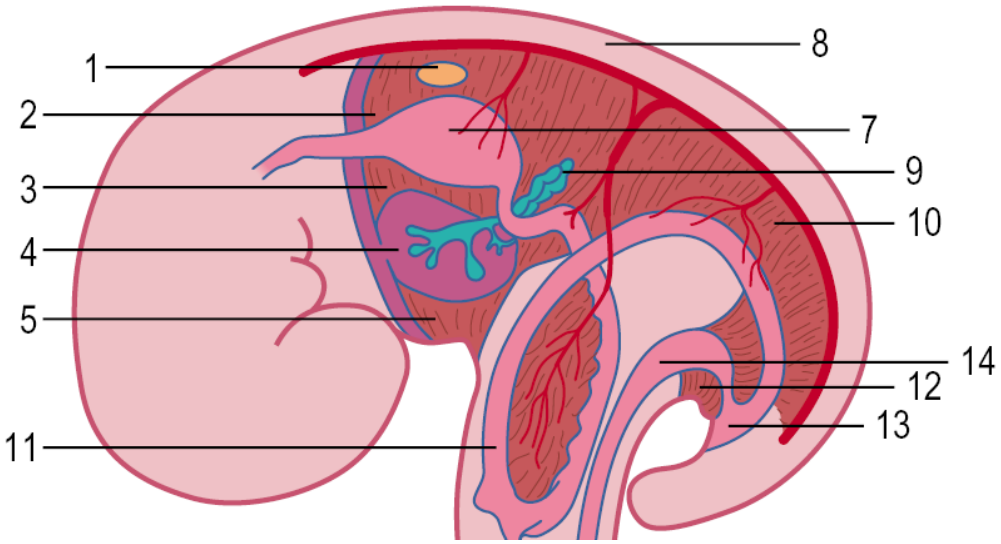
2.4 Inervace sleziny

Slezina je inervována nervovými vlákny z *plexus coelicus*. Jedná se zejména o vlákna bez myelinové pochvy, která doprovázejí tepny až k jejich rozvětvení, kde se zakončují na svalovině cév. Další větve končí mezi buňkami BP a ČP (NOVOTNÝ *et al*., 1966).

2.5 Embryonální vývoj sleziny

Embryonální vývoj sleziny je úzce spjat s vývojem trávicí trubice a mezenterií v břišní dutině (HORKÝ *et* MIKYSKA, 1984; KLIKA, 1985; MCGEADY *et al*., 2006; HYTTEL *et al*., 2010). Slezina se zakládá poměrně časně jako malé zesílení celomového epitelu na levé straně dorzálního mezogastria (Obrázek 6) (KLIKA, 1985; MCGEADY *et al*., 2006; BRENDOLAN *et al.,* 2007). Základ sleziny se postupně zvětšuje a dochází k jeho odškrcení od dorzálního mezogastria, se kterým zůstává ve spojení pouze vazivovým pruhem, budoucím *ligamentem gastrolienale (*HORKÝ *et* MIKYSKA, 1984*)*. V průběhu vývoje se celomový epitel diferencuje ve splenopankreatický mezenchym, do kterého vrůstají větve *omhalomesenterica sinistra* (*vena portae*) jako základ slezinné žíly (*vena lienalis*) a o něco později větev *arteria coeliaca* jako *arteia lienalis.* Obě tyto cévy se v mezenchymu dále větví (HORKÝ *et* MIKYSKA, 1984; KLIKA, 1985; GOLUB *et* CUMANO, 2013).

V dalším období se na povrchu sleziny mezenchym diferencuje ve vazivové pouzdro a retikulární vazivo. Z vazivového pouzdra do nitra sleziny vybíhají základy vazivových trámců a v retikulárním vazivu později vznikají krevní siny vystlané endotelem (HORKÝ *et* MIKYSKA, 1984). Do retikulárního vaziva postupně migrují progenitory myeloidní a erytroidní linie a začne zde hematopoéza, která ustává v období před narozením (MEBIUS *et* KRALL, 2005). Po ustálení hematopoézy v kostní dřeni a vytvoření lymfatických struktur v thymu, migrují B a T lymfocyty do sleziny, kde se pod vlivem chemokinů produkovaných specializovanými stromálními buňkami organizují do T a B oblastí (NGO *et al*., 1999; MCGEADY *et al*., 2006; GOLUB *et* CUMANO, 2013; SCHAEUBLE *et al*., 2017).



Obrázek 6: Uložení základu sleziny: 1: základ sleziny, 2: dorzální mezogastrium, 3: ventrální mezogastrium, 4: základ jater, 5: srpovitý vaz, 7: základ žaludku, 8: dorzální tělní stěna, 9: dorzální pankreatický pupen, 10: dorzální mezenterium, 11: střední klička, 12: základ středního vazu měchýře, 13: kloaka, 14: urachus. Upraveno dle MCGEADY *et al*., 2006.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Experimentální zvířata

Do pokusu bylo zařazeno 48 králíků plemene novozélandský bílý.

3.2 Odběr vzorků

V definovaném věku (0., 5., 10., 14., 19., 27., 32. a 39. den) byli králíci (n6) zváženi a následně, dle legislativy, po aplikaci anestetik usmrceni. Bezprostředně po usmrcení zvířat byla provedena pitva za účelem získání sleziny. Po vyjmutí byla slezina změřena, zvážena a vložena do nádoby s 10% pufrovaným formalínem. Veškeré vzorky byly zpracovány v histologické laboratoři Zemědělské fakulty JU.

3.3 Histologické zpracování vzorku

Po dostatečném profixování byly vzorky slezin překrojeny a vloženy do kazet, propláchnuty ve dvou lázních 60% a 96% etanolu, následně odvodněny a prosyceny parafínem pomocí multifunkčního tkáňového procesoru KOS: 99% histoetanol – 35 min.; isopropylalkohol – 1,15 h; parafín – 1,5 h. Po prosycení byly vzorky zality do parafínových bloků a pomocí rotačního mikrotomu Leica 2235 nařezány řezy o síle 5 μm. Získané řezy byly následně napnuty ve vodní lázni a přilepeny na podložní skla. Takto získané řezy byly obarveny hematoxylinem a eozinem (HE) následujícím postupem:

- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min.
  1x xylen:etanol (1:1) – 5 min.
  2x 100% etanol – 5 min.
  2x 96% etanol – 5 min.
  1x 70% etanol – 5 min.
  1x 50% enatol – 5 min.
- Opláchnutí vodou.
- Oplach destilovanou vodou.
- Barvení hematoxylinem dle Koďouska – 7 min.
- Alkalizace vodovodní vodou – 10 min.
- Oplach destilovanou vodou.

- Eozin ve vodě rozpustný 0,1 % – 4 min.
- Etanol 80% – 40 s.
- Etanol 96% – dvě lázně po 40 s.
- Aceton – dvě lázně po 1 min.
- Aceton:xylen (1:1) – po 1 min.
- Xylen – dvě lázně po 1 min.
- Zapravení do kanadského balzámu.

3.4 Imunohistochemické vyšetření

3.4.1 Použité protilátky

3.4.1.1 *Primární protilátka*

Monoklonální myší proti humánnímu CD79a, clone HM57 (Invitrogen).

3.4.1.2 *Sekundární protilátka*

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

3.4.2 Použité detekční systémy

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

3.4.3 Ředění primární protilátky

Primární protilátka byla ředěna pomocí Antibodydiluent (DAKO) v poměru 1:100.

3.4.4 **Použité pufry**

Citrátový pufr pH 6,0 a fosfátový pufr pH 7,4 ± 0,1.

3.4.5 **Vlastní metodika imunohistochemických reakcí**

- Odparafinování a zavodnění řezů: 3x xylen – 5 min.
  1x xylen:etanol (1:1) – 5 min.
  2x 100% etanol – 5 min.
  2x 96% etanol – 5 min.
  1x 70% etanol – 5 min.
  1x 50% enatol – 5 min.
- Blokace endogenní peroxidázy (Protein Block, Serum free, DAKO) – 10 min.
- Proplach destilovanou vodou.
- Demaskování antigenu varem v citrátovém pufru pH 6,0 – 20 min.
- Oplach ve fosfátovém pufru pH 7,4 ± 0,1.
- Inkubace s primární protilátkou po dobu 60 min. při pokojové teplotě (1:100).
- 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, Abcam).
- Oplach vodovodní vodou.
- Obarvení jader hematoxylinem dle Koďouska.
- Etanol 80% – 1 min.
- Etanol 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.
- Zapravení do kanadského balzámu.

3.4.6 **Kontroly**

Jako negativní protilátkové kontroly bylo využito nahrazení primární protilátky ředícím roztokem.

3.5 Morfometrická analýza

Síla vazivového pouzdra byla měřena na čtyřech místech transverzálního a longitudinálního řezu od zevní hranice k vnitřní hranici pouzdra pomocí optického mikroskopu Leica DM 2500 a digitální kamery Leica DFC 320 a softwaru Leica IM 500 (Version 4.0). Výsledné hodnoty představují průměrnou hodnotu z osmi měřených oblastí (μm).

Plocha byla měřena na řezu z nejsilnějšího místa sleziny pomocí Stereomikroskopu Nikon SMZ 25 a softwaru Nikon NIS-Elements. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny v μm^2.

3.6 Statistické zpracování dat

Pro statistické vyhodnocení zjištěných dat byla použita analýza rozptylu (ANOVA) Tukeyův HSD test v programu Statistika 10 (StatSoft. Inc.). Základní statistická průkaznost byla akceptována na hladině významnosti $P < 0,05$.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Hmotnost a morfometrické parametry sleziny králíka

4.1.1 Hmotnost sleziny

Slezina je největší sekundární lymfatický orgán v těle, který vykazuje značnou mezidruhovou, tvarovou, velikostní a hmotnostní variabilitu (CESTA, 2006). Velikostní a hmotnostní variabilita je ovlivněna různými faktory jako je stáří, tělesná hmotnost, pohlaví a různé patologické stavy (SCHNAPPER *et al*., 2003; CESTA, 2006; SIDDIQUI *et* ALI, 2015). Při posouzení patologických stavů jsou morfometrické a hmotnostní údaje nezbytnou součástí patologické diagnostiky (HALEY *et al*., 2015). Z výše uvedeného vyplývá, že je nezbytné znát informace o metrických hodnotách sleziny u různých věkových kategorií zvířat.

Tabulka 1: Průměrná tělesná hmotnost, hmotnost sleziny a relativní hmotnost sleziny.

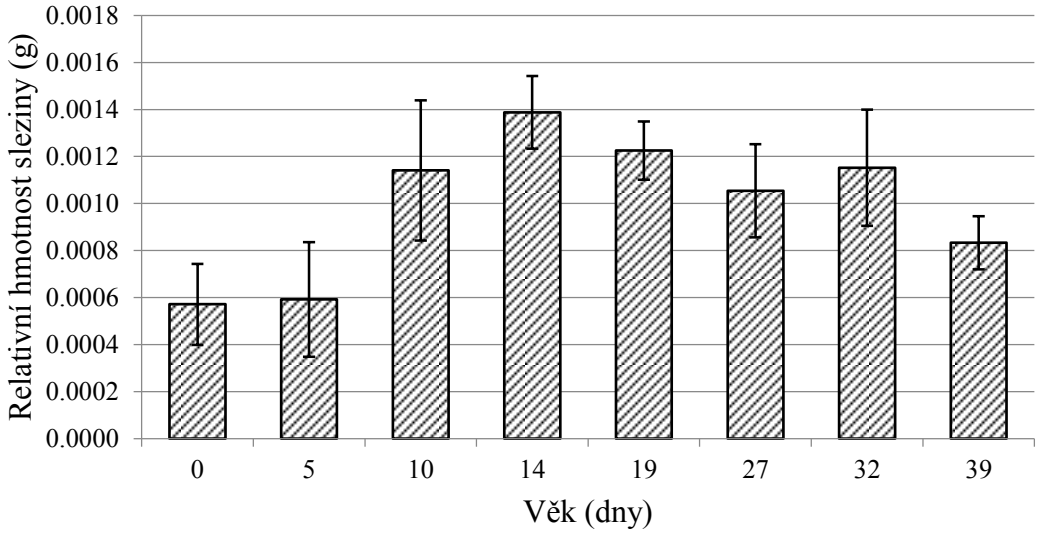
Dny postnatálního života	Tělesná hmotnost (g)	Hmotnost sleziny (g)	Relativní hmotnost sleziny x 10^4
0	52,50 ± 9,69	0,03 ± 0,01	5,71 ± 1,72
5	72,60 ± 6,67	0,04 ± 0,01	5,92 ± 2,44
10	114,00 ±17,50	0,13 ± 0,03	11,40 ± 2,98
14	204,00 ± 44,45	0,28 ± 0,04	13,87 ± 1,54
19	277,50 ± 48,55	0,34 ± 0,08	12,25 ± 1,23
27	450,60 ± 86,22	0,48 ± 0,08	10,54 ± 1,98
32	642,40 ± 40,49	0,74 ± 0,07	11,52 ± 2,47
39	1078,40 ± 143,35	0,90 ± 0,10	8,34 ± 1,13

Tabulka 1 zobrazuje průměrné hmotnosti slezin králíků v postnatálním období do stáří 39 dnů. Z výsledků je patrné, že se vzrůstajícím věkem dochází současně ke zvyšování její hmotnosti. Průměrná hmotnost sleziny byla u novorozených králíků 52,50±9,69 g a 39. den pak 1078,40±143,35 g. Dynamika růstu hmotnosti sleziny nebyla v průběhu sledovaného období shodná. Nejvyšší

nárůst hmotnosti (79 %) byl pozorováno v období mezi 10. a 14. dnem věku, naproti tomu nejnižší (36 %) mezi 14. až 19. dnem.

Z tabulky 1 je dále patrné, že hmotnost sleziny se zvyšovala společně s růstem tělesné hmotnosti. Potvrzuje to i vysoký korelační koeficient r = 0,970. Podobné výsledky zaznamenali také YANG *et* GAWLAK (1989) u psů, GOMARIZ *et al*. (1989) u zlatých křečků a SCHNAPPER *et al*. (2003) u selat.

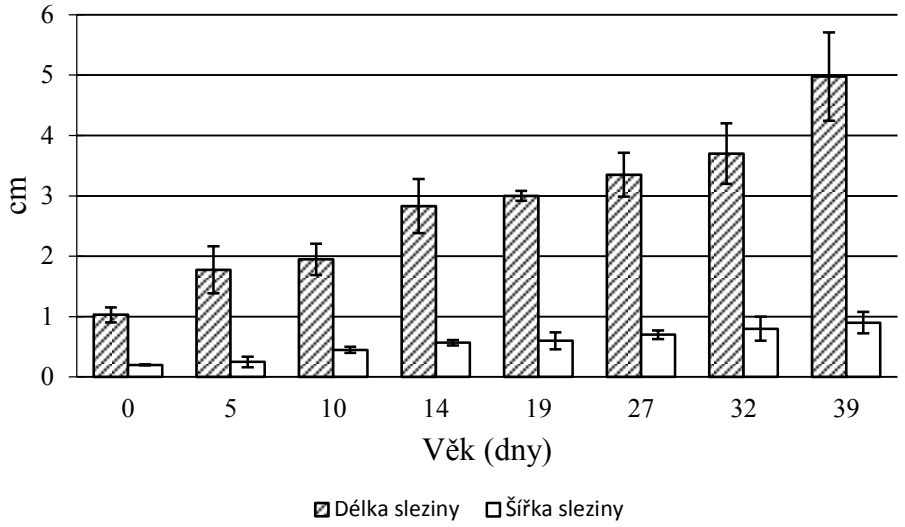
Graf 1: Relativní hmotnost sleziny v jednotlivých dnech věku.



Kromě absolutní hmotnosti sleziny byla zkoumána i změna její relativní hmotnosti, která vyjadřuje poměr hmotnosti sleziny ke hmotnosti těla. Oproti absolutní hmotnosti vykazovala relativní hmotnost sleziny odlišnou dynamiku (Graf 1). Po narození až do věku 14 dní byl nárůst relativní hmotnosti statisticky významný ($P < 0,01$). V následujícím období byl zaznamenán její pokles (Graf 1), který byl statisticky významný až 39. den. V tomto období byla relativní hmotnost sleziny oproti narození o 46,06 % vyšší. Rozdíly v dynamice relativní a absolutní hmotnosti sleziny uvádějí také autoři GOMARIZ *et al*. (1989), YANG *et* GAWLAK (1989), SCHNAPPER *et al*. (2003) a INDUR *et al.* (2010) u jiných druhů zvířat.

4.1.2 **Délka a šířka sleziny**

Graf 2: Délka a šířka sleziny v jednotlivých dnech věku.

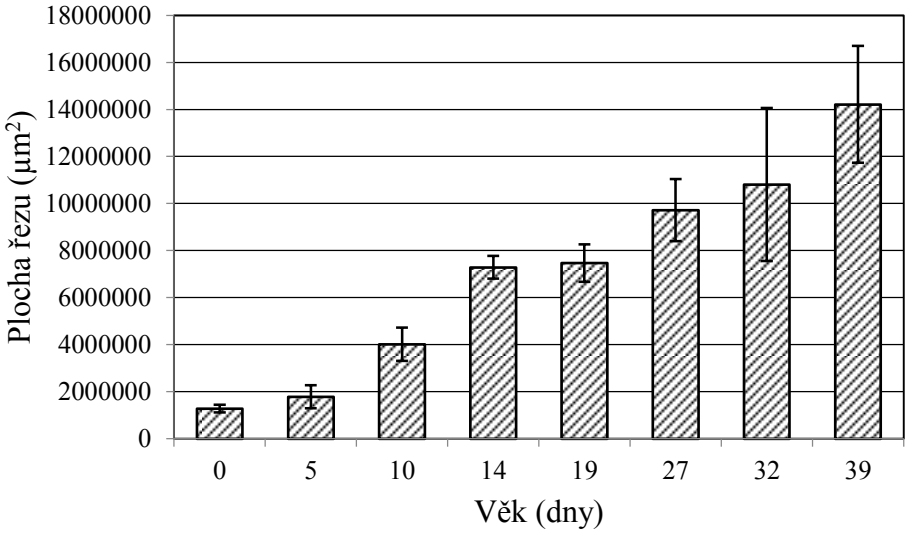


Graf 2 zobrazuje morfometrické údaje (délku a šířku) sleziny ve sledovaném období postnatálního vývoje králíků. Průměrná délka a šířka sleziny novorozených králíků byla 1,03±0,12 cm a 0,2±0,01 cm. V průběhu 39 dní byl zaznamenán statisticky významný ($P < 0,01$) vzestup velikosti tohoto orgánu. Ve 39 dnech dosahovala slezina průměrné délky 4,97±0,73 cm a šířky 0,9±0,18 cm. K nejvýraznějšímu (72%) prodloužení sleziny došlo v průběhu prvních pěti dní života králíků. Nejnižší vzestup byl pak pozorován v období mezi 14. až 19. dnem. Oproti délce vykazovala šířka sleziny nejvyšší dynamiku v období mezi 5. a 10. dnem. Mezi hmotností a délkou sleziny byl vypočítán vysoký korelační koeficient $r = 0,942$, mezi hmotností a šířkou sleziny byl korelační koeficient o něco nižší, a to $r = 0,891$. V dostupných literárních zdrojích se nevyskytují relevantní informace týkající se změny velikosti tohoto orgánu.

4.1.3 **Plocha řezu sleziny**

Pro doplnění metrických údajů byla měřena také plocha řezu v nejsilnějším místě sleziny (Graf 3). Dynamika plochy řezu odpovídala průběhu absolutní hmotnosti, délce a šířce sleziny. Korelační koeficienty vykazovaly vysokou závislost mezi plochou a délkou (r = 0,985), šířkou (r = 0,989) a hmotností sleziny (r = 0,932).

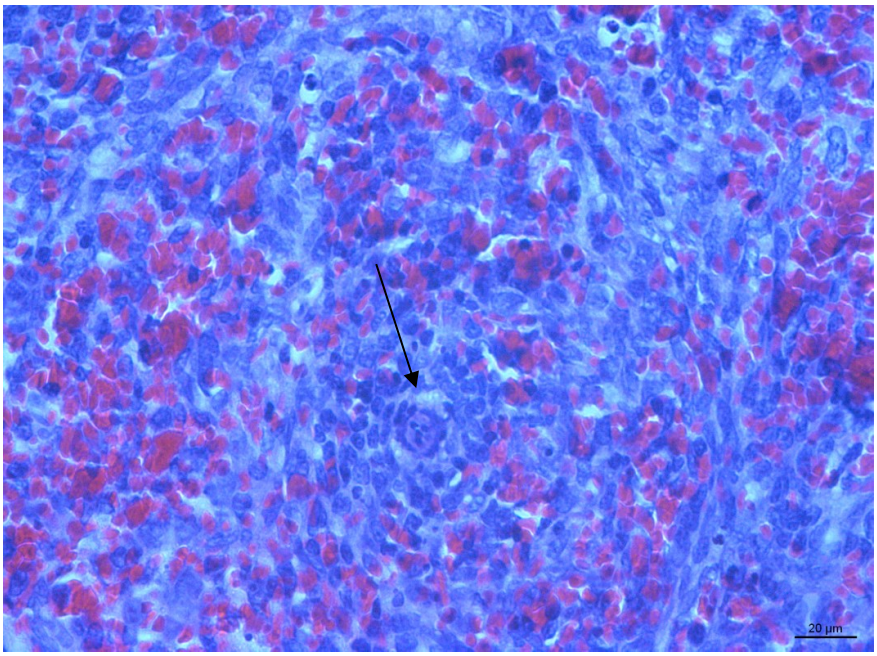
Graf 3: Plocha řezu sleziny v průběhu postnatálního vývoje.



4.2 Histologická analýza a imunohistochemická analýza

4.2.1 Histologická stavba sleziny 0. den vývoje

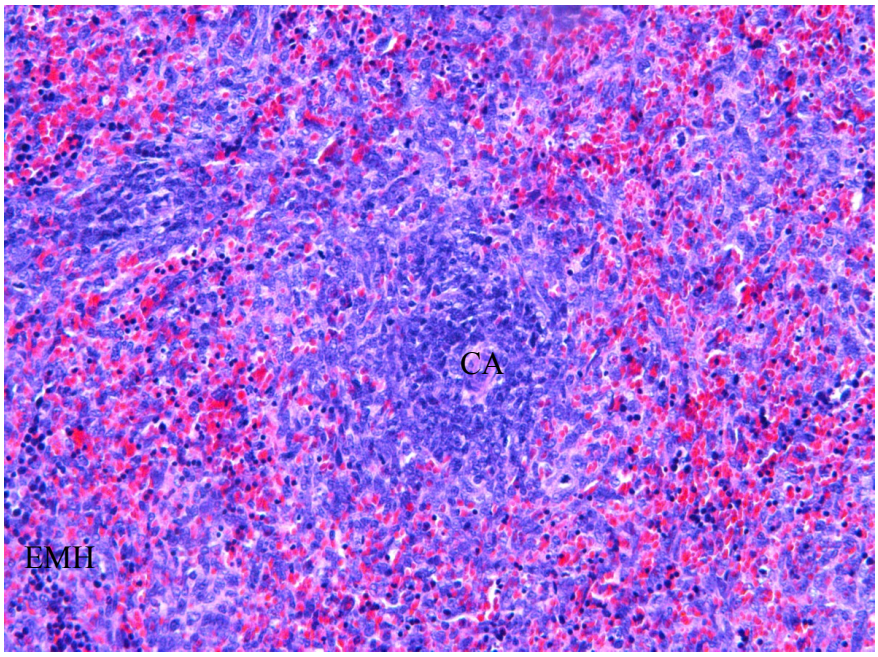
Povrch sleziny je pokryt tenkým vazivovým pouzdrem o průměrné síle 8,04±1,50 µm. Parenchym sleziny je tvořen převážně z ČP, bez přítomnosti vazivových trámců. Lymfatická tkáň je formována v podobě malých agregací mononukleárních bazofilních buněk okolo CA (Obrázek 7). LN nejsou přítomny. V ČP se vyskytují oblasti s probíhající mírnou extracelulární hematopoézou. Megakaryocyty jsou přítomny ojediněle.



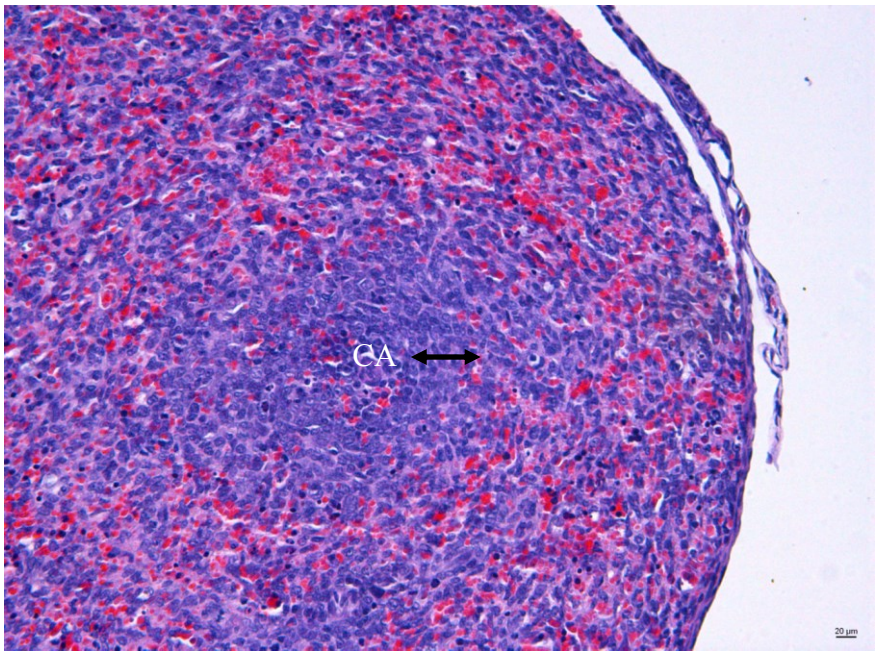
Obrázek 7: Slezina novorozeného králíka. Koncentricky uspořádané bazofilní buňky kolem centrální arterie znázorněny černou šipkou, HE.

4.2.2 **Histologická stavba sleziny 5. postnatální den vývoje**

Povrch sleziny pokryt relativně tenkým vazivovým pouzdrem o průměrné síle 9,25±1,74 µm. Vazivové trámce nejsou přítomny. Podobně jako v předchozím období je slezina tvořena zejména ČP. Lymfatická tkáň je formována koncentricky uspořádanými bazofilními mononukleárními buňkami okolo CA. Oproti předchozímu období je četnější výskyt CA s agregací buněk. Na některých místech jsou tyto agregace formovány do více vrstev (Obrázek 8). Na periferii některých PALS (Obrázek 9) je patrná oblast sestávající z větších světlejších mononukleárních buněk, některé buňky jsou CD 79^{+}. Tuto oblast lze považovat za počínající tvorbu MZ. V ČP je patrná mírná extramedulární hematopoéza (Obrázek 8).



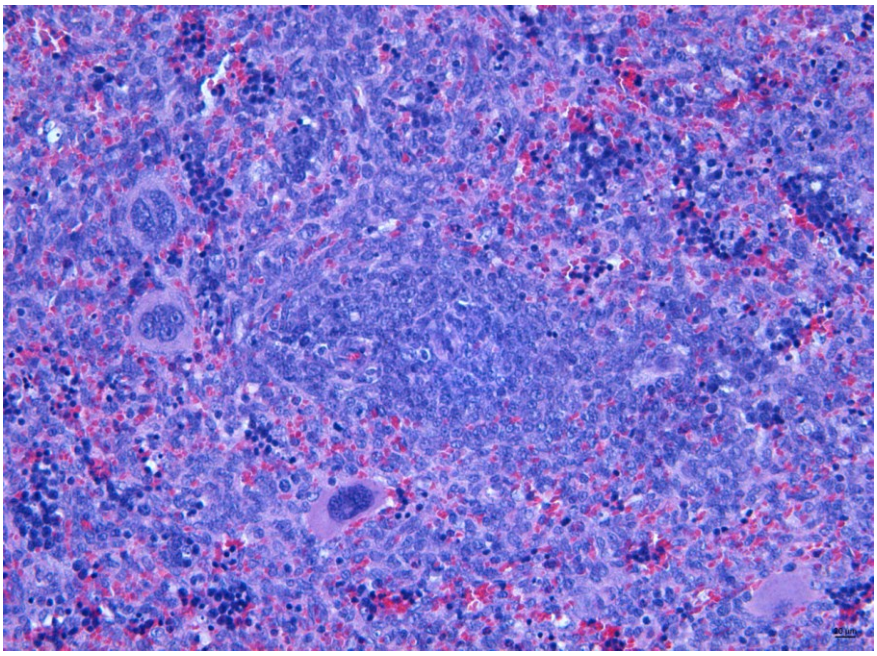
Obrázek 8: Slezina 5. postnatální den. Agregace bazofilních buněk okolo centrální arterie (CA). EMH – extracelulární hematopoéza, HE.



Obrázek 9: Slezina 5. den postnatálního vývoje. Černá šipka vyznačuje světlejší oblast tvořenou většími, mononukleárními buňkami (primitivní MZ). CA – centrální arterie, HE.

4.2.3 **Histologická stavba sleziny 10. postnatální den vývoje**

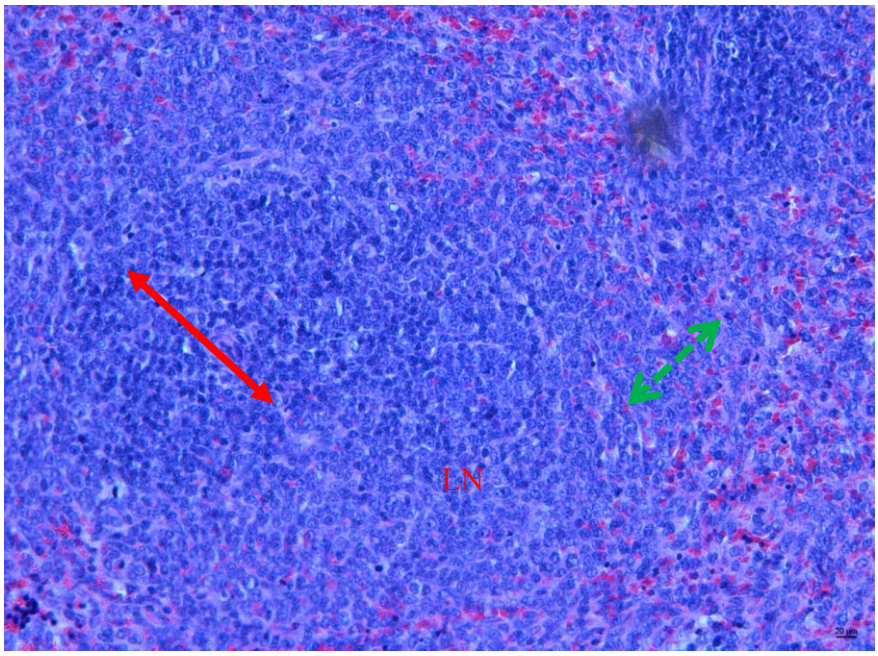
Slezina je uzavřena do vazivového pouzdra o průměrné síle 13,88±2,74 µm. Z vazivového pouzdra do parenchymu odstupují ojediněle velice tenké vazivové trámce. Strukturální složení BP je s minimálním rozdílem od předchozího období. CA je obklopena nepatrně silnější vrstvou bazofilních buněk, na periferii jsou přítomny světlejších mononukleární buňky. LN nejsou přítomny. V ČP se vyskytují četné megakaryocyty, které poukazují na intenzivnější extramedulární hematopoézu (Obrázek 10).



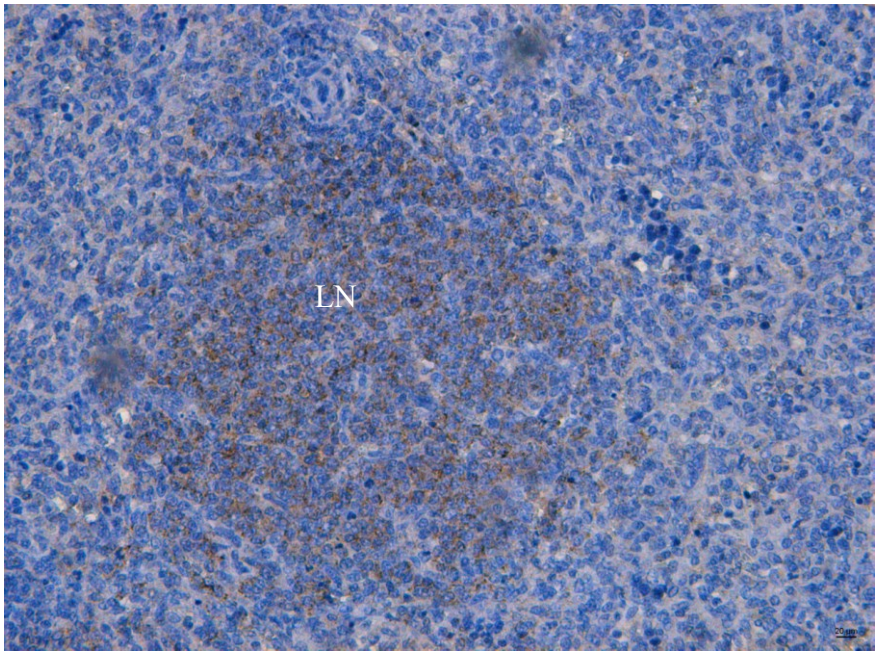
Obrázek 10: Slezina 10. den postnatálního vývoje. Probíhající hematopoéza ve slezině králíka. Přítomnost megakaryocytů, HE.

4.2.4 **Histologická stavba sleziny 14. postnatální den vývoje**

Na povrchu sleziny je patrné vazivové pouzdro o síle 14,32±2,00 μm, z kterého do parenchymu sleziny odstupují jemné vazivové trámce. BP oproti předchozímu období zaujímá nepatrně větší plochu. PALS je tvořen různě silnými koncentricky uspořádanými vrstvami bazofilními mononukleárních buněk. Síla PALS odpovídá předchozímu období. Ojediněle jsou přítomny primární LN (Obrázek 11) sestávající z CD 79^{+} buněk (Obrázek 12). BP je oddělena od ČP dobře patrnou MZ. V ČP je výskyt megakaryocytů s četností podobnou předchozímu období.



Obrázek 11: Slezina 14. den postnatálního období. Červená šipka – periarteriální lymfatický plášť, zelená šipka – marginální zóna, LN – lymfatický nodulus, HE.



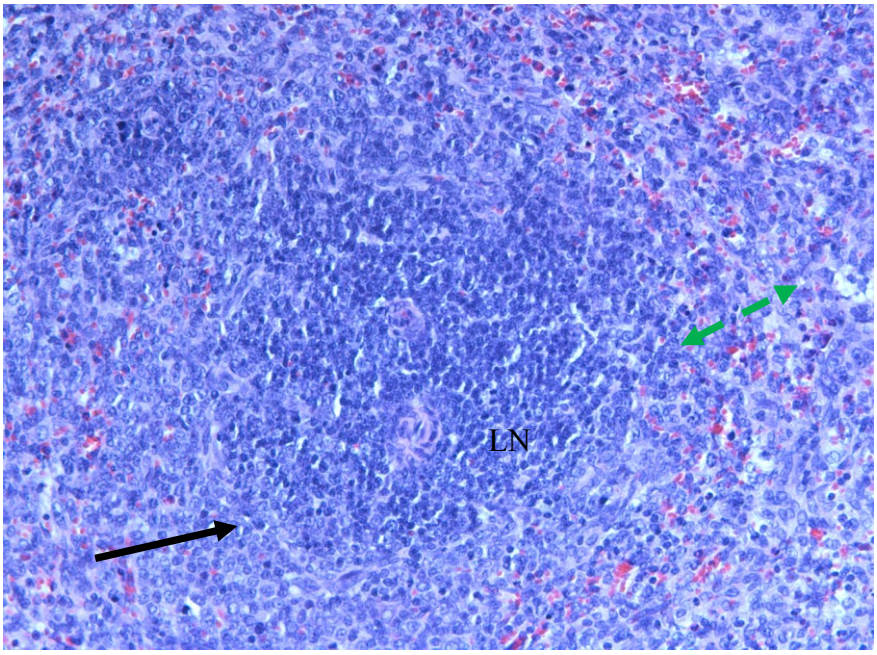
Obrázek 12: Slezina 14. den postnatálního vývoje. CD 79^{+} buňky v oblasti lymfatického nodulu (LN).

4.2.5 **Histologická stavba sleziny 27. postnatální den vývoje**

Na povrchu sleziny je vazivové pouzdro o síle 18,83±2,37 μm. Z vazivového pouzdra odstupují do parenchymu vazivové trámce. Parenchym sleziny je rozdělen na ČP a BP. Oproti předchozímu období zaujímá BP větší plochu. PALS jsou zesíleny, tvořeny několika vrstvami malých bazofilních buněk. LN jsou přítomny, bez GC. V některých oblastech je MZ zesílená a oddělena marginální sinem. V ČP je patrná slabá hematopoéza a ojedinělý výskyt megakaryocytů.

4.2.6 **Histologická stavba sleziny 32. postnatální den**

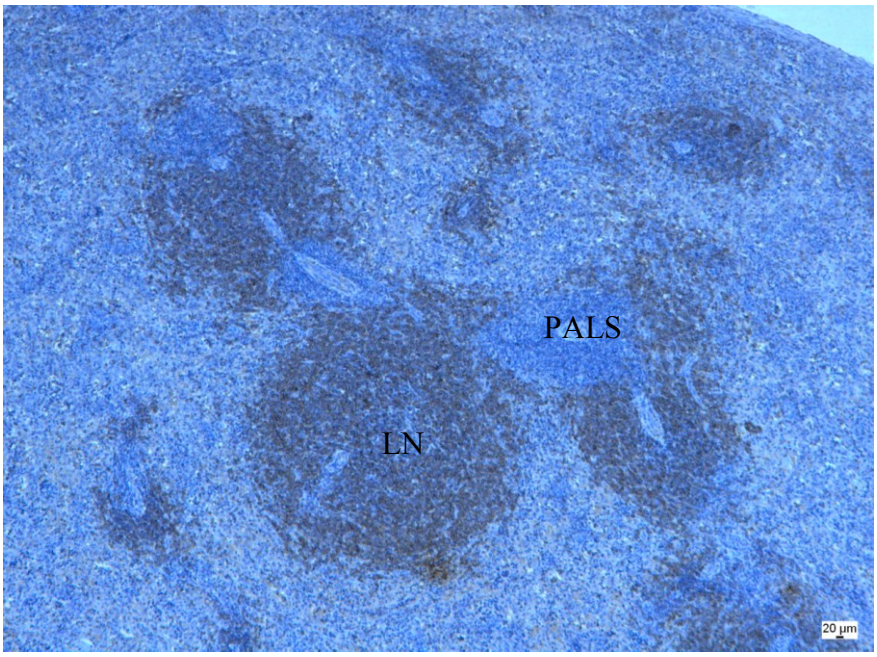
Slezina je obalena vazivovým pouzdrem o průměrné tloušťce 23,87±4,78 μm. Z pouzdra odstupují do nitra parenchymu relativně silné vazivové trámce. V BP je zastoupen převážně PALS, který je tvořen malými, bazofilními lymfocyty. PALS je často velmi silný. V BP jsou přítomny pouze primární LN. Přítomna je i slabá extramedulární hematopoéza, zřídka se vyskytují megakaryocyty. Různě silná MZ je oddělena od BP marginálním sinem (Obrázek 13). Na periferii PALS, v LN a v MZ jsou přítomny CD 79^{+} buňky.



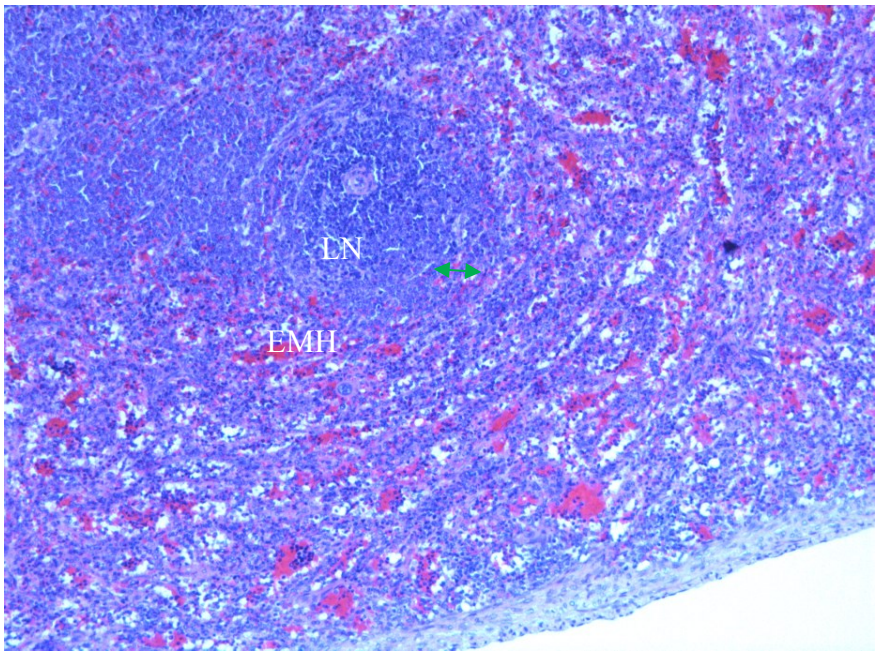
Obrázek 13: Slezina 32. den postnatálního období. Černá šipka - marginální sinus, zelená šipka – marginální zóna, LN – lymfatický nodulus, HE.

4.2.7 **Histologická stavba sleziny 39. postnatální den vývoje**

Povrch sleziny je pokryt vazivovým pouzdrem o síle 31,3±5,51 µm, ze kterého do parenchymu odstupují výrazné vazivové trámce. Parenchym sleziny je již zřetelně rozdělen na ČP a BP. Oproti předchozímu období je BP více celulizována. PALS je silnější, tvořený převážně malými bazofilními CD 79^- lymfocyty (Obrázek 14). V BP se vyskytují četné LN tvořené CD 79^+ lymfocyty. Ojediněle se vyskytují GC. MZ je dobře patrná, v některých oblastech výrazná. V ČP je minimální hematopoéza (Obrázek 15).



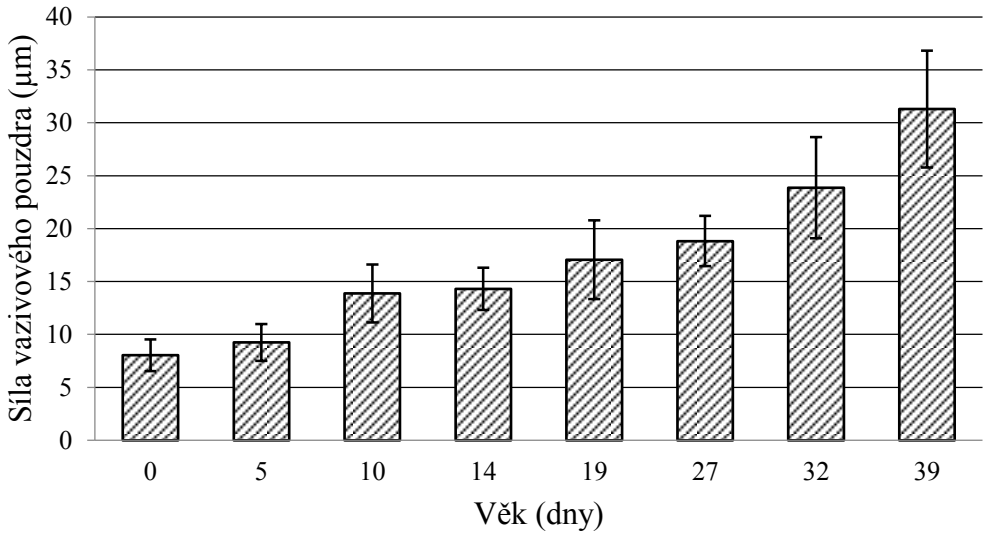
Obrázek 14: Slezina 39. den postnatálního vývoje. Imunohistochemický průkaz CD 79^- buněk (B lymfocyty). CD 79^+ buňky v lymfatických nodulech (LN) a marginální zóně, periarteriální lymfatické pláště (PALS) CD 79^-.



Obrázek 15: Slezina 39. den postnatálního období. EMH – extramedulární hematopoéza, zelená šipka – marginální zóna.

4.3 **Shrnutí histologických nálezů**

Graf 4: Změny síly vazivového pouzdra v průběhu postnatálního vývoje králíků.



V průběhu postnatálního vývoje králíků dochází ke zvýšení hmotnosti, délky a šířky sleziny (Tabulka 1, Graf 1). Změny těchto parametrů souvisí se zvyšujícím se podílem vazivové tkáně (Graf 4), ale také zejména s postupným nárůstem celulizace parenchymu sleziny. Parenchym sleziny však neprodělává pouze změny objemového charakteru, ale mění se také zastoupení a distribuce různých fenotypů buněk (JEKLOVÁ *et al*., 2007; WITHERS *et al*., 2007; KODAMA *et al*., 2012).

Parenchym sleziny novorozených králíků sestával zejména z ČP s významným podílem erytrocytů. BP tvořily pouze malé agregace bazofilních mononukleárních buněk kolem nečetných CA (Obrázek 7). Shodnou stavbu sleziny pozorovali také DIJKSTRA *et al.* (1990) a Parker *et al*. (2015) u novorozených potkanů, GOMARIZ *et al*. (1989) u zlatých křečků a SCHAEUBLE *et al*. (2017) u myší. Autoři dále popisují v průběhu 5. až 9. dne postnatálního života postupný nárůst počtu vrstev bazofilních mononukleárních buněk okolo četnějších CA, které formují PALS. Na periferii PALS pak světlejší oblast tvořenou většími mononukleárními buňkami, které formovaly MZ. Shodný nález byl v uvedeném období zaznamenán i ve slezině králíků (Obrázek 8 a 9).

V průběhu dalšího sledovaného období (od 10. až do 39. dne) bylo v parenchymu sleziny králíků pozorováno pozvolné zesilování PALS, MZ a výskyt LN. Primární LN tvořené CD 79^+ buňkami byly poprvé zaznamenány 14. den (Obrázek 11 a 12) a ojedinělé sekundární LN až 39. den postnatálního období. Výskyt primárních LN ve slezině 14denních králíčat popisují také autoři (JEKLOVÁ *et al*. (2007). Naproti tomu GOMARIZ *et al*. (1989), DIJKSTRA *et al.* (1990), KODAMA *et al*. (2012) a Parker *et al*. (2015) pozorovali primární LN ve slezině potkanů a zlatých křečků mezi 20. až 30. dnem a sekundární LN mezi 25. až 35. dnem.

V ČP byla v celém průběhu sledovaného období pozorována extramedulární hematopoéza o různé intenzitě (Obrázek 8, 10, 15). Nejvyšší intenzita byla zaznamenána v období mezi 10. a 14. dnem (Obrázek 10).

5. Závěr

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o postnatálních změnách sleziny králíka v období od narození do 39. dne života. V průběhu sledovaného období byl zaznamenán statisticky významný ($P < 0,01$) nárůst velikosti a hmotnosti tohoto orgánu.

Slezina novorozených králíků představovala relativně drobný orgán o průměrné délce 1,03±0,12 cm, šířce 0,2±0,01 cm a hmotnosti 52,50±9,69 g. U králíků ve stáří 39 dnů odpovídala velikostně a tvarově slezině dospělých jedinců. V tomto období dosahovala průměrné délky 4,97±0,73 cm, šířky 0,9±0,18 cm a hmotnosti 1078,40 ± 143,35 g.

V rámci pozorování bylo zjištěno, že hmotnost sleziny se zvyšovala souběžně s tělesnou hmotností. Mezi těmito parametry byl zaznamenán vysoký korelační koeficient $r = 0,970$. Vysoký korelační koeficient byl také vypočten mezi hmotností a délkou sleziny $r = 0,942$, a o něco nižší ($r = 0,891$) mezi hmotností a šířkou sleziny. Rovněž plocha řezu v nejsilnějším místě sleziny vykazovala vysokou závislost ve vztahu k délce ($r = 0,985$), šířce ($r = 0,989$) a hmotnosti sleziny ($r = 0,932$).

Z histologické analýzy vyplývá, že růst sleziny byl doprovázen zvyšující se celulizací parenchymu, zesilováním vazivového pouzdra a postupným výskytem vazivových trámců v parenchymu sleziny. Vazivové pouzdro novorozených králíků bylo po narození silné 8,04±1,50 μm a na konci pozorování pak 31,30±5,51 μm. Jemné vazivové trámce se ve slezině vyskytovaly až 10. den po narození. U novorozených králíků v parenchymu sleziny převládala ČP s vysokým podílem erytrocytů. Lymfatická tkáň tvořila pouze malé nepravidelné agregace bazofilních mononukleárních buněk okolo nečetných CA. V období do 10. dne postnatálního období docházelo ke zvyšování koncentrických vrstev bazofilních mononukleárních buněk okolo CA a tvorbě MZ. Dobře patrná MZ byla u králíků ve věku 14 dnů, kdy byly poprvé zaznamenány primární LN tvořené $CD\ 79^+$ buňkami. Od 14. do 39. dne docházelo ve slezině k postupnému zvyšování celulizace jednotlivých kompartmentů, přičemž ojedinělá GC byla pozorována v LN až 39. den. V ČP sleziny probíhala v průběhu 39 dní extramedulární hematopoéza s různou intenzitou. Nejvyšší intenzita byla pozorována mezi 10. a 14. dnem věku. Získané výsledky poukazují na podobný postnatální vývoj sleziny králíka s laboratorními hlodavci.

V dalším výzkumu by bylo vhodné zaměřit se na distribuci jiných fenotypů lymfatických buněk při vývoji sleziny.

6. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Slezina králíka……..11
Obrázek 2: Uložení sleziny v dutině břišní 12
Obrázek 3: Histologický řez slezinou králíka (HE)……14
Obrázek 4: Stavba slezinného sinu a způsob ukončení cév v červené pulpě. 17
Obrázek 5: Krevní zásobení sleziny králíka……...19
Obrázek 6: Uložení základu sleziny..... 20
Obrázek 7: Slezina novorozeného králíka..... 29
Obrázek 8: Slezina 5. postnatální den 30
Obrázek 9: Slezina 5. den postnatálního vývoje 31
Obrázek 10: Slezina 10. den postnatálního vývoje 32
Obrázek 11: Slezina 14. den postnatálního období 33
Obrázek 12: Slezina 14. den postnatálního vývoje 33
Obrázek 13: Slezina 32. den postnatálního období.. 34
Obrázek 14: Slezina 39. den postnatálního vývoje 35
Obrázek 15: Slezina 39. den postnatálního období. 36

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Průměrná tělesná hmotnost, hmotnost sleziny a relativní hmotnost sleziny. 25

8. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Relativní hmotnost sleziny v jednotlivých dnech věku. 26
Graf 2: Délka a šířka sleziny v jednotlivých dnech věku..... 27
Graf 3: Plocha řezu sleziny v průběhu postnatálního vývoje..... 28
Graf 4: Změny síly vazivového pouzdra v průběhu postnatálního vývoje králíků. ... 37

9. SEZNAM ZKRATEK

BP – bílá pulpa

CA – centrální arterie

CD – diferenciační antigen (*cluster of differentiation*)

CD79 – transmembránový protein asociovaný s receptorem B lymfocytů

ČP – červená pulpa

EMH – extramedulární hematopoéza

GALT – lymfatická tkáň gastrointestinálního traktu

GC – germinální centra

HE – hematoxylin-eosin

LN – lymfatický nodulus

MZ – marginální zóna

NKT – natural killer T-lymfocyt

PALS – periarteriolární lymfatická pochva (plášť)

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ARNON, T., I., HORTON, R., M., GRIGOROVA, I., L., CYSTER, J., G. (2013): Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. Nature 493, 684–688. DOI: 10.1038/nature11738.
2. BACHA, J. JR., BACHA, L., M. (2012): Color Atlas of Veterinary Histology. 3rd edition, Wiley-Blackwell, 356 p. ISBN: 9780470958513.
3. BANKS, W. J. (1993): Applied veterinary histology. 3rd edition. St. Louis: Mosby-YearBook, 527 p. ISBN 0801666104.
4. BARONE, R., PAVAUX, C., BLIN, P. C., CUQ, P. (1973): Atlas d'Anatomie du Lapin. Paris: Masson, 224 p.
5. BRENDOLAN, A., ROSADO, M., M., CARSETTI, R., SELLERI, L., DEAR, T. N. (2007): Development and function of the mammalian spleen. BioEssays. 29 (2): 166-77.
6. BRONTE, V., PITTET, M. (2013): The spleen in local and systemic regulation of immunity: Immunity, 806-818. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010
7. CERUTTI, A., COLS, M., PUGA, I. (2013): Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. Nature Reviews Immunology, 13 (2): 118-32. DOI: 10.1038/nri3383.
8. CESTA, M. F. (2006): Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicologic Pathology, 34 (5): 455-65.
9. DIJKSTRA, C., D., VEERMAN, A., J., P., JONES, T., C., WARD, J., M., MOHR, U., HUNT, R., D. (1990): Normal Anatomy, Histology, Ultrastructure, Rat Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Hemopoietic System. Springer, Berlin, Heidelberg. 129-136.
10. DIMITROV, R., STAMATOVA, K., RUSSENOV, A., KOSTOV, D., VLADOVA, D., STEFANOV, M. (2012): Ultrasonographic qualitative characters of rabbit spleen (Oryctolagus cuniculus). Trakia Journal of Sciences, 10 (1): 64-69. ISSN 13137050.
11. EURELL, J. A., FRAPPIER, B. L. (2006): Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 6th edition, Iowa, Blackwell Publishing. 420 p. ISBN 0781741483. 414–415.

12. GOLUB, R., CUMANO, A. (2013): Embryonic hematopoiesis. Elsevier. 51 (4): 226-231. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004
13. GOMARIZ, R., P., DE CÁRDENAS, L., ZAPAT, A. (1989): Postnatal development of the splenic white pulp in the golden hamster Mesocricetus auratus. I. The periarterial lymphoid sheath (PALS). Tissue Cell. 21 (3): 403-17.
14. GORDON, S., PLÜDDEMANN, A., MARTINEZ ESTRADA, F. (2014): Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. Immunology Review, 262 (1): 36–55. DOI: 10.1111/imr.12223.
15. HALEY, P., PERRY, R., ENNULAT, D., FRAME, S., JOHNSON, C., LAPOINTE, J., M., NYSKA, A., SNYDER, P., WALKER, D., WALTER, G. (2015): STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. Toxicologic Pathology. 33 (3): 404–408. DOI: 10.1080/01926230590934304.
16. HARCOURT-BROWN, F. (2002): Textbook of Rabbit Medicine, Butterworth-Heinemann, Oxford. 436 p. ISBN 0750640022.
17. HEGAB, A., S. (2010): Light and Electron Microscopic Study on the Spleen of Adult Albino Rabbit with Special Reference to the Role of Reticular Cells. Egypt. Journal of molecular histology. 33 (3): 532–540.
18. HORKÝ, D., MIKYSKA, E. (1984): Veterinární embryologie. 1. vydání Praha: Vysoká škola veterinární v Brně. 191 s. ISBN 8085114844.
19. HYTTEL, P. (2010): Development of the gastro – pulmonary system In: HYTTEL, P., SINOWATZ, F., VEJLSTED, M. (2010): Essentials of Domestic Animals Embryology. Saunders Elsevier. Denmark. 472 p. ISBN 9780702028991. 217–251.
20. IKEGAMI, R., TANIMOTO, Y., KISHIMOTO, M., SHIBATA, H. (2016): Anatomical variation of arterial supply to the rabbit spleen. The Journal of Veterinary Medical Science. 78 (2): 199-202.
21. INDUR, V., R., CHUNGATH, J., J., HARSHAN, K., R., ASHOK, N. (2010): Influence of age and body weight on spleen parameters in white pekin ducks. Journal of Veterinary and Animal Sciences. 55–57.

22. JEKLOVA, E., LEVA, L., FALDYNA, M. (2007): Lymphoid organ development in rabbits: Major lymphocyte subsets. Developmental and Comparative Immunology, 31 (6): 632–644.
23. JELÍNEK, F., JELÍNEK, K. (2006): Morfologie hospodářských zvířat. 2. vydání České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 294 s. ISBN 8070408456.
24. JELÍNEK, R., DOSTÁL, M., LIKOVSKÝ, Z., HALAŠKOVÁ, M., MAŇÁKOVÁ, E., PETERKA, M., PETERKOVÁ, R., TITLBACH, M. VELICKÝ, J., ZEMANOVÁ, Z. (2007): Histologie embryologie. [elektronická skripta] [cit. 13.10.2017]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf.
25. JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J., KELLEY, D. H. (1999): Základy histolologie. 7 ed. Jinočany: H&H, 502 s. ISBN 8085787377.
26. KIERSZENBAUM, A. L. (2007): Histology and cell biology: Anintroduction to pathology. 2nd edition. Edinburgh: Elsevier Mosby, 671 p.
27. KLIKA, E. (1985): Embryologie člověka. 3. přepracované vydání. Praha: SPN. 125 s
28. KNOTEK, Z., MÍŠEK, I., ČERVENÝ, Č., RAJTOVÁ, V. (1999): Chov a využití pokusných zvířat, II. díl. 1. vydání Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 140 s. ISBN 8085114690.
29. KODAMA, R., OKAZAKI, T., SATO, T., IWASHIGE, S., TANIGAWA, Y., FUJISHIMA, J., MAEDA, H. (2012): Age Difference in Morphology and Immunohistology in the Thymus and Spleen in Crl: CD (SD) Rats. Journal of Toxicologic Pathology, 25 (1): 55–61. DOI: http://doi.org/10.1293/tox.25.55.
30. KUROTAKI, D., UEDE, T., TAMURA, T. (2015): Functions and development of red pulp macrophages. Microbiology Immunology, 59 (2): 55–62. DOI: 10.1111/1348-0421.12228.
31. MARVAN, F., HAMPL, A., HLOŽÁNKOVÁ, E., KRASAN, J., MASSANYI, L., VERNEROVÁ, E. (1998): Morfologie hospodářských zvířat. 2. vydání Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze a Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 328 s. ISBN 8020902732.
32. MCGAVIN, M. D., ZACHARY, J. F. (2007): Pathologic basis of veterinary disease. 4th edition. St Louis: Mosby Elsevier, 1788 s. ISBN 0323028705.

33. MCGEADY, T. A., QUINN, P. J., FITZPATRICK, E. S., RYAN, M. T., CAHALAN, S. (2006): Veterinary Embryology. Wiley – Blackwell. 392 p. ISBN: 9781405111478.
34. MEBIUS, R., E., KRAAL, G. (2005): Structure and function of the spleen. Nature Reviews Immunology. 5 (8): 606-616.
35. MIILS, S., E. (2007): Histology for pathology. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1328 p. ISBN: 9780781762410.
36. NGO, V., N., KORNER, H., GUNN, M., D., SCHMIDT, K., N., RIMINTON, D., S., COOPER, M., D., BROWNING, J., L., SEDGWICK, J., D., CYSTER, J., G. (1999): Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. The Journal of Experimental Medicine, 189 (2): 403-412.
37. NOVOTNÝ, E., BÖHM, R., GEISSEL, V., HOLMAN, J. (1966): Veterinární histologie. 1. vydání Praha: Státní zemědělská nakladatelství v Praze. 637 s.
38. PARKER, G., A., PICUT, C., A., SWANSON, C., TOOT, J., D. (2015): Histologic Features of Postnatal Development of Immune System Organs in the Sprague-Dawley Rat. Toxicologic Pathology, 43 (6): 794-815.
39. PERCY, D., H., BARTHOLD, S., W. (1993): Rabbit. In: Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. Iowa State University Press. 179–223.
40. QASEM, H. H., RABEE, F. O., Al-A´ARAJI, A. S. (2015): Comparative anatomical and morphological study of spleen in rabbit and Guinea pig. Journal of Kerbala University, 13(4): 147-155.
41. REECE, W: (2011): Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. 2. vydání Praha: Grada Publishing, 480 s. ISBN 9788024732824.
42. ROSS, M. H., PAWLINA, W. (2011): Histology: A text and atlas. 6th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 974 p. ISBN 0781772001.
43. SAMUELSON, D. A. (2007): Textbook of veterinary histology. 1st editon. St. Louis: Saunders-Elsevier, 560 s. ISBN0721681743.
44. SCHAEUBLE, K., BRITSCHGI, M., R., SCARPELLINO, L., FAVRE, S., XU, Y., KOROLEVA, E., LISSANDRIN, T., K., A., LINK, A., MATLOUBIAN, M., WARE, C., F., NEDOSPASOV, S., A., TUMANOV

A., V., CYSTER, J., G., LUTHER, S., A. (2017): Perivascular fibroblasts of the developing spleen act as LTα1β2-dependent precursors of both T and B zone organizer cells. Cell Reports, 21(9): 2500-2514. DOI: 0.1016/j.celrep.2017.10.119.

45. SCHNAPPER A., UHR, G., MEYER, W. (2003): Growth kinetics of porcine lymphatic organs during early postnatal life. Anatomia, Histologia, Embryologia. 32 (5): 297-304.
46. SIDDIQUI, A., M., ALI, A., H., A (2015): Assessment of normal spleen size. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 6 (3): (B) 46-57. ISSN: 0975-6299.
47. STEINIGER, B., BARTH, P., HELLINGER, A. (2001): The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? American Journal of Pathology, 159 (2): 501-512.
48. STEINIGER, B., TIMPHUS, E., M., BARTH, P., J. (2006): The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. Histochemistry Cell Biology, 126 (6): 641–648.
49. TABLIN, F., CHAMBERLAIN, J., K., WEISS, L. (2002): The microanatomy of the mammalian spleen: mechanisms of splenic clearance. In The complete spleen: structure, function, and clinical disorders. Edited by A. J. Bowdler. Humana Press, Totawa, New Jersey. 328 p. 11–22.
50. TICHÝ, F., HORKÝ, D., BUCHTOVÁ, M., GOROŠOVÁ, A., KOCIÁNOVÁ, I., PÁRAL, V., ZIBRÍN, M. (2004): Histologie – Mikroskopická anatomie. 1. vydání Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 275 s. ISBN 8073054957.
51. VAN REES, E. P., SMINIA, T., DIJKSTRA, C. D. (1996): Structure and development of the lymphoid organs. In: Pathobiology of the Aging Mouse. Vol. 1, 173–187. ILSI Press, Washington, D. C.
52. WITHERS, D., R., MI-YEON, K., BEKIARIS, V., ROSSI, S., W., JENKINSON, W., E., GASPAL, F., MCCONNELL, F., CAAMANO, J., H., ANDERSON, G., LANE, P., J., L (2007): The role of lymphoid tissue inducer cells in splenic white pulp development. European Journal of Immunology, 37 (11): 3240–3245. DOI: 10.1002/eji.20073754.

53. YANG, T., J, GAWLAK, S., L. (1989): Lymphoid organ weights and organ:body weight ratios of growing beagles. Laboratory Animals. 23 (2): 143-146.