

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA ANATOMIE A FYZIOLOGIE HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

OBOROVÁ RADA: OBECNÁ ZOOTECHNIKA



DISERTAČNÍ PRÁCE

NA TÉMA

**VLIV ZKRMOVÁNÍ RŮZNÝCH FOREM SELENU NA AKTIVITU
LEUKOCYTŮ V KRVI U OVCÍ A JEHŇAT.**

PŘEDKLADATEL: **Ing. Lukáš Písek**

2007

ŠKOLITEL:

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

ŠKOLITEL SPECIALISTA:

Prof. RNDr. Ing. Vlasta Kroupová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „*Vliv zkrmování různých forem selenu na aktivitu leukocytů v krvi u ovcí a jehňat*“ **vypracoval samostatně** na základě vlastních zjištění a materiálů, které jsou uvedeny v seznamu literatury.

.....
Ing. Lukáš Písek

V Českých Budějovicích dne

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto vyjádřil poděkování mým školitelům **prof. RNDr. Ing. Vlastě Kroupové, CSc.** a **prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc.**, za cenné rady a odborné vedení při řešení úkolů této disertační práce. Dále bych rád poděkoval **celému kolektivu katedry Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat** za tvůrčí prostředí, které mi dopomohlo tuto práci zpracovat. Speciální poděkování směřuji **pani Richterové a Ing. Staňkové** za cenné rady v průběhu laboratorních analýz. Velký dík patří **kolektivu AV ČR v Českých Budějovicích**, vedeným doc. RNDr. Václavem Kopeckým, CSc., za zaškolení do metodiky analýzy FACS a poskytnutí průtokového cytometru. V neposlední řadě děkuji své **rodině a blízkým** za cennou morální podporu.

1. ÚVOD

Ačkoli jsou minerální látky v živočišném organismu zastoupeny v malém množství, přesto mají významný vliv na uplatnění normálního průběhu neurohumorálních, imunitních a metabolických procesů, a tím i na užitkovost, zdraví, reprodukci atd. Z hlediska rozdílné potřeby organismu na saturaci minerálními látkami hovoříme o esenciálních, neesenciálních a toxických prvcích. Tento způsob dělení je do jisté míry zavádějící, protože i při podávání esenciálního prvku může dojít k poškození organismu z důvodu dosažení toxické dávky.

Oblast minerální výživy a průmyslu se intenzivně rozvíjí. Pro aplikaci do diet podávaným zvířatům jsou stále vyvíjeny nové produkty krmivářských biotechnologií. Významným trendem této doby jsou prvky vázané na rozličné organické nosiče. Tyto zdroje představují nutriční faktory, které mohou pozitivně ovlivnit stravitelnost, retenci i bilanci zkrmovaných prvků. Toto tvrzení podporují mnozí autoři z jejichž prací vyplývá vyšší využitelnost organických zdrojů než je tomu u anorganických solí prvků. Biologickou využitelnost minerálií ovlivňuje celá řada dalších faktorů, např. druh, věk, úroveň užitkovosti zvířete, skladba krmné dávky atd.

Pokud zadáte klíčové slovo „selenium“ do celosvětově používaného vyhledávače „Google“ (www.google.com) pak se zobrazí téměř čtrnáct milionů odkazů, které se vztahují k tomuto tématu. Tyto odkazy obsahují široké spektrum nejrůznějších příspěvků z oblasti komerční, populární i vědecké. Pokud jde striktně o poznatky v rámci medicínského výzkumu může být použito stránek „PubMed“ (www.pubmed.gov), kde se zobrazí více než osmnáct tisíc původních vědeckých prací. Z uvedených faktů vyplývá, že na výzkum biologického efektu selenu je soustředěn velký zájem pracovišť po celém světě. Zmíněný biologický účinek je zpravidla vázán na celou řadu selenoproteinů. Tyto „funkční“ bílkoviny (hlavně enzymy) obsahují selen kovalentně vázaný na aminokyselinu cystein. Mezi nejvýznamnější selenoproteiny savců řadíme glutathionperoxidázy, thioredoxinreduktázy, jodothyronindeiodinázy, selenofosfátsyntáza, selenoproteiny K, P, M, N, S, W, 15 kDa, 18 kDa (Papp *et al.* 2007).

Selen patří k nejvíce toxickým stopovým prvkům. Vstupní branou selenu pro zvířata jsou rostliny, které přijímají selen z půdy v anorganické formě. Výskyt selenu v půdě celosvětově podléhá značné variabilitě. Česká republika se řadí mezi země s nízkým příjmem selenu. Již v šedesátých letech byly publikovány první zprávy o výskytu

onemocnění mladých kategorií skotu souvisejících s deficitem selenu (Kursa 1969). Výskyt klinických forem selenového deficitu v podobě nutriční svalové dystrofie byl zaznamenáván v pozdější době těmito autory: Vrzgula *et al.* (1972), Kursá *et Kroupová* (1975), Anke *et al.* (1983), Kvíčala *et al.* (1997), Pavlata *et al.* (2001). Otravy selenem (selenózy) probíhají buď akutně, subakutně nebo chronicky. Podle druhu a užítkovosti hospodářských zvířat udávají literární údaje potřebu selenu mezi 0,1 - 0,3 mg.kg⁻¹ sušiny krmiva (Shenkel *et Flachowsky* 2000). V USA je suplementace krmné dávky pro drůbež, ovce a skot stanovena na maximální hodnotu 0,3 mg.kg⁻¹ sušiny krmiva (FDA 1997).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 VOLNÉ RADIKÁLY

Za zakladatele „radikálové“ chemie jsou považováni Henry John Horstman **Fenton** (1854-1929), který roku 1884 popsal vznik hydroxylového radikálu při oxidaci kyseliny vinné za přítomnosti železa ve svém pojednání „*Oxidation of tartaric acid in the presence of iron*“, a Moses **Gomberg** (1866-1948), který v roce 1900 popsal trifenylmethylový radikál ve své práci „*An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl*“, a o dvacet čtyři let později své poznatky shrnul v pojednání „*Organic Radicals*“.

Existenci superoxidového radikálu při reakci v plynné fázi poprvé předpověděl **Marshall** (1926), ve vodném roztoku pak **Haber et Willstatter** (1931). Avšak průkaz tohoto radikálu byl umožněn teprve vývojem elektronové spinové rezonanční spektroskopie (**Saito et Bielski** 1961). Tento objev odstartoval a do jisté míry umožnil výzkum volných radikálů, který je v současné době v rozkvětu. Této, do jisté míry, popularity využívá komerční sektor k propagaci svých produktů. Ty mohou vznik volných radikálů redukovat, ale je potřeba velkého nadhledu při chápání promyšlených marketingových strategií jednotlivých firem.

2.1.1 Definice

Během života organismu přirozeně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species* – ROS) a dusíku (*reactive nitrogen species* – RNS). Z četných pokusů vyplývá, že tyto látky mají značný fyziologický a patogenetický význam (Reaume 1996, Goldfarb 1999, Seifried *et al.* 2003, Valko *et al.* 2004, Schumacker 2006). Volené radikály pohotově reagují s různými biologickými strukturami, např. mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty (Vodrážka 2002). Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností mohou působit jako toxické látky a jako dezinformační agenti (Štípek *et al.* 2000).

Tab. 1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku (Usmar et Hallivell 1996, Štípek et al. 2000)

Reaktivní formy kyslíku		Reaktivní formy dusíku	
volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály	volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
superoxid, O_2^{\cdot}	peroxid vodíku, H_2O_2	oxid dusnatý, NO^{\cdot}	nitrosyl, NO^+
hydroxylový radikál, HO^{\cdot}	kyselina chlorná, $HOCl$	oxid dusičitý, NO_2^{\cdot}	nitroxid, NO
peroxyl, ROO^{\cdot}	ozon, O_3		kyselina dusitá, HNO_2
alkoxyl, RO^{\cdot}	singletový kyslík, 1O_2		oxid dusitý, N_2O_3
hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}			oxid dusičitý, N_2O_4
			nitronium, NO_2^+
			peroxynitrit, $ONOO$
			alkylperoxynitrit, $ROONO$

Jak vyplývá z tabulky 1, pouze některé z reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) jsou volné radikály (látky s nepárovým elektronem).

Volný radikál vzniká trojím způsobem (Sjodin *et al.* 1990):

- homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby (každý fragment si ponechává jeden nepárový elektron),
- redukcí (přidáním jednoho elektronu k molekule),
- a oxidací (ztrátou jednoho elektronu z molekuly).

První ze způsobů je velmi energeticky náročný a proto v biologickém systému volné radikály vznikají odejmutím nebo přidáním elektronu. Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně či kladně nabitě ionty (Štípek *et al.* 2000).

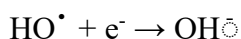
Obecně je radikál velice reaktivní částice, díky jeho snaze doplnit si párový elektron, a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule nebo jí ho odejmout. Pokud dojde k reakci radikálu s jinou molekulou, tak si z této molekuly doplní párový elektron a zároveň z této molekuly radikál vytvoří. Tímto způsobem se radikálová reakce šíří do okolí a teprve po setkání a reakci dvou radikálů dojde k jejímu ukončení – terminaci (Halliwell *et Gutteridge* 1985, Reynolds *et al.* 2007).

2.1.1.1 Reaktivní formy kyslíku

Následné reakce popisují průběh kompletní redukce kyslíku (Clarkson *et* Thompson 2000):



V poslední reakci elektron (v pořadí čtvrtý) redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody (v reakci uvedena disociovaná forma, tedy hydroxylový ion OH^- a nikoli H_2O):



Výše popsaná čtyř elektronová redukce molekuly atmosférického kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života. Probíhá v dýchacím řetězci v mitochondriích, v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy, a umožňuje transformaci energie chemických vazeb živin do adenosintrifosfátu –ATP (Khalimonchuk *et al.* 2007).

- *Superoxid*

- má oxidační i redukční vlastnosti,
- podléhá dizmutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé (zároveň se oxiduje i redukuje):



- tato reakce ve vodném prostředí probíhá velkou rychlostí a biologických systémech je ještě urychlována enzymem superoxiddizmutázou (Yu 1994, Van Camp *et al.* 1997).

- *Peroxid vodíku*

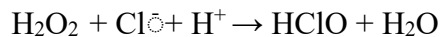
- z chemického hlediska není volným radikálem, ale účastní se při jejich vzniku,
- jeho reakce s biomolekulami jsou poměrně pomalé, ale z přítomnosti tranzitních kovů se pohoťově redukuje:



- při této Haber-Weissově reakci (též známá jako Fentonova reakce) vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál, který okamžitě napadá okolní biomolekuly (Sohal 2002).

- *Kyselina chlorná*

- je syntetizována neutrofilními granulocyty pomocí myeloperoxidázy:



- jelikož je silný oxidant, tak je neutrofilní využívána (spolu s ROS a NOS) jako baktericidní prostředek (Štípek *et al.* 2000).

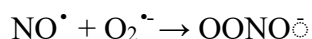
2.1.1.2 *Reaktivní formy dusíku*

- *Oxid dusnatý*

- v organismu je syntetizován poměrně složitým enzymovým mechanismem,
- *in vivo* reaguje s většinou biomolekul velmi pomalu, neboť jeho difúze do krve a inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší,
- dostatečně rychle reaguje pouze s tranzitními kovy,
- jeho metabolity jsou velmi reaktivní,
- pohotově se váže na hemové železo a slučuje se s fenoly (Tyr), thioly (Cys, GSH, albumin) a se sekundárními aminy (Squadrito *et Pryor* 1998).

- *Peroxynitrit*

- nejvýznamnější je reakce oxidu dusnatého se superoxidem za vzniku toxického peroxynitritu:



- fyziologické podmínky nejsou pro jeho syntézu ideální (↓ koncentrace NO a superoxidu), avšak při intenzivní syntéze NO a superoxidu (aktivované granulocyty) může koncentrace peroxynitritů dosáhnout významných hladin,
- *in vivo* je přímo odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyrozinu - Tyr (Štípek *et al.* 2000).

2.1.2 Nejvýznamnější funkce volných radikálů v organismu

- *Cytochromoxidáza*

- je poslední funkční enzym dýchacího řetězce ve vnitřní membráně mitochondrií,
- přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík (redukuje ho čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody, přičemž se uvolní energie pro syntézu ATP (viz. výše),
- redukce kyslíku probíhá na aktivním centru enzymu a probíhá ve stupních,
- toxické meziprodukty zůstávají vázány na enzym - mimo něj by tvořily reaktivní metabolity a poškozovaly okolní biomolekuly.

- *Monoxygenáza*

- aktivuje kyslík podobným způsobem v endoplazmatickém retikulu jater a v mitochondriích nadledvinek,
- dioxygen je redukován třemi elektrony až na úroveň hydroxylového radikálu, který je využit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek včetně léků,
- hydroxylace je významnou reakcí při syntéze cholesterolu a při jeho přeměně na žlučové kyseliny,
- xenobiotika se mohou po hydroxylaci konjugovat s hydrofilními látkami, tím se stanou rozpustnější ve vodě, a snadněji se vyloučí z těla (Cotton *et al.* 2007).

- *Fagocyty*

- neutrofilní granulocyty a makrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií,
- jejich funkce popisuje kapitola 2.4 Imunitní systém.

- *Signální molekuly*

- buněčné pochody jsou řízeny mnoha extracelulárními i intracelulárními signály, které pomocí buněčné informační sítě ovlivňují aktivitu enzymů a expresi genů. Stav oxidoredukčního prostředí a RONS se na tomto řízení podílí buď přímo, nebo ovlivněním regulačních molekul (Elliott *et Elliott* 1997).

2.2 ANTIOXIDANTY

Před 2,5 miliardami let došlo, z důvodu fotosyntetické aktivity sinic, ke vzestupu koncentrace kyslíku v zemské atmosféře. Tento vzestup působil jako stresový faktor, který mohly přežít jen druhy organismů u nichž se vyvinuly mechanismy chránící před tímto vysoce reaktivním prvkem.

Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu ROS - snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Antioxidanty se zpravidla dělí na látky tělu vlastní, na léčiva s antioxidačním účinkem (Probukol, Chelatační látky, Kys. ethylendiamintetraoctová, Penicilamin, N-acetylcystein, atd.) a na syntetické antioxidanty (Ebselen, Nitroxidy, Dimethylsulfoxid, atd.).

Látky tělu vlastní se dále dělí na (Štípek *et al.* 2000):

- metabolity, kofaktory a hormony (Koenzym Q, Nikotinamid, Melatonin),
- antioxidační enzymy (Superoxiddizmutáza, Glutathionperoxidáza, Kataláza, Lakto-peroxidáza, DT-diaforáza),
- antioxidační vitamíny (vitamin A, C, E),
- antioxidační substráty (Thioly, Glutathion, Kys. lipoová, Plazmalogeny)
- stopové prvky (Zinek, Měď, **Selen**).

2.2.1 Selen, jeho charakteristika a význam

Selen (Se, *Selenium*) je chemický prvek s atomovým číslem 34 a s relativní atomovou hmotností 78,96. V periodické soustavě prvků je zařazen mezi sírou a telurem do VI. A skupiny (chalkogeny). Elementární selen se v přírodě vyskytuje jen velmi vzácně v několika krystalických formách, jejichž barva je buď šedá nebo tmavě červená. Tvoří šest stabilních izotopů a to: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se a ^{82}Se . Tyto izotopy se přirozeně vyskytují v následujícím procentickém zastoupení: 0,87; 9,02; 7,58; 23,52; **49,82** a 9,19 (Hoffmann *et King* 1997). Relativní zastoupení selenu v zemské kůře je velmi nízké 0,05 až 0,09 ppm.

Selen se v přírodě vyskytuje jak v anorganických tak v organických sloučeninách. Ve sloučeninách se vyskytuje v mocenství Se^{2-} (selenid), Se^{2+} (selenatan), Se^{4+} (seleničitan) a Se^{6+} (selenan). Organický selen se vyskytuje ve formě aminokyselin – selenomethioninu a selenocysteinu (Se-Met a Se-Cys).

Tento prvek je obvykle získáván z odpadů po spalování síry, při výrobě kyseliny sírové nebo jako doprovodný produkt po elektrolytické výrobě mědi ze sulfidických rud. Do prostředí se může selen uvolňovat při spalování uhlí či jiných fosilních paliv (Risher *et* McDonald 2003). Jak elementární selen tak jeho sloučeniny jsou využívány jako součást: fotografických zařízení, přípravků na čištění zbraní, skel, plastů, barev, šamponů proti lupům, fungicidů, vitaminových a minerálních doplňků.

Vstupní branou selenu pro zvířata jsou rostliny, které přijímají selen z půdy v anorganické formě. Avšak jeho dostupnost v půdách je velmi rozdílná a mění se v závislosti na území, např. nízký obsah selenu je zaznamenáván v oblastech se sopečnou činností a na kyselých půdách (Mushak 1985, Surai 2006). Přítomnost dalších prvků (např. síry, hliníku, železa) může negativně ovlivnit příjem selenu rostlinami (Jonnalagadda *et* Rao 1993, Terry *et al.* 2000).

Selen byl objeven v roce 1817 švédským chemikem a lékařem Jönsem Jakobem **Berzelium** (1779 –1848), který tento prvek pojmenoval po řecké bohyni Měsíce - *Selene*. Jedná se o metaloid (polokov), který se svými vlastnostmi podobá síře a teluru. Selen byl dlouhou dobu považován za toxický prvek (např. v souvislosti s alkalickou chorobou u pasoucího se skotu). Jako první popsali důležitost selenu (dříve třetí faktor) **Schwarz et Foltz** (1957). Největší zájem od objevu esenciality Se byl zaměřen na rozpoznání biologicky aktivních struktur, kterých je Se strukturální součástí. Toto snažení mělo za následek objev **Rotrucka et al.**, (1973), který označil již dříve popsanou glutathion peroxidázu (Mills 1957) za *selenoenzym*.

2.2.1.1 *Metabolismus selenu*

Selen je vstřebáván především v duodenu. Pokud se jedná o selen anorganický a organický je mechanismus vstřebávání odlišný. Seleničitan je vstřebáván pomocí pasivní difúze, zatímco pro absorpci selenanu je nutný aktivní transport spolu se sodíkovými ionty (Van Dael 2002). Molybdenan a sulfát jsou vstřebávány stejnou cestou jako seleničitan a mohou při jeho absorpci vyvolávat antagonistické interakce (Underwood *et* Suttle, 1999). Absorpce Se-Met probíhá v tenkém střevě pomocí sodíkového transportního systému, který je specifický pro neutrální AMK, a je inhibována metioninem. Se-Cys je vstřebáván podobným mechanismem a to pomocí nosičů pro zásadité AMK. Tento proces je inhibován lysinem a argininem (Wolffram *et al.* 1989a, b, Wolffram 1999).

Metabolické cesty anorganického a organického selenu se od sebe vzájemně odlišují a jsou znázorněny na obrázku 1. Selen použitý na syntézu selenoproteinů musí být nejprve transformován na hydrogen selenid, který je dále transformován a inkorporován do tělních proteinů (Daniels 1996).

Anorganický selen je postupně redukován, přes různé meziprodukty, až na hydrogen selenid. Ten může být zabudován do selenoproteinu nebo je vyloučen močí. Aby byla možná jeho inkorporace, musí dojít k transformaci na selenofosfát, ten je poté pomocí selenocysteinyl-tRNA (dle UGA kodonu) zabudován do selenocysteinového zbytku. Před samotnou exkrecí selenidu močí je nutná jeho přeměna na metylované metabolity (Lobinski *et al.* 2000).

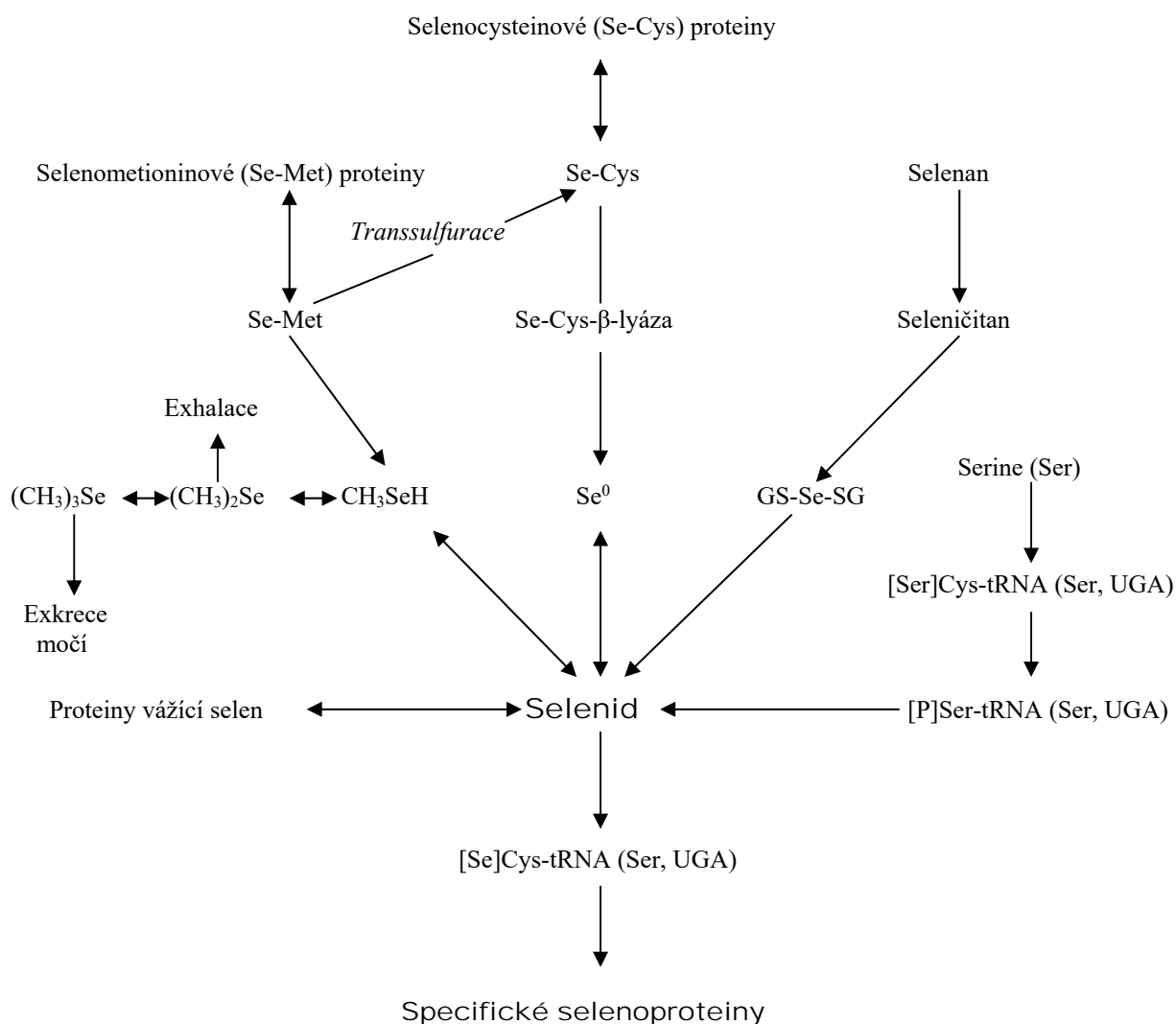
Se-Met je nejprve demetylován a následně konvertován na Se-Cys. Alternativně může být hydrogen selenid ze Se-Met uvolněn cestou L-methionin- γ -lyázy. Také Se-Cys může být metabolizovaný na selenid. Avšak tato reakce vyžaduje specifický enzym (Se-Cys- β -lyázu), který katalyzuje rozklad Se-Cys na alanin a hydrogen selenid. Pro správnou funkci zmiňovaného enzymu je nutný kofaktor pyridoxin-5-fosfát (Sunde 1994). Se-Met, který není využitý k tvorbě selenoproteinů, je zabudován do tkání s vysokou úrovní syntézy proteinů. Jedná se např. o kosterní svalovinu, játra, ledviny, slinivku břišní, žaludek, mukózu gastrointestinálního traktu a červené krvinky (Schrauzer 2000). Inkorporací selenu do proteinů těla se vytváří tkáňové rezervy, které mohou být využity při stavech zvýšené potřeby tohoto prvku jako je gravidita nebo obrana proti chorobám (Behne *et al.* 2001).

Sunde (1990), definuje čtyři druhy selenoproteinů: specifické selenoproteiny; proteiny se zabudovaným selenocysteinem na pozici cysteinového kodonu; proteiny se zabudovaným selenomethioninem na pozici, která náleží methioninu; a na proteiny vážící nesespecificky selenid. Nejdůležitější skupinou, z hlediska fyziologického účinku, jsou specifické selenoproteiny. Ty jsou v organismu zastoupeny např. glutathionperoxidázou, thioredoxinreduktázou a jodothyronindejodinázou.

Selenid je při transportu do jater specificky vázaný na albuminy, kde je nejprve metylován a poté je vylučován z organismu (Ganther *et al.* 1997). Selen může být vylučován vydechnutým vzduchem, močí i výkaly (Hawkes *et al.* 1992, 1994). Procesem metylace probíhá detoxikace selenu v organismu a její úroveň je závislá na množství detoxikovaných látek (Kobayashi *et al.* 2002). Jsou známy tři druhy metylovaného selenu, jejichž tvorba je závislá na dávce selenu. Pokud je selen přítomen v organismu v nízké, normální nebo slabě toxické koncentraci dojde k jeho monometylaci

a k následnému vylučování močí (Howard 1999). Jakmile hladina monometylovaného selenu dosáhne toxické úrovně, dojde ke zvýšení koncentrace trimetylovaného selenu v moči a dimetylovaného selenu ve vydechovaném vzduchu (Ganther 1986). Hlavní metabolit selenu vzniklý po jeho metylaci je metylselenol, který byl později Kobayashim *et al.* (2002) popsán jako selenocukr (1β -methylselenol-N-acetyl-D-galactosamine). U lidí vystavených vysokým dávkám selenu byl zjištěn velmi nápadný česnekový pach vydechovaného vzduchu, který byl pravděpodobně způsoben přítomností dimetyl selenidu (Bopp *et al.* 1982).

Obr. 1 Schématické znázornění metabolismu selenu (Sunde 1994, Schrauzer 1998)



2.2.1.2 Toxicita selenu

Selen patří k nejvíce toxickým stopovým prvkům. Otravy selenem (selenózy) probíhají buď akutně, subakutně nebo chronicky a mohou nastat např. neodbornou suplementací, nebo v oblastech kde se selen hojně vyskytuje (O'Toole *et* Raisbeck 1995). Tyto oblasti se lokálně vyskytují v mnoha zemích např. USA, Rusko, Izrael, Indie, Austrálie, atd.

Mechanismus toxicity selenu ještě není zcela objasněna. Předpokládá se, že při redukci seleničitanu dochází k formaci velkého množství volných radikálů (následek – poškození tkání). Velký význam má také nahrazování síry v některých AMK a tím i v proteinech (Raisbeck 2000). Toxicita může být vyvolána několika důvody. Např. zkrmováním rostlin, které velmi efektivně kumulují nebo konvertují selen z prostředí (kozince z čeledi bobovitých). Dále zkrmováním píce a obilovin s vysokým obsahem využitelného selenu, který je v rostlinách kumulován z důvodu vysokého obsahu využitelného selenu v půdě, nebo kombinací obou předešlých způsobů (Rosenfeld *et* Beath 1964, Underwood *et* Suttle 1999). Akumulační schopnost rostlin je závislá na půdním druhu a na pH.

Chronická otrava selenem (*alkali disease*) je pozorována u pasoucích se zvířat a projevuje se celkovou skleslostí, kachexií, vypadáváním srsti, ztuhlostí a bolestivostí končetin. Subakutní otrava (*blind staggers*) je charakteristická postupnou ztrátou zraku s následným kolapsem a smrtí. Akutní otrava vzniká zejména po požití většího množství rostlin kumulujících selen a probíhá rychle za příznaků dyspnoe, kolikových bolestí, cyanózy, slabosti a končí smrtí v důsledku respiračního selhání (Pavlatá 2004).

Podle druhu a užitkovosti hospodářských zvířat udávají literární údaje potřebu selenu mezi 0,1 - 0,3 mg.kg⁻¹ sušiny krmiva (Shenkel *et* Flachowsky 2000). V USA je suplementace krmné dávky pro drůbež, ovce a skot stanovena na maximální hodnotu 0,3 mg.kg⁻¹ suš. krmiva (FDA 1997).

Při dávce 5 mg Na₂SeO₃.kg⁻¹ živé hmotnosti těla byl zaznamenán úhyn dvou (celkový počet čtyři) dvanáctiměsíčních jehňat již po šestnácti hodinách od podání (Smyth *et al.* 1990). Akutní intoxikace nastupují při dávkách 20 - 80 mg Se.kg⁻¹ živé hmotnosti těla (Puls 1988). Tabulka 2 shrnuje u vybraných zvířecích druhů dávky, při kterých dochází k úmrtí právě 50 % pozorovaných jedinců (*lethal dose* - LD₅₀).

Tab. 2 LD₅₀ při podávání Na₂SeO₃ u různých druhů zvířat [mg Se.kg⁻¹ živé hmotnosti těla]

Druh zvířete	LD ₅₀	Převzato z
Myš	3,2	Cummins <i>et</i> Kimura (1971)
Potkan	4,8 - 7,0	
Králík	1,0	Pletnikova (1970)
Prase	13,0 - 18,0	Miller <i>et</i> Williams (1940)
Skot	9,9 - 11,0	

2.2.1.3 Selenoproteiny

Biologický efekt selenu je vázán na celou řadu selenoproteinů (Se-P). Se-P obsahují tento prvek kovalentně vázaný na aminokyselinu cystein a tvoří tak selenocystein (Se-Cys). Dle údajů uváděných různými autory dnes známe 25-30 Se-P, avšak charakteristika jejich funkce byla popsána pouze u některých z nich (Behne *et* Kyriakopoulos 2001; Papp *et al.* 2007). Větší část Se-P představuje intracelulární antioxidantní enzymy, které se podílejí na inaktivaci volných radikálů a redukci peroxidu vodíku a lipidů na alkohol a vodu (Behne *et* Kyriakopoulos 2001; Jacques 2001).

- *Glutathionperoxidázy (GPxs)*

- katalyzují redukci peroxidu vodíku a organických peroxidů a tím chrání buňky před oxidativním poškozením ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$, nebo $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$),

- zatím bylo identifikováno pět GPxs - cytozolová (klasická) GPx, gastrointestinální GPx, plazmová GPx, fosfolipidová GPx a GPx lokalizovaná v jádrech spermií,

- nejnovější výsledky prokázaly u lidí další dvě GPxs – první je lokalizována v čichovém epitelu a druhá v embryonální tkáni (Kryukov *et al.* 2003),

- cytozolová GPx (EC 1.11.1.9) byla prvním identifikovaným selenoproteinem (viz výše).

- *Jodothyronindeiodinázy (IDs)*

- hlavní fyziologický účinek IDs je katalyzovat průběh aktivace a inaktivace thyroïdních hormonů, které regulují různé metabolické procesy a jsou nepostradatelné pro normální vývoj mozku v průběhu fetálního vývoje (Arthur *et al.* 1990, Behne *et al.* 1990),

- skupina IDs obsahuje tři zástupce – ID typu 1, 2 a 3,

- ID prvního typu zabezpečuje stálou hladinu 3,3',5-trijodtyroninu (T3) v krevní plazmě přeměnou biologicky neaktivního tyroxinu (T4) a eliminuje reverzní 3,3',5-trijodtyroninu (rT3) z oběhu (Berry *et al.* 1991),
- ID typu 2 katalyzuje konverzi T4 na T3 a T3 na 3,3'-dijodtyronin (T2) a udržuje lokální intracelulární produkci T3 z plazmového T4 (Leonard *et al.* 2000),
- typ 3 je enzym, který má schopnost inaktivovat tyroidní hormony tvorbou rT3 z T4 a T2 z T3 – tento mechanismus chrání savčí mozek před nadměrnou hladinou T3 (Kaplan 1986) a reguluje přívod T4 a T3 z matky na plod (Mortimer *et al.* 1996).

- *Thioredoxinreduktázy (TRs)*

- tato skupina enzymů se zúčastňuje redukce bílkovinných disulfidů a některých dalších sloučenin (Surai 2001),
- s pomocí NADPH (donor elektronu) redukuje TR thioredoxin, který poté zvyšuje redukční kapacitu enzymů s antioxidační aktivitou (Zhong *et al.* 2000, Jacques 2001),
- biologická funkce je zatím popsána u tří typů TR, nejvýznamnější funkce popisuje tabulka 3.

Tab. 3 Nejvýznamnější úlohy thioredoxinu v organismu (Arnér et Holmgren 2000)

Efekt	Úloha thioredoxinu
Syntéza DNA	donor H pro ribonukleovoureduktázu
Redukce disulfidických proteinů	udržuje intracelulární proteiny v redukovaném stavu
Redukce H ₂ O ₂	ochrana před oxidačním stresem a indukci apoptózy
Regulace apoptózy	reguluje směr apoptózy
Imunomodulace	funguje jako ko-cytokin a chemokin a stimuluje eozinofily
Gravidita	podporuje implantaci a zachování gravidity
Porod	při narození chrání před hypoxií
CNS	pomáhá přežití neuronů při ischemii

- *Selenofosfátsyntetáza 2*

- katalyzuje reakci selenidu s AMP za vzniku selenofosfátu, který slouží jako donor selenu při biosyntéze selenocysteinu (Guimaraes *et al.* 1996).

- *Selenoprotein P (Se-PP)*

- Se-PP představuje asi 50 % selenu krevní plazmy (Read *et al.* 1990, Akesson *et al.* 1994)
- jeho nejvýznamnější úlohou je transport selenu ke vzdáleným tkáním,

- u Se-PP deficitních myší byl prokázán snížená distribuce selenu do mnohých tkání např. mozek, varlata atd. (Hill *et al.* 2003, Peters *et al.* 2006),
 - vedle transportní funkce je velmi významná jeho schopnost vytvářet chelátové vazby s těžkými kovy, což snižuje riziko neurotoxicity (Whanger 2001),
 - Se-PP chrání endoteliální buňky (Atkinson *et al.* 2001, Steinbrenner *et al.* 2006b) astrocyty (Steinbrenner *et al.* 2006a) před oxidativním poškozením a inhibuje oxidaci LDLs (Traulsen *et al.* 2004).
- *15 kDa selenoprotein (Se-P15)*
 - je přítomen ve většině tkání nejvíce však v mozku, plicích, varlatech, játrech, štítné žláze a ledvinách (Kumaraswamy *et al.* 2000),
 - jeho zastoupení je přímo závislé na příjmu selenu dietou (Ferguson *et al.* 2006),
 - předpokládá se jeho role v regulaci průběhu apoptózy (Apostolou *et al.* 2004),
 - je potenciálně významná složka regulace patologických procesů, zvláště rakoviny (Cheung *et al.* 1999).
- *Selenoprotein W (Se-PW)*
 - jedná se o poměrně malý protein (9,5 kDa), který se vyskytuje rovnoměrně ve všech tkáních (Vendeland *et al.* 1993, Gu *et al.* 1999),
 - jeho vyšší výskyt má za následek zvýšenou ochranu buněk před oxidačním stresem (Jeong *et al.* 2002),
 - nedostatečný příjem selenu v dietě má za následek nižší výskyt Se-PW ve tkáni kosterní svaloviny, srdce, zažívacího traktu, prostaty a pokožky (Whanger 2000).
- *Selenoprotein N (Se-PN)*
 - je přítomen ve většině tkání v membráně endopazmatického retikula (Papp *et al.* 2007),
 - u myší bylo zjištěno, že jeho koncentrace vzrůstá v průběhu embryonálního vývoje (Petit *et al.* 2003),
 - jedná se o doposud jediný selenoprotein (65 kDa), který je přímo spojován s onemocněním (Moghadaszadeh *et al.* 2001, Rederstorff *et al.* 2006),
 - několik typů myopatií je dáváno do spojitosti s geny, které kódují Se-PN (Rederstorff *et al.* 2006), avšak mechanismus vzniku těchto na Se-PN závislých myopatií není doposud detailněji prozkoumán.

- *Selenoprotein R (Se-PR)*
 - převážně je obsažen v jádru a cytoplazmě buněk (Kim *et Gladyshev* 2004),
 - je také znám jako metionin-R-sulfoxidreduktáza a patří do rodiny enzymů katalizujících průběh redukce oxidovaných metioninových reziduí, tento proces je velmi důležitý jelikož při oxidaci methioninu dochází k významnému zvyšování koncentrací ROS, a ty mohou způsobit poškození proteinů (Stadtman 2006).

- *Selenoprotein M (Se-PM)*
 - u myši je lokalizován ve tkáních srdce, plic, ledvin, dělohy, placenty, ale nejvíce je zastoupen ve tkáních štítné žlázy a mozku (Korotkov *et al.* 2002),
 - v současné době je uvažováno o jeho úloze v průběhu Alzheimerovy choroby (Hwang *et al.* 2005), avšak jeho role není dostatečně objasněna.

- *Selenoprotein S (Se-PS)*
 - předpokládá se, že tento protein má regulační úlohu u makrofágy produkovaných cytokinů a tím hraje významnou úlohu v průběhu zánětlivé reakce (Curran *et al.* 2005, Gao *et al.* 2006).

- *Selenoprotein K (Se-PK)*
 - jeho převážná část se nachází v srdeční a kosterní svalovině,
 - vyšší exprese Se-PK vede ke snižování koncentrace intracelulárních ROS a k vyšší ochraně kardiomyocytů před oxidativním stresem (Lu *et al.* 2006).

- *Selenoproteiny, u kterých nebyly charakterizovány funkce*
 - do této skupiny patří selenoproteiny H, O, I, T a V.

2.2.1.4 Selen, jeho vliv na hematologické parametry a imunitní systém

2.2.1.4.1 Selen a hematologické parametry

U dětí s vyšším příjmem selenu byla zjištěna slabá tendence ke snižování koncentrace hemoglobinu a ke snižování hodnot hematokritu (Jaffe *et Mondragon* 1972). Hawkes *et*

Turek (2001) zjistili, u mužů suplementovaných buď nízkou nebo vysokou dávkou selenu, pěti procentní pokles hodnot počtu bílých krvinek u skupiny s vysokým příjmem selenu a deseti procentní nárůst u skupiny s nízkým příjmem selenu. U obou skupin byly tyto rozdíly způsobené změnou počtu neutrofilních granulocytů. V počtu lymfocytů nezaznamenal, u skupiny s vysokým příjmem, statisticky významný nárůst počtu. Tato studie nezjistila významný efekt na procento aktivovaných cytotoxických lymfocytů (CD8⁺) a na koncentraci sérových imunoglobulinů.

U potkanů, kteří byly suplementováni dietou obsahující seleničitan sodný, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v koncentraci hemoglobinu, hodnotě hematokritu a počtu červených krvinek (Turan *et al.* 1999a,b).

2.2.1.4.2 Selen a imunitní parametry

Z mnohých prací vyplývá, že adekvátní příjem selenu je esenciální faktor a může chránit imunitní systém před oxidativním poškozením (Clark *et al.* 1996, Baum *et al.* 1997, McKenzie *et al.* 1998, Rivera *et al.* 2003, Šimek *et al.* Krása 2007, Vega *et al.* 2007).

Deficience selenu snižuje aktivitu buněčné (Combs *et al.* 1986, Peretz *et al.* 1991), i humorální imunity (Marsh *et al.* 1981) a zpomaluje vývin primárních lymfoidních orgánů (Marsh *et al.* 1986). Nejdůležitější projevy selenodeficience uvádí tabulka 4.

Tab. 4 Přehled změn vybraných parametrů imunitního systému při deficienci selenu (McKenzie *et al.* 1998)

Stav	Parametr	Zvíře
↑	shlukování trombocytů a syntéza leukotrienů	člověk
↓	titrů IgG a IgM	člověk
↓	produkce protilátek lymfocyty	člověk, myš
↓	chemotaxe neutrofilů	koza
↓	aktivita leukocytů a neutrofilů	prase
↓	baktericidní aktivita neutrofilů	potkan
↑	CD4 ⁺ T lymfocytů	myš, ovce
↓	CD8 ⁺ T lymfocytů	myš, ovce
↓	CD4 ⁻ /CD8 ⁻ thymocytů	myš

Suplementace selenu povzbuzuje buněčnou imunitu trojím způsobem. Za prvé, selen zvyšuje expresi receptorů interleukinu 2 (IL2) na T lymfocytech, čímž podporuje jejich imunitní odezvu na antigeny (Roy *et al.* 1994). T buňky díky svým pomocným signálům, které poskytují B lymfocytům, hrají klíčové postavení v průběhu tvorby protilátek a tím se vysvětluje účinek selenu v tomto procesu. U starších jedinců byla po podávání selenu zjištěna efektivnější imunitní odpověď - ve vztahu k IL2 (Roy *et al.* 1995). Za druhé, selen chrání imunokompetentní buňky před poškozením, které vzniká v důsledku oxidačního stresu. Poslední mechanismem se jeví redukce agregace krevních destiček snížením poměru tvorby tromboxanu ku leukotrienům (McKenzie *et al.* 1998). Na nejvýznamnější efekty suplementace poukazuje tabulka 5.

Tab. 5 Přehled změn vybraných parametrů imunitního systému při dostatečné suplementaci selenu (McKenzie *et al.* 1998)

Stav	Parametr	Zvíře
<i>In vitro</i>		
↓	aktivace NF-κβ	člověk
↑	protilátková odpověď (primární i sekundární) na viry	skot, ovce
↓	smrt buněk kůže v důsledku UV záření	myš, člověk
↓	poškození DNA a peroxidace lipidů	myš, člověk
↑	apoptóza nádorových buněk	myš, člověk
↑	aktivita makrofágů	člověk
↑	aktivita CD8 ⁺ T lymfocytů	člověk
<i>In vivo</i>		
↑	migrace neutrofilů	skot, ovce
↑	afinita receptorů IL2	myš, člověk
↑	ploriferace a funkce T lymfocytů	myš, člověk
↑	aktivita NK T lymfocytů	myš, člověk
↑	aktivita CD8 ⁺ T lymfocytů	myš
↑	podpora opožděného typu odpovědi vedoucí k lepší antigenní odpovědi	myš
↓	výskyt rakoviny kůže vyvolané UV zářením	myš

Dotace selenu zvyšuje schopnost neutrofilních granulocytů pohlcovat mikroorganismy a stimuluje jejich mikrobicidní aktivitu (Boyne *et Arthur* 1979, Gyang *et al.* 1984, Grasso *et al.* 1990, McKenzie *et al.* 2002b, Flora 2007). Byl zjištěn významný pozitivní efekt suplementace selenem, která vedla ke zvýšené intracelulární eliminaci *Staphylococcus aureus* (Arvilommi *et al.* 1983) a *Escherichia coli* (Grasso *et al.* 1990) neutrofilními

granulocyty *in vitro*. Sordillo *et al.* (1997) zjistili, při sníženém selenovém statusu organismu, pokles baktericidní aktivity neutrofilů.

Kiremidjian-Schumacher *et al.* (1994), popsali zvýšenou ploriferaci T lymfocytů již při dávce $0,001 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ živé hmotnosti na den. U zkoumaných jedinců došlo ke zvýšení imunitní odpovědi vedoucí k nárůstu počtu CD4^+ schopných ničit nádorové buňky. Četné práce potvrzují zlepšení lymfocytární odpovědi již při nízkých dávkách selenu (Turner *et al.* 1985, Finch *et Turner* 1989, Stabel *et al.* 1990, Broome *et al.* 2004). Nedostatek selenu ovlivňuje růst primárních lymfoidních orgánů, redukcii tvorby lymfocytů a změny v rovnováze subpopulací $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ (Marsh *et al.* 1986, Chang *et al.* 1994). U jedinců stimulovaných phytohemaglutininem-P nebo konkavalinem A vzrostla u thymocytů exprese znaku CD3^+ , avšak exprese CD4^+ a CD8^+ se snížila (Chang *et al.* 1994). Přítomnost selenu v organismu způsobuje nárůst subpopulací CD4^+ a CD8^+ a zvyšuje jejich specifickou odpověď na mitogeny, dále způsobuje delší přežívání CD4^+ u pacientů nakažených virem HIV - *human immunodeficiency virus* (Spallholz *et al.* 1990, Kiremidjian-Schumacher *et al.* 1996, 2000, Kiremidjian-Schumacher *et Roy* 1998, McKenzie *et al.* 2002a).

Pokusy na myších, potkanech a skotu prokázaly negativní dopad vysokých dávek seleničitanu sodného na imunitní odpověď, avšak tento dopad nebyl prokázán při podávání selenomethioninu (Koller *et Exon* 1986, Raisbeck *et al.* 1998, Yaeger *et al.* 1998, Johnson *et al.* 2000). Spallholz *et al.* (1990), uvádí toxický a imunosupresivní efekt selenu již při dávkách vyšších než $0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ živé hmotnosti na den.

2.2.1.4 Selen a poruchy zdravotního stavu

Charakteristické poruchy zdravotního stavu mohou být vyvolány jak nedostatkem tak nadbytkem selenu. Tyto poruchy jsou vyvolané změnami fyziologických funkcí, které jsou selenem ovlivňovány. Problematika nadbytku selenu byla již diskutována (kapitola 2.2.1.2 Toxicita selenu), proto se v této kapitole zaměříme spíše na poruchy vyvolané jeho nedostatkem.

Mezi choroby vyvolanými nedostatkem selenu se dle různých autorů zařazují: nutriční myopatie, poruchy imunity, mastitidy, poruchy reprodukce (embryonální mortalita, retence placenty, ovariální dysfunkce, metritidy, degenerace varlat, snížení motility spermií, malformace spermií), snížená osmotická rezistence erytrocytů, erytrocytární hemolýza,

anémie, nekróza jater, degenerace tubulů ledvin, exudativní diatéza, pankreatická fibróza, nedostatečný růst, snížená chladová rezistence, narušení syntézy steroidních hormonů a prostaglandinů, kardiovaskulární poruchy, lupénka, rakovina, atd. (Kursa 1969, Kursa *et Kroupová* 1975, Shamberger 1983, Miller *et al.* 1993, Aitken 1994, MacPherson 1994, Smith *et al.* 1997, Surai *et al.* 1997, 1998, McKenzie *et al.* 1998, Edens *et al.* 2000, Avanzo *et al.* 2002, Birringer *et al.* 2002, Pavlata 2004).

2.2.1.5 Řasy, jako nosič prvků

Věda zabývající se studiem řas se nazývá **algologie**. Řasy jsou jednoduché fotosyntetizující organismy, tradičně řazené mezi nižší rostliny. Mezi řasami najdeme jednobuněčné i mnohobuněčné formy, tělo mnohobuněčných řas je tvořeno stélkou. Nejsou schopné přežít v suchém prostředí, žijí proto ve sladké nebo slané vodě, suchozemské formy jsou malé, nenápadné a hojněji se vyskytují ve vlhkých tropických oblastech. Některé řasy vyřešily problém vyschnutí symbiózou s houbou a tvoří součást lišejníků (Rosypal 2003).

Většina řas je schopná fotosyntézy a je proto autotrofní. Chloroplasty vznikly primární endosymbiózou se sinicí nebo až sekundárně symbiózou s jinou řasou. Některé jednobuněčné řasy jsou mixotrofní nebo sekundárně chloroplasty dokonce úplně ztratily. Řasy jsou součástí vodních ekosystémů, ruduchy a chaluhy poskytují potravu i úkryt, mikroskopické řasy tvoří fytoplankton (Graham *et Wilcox* 2000).

2.2.1.5.1 Chlorella, její systematika a charakteristika

- *Systematika*

Říše: Plantae

Oddělení: Chlorophyta

Třída: Chlorophyceae

Řád: Chlorococcales

Čeleď: Oocystaceae

Rod: Chlorella

Druh: *Chlorella vulgaris pyrenoidosa*, *Chlorella pyrenoidosa*

- *Charakteristika*

Chlorella je rod jednobuněčných sladkovodních zelených řas náležících do oddělení Chlorophyta. Poprvé byla popsána až v roce 1890 holandským mikrobiologem M. W. **Beijernickem**. Zástupci se vyznačují oválným tvarem bez bičíků po obvodu, a v průměru měří 2 – 10 μm (www.sinicearasy.cz, www.wikipedia.org).

Zelené řasy vznikly asi před 400 – 500 miliony lety a zahrnují více jak 8000 druhů členěných do 500 rodů. Pravděpodobně jde o jednu z prvních jednobuněčných forem s pravým jádrem. Její přežití až do dnešní doby je zdůvodňováno silnou genetickou stabilitou, tvrdostí a pevností buněčné stěny a neobvykle účinným mechanismem oprav DNA (Yamada *et al.* 2006, Kapraun 2007).

Mikrobiologický ústav AV ČR v Třeboni upravil technologii kultivace a finálního zpracování řas rodu Chlorella ve prospěch zvýšení využitelnosti celého buněčného obsahu zařazením dezintegrace celulóзовých stěn buněk. V současné době je pěstování Chlorelly přísně řízený proces, ve kterém lze využít schopností řas absorbovat mikroprvky z prostředí (Doucha *et al.* 1992). V případě selenu lze jeho obsah v sušině biomasy z řas zvyšovat v průměru až na 800 mg Se.kg⁻¹ sušiny.

V porovnání s jinými zdroji organicky vázané formy selenu (většinou se jedná o jeho chelátovou vazbu) se biomasa Chlorelly vyznačuje i vysokým obsahem β -karotenu, vitamínu E, kyseliny nikotinové a listové. Významná je přítomnost specificky biologicky účinných látek především Chlorella růstového faktoru (CGF – chlorella growth factor), peptidů a glykoproteidů (Doucha 1998). Řada těchto látek zasahuje synergicky se selenem do biochemických a fyziologických procesů, čímž se účinek selenu může posilovat. Jedná se například o funkční vazbu mezi vitamínem E a selenem na úrovni peroxidačních enzymů nebo o stimulaci fagocytární aktivity, proliferaci lymfocytů a produkci protilátek (Kotrbaček *et al.*, 1994a,b, 1996, 1998; Doubek *et al.*, 1995).

2.3 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho základní vlastností je rozeznávat škodlivé od neškodného a adekvátně na tyto podněty reagovat. Funkce imunitního systému zajišťuje spolupráce imunity přirozené (nespecifické) a adaptivní (specifické).

Nespecifické (neadaptivní, vrozené) mechanismy imunity jsou evolučně starší a reagují na nebezpečný podnět rámcově v minutách až hodinách. Na rozdíl od specifických složek nemají imunologickou paměť. Tvoří je jak humorální, tak buněčné složky, rozpoznávající cizorodé struktury, které jsou společné různým skupinám mikroorganismů, popřípadě apoptotickým či nádorově změněným buňkám. U mikroorganismů se tyto formace označují jako struktury charakteristické pro mikroorganismy (*microbe associated molecular patterns* - MAMP). Buněčné nespecifické složky jsou prezentovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky). Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny.

Na obraně organismu a udržování jeho integrity vůči zevnímu prostředí se podílejí i další součásti organismu. Patří k nim neporušený povrch kůže a sliznic a jejich přirozené obranné a mikrobicidní mechanismy (mechanické, chemické a mikrobiální).

Složky **specifické** imunity jsou evolučně mladší. Označují se také jako adaptivní (získané), neboť jejich konečný vývoj probíhá až po styku s příslušným antigenem, kdy se aktivují převážně ty složky, které mají antigenně specifické receptory pro daný antigen. K vývoji specifické imunitní reakce dochází v průběhu několika dnů až týdnů. Charakteristickým rysem těchto reakcí je vznik imunologické paměti. Specifická imunitní reakce se odehrává převážně v sekundárních lymfatických orgánech.

2.3.1 Hlavní složky imunitního systému

Imunitní reakce zprostředkovávají různé druhy buněk a molekul, ale také jejich vzájemné interakce. Lymfatická tkáň a lymfatické orgány jsou anatomické a funkční celky, které jsou tvořeny buňkami imunitního systému, pojivovými buňkami a dalšími strukturami.

2.3.1.1 Lymfatické tkáně a orgány

Dle funkce se lymfatické tkáně a orgány dělí na primární a sekundární.

Jako **primární** jsou označovány kostní dřeň a brzlík. Tyto struktury jsou místem vzniku, diferenciací a zrání imunokompetentních buněk.

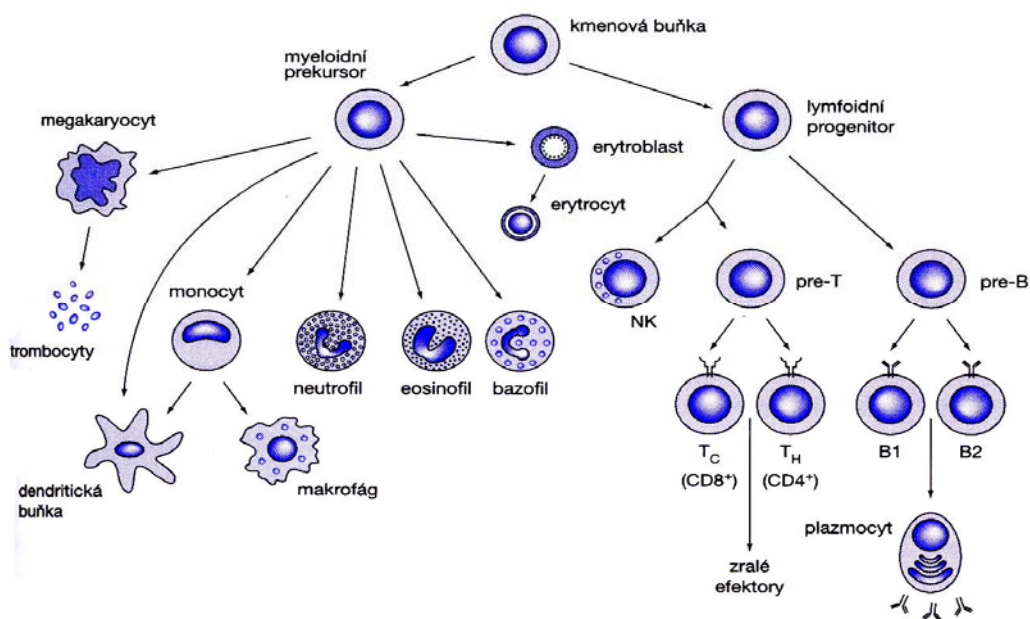
Za **sekundární** jsou považovány slezina, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky (Payerovy plaky, appendix, tonsily). Slizniční lymfatická tkáň (*mucous associated lymphoid tissue* – MALT) je tvořena lymfatickou tkání, která je rozptýlena do funkčních a nikoli anatomických celků. V sekundárních lymfatických orgánech dochází k hlavní části z antigeně specifických imunitních reakcí.

Lymfatické orgány jsou propojeny se svým okolím pomocí sítě lymfatických a krevních cév, které sbírají lymfu z tkání a přivádějí ji do uzlin odkud ji odvádějí do krevního řečiště. Ty cévy, které přivádějí do uzlin lymfu se nazývají aferentní cévy a naopak cévy, které lymfu z uzlin odvádějí se nazývají eferentní cévy (Marvan *et al.* 1998).

2.3.1.2 Buňky imunitního systému

Bílé krvinky (leukocyty) tvoří podstatnou část imunitního systému. Všechny druhy leukocytů pocházejí z pluripotentních kmenových buněk (CD34) nacházejících se v kostní dřeni. Kmenové buňky se ve dřeni nacházejí v omezeném počtu po celý život a pod vlivem určitých faktorů se diferencují na různé druhy leukocytů (obrázek 2).

Obr. 2 Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky (Hořejší *et Bartůňková* 2002)



Počet leukocytů je druhově rozdílný (tabulka 6) a kolísá pod vlivem fyziologických změn. Vzestup počtu leukocytů se nazývá leukocytóza a dochází k ní při stresu, fyzické námaze, zánětlivých procesech apod. Leukopenie je stav kdy dojde k poklesu počtu leukocytů. K tomuto stavu může dojít při poruše mitotického dělení vývojových buněk působením toxinů nebo při nedostatku látek nutných pro krvetvorbu (Jelínek *et al.* 2003)

Tab. 6 Celkový počet leukocytů a procentuální zastoupení jednotlivých druhů leukocytů (Reece 2002, Doubek *et al.* 2003)

Druh zvířete	Počet leukocytů [10 ⁹ .l ⁻¹]	Zastoupení jednotlivých druhů leukocytů [%]				
		Lymfocyty	Monocyty	Neutrofilly	Eozinofily	Bazofily
Ovce	7-10	60-65	5	25-30	2-5	0-1
Skot	7-10	60-65	5	25-30	2-5	0-1
Kůň	8-11	30-40	5-6	50-60	2-5	0-1
Prase	15-22	55-60	5-6	30-35	2-5	0-1
Kur	20-30	55-60	10	25-30	3-8	1-4

2.3.2 Nespecifické mechanismy imunity

2.3.2.1 Humorální složky

2.3.2.1.1 Komplement

Tímto pojmem je označován systém plazmatických bílkovin produkovaných především jaterními buňkami, z menší části makrofágy (Bartůňková *et al.* 2007). Základních devět složek je označováno C1 - C9. Celý komplementový systém se skládá z mnoha enzymů a ostatních proteinů, které se nalézají v krevním séru v neaktivní formě (Tizard 2004). Aktivují se třemi způsoby (Medzhitov *et Janeway* 2000):

- klasická cesta – za účasti komplexu antigenu s protilátkou,
- lektinová cesta – vazba monózy na lektin přítomný na mikrobiálním povrchu,
- alternativní cesta – aktivují ho výlučně specifické povrchy patogenů nebo cizorodých látek.

Aktivace je kaskádovitá reakce, při níž produkty jedné reakce aktivují reakci další. Konečný komplex vazbou na membránu způsobí lýzu a zničení buňky. Prevence poškození

vlastních tkání před účinky komplementu je zajišťována plazmatickými a membránovými inhibitory.

Funkce složek komplementu (Walport 2001, Griffin *et al.* 2007):

- zajišťují transport antigenu,
- mají pomocnou funkci při prezentaci antigenu,
- vazbou na cizorodé částice způsobují jejich opsonizaci pro fagocyty,
- mají chemotaxickou aktivitu,
- způsobují osmotickou lýzu cílových buněk,
- způsobují přídatnou aktivaci lymfocytů B,
- zvyšují účinek cytotoxické reakce zprostředkované protilátkami a aktivitu NK buněk.

2.3.2.1.2 Přírozené protilátky

Přírozenými protilátkami se označují polyreaktivní nízkoafinní protilátky produkované subpopulací lymfocytů B1, kódované imunoglobulinovými geny v zárodečné konfiguraci (Devereux 2002, Tizzard 2004).

2.3.2.1.3 Lektiny vázající manózu a další humorální faktory

Do humorálních nespecifických složek patří interferony, některé cytokiny a chemokiny, sérové proteiny ze skupiny lektinů a pentraxiny (Baggiolini 1998, 2001).

2.3.2.2 Buněčné složky

2.3.2.2.1 Fagocyty a fagocytóza

Fagocytóza je evolučně velmi starý děj podobný pohlcování potravních částic amébami. Schopnost pohlcovat částice z okolí má celá řada buněk: neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty a z nich se diferencující makrofágy. Fagocytózy jsou schopny také dendritické buňky, ale pouze v určité fázi svého vývoje (Chan *et al.* 2002).

Ačkoli se fagocyty odlišují svou receptorovou a enzymatickou výbavou je většina jejich charakteristik shodná. Základním rozdílem u neutrofilních granulocytů je, že za normálních okolností neexprimují hlavní histokompatibilní komplex (*master histocompatibility complex* - MHC) II. třídy, a nejsou tedy s největší pravděpodobností buňky reprezentující antigen (Reeves *et al.* 2002). Granulocyty mají význam především proti extracelulárním, zatímco makrofágy proti intracelulárním mikroorganismům (Tizard 2004). Granulocyty jsou schopny vykonávat své efektorové funkce ihned, ale makrofágy se stávají plně funkčními až po aktivaci signály, které jim poskytují Th 1 lymfocyty ve formě cytokinů – TNF a interferon- γ (Chitko-McKown *et al.* 1992). Neutrofilové cirkulují v krevním oběhu a jsou v dynamické rovnováze s poolem neutrofilů přichycených na cévní stěně. Těchto periferních elementů je asi 7 % a zbytek je lokalizován v kostní dřeni odkud se průběžně vyplavují. Zastoupení v těchto částech se mění vlivem zánětlivých cytokinů, hormonů a bakteriálních produktů (Bartůňková *et al.* 2007). Neutrofilové jsou krátce žijící buňky (poločasem v krvi je 6 - 12 hodin), makrofágy žijí dlouho a mohou se transformovat a přecházet do různých aktivačních stádií.

Prostup fagocytu do poškozených a infikovaných tkání je umožněn tím, že se zachytí na povrchu endoteliálních buněk cév, pak mezi nimi prostoupí (diapedéza, extravazace) a uvnitř tkáně se aktivně pohybují do místa poškození. Na povrchu endotelií zanícených tkání se fagocyty (především neutrofilové) zachycují, protože se tu narozdíl od klidových endotelií exprimují pod vlivem cytokinů některé adhezivní molekuly. Nejprve neutrofilové reagují díky svým sacharidovým strukturám, které jsou přítomny ve velkém počtu na jejich povrchu, se selektivně (adhezivní protein endotelií). Tato prvotní reverzibilní vazba neutrofilové zpomalí. V další fázi dochází k navázání leukocytárních integrinů na povrchový glykoprotein endoteliálních buněk – ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*; CD45). Do míst zánětu fagocyty směřují různé látky s chemotaxickou aktivitou (Medzhitov *et al.* 1997). Hlavní chemotaxickou látkou pro neutrofilové je cytokin interleukin-8 (IL-8), další chemotaxické látky jsou složky komplementu C3a a C5a, leukotrien B4 a chemotaxické peptidy pocházející z bakteriálních proteinů (nejznámější je formyl-metionylleucylphenylalanin). Pro všechny tyto látky mají fagocyty na svém povrchu příslušné receptory, jejichž aktivace vede nejen k chemotaxi, ale také k aktivaci fagocytózy (Bartůňková *et al.* 2005, Erwig *et al.* 2007). Neutrofilové, které v místě poškození splnily svůj úkol, během krátké doby hynou (tvoří hnis) a jsou odstraňovány dalšími fagocyty (hlavně makrofágy).

Fagocyty mají **schopnost rozpoznat** povrchové struktury, které se nacházejí na mikroorganizmech, ale už se nenacházejí na vlastních poškozených buňkách organismu. Tyto struktury jsou evolučně velmi konzervované a jsou nezbytné pro jejich život. Fagocytózu zprostředkovávají zejména interakce mezi povrchovými lektiny (proteiny schopné vázat sacharidy) fagocytů a sacharidy náležející mikrobiálním glykoproteinům a polysacharidům. Nejvýznamnější povrchové lektiny jsou: mannosový a laktosový receptor (Matsushita *et* Fujita 1992). Další velmi důležitý mechanismus pro rozpoznávání cizorodých částic je opsonizace, ta je závislá na spolupůsobení protilátek, složek komplementu a dalších sérových proteinů (Brown 1995). Protilátky vázané na mikroorganismy jsou rozeznávány Fc-receptory fagocytů. Na povrchu mikroorganismů dochází k aktivaci komplementového systému, což vede k usazování komplementových fragmentů, které jsou rozeznávány komplementovými receptory.

Samotná **fagocytóza** probíhá tak, že dojde ke kontaktu malé části povrchu fagocytu s cizorodou částicí prostřednictvím jeho rozmanitých povrchových receptorů. Částice je poté postupně obalována membránou fagocytu, až do úplného pohlcení kdy vzniká fagozóm. Už při vytváření fagozómu dochází k jeho spojování s lyzozómy, které obsahují řadu baktericidních látek a hydrolytických enzymů v tekutině s nízkým pH (Baggioloni *et* Dewald 1985). Vzájemné interakce komplementových a Fc receptorů s opsonizovanými strukturami vedou k aktivaci membránového enzymu NADPH-oxidázy (Nox). Ten katalyzuje reakci NADPH s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), z něhož dalšími reakcemi vzniká singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál (viz. kapitola 2.1.1.1 Reaktivní formy kyslíku). Vzniklý peroxid vodíku reaguje s chloridovým aniontem za vzniku baktericidních chlornanových (ClO^-) iontů. Tuto reakci katalyzuje enzym myeloperoxidáza. Popsané děje zahájené aktivací Nox se souborně nazývají respiratorní (někdy také oxidační) vzplanutí – *respiratory burst* (Whist *et al.* 2002, Tizard 2004, Choudhary *et al.* 2007).

Krom svých efektorových funkcí mají fagocyty důležité **regulační funkce**, jelikož monocyty a makrofágy produkují celou řadu cytokinů. Neutrofilů, ve srovnání s monocyty a makrofágy, produkují menší množství cytokinů, avšak tato nižší produkce je nahrazována jejich podstatně vyšším počtem v místě zánětu. Dle Hořejšího *et* Bartůňkové (2002), tyto cytokiny zprostředkovávají systémovou odpověď na zánět (IL-1, IL-6, TNF), zesilují zánětlivou reakci (IL-3, GM-CSF) a regulují diferenciaci T lymfocytů (IL-12).

2.3.3 Specifické mechanismy imunity

2.3.3.1 Humorální složky

Imunitní reakce založené na protilátkách jsou založeny na rozeznávání antigenů povrchovým antigeně specifickým receptorem **B lymfocytů** (*B-cell receptor* - BCR). Za vhodných podmínek (spolupráce s Th lymfocyty) se takto stimulované B lymfocyty pomnoží a diferencují na plazmatické buňky, které produkují velké množství protilátek (Berk 1992).

Při prvním setkání s antigenem dojde nejprve k produkci imunoglobulinů třídy IgM. K přesmyku na další izotypy je nutný přímý kontakt aktivovaných lymfocytů T s lymfocyty B prostřednictvím adhezivních a kostimulačních molekul a za přítomnosti cytokinů (Berk *et* Ziegner 1993). Přesmyk na syntézu IgA kontroluje kromě IL-4 také transformující růstový faktor (TGF- β). Syntéza IgG2 je závislá na přítomnosti typického produktu Th1 lymfocytů, a to interferonu γ - IFN- γ (Wakabayashi *et al.* 2002). Charakteristiku jednotlivých imunoglobulinů popisuje tabulka 7.

Tab. 7 Charakteristika imunoglobulinových tříd (Bartůňková *et al.* 2007)

Izotyp	Lokalizace	Biologický poločas [dny]	Funkce
IgG	sérum, intersticiální tekutina	21	opsonizace, neutralizace, aktivace komplementu, průnik placentou, sekundární protilátková reakce
IgA	sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, kolostrum a mléko	6	opsonizace, ochrana sliznic
IgM	sérum, membrána lymfocytů B	6	aktivace komplementu, primární protilátková reakce, receptor pro antigen na lymfocytech B
IgD	sérum, membrána lymfocytů B	3	receptor pro antigen na lymfocytech B
IgE	sérum, intersticiální tekutina	2	ochrana proti parazitům

2.3.3.2 Buněčné složky

Specifická buněčná imunita je tvořena **lymfocyty T**. Většina z nich vyžívá v thymu přes stádia, při kterých dochází k přeskupování genů kódujících receptor pro antigen (*T-cell receptor* – TCR). Procesem pozitivní a negativní selekce opouští thymus z původního počtu prekurzorů asi 2 %, z nichž se stávají zralé lymfocyty T (buď CD4⁺ nebo CD8⁺),

které osidlují periferní lymfatické orgány (Stites *et Terr* 1994). Zastoupení hlavních populací lymfocytů v krvi hospodářských zvířat ukazuje tabulka 8.

Podle typu TCR lze rozdělit T lymfocyty na buňky nesoucí TCR $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$. Většinovým typem jsou buňky nesoucí TCR $\alpha\beta$, ty potřebují pro svůj vývoj thymus a rozeznávají peptidy vázané v komplexu s MHC. Zatímco lymfocyty nesoucí TCR $\gamma\delta$ thymové prostředí nepotřebují a rozeznávají antigeny jiného typu než je MHC (Hein *et Mackay* 1991).

Tab. 8 Zastoupení hlavních populací lymfocytů v krvi hospodářských zvířat

Druh zvířete	Lymfocyty		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4/8	převzato z
	T	B				
Ovce	56-64	11-50	8-22	4-22	1,55	Thorp <i>et al.</i> (1991), Smith <i>et al.</i> (1994)
Skot	45-53	16-21	8-31	10-30	1,53	Park <i>et al.</i> (1992)
Kůň	38-66	17-38	56	20-37	4,75	McGorum <i>et al.</i> (1993), Grunig <i>et al.</i> (1994)
Prase	45-57	13-38	23-43	17-39	1,4	Pescovitz <i>et al.</i> (1994), Saalmüller <i>et Bryant</i> (1994)

2.3.3.2.1 Intraepiteliální T lymfocyty

Nacházejí se v epiteliích (kůže, sliznice) a jsou zde zastoupeni jak $\alpha\beta$ tak $\gamma\delta$ T lymfocyty. Některé buňky chrání velmi exponovaná místa blízka tělnímu povrchu, jiné zřejmě regulují slizniční imunitu produkcí specifické směsi cytokinů (Ishikawa *et al.* 2007).

2.3.3.2.2 NK T-lymfocyty

Přirození zabíječi (*natural killers* – NK) jsou popisovány jako buňky schopné rychle zabít některé nádorové a vorově infikované buňky (Cunningham-Rundles 2002). Vyznačují se TCR $\alpha\beta$, avšak disponují celou řadou receptorů (stimulačních a inhibičních) charakteristických právě pro NK buňky. Tyto buňky produkují velké množství cytokinů a proto pravděpodobně mají důležité regulační funkce (MacDonald 2002, White *et al.* 2005).

2.3.3.2.3 CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty

T lymfocyty exprimující TCR $\alpha\beta$ se dají dále dělit na ty, které nesou na svém povrchu molekuly CD8 – koreceptor pro MHC I a ty, které mají na povrchu molekulu CD4 – koreceptor pro MHC II (Tizard 2004).

CD8⁺ T buňky jsou prekurzory cytotoxických T lymfocytů (Tc) nebo paměťové buňky tohoto funkčního typu. Tyto buňky mají důležité regulační funkce, protože produkují široké spektrum cytokinů (Hořejší *et* Bartůňková 2002, Jabri *et* Ebert 2007).

Většina CD4⁺ jsou prekurzory pomocných T lymfocytů (Th), ty lze dále dělit podle produkce hlavních cytokinů – **Th1** produkují IL-2 a INF- γ ; **Th2** produkují IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10; **Th0** produkují směs typu 1 a 2; **Th3** produkují TGF- β (Abbas *et al.* 1996). Jako regulační se označují T lymfocyty, které jsou schopny potlačovat aktivitu jiných efektorových T buněk. Přirozené regulační T lymfocyty (Treg) tvoří asi 5 % krevních lymfocytů a jsou podobné aktivovaným T lymfocytům. Vznikají v thymu a nesou TCR rozpoznávající vlastní autoantigeny. Působí jednak produkcí tlumivých cytokinů, ale i přímým kontaktem s jinými buňkami (Sarkar *et* Fox 2007).

- **Th1 buňky**

Základní funkcí těchto buněk je spolupráce s makrofágy a jejich stimulace k přeměně v aktivované makrofágy. Tento proces je nutný v boji proti intracelulárním parazitům, kteří dokáží přežít uvnitř fagozómů makrofágů a pro jejich zničení jsou nutné další baktericidní mechanismy (NO). Aktivované makrofágy nejen lépe likvidují intracelulární parazity, ale také produkují řadu látek podporujících další stimulaci T buněk (obecně stimulují lokální zánět). Vzájemné působení Th1 a makrofágů je podstatou mechanismu tzv. imunopatologické přecitlivělosti opožděného typu (*delayed type hypersensitivity* – DTH) (Kroenke *et* Segal 2007).

- **Th2 buňky**

Jejich základní funkce je spolupráce s B lymfocyty, které byly stimulovány rozeznáním antigenu. Tato interakce vede k pomnožení daného klonu B buněk a jejich diferenciaci v plazmatické buňky produkujících velké množství protilátek. Pomoc Th2 buněk spočívá v produkci celé řady cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6) a přímém kontaktu zprostředkovaném několika páry adhezivních a signalizačních povrchových molekul (Lee *et al.* 2007).

K tomu aby se z prekurzorové T buňky stala Th2 buňka je nutné, aby se setkala s antigenem na povrchu profesionální antigen prezentující buňky (*antigen presenting cell* – APC) za přítomnosti IL-4. Spolupůsobením signálů předaných do T buňky dojde k proliferaci a diferenciaci na klon zralých efektorových Th2. Ty pak dodávají B buňkám potřebné pomocné signály (Weaver *et Unanue* 1990).

- **Tc buňky**

Cytotoxické T lymfocyty rozeznávají buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními parazity a ničí je mechanizmy závislých na bezprostředním kontaktu mezi Tc a napadenou buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů. Tento způsob obrany je velmi radikální, ale je také značně riskantní (poškození tkání vyvolané Tc může být vyšší než možné poškození např. virem). Jeho účelem je odstranit z organismu potenciální zdroj nákazy (Burgdorf *et al.* 2007).

Prekurzory Tc musí rozeznat komplexy MHC I s antigenními peptidy na povrchu APC (dendritické buňky, makrofágy). Tyto buňky mohou být virem přímo infikovány, nebo pohlí antigeny pocházející z odumřelých infikovaných, nádorových nebo stresovaných buněk. Pokud by Tc rozeznaly antigen na jiných buňkách než APC dostaly by pouze jeden signál, který by jejich aktivitu utlumil. Dojde-li k prvnímu kontaktu na povrchu APC, prekurzor Tc se začne dělit a diferencovat na klon zralých efektorových Tc (Weaver *et Unanue* 1990). Tomuto procesu napomáhají Th1 lymfocyty, které sekretují IL-2 potřebný pro proliferaci klonů Tc. Th buňky jsou pro stimulaci Tc ještě podstatnější, aby byla dendritická buňka schopna stimulovat Tc musí být sama nejprve stimulována kontaktem s Th (Rigano *et al.* 2007).

Efektorové Tc jsou roznášeny krví do tkání, kde mohou začít působit. Důležité je, že zralé Tc potřebují k aktivaci cytotoxických mechanismů pouze jeden signál (přes TCR). Tc lymfocyty využívají tři typů cytotoxických mechanismů (Dudek *et al.* 2006, Bartůňková *et al.* 2007):

1. Cytoplazma zralých Tc obsahuje řadu cytotoxických granulí (lyzozómů), které obsahují perforin (bílkovina) a granzymy (proteázy). Perforin je schopný po kontaktu Tc s „vadnou“ buňkou vytvořit v její membráně póry, kterými se do buňky dostanou granzymy. Ty pak v cytoplazmě štěpí prekurzory proteáz, které působí na další proteiny a tím se spustí kaskáda dějů, která vyústí až v apoptickou smrt zasažené buňky.

2. Povrch Tc obsahuje protein zvaný Fas-ligand (FasL), který se váže na apoptický receptor Fas (je přítomný na povrchu různých typů buněk). Signály, které se po navázání přenesou vyvolají kaskádu dějů opět končících apoptickou smrtí buňky.
3. Především způsoby vyžadují nejen úzký kontakt, ale také velké množství Tc. Proto Tc používají k zabíjení cílových buněk své sekretované produkty (zejména cytokin – lymfotoxin), který působí podobně jako FasL. Jedná se o méně specifický proces, který může poškodit okolní buňky.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem doktorské disertační práce bylo porovnat účinky zkrmování diet obsahující odlišné formy selenu (*anorganický* – Na₂SeO₃ a *organický* – selenizovaná řasa rodu *Chlorella*) na aktivitu leukocytů v krvi ovcí a narozených jehňat, plemene ovce Šumavská.

Parametry sledované v průběhu pokusu:

- koncentrace selenu v krvi,
- počet leukocytů v krvi a jejich diferenciační rozpočet,
- exprese CD4⁺ a CD8⁺ subpopulací T lymfocytů v krvi,
- fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů v krvi,
- doplňkové údaje – baktericidní aktivita krve, živé hmotnosti zvířat.

Předložená disertační práce vznikla v rámci řešení projektů:

- *MSM 600 766 58/06*, Trvale udržitelný způsob zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním;
- *GAČR 523/03/H076*, Zvýšení metodologické úrovně a teoretického vzdělávání studentů akreditovaného DSP 4103V Zootechnika - perspektivního studijního oboru obecná zootechnika;
- *IG 15/05*, Účinnost organicky vázaného selenu v řase rodu *Chlorella* na vybrané parametry nespecifické imunity;
- *IG 13/06*, Vliv zkrmování diet obsahujících různou formu selenu na CD4⁺ a CD8⁺ subpopulace lymfocytů u bahnic a u narozených jehňat.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA A JEJICH USTÁJENÍ

Do pokusu bylo zařazeno patnáct osmnáctiměsíčních jehnic plemene ovce šumavská. Pokusná zvířata byla ustájena ve Školním zemědělském podniku JU v experimentální stáji akreditované pro pokusné účely (číslo akreditace 1020/788/A/00). Jednalo se o zděnou budovu s pevným stropem a podlahou. Každý kotec byl dostatečně oddělen od sousedních a měl návaznost na venkovní výběh s pevným podkladem. Rozměry jsou uvedeny a znázorněny na situačním plánu v kapitole 10 přílohy.

Jak vyplývá z tabulky 9, pokusné ovce byly rozděleny do tří skupin po pěti kusech: kontrolní - C a dvou experimentálních - E1 a E2.

Tab. 9 Živá hmotnost ovcí, počet a hmotnost narozených jehňat

Skupina (n = 5)	Živá hmotnost ovcí [kg]		Počet narozených jehňat na ovci	Průměrná hmotnost [kg]	
	začátek experimentu	2 měsíce po porodu		narozených jehňat	vrhu
C	37,0 ± 2,6	50,0 ± 2,7	1	4,6	4,6
E1	40,0 ± 3,6	52,8 ± 3,9	1	4,7	4,7
E2	39,3 ± 6,0	52,3 ± 3,6	1,8	4,4	7,7

Samotný pokus proběhl od července 2005 do března následujícího roku. Pokusná zvířata byla chována na hluboké podestýlce. Od září do října 2005 bylo zahájeno zapouštění ovcí beranem stejného plemene (09047-031CZ). Ovce byly v průběhu pokusu ve stádiu jalovosti, gravidity a laktace. Všechny ovce zabřezly a porody proběhly v průběhu šesti týdnů. Průměrný počet narozených jehňat na ovci a průměrnou hmotnost jehňat i vrhu v rámci skupin uvádí tabulka 9.

Základní krmná dávka byla shodná pro všechny skupiny. Rozdíl byl pouze v obsahu selenu v minerální krmné přísadě (MKP). Složení krmné dávky na ks a den: 1180 g sena, 240 g vojtěškových úsušků, 270 g ovesného šrotu, 6 g MKP. Minerální krmná přísada (tabulka 10) pro skupinu C neobsahovala selen, pro skupinu E1 obsahovala 180 µg selenu ve formě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) a pro skupinu E2 180 µg selenu vázaného v biomase jednobuněčné sladkovodní řasy rodu *Chlorella*. Minerální krmná přísada pro

skupiny C a E1 obsahovala stejné množství biomasy řasy rodu *Chlorella*, jako pro skupinu E2, ale bez selenu. Celkový příjem selenu krmnou dávkou uvádí tabulka 11.

Tab. 10 Obsah jednotlivých složek v 6 g minerální krmné přísady

Skupina	Složka									
	P	Mn	Zn	Cu	I ₂	Se	Chlorella	Vit. A	Vit. D	Vit. E
	[g]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[μg]	[mg]	[mj]	[mj]	[mj]
C	0,396	30,6	36	3	0,636	0	705,9	5000	600	8,5
E1	0,396	30,6	36	3	0,636	180	705,9	5000	600	8,5
E2	0,396	30,6	36	3	0,636	180	705,9	5000	600	8,5

Tab. 11 Průměrné složení krmné dávky na ovci a den a denní příjem Se

Skupina	C			E1			E2		
	Obsah	Suš.	Se	Obsah	Suš.	Se	Obsah	Suš.	Se
Komponent	[g]	[g]	[μg]	[g]	[g]	[μg]	[g]	[g]	[μg]
Seno	1180	1010	40	1180	1010	40	1180	1010	40
Vojtěška	240	218	6	240	218	6	240	218	6
Ovesný šrot	270	236	9	270	236	9	270	236	9
MKP	6	6	0	6	6	180	6	6	180
<i>Celkem</i>	<i>1696</i>	<i>1470</i>	<i>55</i>	<i>1696</i>	<i>1470</i>	<i>235</i>	<i>1696</i>	<i>1470</i>	<i>235</i>
Obsah Se [μg.kg ⁻¹ suš]			37			160			160

K produkci řasové biomasy byla použita technologie řízené kultivace v solárních bioreaktorech Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR v Třeboni podle patentu Doucha *et* Lívanký (1999). Obsah selenu v 1 kg sušiny vyprodukované biomasy řasy rodu *Chlorella* byl 255 mg.

4.2 ODBĚRY A ANALÝZA VZORKŮ

Krev byla odebírána standartním postupem v ranních hodinách z *vena jugularis* jednorázovou jehlou do heparinizované zkumavky. Odebraná krev byla neprodleně po odběru uložena do prostředí se stabilní teplotou. Před zahájením pokusu byl proveden kontrolní odběr (dále označovaný jako „PP”). Po zahájení pokusu byly odběry prováděny jedenkrát za měsíc a poslední v průměru 3 týdny před předpokládaným porodem. Odběry

provedené u jalových zvířat jsou označovány písmenem „J”. Období gravidity bylo rozděleno na tři části: **0-50**, **50-100** a **100-150** dnů. Po porodu byly vzorky krve odebrány v intervalech **1. ± 1**, **10. ± 2**, **30. ± 3** a **60. ± 3** den u bahnic a u narozených jehňat **1. ± 1**, **3. ± 1**, **10. ± 2**, **30. ± 3** a **60. ± 3** den. Ve stejných intervalech byla také zjišťována živá hmotnost pokusných ovcí a jehňat.

4.2.1 Sledované parametry

- *Koncentrace Se v krevním séru*

- koncentrace selenu v krevním séru byla stanovena spektrofluorometricky (Kvicala *et al.* 1995),
- obsah selenu byl vyjádřen v $\mu\text{g.l}^{-1}$ krevního séra.

- *Počet leukocytů v krvi*

- krevní nátěr byl zhotoven po zředění krve Türkovým roztokem v poměru 1:20,
- počet leukocytů byl stanoven mikroskopickou metodou v Bürkerově počítací komůrce dle normy ON 84 3206,
- výsledkem byl počet leukocytů udávaný v jednotkách $10^9.l^{-1}$ (tj. G.l^{-1}).

- *Diferenční rozpočet leukocytů v krvi (Leukogram)*

- neprodleně po odběru byl připraven krevní nátěr, který byl obarven panoptickou metodou dle Pappenheima,
- samotná diference leukocytů byla provedena mikroskopicky dle normy ON 84 3209,
- touto metodou bylo zjištěno procentické zastoupení jednotlivých druhů leukocytů.

- *Fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů v krvi*

- bezprostředně po odběru krve byla zajištěna inkubace krve s mikrosférickými hydrofilními partikulemi (MSHP; kód RK 031, Artim s.r.o., Praha), poté byl zhotoven krevní nátěr a obarven metodou dle Pappenheima,
- jako pozitivní byly v nátěru označeny buňky, které pohltily více než tři partikule,
- fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů byla vyjádřena v procentech (%).

- *CD4⁺ a CD8⁺ subpopulace T lymfocytů v krvi*
 - procentické zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ subpopulace T lymfocytů v krvi pokusných zvířat bylo zjištěno průtokovou cytometrií analýzou FACS (*fluorescents activated cell sorting*),
 - nejprve bylo provedeno temperování 500 µl heparinizované krve se 3 ml 0,84 % chloridem amonným při 37 °C po dobu tří minut, aby došlo k lyzování erytrocytů,
 - poté byly přidány 3 ml roztoku PBS, promícháno a centrifugováno při 10 tis. ot. za min po dobu deseti minut,
 - centrifugace byla opakována třikrát a pokaždé bylo přidáno 5 ml roztoku PSB s 1 % boviním fetálním sérem, tento proces je označován jako promývání,
 - 50 µl promyté suspenze a 5 µl protilátky (tabulka 11) bylo postupně odpipetováno do připravených zkumavek, které byly vloženy do ledu a ponechány 30 minut ve tmě,
 - dalším krokem bylo opětovné promývání roztokem PBS s 1 % boviním fetálním sérem (dvakrát opakováno),
 - samotné měření bylo provedeno průtokovým cytometrem (Becton Dickinson, SRN).

Tab. 12 Monoklonární protilátky (mAbs) a izotypové kontroly (IC) použité při analýze

Specifita	mAbs	Značení	IC	Ředění
CD4 ⁺	Mouse anti ovine CD4 (MCA2213PE)	RPE	Mouse IgG2 (1P-458-C100)	1:25
CD8 ⁺	Mouse anti ovine CD8 (MCA2216F)	FITC	Mouse IgG2a (1F-458-C100)	1:25

- *Baktericidní aktivita krve*
 - vyočkování *Staphylococcus aureus* (SA) – den před použitím byla provedena inkubace na krevním agaru po dobu 24 hodin při 37 °C,
 - vyočkování *Candida albicans* (CA) – na Sabouraud agar s gentamicinem kultivace 1 týden při 37°C,
 - příprava suspenze SA – do zkumavky bylo odpipetováno 400 µl fyziologického roztoku a přidáno několik kolonií SA,
 - příprava suspenze CA – dvanáct drobných kolonií bylo přidáno do 0,2 ml fyziologického roztoku,
 - příprava média – k 10 ml RPMI 1640 bylo přidáno 40 ml destilované, poté bylo přidáno 10 kapek hydrogenuhličitanu sodného,

- vzorek byl pipetován ve dvou sériích po pěti zkumavkách (jedna serie pro SA a druhá pro CA), do první zkumavky bylo dáno 450 μ l heparinizované krve a 50 μ l příslušné suspenze (SA nebo CA), do druhé 450 μ l RPMI a 50 μ l z první zkumavky (takto pokračujeme až do páté zkumavky),
- z páté zkumavky bylo vyočkováno 100 μ l roztoku vždy na tři plotny (roztok je třeba masivně rozočkovat po celém povrchu),
- první zkumavka byla temperována po dobu tří hodin při 37°C,
- dále byly připraveny další dvě série, avšak po čtyřech zkumavkách s 450 μ l RPMI a znovu rozpipetováno (viz. výše),
- plotny s SA byly odečítány po 24 hodin a s CA po 36 hodin,
- na plotně byl spočítán počet kolonií, v čase nula (počet kolonií v čase nula je brán za 100 %) i v čase tři, a vyjádřen v procentech kolonií v čase tři.

- *Živá hmotnost pokusných jedinců*

- hmotnost pokusných zvířat byla zjišťována, ve stejnou denní dobu bezprostředně po odběru biologického materiálu, na analogové decimální váze (účinné rozpětí do 100 kg) a vyjádřena v kilogramech živé hmotnosti.

4.3 ZPRACOVÁNÍ A STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT

Ke zpracování této práce byly použity programy Microsoft Word 2003 a Excel 2003. MS Excel byl dále využit pro stanovení korelačních koeficientů, jejichž úroveň významnosti jsou uvedeny v tabulce 13. Pro statistické vyhodnocení zjištěných dat byla použita ANOVA Tukeyův HSD test (dle potřeby pro stejná nebo nesejná - **n**) v programu Statistika 6. firmy Stat Soft. Základní statistická průkaznost byla akceptována na hladině významnosti $P < 0,05$. Další dvě hladiny významnosti byly zvoleny na úrovni $P < 0,01$ a $P < 0,001$.

Tab. 13 Úroveň významnosti korelačních koeficientů ($r_{x,y}$)

Rozmezí hodnot	Korelační koeficient	Rozmezí hodnot
$r_{x,y} > 0,3$	nízký	$r_{x,y} > - 0,3$
$0,3 \leq r_{x,y} < 0,5$	mírný	$- 0,3 \leq r_{x,y} < - 0,5$
$0,5 \leq r_{x,y} < 0,7$	střední	$- 0,5 \leq r_{x,y} < - 0,7$
$0,7 \leq r_{x,y} < 0,9$	vysoký	$- 0,7 \leq r_{x,y} < - 0,9$
$0,9 \leq r_{x,y} < 1,0$	velmi vysoký	$- 0,9 \leq r_{x,y} < - 1,0$
$r_{x,y} = 1,0$	funkční (matematická) závislost	$r_{x,y} = - 1,0$

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 STRUČNÝ ÚVOD

Jako pokusných zvířat bylo užito patnácti ovcí, které byly rozděleny po pěti kusech do tří skupin: kontrolní – C a experimentální – E1 a E2. Ovce byly krmeny shodnou základní krmnou dávkou (viz. kapitola 4 MATERIÁL A METODIKA – tabulka 11). Tato základní krmná dávka byla obohacena o minerální krmnou přísadu, která se pro jednotlivé skupiny lišila pouze v obsahu a formě užitého selenu. Minerální krmná přísada pro skupinu C neobsahovala selen, pro skupinu E1 obsahovala 180 µg selenu ve formě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3) a pro skupinu E2 180 µg selenu vázaného v biomase řasy *Chlorella*.

Suplementací 180 µg selenu v anorganické nebo organické podobě na kus a den se docílilo u pokusných skupin E1 a E2 příjmu 235 µg Se na kus a den. Uvedené množství je v rozmezí normy (Schenkel *et* Flachowsky 2000), nedosahuje však horní hranice doporučených dávek. Nízký obsah Se v krmné dávce kontrolní skupiny (C) odráží jeho nízký obsah v rostlinných krmivech.

5.2 OVCE

5.2.1 Základní parametry

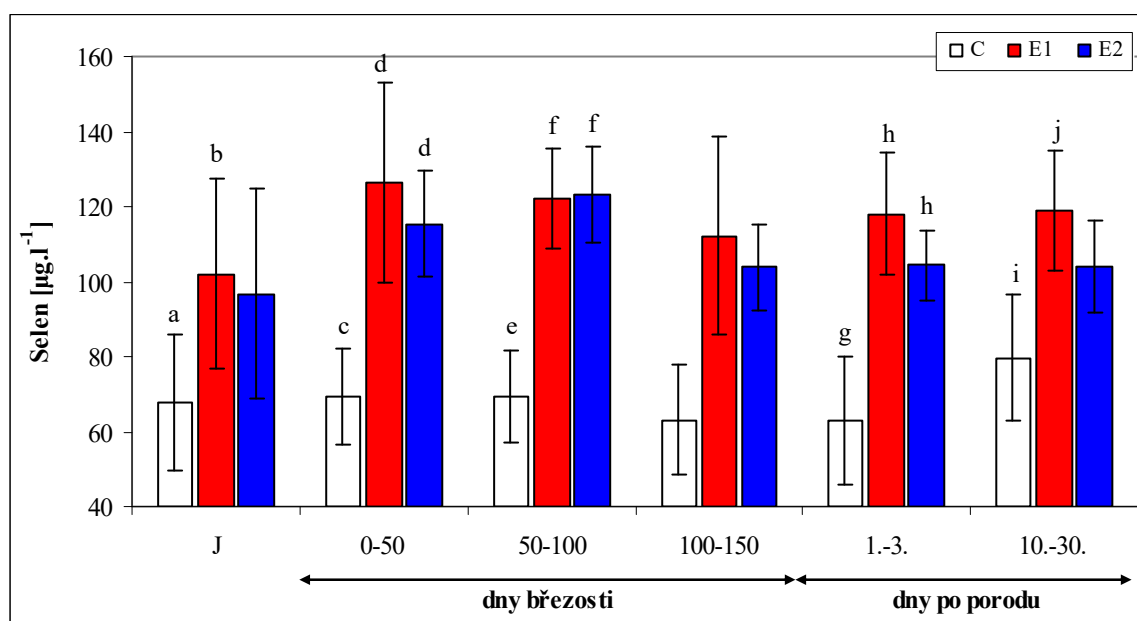
5.2.1.1 Koncentrace selenu v krevním séru

Průměrná **koncentrace selenu (graf 1)** v krevním séru ovcí u skupin E1 ($114,2 \pm 23,6 \mu\text{g.l}^{-1}$) a E2 ($103,1 \pm 20,3 \mu\text{g.l}^{-1}$) byla 1,7 a 1,5 krát vyšší než u ovcí kontrolní skupiny C ($68,6 \pm 16,8 \mu\text{g.l}^{-1}$). Rozdíly byly statisticky vysoce významné. V rámci pokusných skupin byl průměrný obsah Se v krevním séru o 11,4 % vyšší u skupiny E1 oproti skupině E2. Rozdíl mezi pokusnými skupinami nebyl statisticky významný. Obdobně neprokázali statisticky významné rozdíly v obsahu selenu v plasmě, plné krvi i červených krvinkách Boldžarová *et al.* (2005) při suplementaci $300 \mu\text{g Se.kg}^{-1}$ sušiny krmiva jako seleničitan sodný nebo selenem obohacených kvasnic.

Ve srovnání s referenčním rozmezím selenu v krevním séru 120-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Stowe *et* Herdt 1992) byly celkové průměrné hodnoty i u pokusných skupin s dotací 180 μg a tedy celkovým příjmem 235 μg nižší. Referenčního rozmezí dosáhly pouze individuální hodnoty a dílčí průměry u skupin E1 a E2 (graf 1).

Nejvyšší obsah Se v séru bahnic skupiny E1 byl po 3.- 4. měsících (na grafu 0.-50. den gravidity) suplementace selenu ($126,5 \pm 26,6 \mu\text{g.l}^{-1}$), u skupiny E2 přibližně o měsíc později (na grafu 50-100 dnů gravidity), tedy ve 4.-5. měsíce pokusu ($123,3 \pm 12,9 \mu\text{g.l}^{-1}$). U všech skupin došlo k poklesu Se v krevním séru v souvislosti s graviditou a laktanční zátěží v poslední třetině gravidity a v prvním týdnu po porodu. U bahnic skupiny E2 přetrval pokles přibližně do 30. dne po porodu (graf 1). Úbytek selenu v krevním séru v období 100-150. dne březosti ovcí byl popsán Gurdogan (2006).

Graf 1 Obsah Se v krevním séru ovcí [$\mu\text{g.l}^{-1}$] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



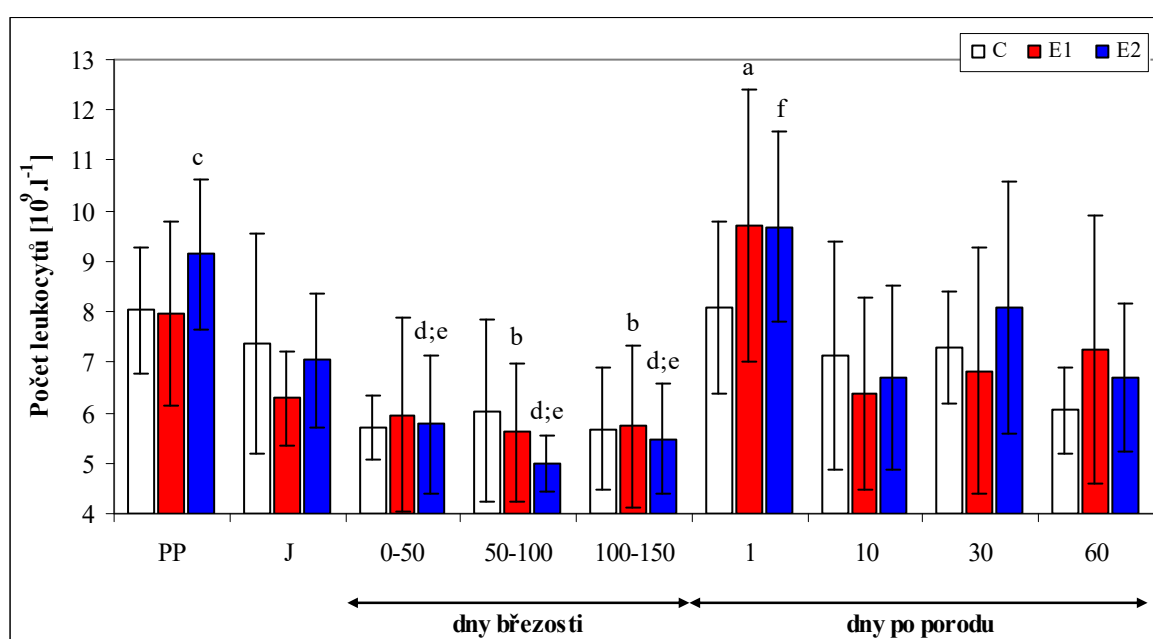
c:d $P < 0,001$; e:f, g:h, i:j $P < 0,01$; a:b $P < 0,05$

Velmi zajímavé je zjištění výrazně vyšší plodnosti bahnic přijímajících selenem obohacené řasy rodu *Chlorella* (skupina E2). Vzestup plodnosti o 38 % v selenodeficitních oblastech po suplementaci selenu zaznamenali u početné skupiny ovcí Balicka-Ramisz *et al.* (2006). V našem pokusu se jednalo o 65 % zvýšení plodnosti než u skupiny kontrolní a skupiny dotované „anorganickou“ formou selenu.

5.2.1.2 Počet leukocytů v krvi

Dynamiku **počtu leukocytů** u kontrolní skupiny (C) i u obou pokusných skupin (E1, E2) popisuje **graf 2**. Z grafu je patrné, že kontrolní odběr před vlastním zahájením pokusu nezjistil statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Nejvyšší počet leukocytů byl zaznamenán u skupiny E2 ($9,14 \pm 1,48 \times 10^9.l^{-1}$) a to přibližně o 12 % než tomu bylo u obou ostatních skupin. Tato vyšší hodnota byla nejvíce ovlivněna jedincem (4162), kterého hodnoty počtu leukocytů dosahovaly téměř 11×10^9 leukocytů. l^{-1} krve.

Graf 2 Počet leukocytů v krvi ovčí [$10^9.l^{-1}$] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



e:f $P < 0,01$; a:b, c:d $P < 0,05$

V období od 0. do 150. dne gravidity došlo k poklesu hodnot počtu leukocytů až na spodní hranici normy $5-11 \times 10^9.l^{-1}$ uváděnou Bock (1994) a pod spodní hranici normy $6-10 \times 10^9.l^{-1}$ uváděnou Jelínkem *et al.* (2003). Jelikož Bock (1994) ve své publikaci uvádí přítomnost většinového podílu gravidních jedinců, proto budou zjištěná data interpretována podle norem udávaných v této publikaci. Zmíněný propad se odehrál v období 50-100 (E1, E2) a 100-150 dnů gravidity (C). Největší pokles vykazovala skupina E2 ($5,00 \pm 1,36 \times 10^9.l^{-1}$), skupina E2 ($5,62 \pm 1,37 \times 10^9.l^{-1}$) a skupin C ($5,68 \pm 1,20 \times 10^9.l^{-1}$). Jako statisticky významný ($P < 0,05$) byl tento pokles prokázán pouze u skupiny E2 a to proti kontrolnímu odběru, který se uskutečnil před začátkem pokusu. Tento nálezn odpovídá zjištění u gravidních opic druhu makak rhesus (*Macaca mulatta*) ve srovnání s jalovými

jedinci (Rogers *et al.* 2005). Avšak je nutno zdůraznit již výše uvedený fakt, že vyšší úroveň počtu leukocytů byla před pokusem zapříčiněna pouze jediným pokusným zvířetem. Jinak by byl průměr skupiny na úrovni ostatních dvou. Toto snížení počtu leukocytů může být způsobeno v důsledku nástupu imunotolerance matky v průběhu gravidity vůči antigenům plodu. Problematika imunotolerance bude blíže probrána v diskuzi subpopulací T lymfocytů.

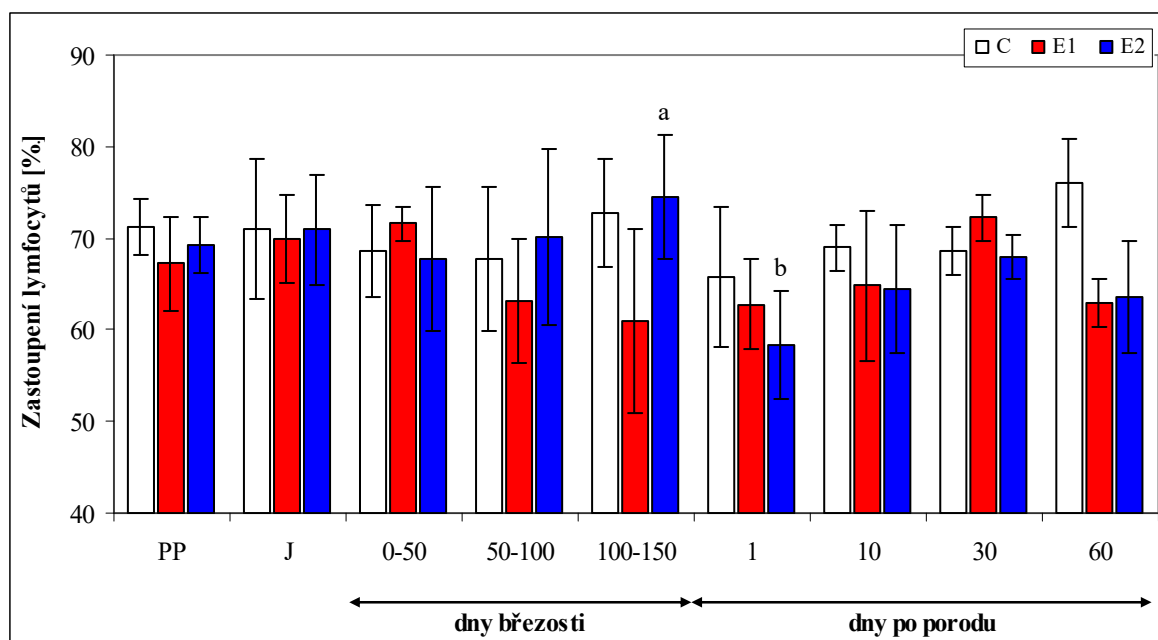
Po porodu došlo u všech skupin k markantnímu nárůstu hodnot. U skupina E1 byla zjištěna nejvyšší hodnota počtu leukocytů ($9,72 \pm 2,69 \times 10^9.l^{-1}$), E2 vykazovala jen o málo nižší hodnotu ($9,68 \pm 1,88 \times 10^9.l^{-1}$) a skupina kontrolní (C) dosáhla nejnižší hodnoty ($8,08 \pm 1,7 \times 10^9.l^{-1}$). Ačkoli byla u skupiny E1 zjištěna nejvyšší hodnota, přesto největšího relativního nárůstu dosáhla skupina E2 (o 44 %). U skupiny E1 byl zjištěn nárůst o 41 % a u skupiny C o 30 %. Statisticky významný nárůst počtu leukocytů byl zaznamenán pouze u pokusných skupin - E1 ($P < 0,05$) a E2 ($P < 0,01$). Tento nárůst mohl být způsoben mobilizací imunitního systému z důvodu blížícího se porodu a tím i očekávaným vyšším patogenním tlakem okolí (McKenzie *et al.* 2002, Doležel 2003). Statisticky významný nárůst leukocytů u žen před a po porodu také zaznamenali Ivanová-Todorová *et al.* (2007). Mezi skupinami se, hlavně díky vyšší variabilitě hodnot uvnitř skupin, nepodařily prokázat statisticky významné rozdíly. Od 10. dne po porodu bylo zaznamenáno kolísání hodnot bez statisticky významných tendencí a to jak v rámci skupin tak mezi skupinami. U skupiny E2 byla pozorována, od 10. do 60. dne po porodu statisticky nevýznamná, tendence růstu hodnot počtu leukocytů.

V dalším textu je použito, pro lepší srozumitelnost interpretovaných údajů, relativní zastoupení jednotlivých typů leukocytů – leukogram. Je však nutné brát zřetel na to, že na nárůstu počtu leukocytů se podílely všechny složky. Dá se tedy říci, že po porodu nedošlo ke snížení absolutních počtů jednotlivých skupin leukocytů oproti období gravidity. Jinak řečeno se absolutní počty všech skupin leukocytů zvyšovaly, i když mohlo souběžně dojít ke snížení jejich relativního zastoupení. Statistické hodnocení rozdílů uvnitř i mezi skupinami bylo provedeno jak u relativního zastoupení tak po přepočtu na absolutní čísla. Dosažené výsledky byly shodné z více jak 95 % a proto se dá tvrdit, že při použití relativních čísel nedochází ke zkreslení statistických analýz.

5.2.1.3 Zastoupení a počet lymfocytů v krvi

Relativní zastoupení **lymfocytů** je shrnuto v **grafu 3** a porovnání relativního zastoupení a absolutního počtu je sumarizováno v **tabulce 13**. Kontrolní odběr prokázal, že před zahájením pokusu nebyly mezi skupinami statisticky významné rozdíly. Nejvyšších hodnot procentického zastoupení lymfocytů v leukogramu dosahovala skupina C ($71,2 \pm 3,11$ %), následovala E2 ($69,2 \pm 3,03$ %) a nejnižší hodnota byla zjištěna u E1 ($67,2 \pm 5,07$ %). Po celou dobu pokusu se hodnoty pohybovaly v rozmezí fyziologické normy (50-75 %) udávanou Bock (1994). Dle Jelínka *et al.* (2003), se některé hodnoty pohybovaly nad horní mezi jím udávané normy (50-70 %).

Graf 3 Zastoupení lymfocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,01$

V průběhu pokusu vykazovaly hodnoty procentického zastoupení lymfocytů u všech skupin nesourodé kolísání bez výrazných tendencí a statisticky významných rozdílů v rámci skupin nebo mezi skupinami. Statisticky významné rozdíly nebyly zaznamenány ani mezi rozptyly jednotlivých skupin. Tento stav je v souladu s prací Ivanová-Toldorová *et al.* (2007), která uvádí statisticky nevýznamné změny zastoupení lymfocytů v periferní krvi u gravidních žen. Jediná výjimka byla zjištěna mezi průměry u skupiny E2 (dotovaná organickou formou selenu) mezi obdobími před porodem (100-150) a po porodu (1).

Zmíněný propad relativního zastoupení lymfocytů v leukogramu (o 22 %) se ukázal jako statisticky významný ($P < 0,01$).

Tabulka 13 Porovnání relativního zastoupení [%] a absolutního počtu lymfocytů [$10^9.l^{-1}$] v krvi ovcí u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)

Skupina	Parametr	PP	J	Dny před porodem			Dny po porodu				Celkem
				0-50	50-100	100-150	1	10	30	60	
C	¹ Leu [$10^9.l^{-1}$]	8,04	7,37	5,72	6,04	5,68	8,08	7,14	7,28	6,06	6,88
	² Ly [%]	71,20	71,00	68,60	67,80	72,80	65,80	69,00	68,60	76,00	70,18
	Ly [$10^9.l^{-1}$]	5,72	5,23	3,92	4,10	4,14	5,32	4,93	4,99	4,61	4,83
E1	Leu [$10^9.l^{-1}$]	7,96	6,28	5,96	5,62	5,74	9,72	6,38	6,83	7,27	6,78
	Ly [%]	67,20	69,90	71,60	63,20	61,00	62,80	64,80	72,25	63,00	66,60
	Ly [$10^9.l^{-1}$]	5,35	4,39	4,27	3,55	3,50	6,10	4,13	4,94	4,58	4,52
E2	Leu [$10^9.l^{-1}$]	9,14	7,05	5,78	5,00	5,48	9,68	6,68	8,10	6,70	7,07
	Ly [%]	69,20	70,90	67,80	70,20	74,60^a	58,40^b	64,40	68,00	63,60	67,80
	Ly [$10^9.l^{-1}$]	6,32	5,00	3,92	3,51	4,09^a	5,65^b	4,30	5,51	4,26	4,79

a:b $P < 0,01$; ¹Leu – leukocyty; ²Ly – lymfocyty

Avšak jak bylo poznamenáno výše pokles relativního zastoupení v leukogramu nemusí znamenat zároveň i pokles absolutních hodnot. V relativních číslech tento pokles vypadal takto: C $72,8 \pm 5,89$ % na $65,8 \pm 7,66$ %, a v absolutních hodnotách byl trend následující: $4,14 \times 10^9.l^{-1}$ na $5,32 \times 10^9.l^{-1}$; E2 $74,6 \pm 6,77$ % na $58,4 \pm 5,94$ %, a v absolutních hodnotách: $4,09 \times 10^9.l^{-1}$ na $5,65 \times 10^9.l^{-1}$ (tabulka 13). Skupina E1 nevykazovala pokles hodnot v relativním zastoupení $61,0 \pm 9,97$ % na $62,8 \pm 4,92$ %, ani v absolutním počtu lymfocytů: $3,5 \times 10^9.l^{-1}$ na $6,1 \times 10^9.l^{-1}$. Statisticky významný nárůst ($P < 0,01$) o 28 % byl zaznamenán pouze u skupiny E2. U ostatních skupin nebyly prokázány, z důvodu vysoké variability hodnot uvnitř jednotlivých souborů, statisticky významné rozdíly.

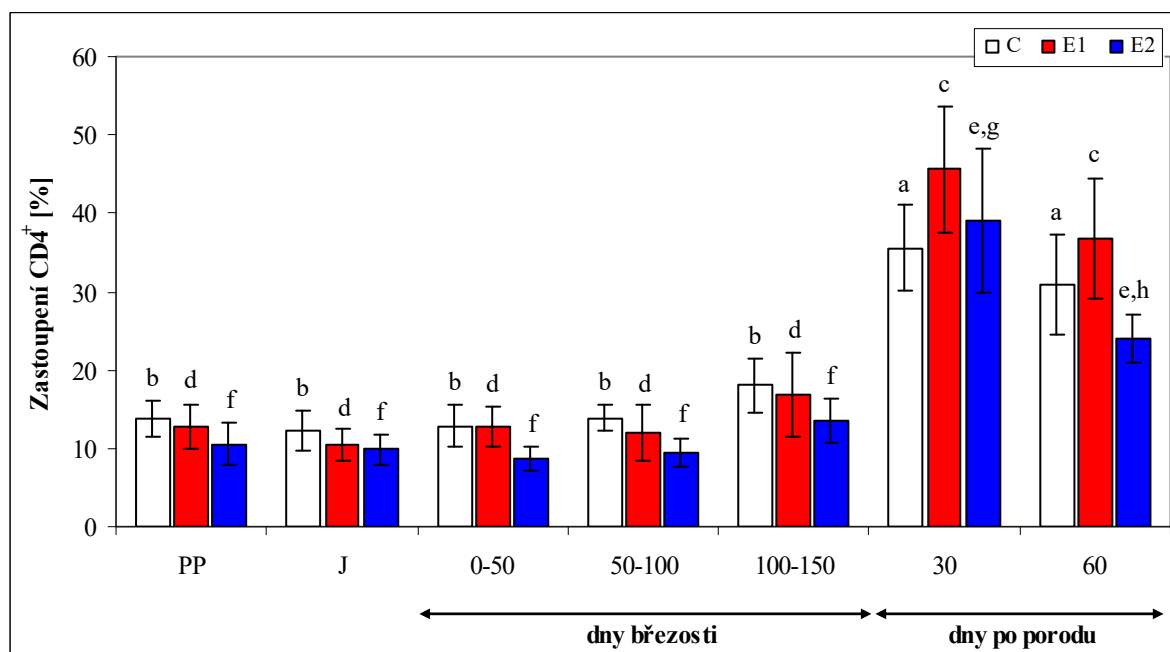
Z relativních hodnot uvedených v grafu 3 vyplývá, že se i při tomto stavu nachází relativní zastoupení lymfocytů ve středu rozmezí fyziologické normy udávané Bock (1994) a nemůže se tedy jednat o patologický stav. Trojan *et al.* 2003 ve své publikaci uvádí, že na kolísání počtu leukocytů se větší a tedy rozhodující měrou podílejí neutrofilní granulocyty. Z uvedeného je tedy zřejmé, že na kolísání jednotlivých typů leukocytů v leukogramu se převážnou měrou podílejí neutrofilní granulocyty.

5.2.1.4 Zastoupení $CD4^+$ a $CD8^+$ subpopulací T lymfocytů v krvi a jejich poměr

Fyziologické normy **zastoupení $CD4^+$ a $CD8^+$ subpopulací T lymfocytů (graf 4 a 5)** jsou v publikacích Thorp *et al.* (1991) a Smyth *et al.* (1994) uváděny v tomto rozmezí: $CD4^+$ 8-22 %, $CD8^+$ 4-22 % a jejich vzájemný poměr by měl dosahovat hodnot kolem 1,55. V každém případě je poměr nižší než 1,0 považován mnohými autory za patologický (Samin *et al.* 2006, Samri *et al.* 2007, Yakoub-Agha *et al.* 2007).

Souhrnné hodnoty subpopulace $CD4^+$ v období jalovosti, gravidity a po porodu byly následující: skupina **C** $18,7 \pm 9,37$ %, **E1** $17,3 \pm 11,8$ % a **E2** $16,1 \pm 10,68$ %. Z fyziologických norem uvedených výše vyplývá, že souhrnné hodnoty se nacházejí v rámci fyziologické normy pro daný druh zvířete. V celém průběhu pokusu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Graf 4 Zastoupení $CD4^+$ subpopulace T lymfocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



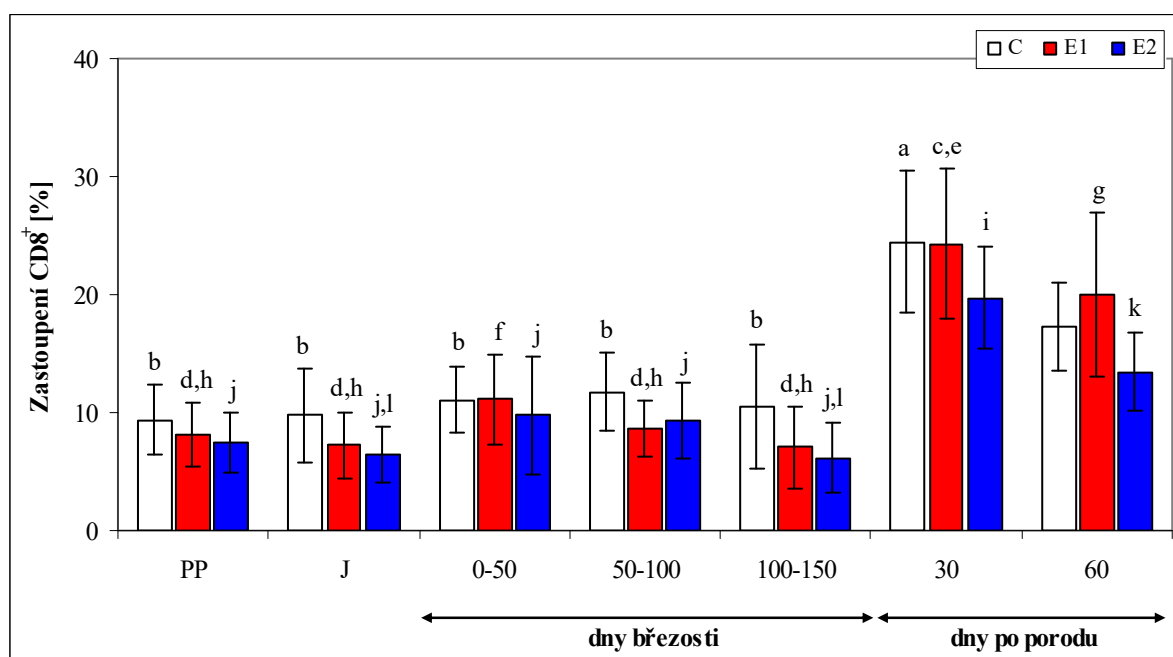
a:b, c:d, e:f $P < 0,001$; g:h $P < 0,01$

Kontrolní odběr před pokusem neprokázal statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Z grafu 4 je patrná velmi stabilní úroveň hodnot, bez statisticky významných rozdílů, $CD4^+$ u jalových a gravidních zvířat u všech skupin v pokusu. Ivanová-Toldorová *et al.* (2007) ve své práci uvádí statisticky významný rozdíl v zastoupení subpopulace $CD4^+$ T lymfocytů mezi skupinou gravidních a negravidních žen. Oproti tomu Zöller

(1988) ve své práci na myších nezjistil statisticky významné rozdíly mezi jalovými a gravidními jedinci. V období jalovosti a gravidity dosahovala skupina E2 nejnižších hodnot a to i po přepočtu relativního zastoupení na absolutní hodnoty. Oproti tomu skupina kontrolní dosahovala nejvyšších hodnot což je v souladu s údaji McKenzie *et al.* (1998), který ve své práci popisuje nárůst subpopulace CD4⁺ u selenodeficientních zvířat. Avšak toto zvýšení nebylo statisticky průkazné.

Souhrnné hodnoty CD8⁺ za celou dobu pokusu byly následující: skupina C 13,0 ± 6,29 %, E1 10,56 ± 6,46 % a E2 10,06 ± 5,37 %. Uvedené hodnoty zastoupení CD8⁺ se nacházejí ve středu normy dle Smyth *et al.* (1994). V průběhu pokusu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Graf 5 Zastoupení CD8⁺ subpopulace T lymfocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b, c:d, i:j $P < 0,001$; e:f, g:h $P < 0,01$; k:l $P < 0,05$

V období jalovosti a gravidity si hodnoty CD8⁺ udržovaly stabilní úroveň bez statisticky významných rozdílů v individuální dynamice skupin. Toto zjištění je v souladu s údaji v publikacích Zöller (1988) a Ivanová-Toldorová *et al.* (2007). Oba autoři shodně uvádějí zjištění, že mezi skupinou gravidních a jalových jedinců zahrnutých do pokusu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v zastoupení subpopulace CD8⁺ T lymfocytů. Stejně jak tomu bylo u předešlé subpopulace tak zastoupení CD8⁺ bylo nejnižší u skupiny E2. Toto zjištění je v rozporu s údaji McKenzie *et al.* (1998), který popisuje pozitivní efekt

suplementace selenu na zastoupení cytotoxických T lymfocytů ($CD8^+$) u myší. Avšak Jukola *et al.* (1996) a Chiaradia *et al.* (2002) ve svých pracích zjistili jistou míru zastupitelnosti deficitního článku v rámci komplexního antioxidačního systému jinými složkami při ploriferaci lymfocytů u koní, ovcí a psů. Dá se tedy tvrdit, že pokud je pouze jediná složka antioxidantní ochrany organismu v deficitu pak nemusí dojít ke klinickým projevům tohoto stavu. V našem případě nemusí deficit selenu vyvolat statisticky významné rozdíly v zastoupení cytotoxických T lymfocytů mezi skupinami, pokud jsou ostatní články systému v optimu.

Po porodu došlo u všech skupin k nárůstu relativních hodnot (růst absolutních hodnot je ekvivalentní se stejnými tendencemi) $CD4^+$ a $CD8^+$ subpopulací T lymfocytů (graf 4, 5). Toto zvýšení bylo statisticky významné a dosáhlo **dvojnásobku** normy udávané Thorp *et al.* (1991), a u subpopulace $CD8^+$, s výjimkou skupiny E2, přesáhlo horní hranici normy udávanou Smyth *et al.* (1994).

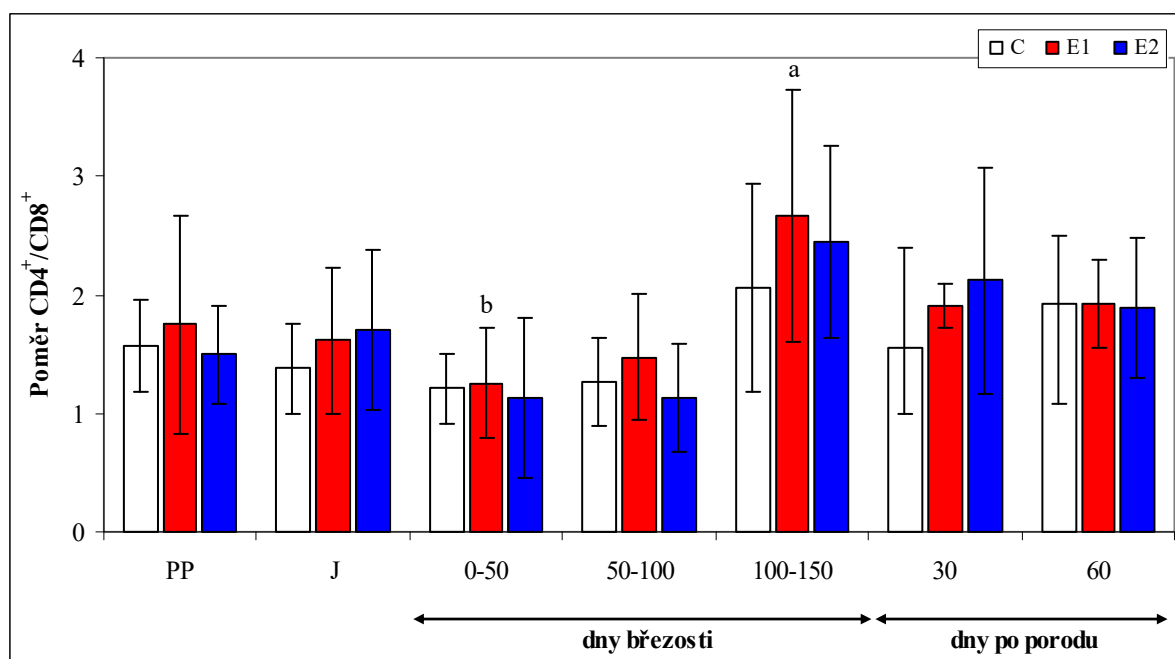
Nejnižší relativní nárůst u $CD4^+$ byl zjištěn u skupiny **C** a to o 49,1 % (z $18,1 \pm 3,44$ % na $35,54 \pm 5,5$ %), následovala **E1** 63,2 % (ze $16,8 \pm 5,4$ % na $45,6 \pm 8,12$ %) a nejvyšší nárůst byl u **E2** 67,2 % (z $13,54 \pm 2,8$ % na $38,94 \pm 9,22$ %). U všech skupin tento nárůst dosahoval velmi vysoké pravděpodobnosti ($P < 0,001$). Podobně tomu bylo i u subpopulace $CD8^+$ kde nejnižší nárůst hodnot opětovně dosáhla kontrolní skupina, ale došlo k prohození pořadí pokusných skupin. U skupiny **C** byl zjištěn nárůst o 57 % (z $10,5 \pm 5,21$ % na $24,44 \pm 6,03$ %), následovala **E2** 68,8 % (ze $6,16 \pm 2,97$ % na $19,72 \pm 4,3$ %) a nejvyšší nárůst byl u **E1** 70,9 % (ze $7,08 \pm 3,45$ % na $24,3 \pm 6,35$ %). Statistická významnost byla opět na velmi vysoké hladině pravděpodobnosti ($P < 0,001$). Pouze u skupiny E1 (dotovaná seleničitanem sodným) byla zjištěna jediná výjimka a to mezi obdobím 0-50 dnů gravidity a 30. dnem po porodu kdy statistická významnost mezi soubory dosáhla nižší, ale přesto vysoké pravděpodobnosti ($P < 0,01$).

Podle Entrican *et al.* (2002) je vývoj plodu v mateřském organismu provázen vyšší zátěží imunitního systému spočívající v nastolení imunotolerance matky vůči antigenům plodu. Na základě histologických vyšetření Nasar *et al.* (2002) lze předpokládat, že se nástup imunotolerance březí matky soustřeďuje převážně na tkáň dělohy, a zastoupení jednotlivých populací lymfocytů v periferní krvi není ovlivněno. Podle Tizard (2004) dochází k nárůstu subpopulací $CD4^+$ a $CD8^+$ při zvýšení antigenního tlaku, což odpovídá vyššímu riziku infekce v období puerperia vyžadujícího posílení imunitního systému matky. V této situaci se současně zvýšil i celkový počet lymfocytů zahrnující i neutrofilní

granulocyty, které se podílejí na procesech nespecifické imunity. Výraznější nárůst $CD4^+$ po porodu uvádí též Raiterová *et al.* (2004) u myši infikovaných *Toxocara canis*.

Nejrychlejší normalizace extrémních hodnot $CD4^+$ a $CD8^+$ subpopulací byla zaznamenána u skupiny E2, která byla dotována organickým selenem a vykazovala osmdesátiprocentní výskyt dvojčat (u ostatních skupin nebyl zjištěn ani jediný případ narozených dvojčat). V období po porodu byla u této skupiny zjištěna nejnížší variabilita hodnot a to u obou analyzovaných subpopulací. Pokles v zastoupení $CD4^+$ mezi 30. a 60. dnem laktace byl statisticky významný ($P < 0,05$) pouze u skupiny E2. Tento pokles dosáhl hodnoty 39 % (z $38,94 \pm 9,22$ % na $24,0 \pm 3,13$ %), a znamenal přiblížení průměru skupiny těsně nad horní hranici fyziologické normy (4-22 %). Ostatní skupiny si stále udržovaly hodnoty nad horní hranicí normy: C ($30,82 \pm 6,38$ %) a E1 ($36,8 \pm 7,57$ %).

Graf 6 Poměr $CD4^+/CD8^+$ subpopulací T lymfocytů v krvi ovcí u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,05$

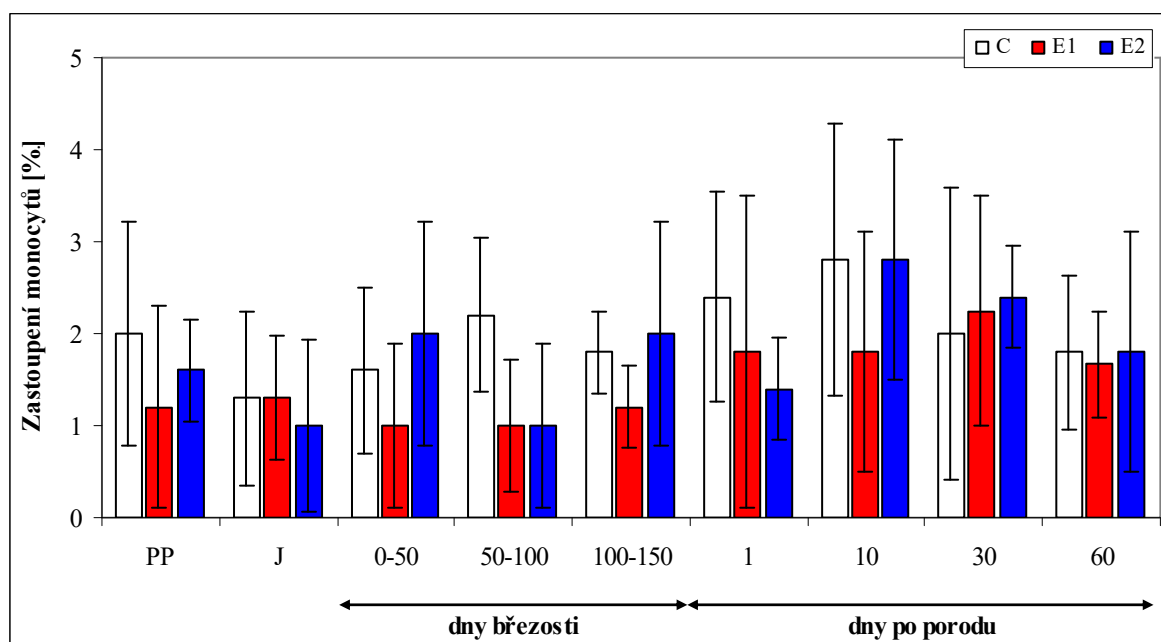
Poměr $CD4^+/CD8^+$ (graf 6) dosahoval u všech skupin v průměru v období před porodem 1,5 a v období po porodu 1,8 – 2,1, což vylučuje poruchu specifické buněčně zprostředkované imunity. Toto vyplývá z prací Yuben *et al.* (2000), Samin *et al.* (2006), Samri *et al.* (2007), Yakoub-Agha *et al.* (2007). Všichni zmínění autoři považují za optimální poměr $CD4/8$ hodnoty vyšší než 1,0. Pokud je tato hodnota nižší jedná se o imunodeficientní stav např. jedinci infikovaní virem lidské imunodeficiency (*human*

immunodeficiency virus – HIV) vykazují tendenci k poklesu poměru pod tuto hodnotu. Důvodem tohoto snížení je fakt, že HIV infikuje převážně subpopulaci CD4⁺, makrofágy a buňky CNS (Bartůňková *et al.* 2007). Jediný případ statistické významnosti byl zaznamenán u skupiny E1 v období mezi 0-50 a 100-150 dnem březosti. Z důvodů vysoké variability uvnitř souboru tomuto jevu nepřikládáme hlubší fyziologický význam.

5.2.1.5 Zastoupení monocytů v krvi

Zastoupení **monocytů** v leukogramu znázorňuje **graf 7**. Fyziologická norma zastoupení tohoto typu bílých krvinek, které jsou významnou součástí fagocytární aktivity organismu, je dle Jelínka *et al.* (2003) od 1 do 4 % a dle Reece (1998) do 5 %. Z uvedených norem je zřejmé, že procentické zastoupení monocytů se udržovalo po celou dobu pokusu v rámci fyziologických hodnot a to u všech skupin. Nejvyšší souhrnné průměrné hodnoty zastoupení monocytů dosáhla skupina **C** ($1,92 \pm 1,08$ %), následovala skupina **E2** ($1,7 \pm 1,09$ %) a nejnižších hodnot dosáhla skupina **E1** ($1,43 \pm 1,06$ %).

Graf 7 Zastoupení monocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



Hodnoty uvnitř skupin C a E2 se vyznačovaly nesourodým kolísáním, ale přesto byla průměrná hodnota za celé období před porodem nižší než souborná hodnota po porodu.

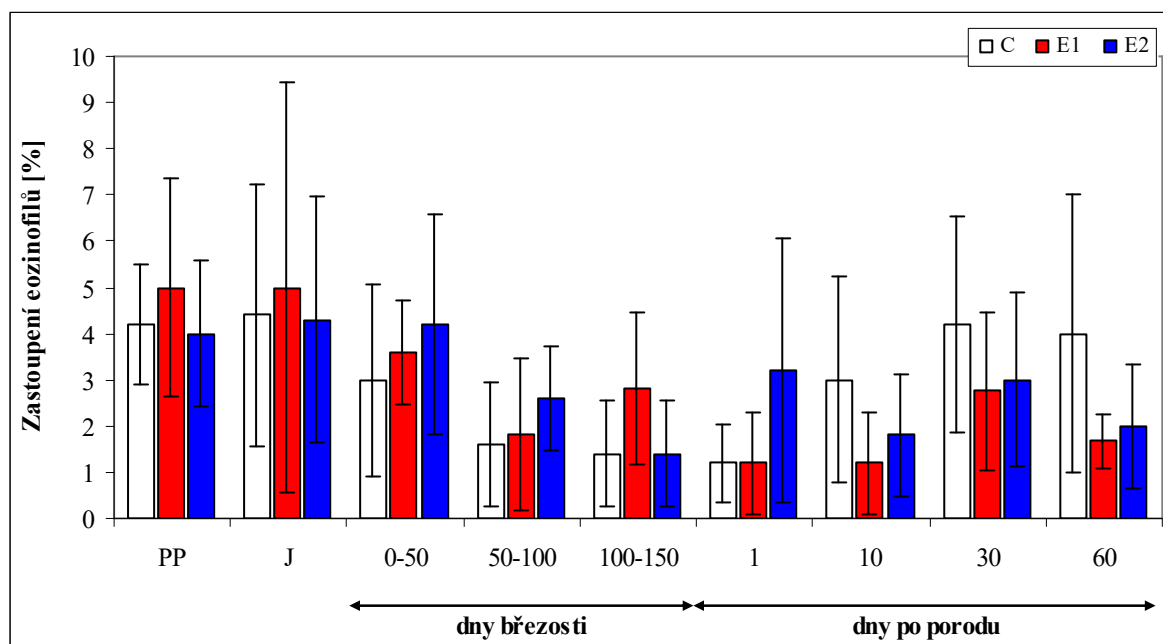
Největší nárůst byl zaznamenán u obou skupin 10. den po porodu. Po přepočtu na absolutní čísla byl tento nárůst u skupiny C 47,4 % (z $0,10 \times 10^9.l^{-1}$ na $0,19 \times 10^9.l^{-1}$) a E2 42,1 % (z $0,11 \times 10^9.l^{-1}$ na $0,19 \times 10^9.l^{-1}$). Pře porodem si skupina E1 udržovala velmi stabilní hodnoty, které po porodu mírně narůstaly a dosáhly maxima 30. den. Absolutní hodnoty dosáhly maxima stejně jako u obou předchozích skupin 10. den po porodu. Nárůst hodnot (skupina E1) byl nejstrmější a dosáhl 58,2 % (z $0,07 \times 10^9.l^{-1}$ na $0,17 \times 10^9.l^{-1}$). Veškeré pohyby v rámci skupin nebyly statisticky významné z důvodu vysoké variability hodnot. Ze stejného důvodu nebyly zjištěny významné rozdíly ani mezi skupinami. Tato zjištění jsou v souladu s tvrzením Procházkové *et al.* (1986) a Saker *et al.* (1998), že zastoupení monocytů (nikoli jejich fagocytární aktivita, která nebyla stanovována) v periferní krvi je velkou měrou ovlivňováno individualitou pokusných jedinců. Výše popsaný nárůst mohl být způsoben vyšším patogenním tlakem, který je spojen s porodem. Dále lze vyloučit chronické záněty u pokusných zvířat (Reece 1998), protože po tomto nárůstu následoval rychlý pokles na hodnoty zjišťované v období před porodem.

5.2.1.6 Zastoupení eozinofilních granulocytů v krvi

Fyziologické hodnota zastoupení **eozinofilních granulocytů (graf 8)** uvádí Jelínek *et al.* (2003) v rozmezí od 1 do 6 % a dle Reece (1998) od 2 do 5 %. Průměrné hodnoty jednotlivých skupin se nacházely v rámci norem, které překračovaly pouze extrémní hodnoty některých jedinců. Kontrolní odběr před zahájením pokusu neodhalil významné rozdíly. Průměrné hodnoty za celou dobu sledování byly u všech skupin shodné.

Nejvyšší hodnoty byly zjištěny v období před zahájením pokusu (PP) a u jalových (J) zvířat (C $0,34 \times 10^9.l^{-1}$, E1 $0,40 \times 10^9.l^{-1}$ a E2 $0,37 \times 10^9.l^{-1}$). Vysoká úroveň zastoupení eozinofilů mohlo být způsobeno vyšším alergením tlakem na organismus, jelikož se jednalo o období pozdně letní a podzimní. Toto tvrzení podporují informace uvedené v publikacích Reece (1998) a Fekete *et Kellems* (2007). Z provedených rozborů výkalů můžeme předem vyloučit jako důvod zvýšení eozinofilů možnou invazi endoparazity. Možnost zvýšení v důsledku alergenického tlaku podporuje opětovný nárůst hodnot po zimním období ve stadiu 1. dne u skupiny E2 a 30. dne gravidity u zbylých skupin (u skupiny C z 0,08 na $0,31 \times 10^9.l^{-1}$, E1 z 0,16 na $0,21 \times 10^9.l^{-1}$ a E2 z 0,08 na $0,31 \times 10^9.l^{-1}$) kdy pokus probíhal v časně jarním období.

Graf 8 Zastoupení eozinofilních granulocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)

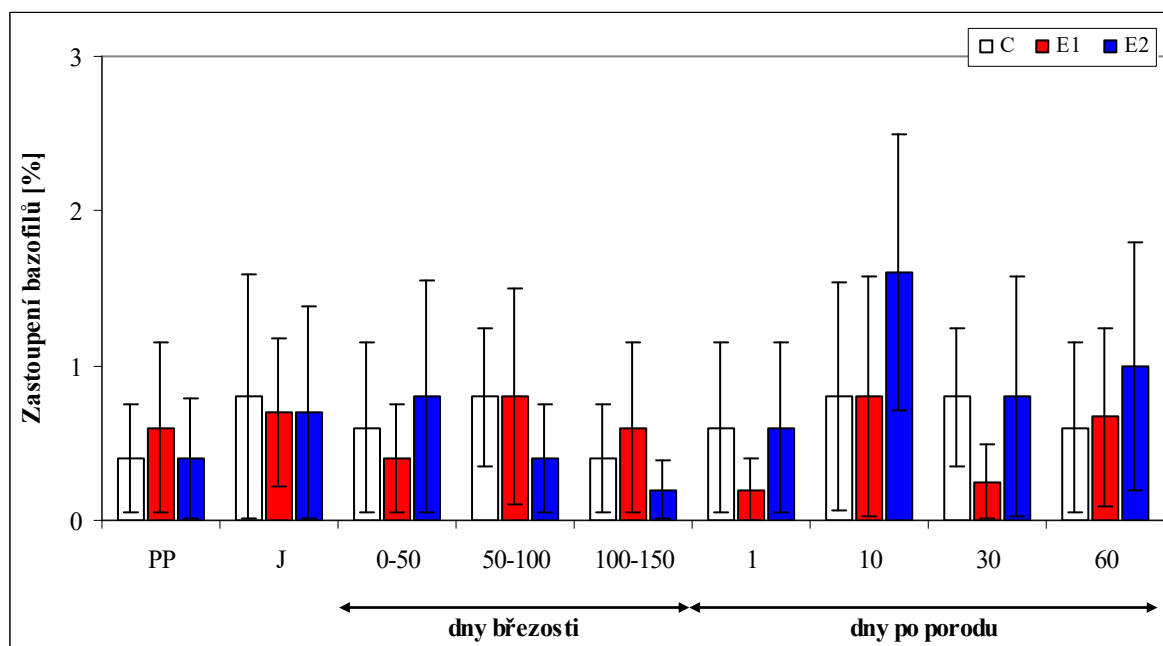


5.2.1.7 Zastoupení bazofilních granulocytů v krvi

Hodnoty **bazofilních granulocytů** jsou uvedeny v **grafu 9**. Rozmezí fyziologické normy udává Jelínek *et al.* (2003) od 0 do 3 % a Reece (1998) od 0 do 1 %. Souhrnné hodnoty za celou dobu pozorování se nalézají v rámci normy a nejsou zde žádné významné rozdíly mezi skupinami. Všechny průměrné hodnoty uvedené v grafu 9 se nachází v uvnitř normy dle Jelínka a kolektivu. Podle druhé normy dle Reece se průměrná hodnota skupiny E2 (10. den po porodu) nachází nad horní hranicí normy.

Dynamika hodnot je obdobná jako bylo výše uvedeno u eozinofilních granulocytů. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány na začátku (u jalových zvířat) a ke konci experimentu (u skupiny E2 1. den a u ostatních svorně 30. den po porodu). Je patrné, že nárůst hodnot bazofilů odpovídá nárůstu hodnot eozinofilů. Tento fakt zmiňuje ve své knize Reece (1998) a Trojan *et al.* (2003) oba poukazují na úzkou „spolupráci“ těchto dvou typů leukocytů. Jejich spolupráce spočívá v tom, že eozinofily (granula obsahují např. histaminázu) tlumí alergickou reakci zatímco bazofily (granula obsahují např. histamin, bradykinin, serotonin) tuto reakci podporují.

Graf 9 Zastoupení bazofilních granulocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)

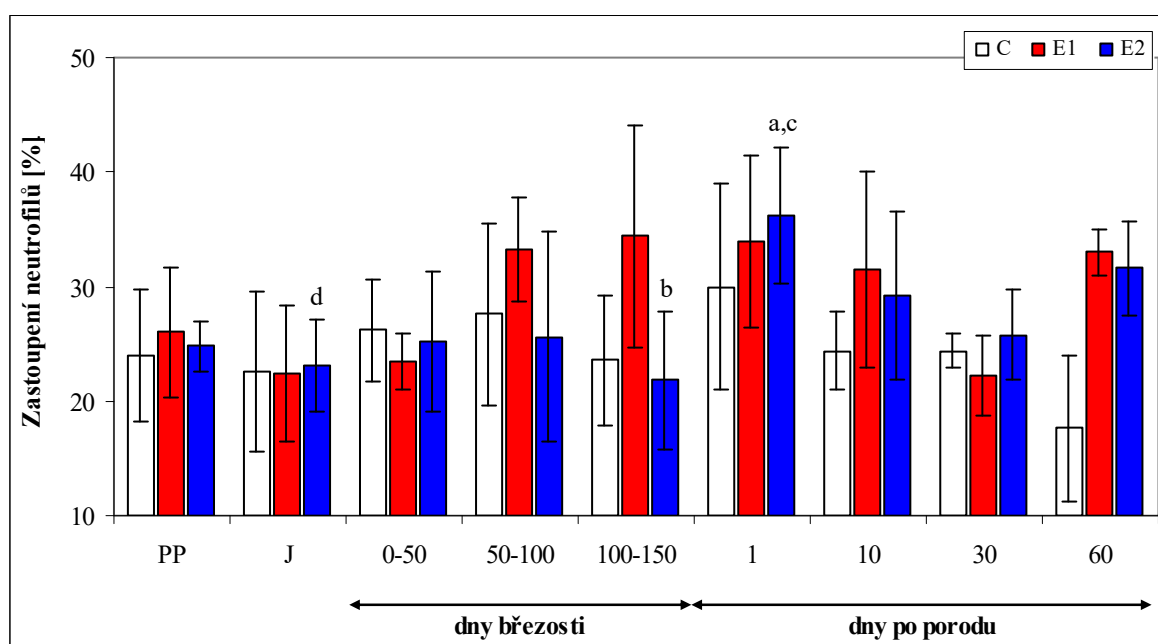


5.2.1.8 Zastoupení neutrofilních granulocytů v krvi a jejich fagocytární aktivita

Procentický podíl **neutrofilních granulocytů** je znázorněn v **grafu 10** a absolutní podíl z celkového počtu leukocytů je uvedeno v **tabulce 14**. Jelínek *et al.* (2003) udává rozmezí fyziologické normy od 20 do 50 %. Reece (1998) udává kritičtější rozmezí fyziologických hodnot od 25 do 30 %. Dle Jelínka *et al.* (2003) se většina uvedených hodnot nalézá ve fyziologickém rozmezí. Relativní zastoupení hodnot naměřených kolem období porodu se dle Reece (1998) nalézá nad horní hranici normy. Výjimku tvoří v samém závěru pokusu skupina C, kdy hodnota dosáhla 17,6 %. Pokles byl zapříčiněn jedincem, u kterého byla naměřena hodnota pod 10 % a tím ovlivnil průměr celé skupiny. Důvod takto nízké hodnoty se nepodařil vysvětlit. Nejvyšší průměrné hodnoty dosáhla skupina **E1** ($28,17 \pm 7,68$ %), následovala skupina **E2** ($26,64 \pm 6,64$ %) a nejnižších hodnot dosáhla skupina **C** ($24,3 \pm 6,5$ %). Absolutní počet neutrofilů za celou dobu pozorování byl ve stejném pořadí jako u relativního zastoupení. Před začátkem pokusu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Ty nebyly zaznamenány ani mezi jednotlivými skupinami v celém průběhu experimentu. Arthur *et al.* (2003) uvádí dopad selenu nikoli přímo na počet neutrofilů, ale na zvýšení jejich aktivity a efektivnosti funkcí.

V období před porodem si skupina C a E2 udržovala velmi stabilní úroveň hodnot s výkyvy cca do 10 %. U skupiny E1 byl zjištěn po období 0-50 dne březosti statisticky nevýznamný, ale přesto patrný nárůst relativních hodnot. Tato zjištění jsou v souladu s údaji z pokusu provedeného na negravidních a gravidních ženách, kde nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami (Ivanová-Toldorová *et al.* 2007).

Graf 10 Zastoupení neutrofilních granulocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,01$; c:d $P < 0,05$

U všech skupin zahrnutých v pokusu, s výjimkou E1, byl objeven po porodu významný nárůst hodnot. Pokud se podíváme na absolutní počty neutrofilů v tabulce 14, tak nalezneme patrný nárůst hodnot i u skupiny E1. Pokud vyjádříme nárůsty hodnot absolutních čísel procenticky, tak nejvyšší nárůst byl nalezen u skupiny E2 a to 66 %, následovala skupina C se 44,7 % a poslední byla skupina E1 se 40 %. Přestože se jednalo o podstatné zvýšení hodnot, tak jediné statisticky průkazné rozdíly byly zaznamenány u skupiny E2 a to mezi 0-50 dnem březosti 1. dnem po porodu ($P < 0,05$), dále mezi 50-100 dnem březosti 1. dnem po porodu ($P < 0,01$). Jak je patrné z tabulky 14, tak u absolutního počtu neutrofilů byl zjištěn významný rozdíl pouze mezi 50-100 dnem březosti 1. dnem po porodu ($P < 0,01$). Stav zjištěný u skupiny E2 by mohla podpořit práce Turner *et Finch* (1991), ve které jistili nárůst polymorfonukeárních lymfocytů v období kolem porodu. Avšak nejednalo se o statisticky průkazný rozdíl. A proto se spíše potvrzuje fakt uváděný

Arthur *et al.* (2003), že efekt selenu netkví ve zmnožení neutrofilů, ale v jejich lepších funkcích (např. uvádí vyšší intenzitu tvorby peroxidových radikálů a potažmo vyšší baktericidní efekt). Nárůst počtu neutrofilů mohl být způsoben mobilizací imunitního systému (zahrnujících nescifické mechanismy) z důvodu blížícího se porodu a tím i očekávaným vyšším patogenním tlakem okolí (McKenzie *et al.* 2002, Doležel 2003). Předem vylučujeme možnost zánětlivého onemocnění jelikož se hodnoty pohybovaly v rámci fyziologické normy.

Tabulka 14 Porovnání relativního zastoupení [%] a absolutního počtu neutrofilních granulocytů [$10^9.l^{-1}$] v krvi ovcí u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)

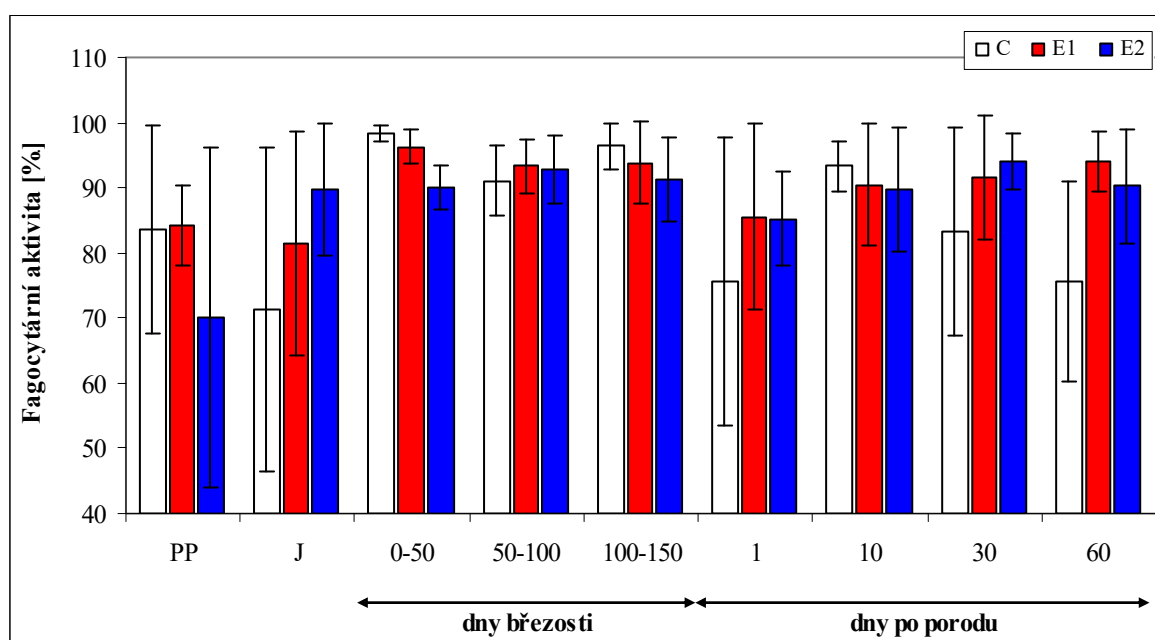
Skupina	Parametr	PP	J	Dny před porodem			Dny po porodu				Celkem
				0-50	50-100	100-150	1	10	30	60	
C	¹ Leu [$10^9.l^{-1}$]	8,04	7,37	5,72	6,04	5,68	8,08	7,14	7,28	6,06	6,88
	² Neu [%]	24,00	22,60	26,20	27,60	23,60	30,00	24,40	24,40	17,60	24,30
	Neu [$10^9.l^{-1}$]	1,93	1,67	1,50	1,67	1,34	2,42	1,74	1,78	1,07	1,67
E1	¹ Leu [$10^9.l^{-1}$]	7,96	6,28	5,96	5,62	5,74	9,72	6,38	6,83	7,27	6,78
	² Neu [%]	26,00	22,40	23,40	33,20	34,40	34,00	31,40	22,25	33,00	28,17
	Neu [$10^9.l^{-1}$]	2,07	1,41	1,39	1,87	1,97	3,30	2,00	1,52	2,40	1,91
E2	¹ Leu [$10^9.l^{-1}$]	9,14	7,05	5,78	5,00	5,48	9,68	6,68	8,10	6,70	7,07
	² Neu [%]	24,80	23,10^d	25,20	25,60	21,80^b	36,20^{a,c}	29,20	25,80	31,60	26,64
	Neu [$10^9.l^{-1}$]	2,27	1,63	1,46	1,28	1,19^b	3,50^a	1,95	2,09	2,12	1,88

a:b $P < 0,01$; c:d $P < 0,05$; ¹Leu – leukocyty; ²Neu – neutrofilní granulocyty

Směrné hodnoty **fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů - FA (graf 11)** jsou dle mnohých autorů udávána v různém rozmezí (Sova *et al.* 1990, Bock 1994, Reece 1998, Jelínek *et al.* 2003, Bartůňková *et al.* 2005, Fekete *et al.* 2007). Nejvíce autorů se shoduje na dolní mezi hodnot, která má být vyšší než 80 %. Nejvyšších průměrných hodnot fagocytární aktivity dosáhla skupina E1 ($88,93 \pm 12,49$), těsně následována skupinou E2 ($88,3 \pm 12,34$) a poslední v pořadí byla skupina kontrolní C ($84,01 \pm 18,88$). Všechny průměrné hodnoty se nevymykají fyziologické normě a je v nich zahrnut i odběr před pokusem. Jak je patrné z kontrolního odběru (PP) nejnižší statisticky nevýznamná FA neutrofilů byla zjištěna u skupiny E2, u které byla tato průměrná hodnota ovlivněna jedincem s velmi nízkou hodnotou FA na úrovni kolem 40 %. Proto byl proveden u tohoto zvířete těsně před začátkem pokusu další odběr, který prokázal normalizaci hodnot FA. Mezi souhrnnými hodnotami FA (průměr za celou dobu pozorování) nebyly zjištěny

statisticky významné rozdíly. Mezi skupinami C a E2 byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi rozptyly $P < 0,05$. Tento rozdíl do jisté míry dokumentuje stabilizační úlohu, kterou ve své práci přiřazuje selenu Beck (1999). Dále toto zjištění podporuje publikace Arthur *et al.* (2003), který popisuje vyšší intenzitu funkcí fagocytů u selenem dotovaných jedinců.

Graf 11 Fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů v krvi ovcí [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



Z grafu 11 vyplývá, že po celou dobu pokusu nebyly mezi skupinami zjištěny statisticky významné rozdíly hodnot FA. Dále je patrné, že nejstabilnějších hodnot FA po celou dobu pokusu vykazovala skupina E2. Velmi stabilní úroveň dosahovala také druhá za pokusných skupin (E1), u které byl zjištěn nepatrný rozdíl hodnot FA mezi obdobími před porodem a po porodu. Nesourodé kolísání bez významných tendencí u skupiny kontrolní (C) bylo navíc podtrženo velkými výkyvy hodnot ($s_x = 18,88$) jedinců uvnitř skupiny. I když nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami, přesto zde jsou patrné rozdíly ve stabilitě hodnot a to jak na úrovni skupin tak jedinců. Obě pokusné skupiny si udržovaly velmi stabilní úroveň FA, která nebyla narušována vysokou variabilitou uvnitř skupiny (jako u skupiny C). Dá se tedy tvrdit, že zjištěné údaje jsou ve shodě s četnými pracemi udávajícími pozitivní efekt suplementace selenu na imunitní parametry, v tomto případě na fagocytární aktivitu neutrofilních granulocytů (Urban *et*

Janstrand 1986, Paulík *et al.* 1998, Erickson *et al.* 2000, Arthur *et al.* 2003, Fekete *et Kollens* 2007).

5.2.2 Doplňkové parametry

5.2.2.1 Baktericidní aktivita krve

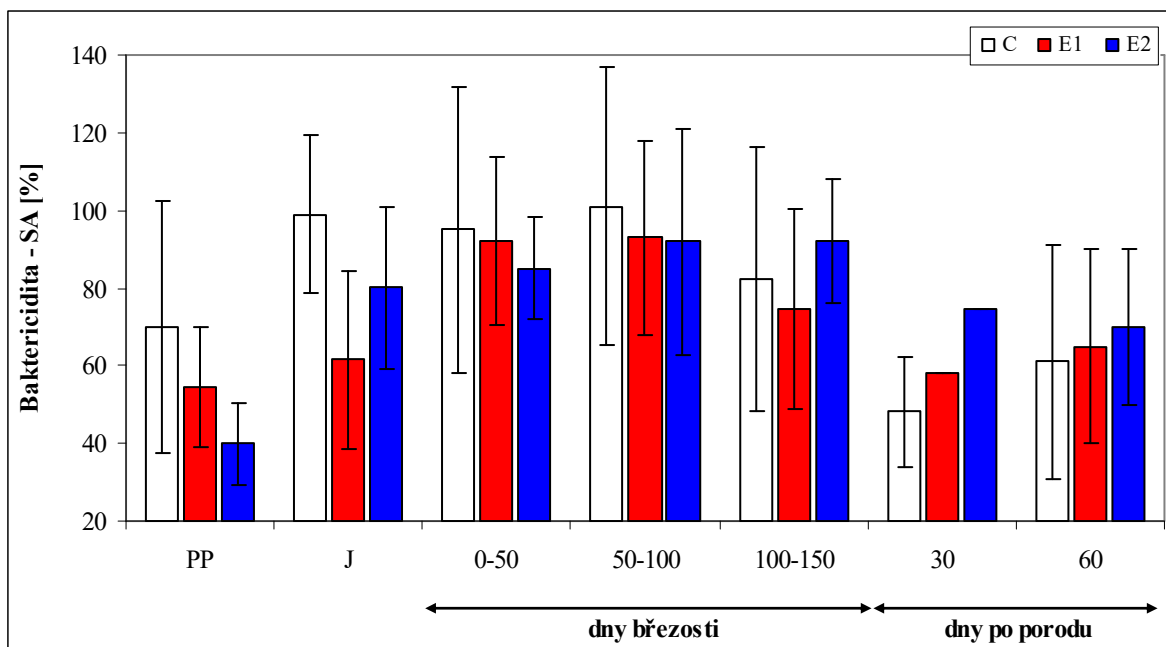
Baktericidní aktivita krve je zahrnuta v této podkapitole z důvodu vyplývajícího z hlavního zaměření disertační práce což je efekt selenu na leukocyty a ne na plnou krev. Avšak tato baktericidita krve je významnou měrou zprostředkována leukocyty v krvi. Z tohoto důvodu byl tento ukazatel zařazen alespoň jako doplňující údaj a nebude s ním operováno při formulování závěrů disertační práce.

Baktericidní aktivita krve byla sledována na dvou rozličných médiích. Prvním médiem byl krevní agar, na který byla vyočkována krev spolu se *Staphylococcus aureus* – SA (**graf 12**). Druhým médiem byl Sabouradův agar (s přidavkem gentamicinu) kam byla očkovaná krev s *Candida albicans* – CA (**graf 13**). Získané hodnoty jsou uvedeny v procentech kolonií v čase 3 ku času 0 (bráno za 100 %). Jako fyziologické hodnoty udává Procházková *et al.* (1987), 0-60 % přežívajících kolonií *Escherichia coli*. Podobné rozmezí udává ve své práci Gyetvai *et al.* (2007) pro *Candida albicans* a pro *Staphylococcus aureus* Borish *et Rocklin* (1987) a Rodrigez *et al.* (1996).

V našem případě se jako spolehlivější zdá být baktericidní test s použitím CA (graf 13), kde bylo zjištěno hlavně v druhé polovině pokusu vyrovnanějších hodnot, které dosáhly nebo se blížily fyziologickému rozmezí. Baktericidita vůči SA (graf 12) po většinu doby pokusu vykazovala nesourodé kolísání hodnot bez výrazných tendencí. Avšak i zde je patrné statisticky nevýznamné snížení hodnot směrem k fyziologické normě. Při porovnání sumarizovaných hodnot obou testů nejsou mezi nimi velké rozdíly: C (SA 79,48 ± 30,14 % a CA 72,92 ± 30,46 %), E1 (SA 71,26 ± 19,45 % a CA 84,13 ± 23,56 %) a E2 (SA 77,32 ± 14,65 % a CA 76,73 ± 25,54 %). Jak je patrné z výše uvedených norem všechny skupiny se po celou dobu pokusu nacházely nad horní hranicí normy. V individuální dynamice v rámci skupin nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Ty nebyly zjištěny v průběhu pokusu ani mezi jednotlivými skupinami. Důvodem tohoto stavu byla vysoká variabilita hodnot baktericidity uvnitř skupin. Dále je patrné, že nejvyšší

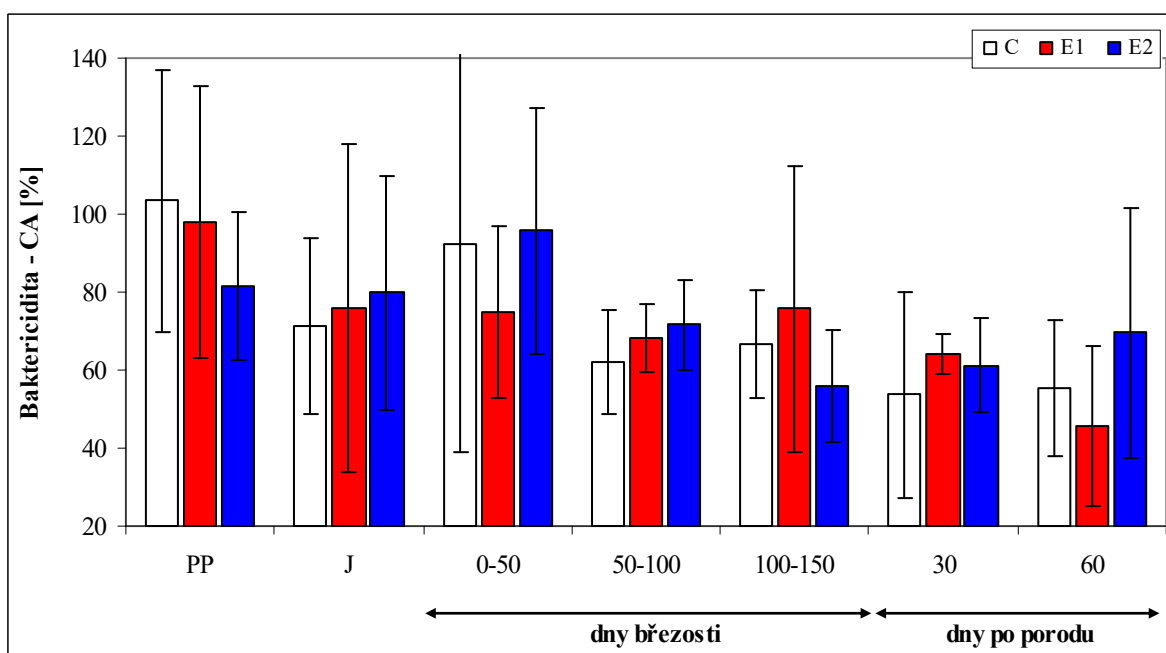
variability (v obou případech) dosahovala stejně jako u fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů skupina C.

Graf 12 Baktericidní aktivita krve ovcí [%] vůči *Staphylococcus aureus* u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



c:d $P < 0,01$; a:b $P < 0,05$

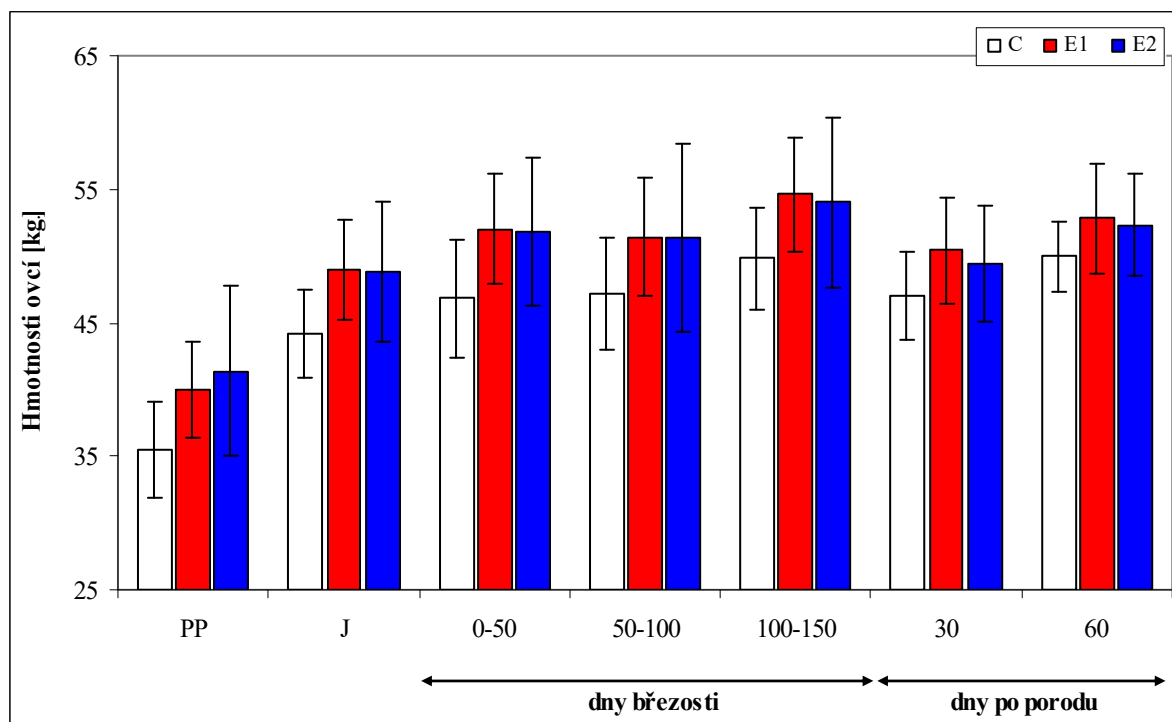
Graf 13 Baktericidní aktivita krve ovcí [%] vůči *Candida albicans* u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



5.2.2.2 Hmotnost ovcí

Hmotnost ovcí je znázorněna v **grafu 14**. Tento ukazatel je zahrnut do této práce z důvodu prokázání podobnosti hmotnosti u jednotlivých skupin v průběhu pokusu, a tedy vyloučení statisticky významných rozdílů mezi skupinami v růstu ovcí. Nejvyšší průměrná hmotnost byla zjištěna u skupiny E1 ($50,0 \pm 0,27$ kg), dále u E2 ($49,9 \pm 1,08$ kg) a nakonec u C ($45,8 \pm 0,56$ kg). Mezi uvedenými hodnotami nebyl statisticky průkazný rozdíl.

Graf 14 Hmotnosti ovcí [kg] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



Kontrolní zjišťování hmotnosti před samotným zahájením pokusu neprokázalo statistickou diferenci mezi skupinami. Průměrná hmotnost byla nejvyšší u skupiny E2 (41,4 kg), těsně následovala E1 (40,0 kg) a nejnižší hmotnost byla zjištěna u skupiny C (35,5 kg). Nejvyšší rozdíl byl mezi skupinami C a E2 a dosahoval úrovně 5,9 kg. Tento stav se zmenšil již při dalším vážení pokusných zvířat kdy byl nejvyšší rozdíl hmotností zaznamenán mezi skupinami C a E1 (4,8 kg). Žádný z uvedených rozdílů nebyl průkazný. Na konci pokusu byl největší rozdíl v hmotnostech 2,8 kg a to opět mezi skupinami C a E1. Je tedy patrné, že v průběhu pokusu docházelo k soustavnému vyrovnávání hmotností jednotlivých skupin. Nepodařilo se potvrdit předpoklad z literatury, že zvířata suplementovaná selenem mají rychlejší růst (Underwood *et* Suttle 1999).

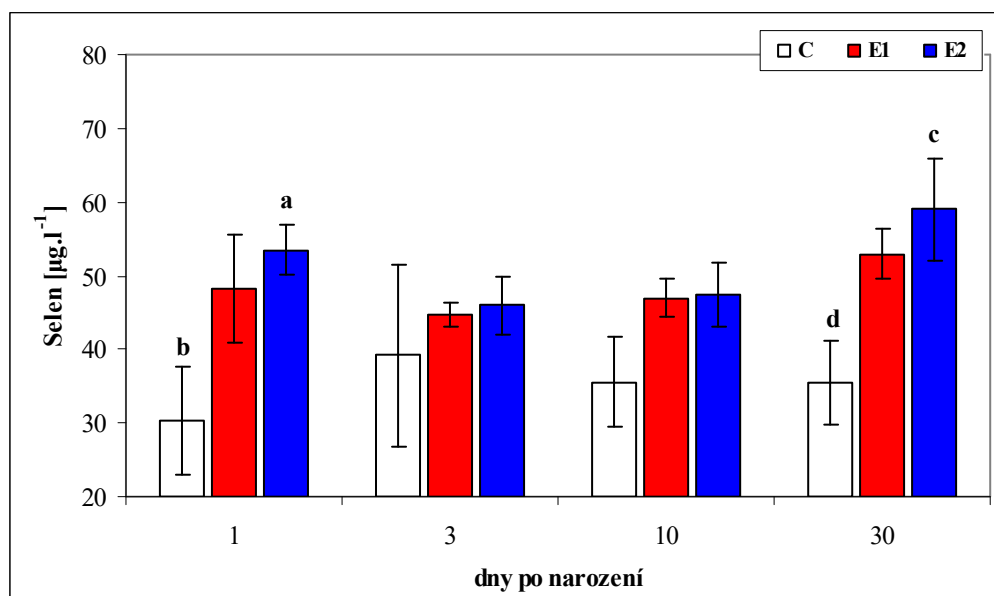
5.3 JEHNATA

5.3.1 Základní parametry

5.3.1.1 Koncentrace selenu v krvi

Pozitivní efekt suplementace **selenu** bahnicím se projevil i v jeho vyšší koncentraci v krevním séru narozených jehňat (**graf 15**). Účinek selenu vázaného v biomase řasy *Chlorella* byl v tomto případě příznivější, než doplněk selenu v anorganické formě. Průměrný obsah selenu v séru jehňat bahnic skupiny E2 byl o 8,9 % vyšší než u jehňat skupiny E1 a o 47,8 % vyšší než u jehňat skupiny C. Zmíněný rozdíl nebyl statisticky průkazný mezi skupinami. Obsah selenu v séru v den narození byl u jehňat skupiny **E1** $48,2 \pm 7,3$, **E2** $53,5 \pm 3,4$ a **C** $30,3 \pm 7,4$ $\mu\text{g.l}^{-1}$ u skupiny **C** a ve 30 dnech věku: **E1** $52,9 \pm 3,4$, **E2** $59,0 \pm 7,0$ a **C** $35,5 \pm 5,8$ $\mu\text{g.l}^{-1}$. Statisticky průkazné rozdíly byly mezi skupinami C a E2 jak v den narození ($P < 0,05$) tak ve věku 30. dnů ($P < 0,01$).

Graf 15 Obsah selenu v krevním séru jehňat [$\mu\text{g.l}^{-1}$] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



c:d $P < 0,01$; a:b $P < 0,05$

Vliv suplementace selenu matkám na jeho obsah v krvi narozených mláďat prokázali rovněž Pavlata *et al.* (2003) u telat po injekčním ošetření jejich matek preparátem

s obsahem selenu a například i Abdelrahman *et al.* Kincaid (1995) po aplikaci selenového bolu do bachoru krav (matek). Vyšší hladiny selenu v krevním séru jehňat od narození až do 30. dne věku u skupin E1 a E2 lze vysvětlit vyšší úrovní transplacentárního přenosu selenu (van Saun *et al.* 1989, Pavlata *et al.* 2004) a pravděpodobně i vyšším výdejem selenu kolostrem a mlékem v závislosti na dietním příjmu selenu (Grace *et al.* 2001, Pavlata *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004, Nandakumaran *et al.* 2006). Rozdíly mezi pokusnými skupinami E1 a E2 lze dát do souvislosti s vyšší retencí selenu z organických forem v organizmu a vyšším vylučováním do mléka (Knowles *et al.* 1999) ve srovnání s anorganickým selenem. Rozdíly v obsahu Se v krevním séru a moči bahnic skupin E1 a E2 (Trávníček *et al.* 2007) v období gravidity a zejména laktace souvisí i s vyššími nároky na selen u bahnic skupiny E2 zajišťující výživu většího počtu plodů a následně i narozených jehňat (viz kapitola Materiál a metody – tabulka 9).

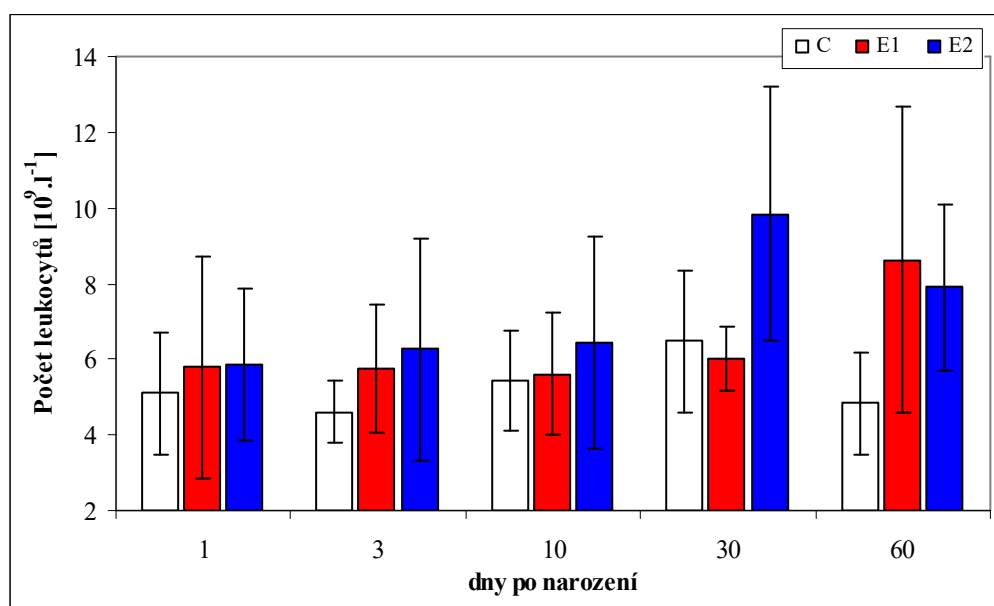
5.3.1.2 Počet leukocytů v krvi

Počty leukocytů jehňat ze skupiny C, E1 a E2 jsou uvedeny v **grafu 16**. Nejvyšší průměrné hodnoty počtu leukocytů byly zjištěny u obou pokusných skupin E2 ($6,99 \pm 2,9 \times 10^9 \cdot l^{-1}$) a E1 ($6,2 \pm 2,39 \times 10^9 \cdot l^{-1}$). Skupina kontrolní dosahovala nejnižších hodnot a to o 23,7 % než skupina E2 a o 13,9 % než skupina E1. Ani jeden uvedený rozdíl nenabyl, z důvodu vysokých variabilit uvnitř skupin, statistické průkaznosti.

Počty leukocytů se u kontrolní skupiny (C) pohybovaly s výjimkou 30. dne po narození pod spodní hranicí normy $6-10 \times 10^9 \cdot l^{-1}$ uváděnou Jelínkem *et al.* (2003). Dle Bock (1994) se hodnoty leukocytů skupiny C nacházely pod spodní hranicí normy 3. a 60. den po narození. U skupiny E1 se počty leukocytů nacházely pod spodní hranicí normy dle Jelínka *et al.* (2003) 1., 3. a 10. den po narození a dle Bock (1994) se po celou dobu pokusu nacházely nad touto hranicí. Skupina E2 se pod spodní hranicí normy dle Jelínka *et al.* (2003) nacházela pouze 1. den po narození a dle Ulrich (1994) se v průběhu sledování udržovala vysoko nad spodní hranicí normy. U skupiny C došlo mezi 1. a 3. dnem po narození k mírnému statisticky neprůkaznému poklesu. Také Batchelder *et al.* (2007) popisuje statisticky nevýznamné, ale patrné snížení počtu leukocytů od narození do padesáti hodin po narození. Dále je z grafu 16 patrná dynamika nárůstu obou skupin dotovaných selenem. U skupiny E1 tento nárůst (o 30,5 %) započal po 30. dnu a u skupiny

E2 dokonce už po 10. dnu narození (o 34,7 %). Knowles *et al.* (2000) uvádí ve své publikaci stav kdy po 27. dnu od narození mláďata dosahují fyziologických hodnot dospělců. Zmíněná dynamika nárůstu koresponduje se stavem u obou pokusných skupin a je v kontrastu se skupinou kontrolní kde k popisovanému nárůstu nedošlo. K tomuto rozdílu mohlo dojít v důsledku nedostatku selenu u skupiny C. Pozitivní efekt selenu na aktivitu leukocytů je popsán v publikaci McKenzie *et al.* (1998). Rozdíl hodnot mezi skupinou kontrolní a pokusnými podtrhuje výše zmíněný fakt, že v tomto období se průměr skupiny C nacházel pod spodní hranicí normy. V konečném důsledku ani tyto dva popsané stavy nestačily pro zjištění statisticky průkazných rozdílů. Největší měrou se na neprůkaznosti podílela vysoká variabilita hodnot uvnitř skupin.

Graf 16 Počet leukocytů v krvi jehňat [$10^9 \cdot l^{-1}$] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)

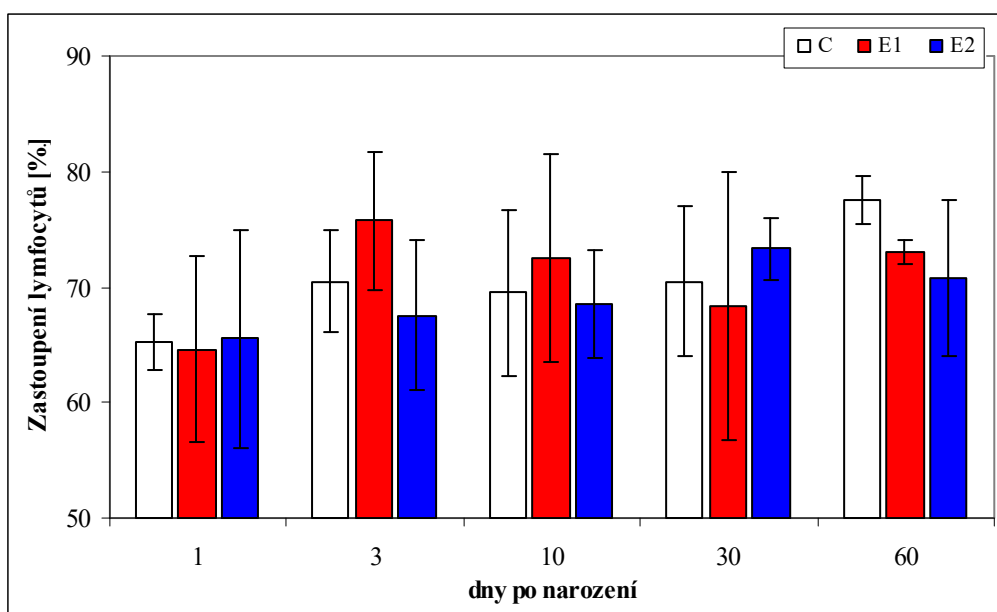


5.3.1.3 Zastoupení lymfocytů v krvi

Procentické zastoupení lymfocytů je uvedeno v grafu 17. Nebylo potřeba uvádět přepočty na absolutní čísla (jak tomu bylo u ovcí), protože dynamiky obou možností jsou totožné. Za celou dobu pozorování byl největší podíl lymfocytů v leukogramu zjištěn u skupiny E1 ($70,53 \pm 8,21$ %), následovala C ($69,89 \pm 5,77$ %) a nakonec E2 ($68,92 \pm 6,55$ %). Rozdíly jsou velmi malé a tudíž statisticky neprůkazné. Po většinu doby pokusu se hodnoty

pohybovaly při horní hranici fyziologické normy (50-75 %) udávanou Bock (1994). Ve dvou případech byla tato norma nepatrně překročena (E1 – 3. den a C – 60. den po narození).

Graf 17 Zastoupení lymfocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



Jak je patrné z grafu 17 nejvyšší výkyvy hodnot byly pozorovány u skupiny E1, která po celou dobu pokusu vykazovala nesourodé kolísání bez výrazných tendencí. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán mezi 1. a 3. dnem po narození (14,9 %). U skupiny C byl tento nárůst méně patrný (7,9 %) a nejméně se projevil u skupiny E2 (2,9). Tento nárůst mohl být způsoben lymfocyty přítomnými v mlezivu. Tizard (2004) uvádí obsah lymfocytů v kravském kolostru na úrovni $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ (polovinu tvoří T lymfocyty). Tyto lymfocyty mohou ve střevě přežívat více než 36 hodin, čemuž odpovídá pokles hodnot u skupiny E1 mezi 3. a 10. dnem po narození (4,3 %). Lymfocyty mohou prostupovat střevní stěnou přes epitel Payerových plaků až do mezenteriálních mizních uzlin. Williams (1993) zjistil výskyt značených leukocytů v krevním nátěru novorozenech selat pocházejících z mleziva již po dvou hodinách od podání.

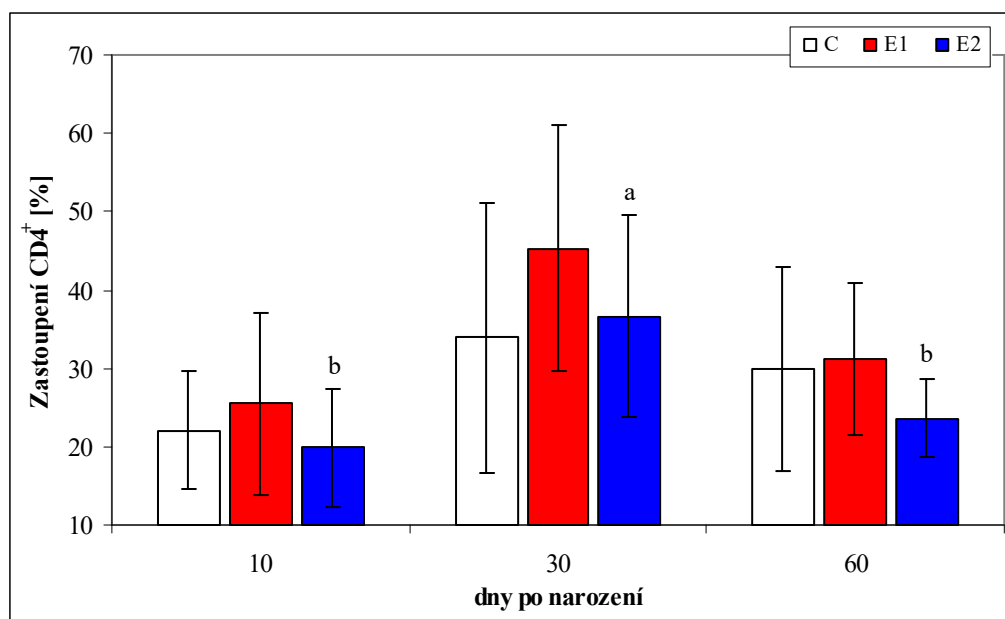
Další průběh dynamik odpovídá výsledkům uvedeným Batchelder *et al.* (2007), kdy po počátečním nárůstu hodnot došlo ke stabilizaci bez statisticky významných diferencí v rámci skupin. Mezi jednotlivými skupinami nebyly zjištěny významné rozdíly.

5.3.1.4 Zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ subpopulací T lymfocytů v krvi a jejich poměr

Normy pro **zastoupení CD4⁺ a CD8⁺** subpopulací T lymfocytů (**graf 18 a 19**) jsou v publikacích Thorp *et al.* (1991) a Smyth *et al.* (1994) uváděny v tomto rozmezí: CD4⁺ 8-22 %, CD8⁺ 4-22 % a jejich vzájemný poměr u narozených by měl dosahovat vyšších hodnot než u dospělých zvířat nad 2,0 (Tizard 2004). Stejně jako u ovcí tak i u jehňat je poměr nižší než 1,0 považován mnohými za projev patologického stavu v organismu (Samin *et al.* 2006, Samri *et al.* 2007, Yakoub-Agha *et al.* 2007).

Nejvyšší souhrnná hodnota zastoupení CD4⁺ byla zjištěna u skupiny E1 (32,45 ± 14,01 %). Skupina C měla tuto hodnotu o 12,7 % (28,34 ± 13,03 %) a skupina E2 o 19,9 % (25,7 ± 11,07 %) nižší než skupina E1. Zmíněné rozdíly mezi skupinami nebyly z důvodu vysoké variability hodnot v rámci skupin statisticky průkazné.

Graf 18 Zastoupení CD4⁺ subpopulace T lymfocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,05$

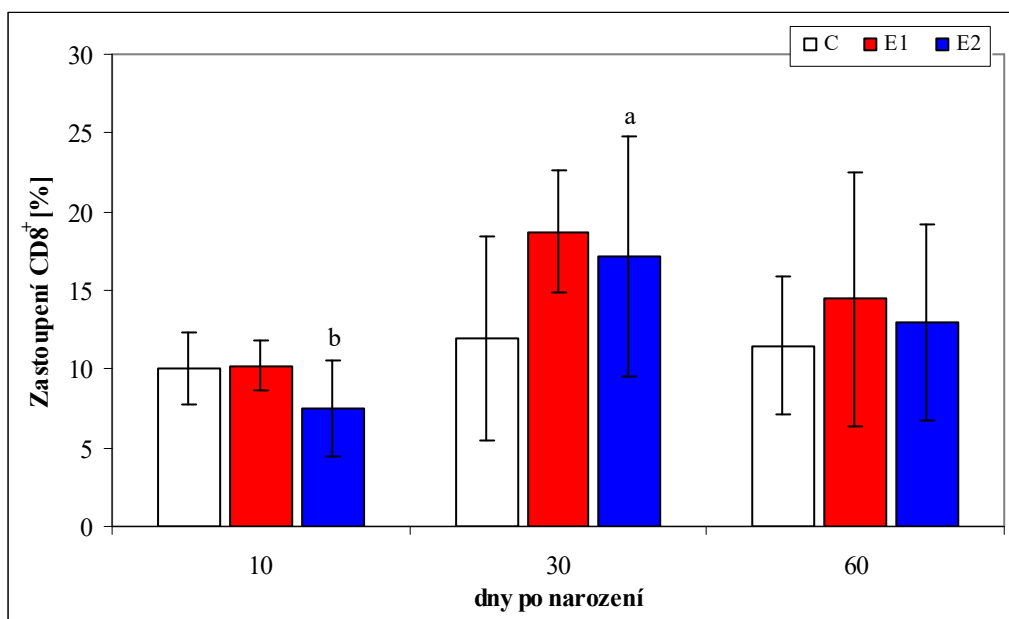
Z grafu 18 je patrný podobný průběh dynamik zastoupení CD4⁺ subpopulace. U všech skupin došlo mezi 10. a 30. dnem k nárůstu hodnot s následným poklesem mezi 30. a 60. dnem po narození. Tato dynamika vypadá po číselném vyjádření takto: u skupiny C došlo k nárůstu na 34,9 % a k poklesu o 11,8 %; u skupiny E1 byl zaznamenán nárůst o 43,9 % a pokles o 31,8 %; a u skupiny E2 byl zjištěn statisticky významný nárůst o 45,8 % ($P <$

0,05) i významný pokles hodnot o 35,7 % ($P < 0,05$). Jednotlivé hodnoty zastoupení $CD4^+$ se po celou dobu pokusu pohybovaly nad horní hranicí normy (skupina C a E1). Hodnoty u skupiny E1 dosáhly 30. den po narození dvojnásobku normy uváděnou Thorp *et al.* (1991). Skupina E2 se nad touto hranicí pohybovala 30. a pouze nepatrně i 60. den po narození. Nadlimitní hodnoty zjistila, s největším nárůstem po 20. dnu pokusu, ve své práci u myši Raiterová *et al.* (2004). Relevantní údaje o postpartálním vývoji subpopulací T lymfocytů u jehňat nejsou dostatečné. Uvádí se přechodné zvýšení jejich počtů po napojení mlezivem, protože je zde zastoupeno velké množství lymfocytů $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ z čehož je polovina tvořena T lymfocyty (Tizard 2004). V našem případě je pravděpodobnější příčina nárůstu $CD4^+$ vyšší antigenní tlak spojený s vývojem jedince po narození. I když se obě subpopulace objevují ve fetálním thymu již po 35. dnu gestace (Mackay *et al.* 1986), přesto jejich plná funkce nastává až jedenáct dnů po narození (Robinson *et al.* 2007). Po tomto období dochází při styku s antigenem k proliferaci specifických klonů stejným mechanismem jako u dospělců. Tímto procesem můžeme charakterizovat nárůst mezi 10. a 30. dnem po porodu.

Nejvyšších hodnot v zastoupení $CD8^+$ T lymfocytů dosáhla, stejně jako u předchozí subpopulace, skupina E1 ($13,68 \pm 5,57$ %), následovala skupina E2 s hodnotou o 13,7 % ($11,81 \pm 6,74$ %) a skupina C o 19,0 % ($11,09 \pm 4,32$ %). Ani zde nebyly zjištěné difference statisticky významné.

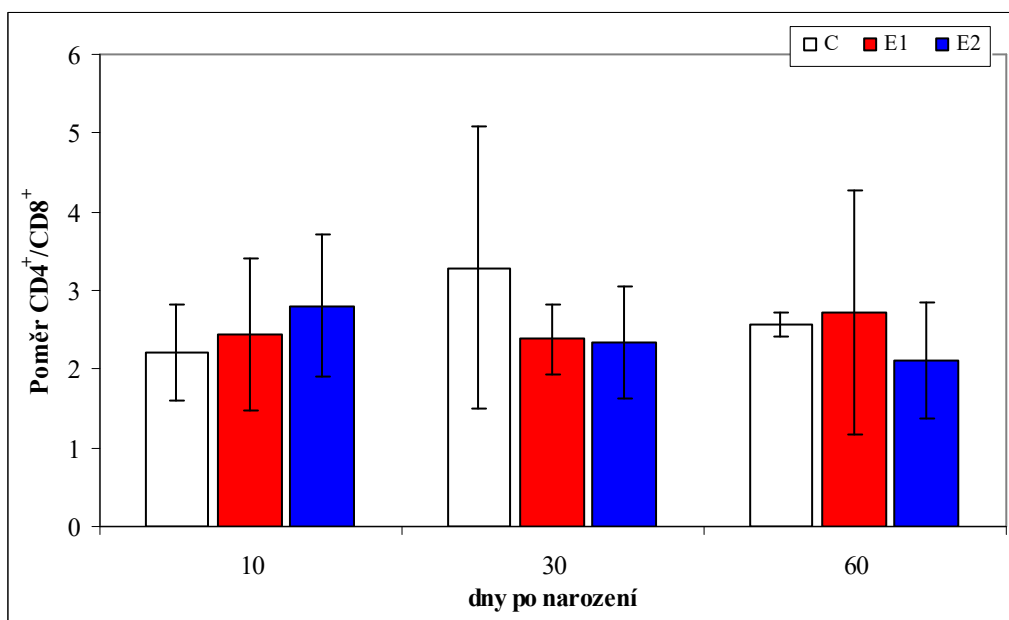
Dynamika zastoupení $CD8^+$ měla podobný průběh jako u předešlé subpopulace T lymfocytů ($CD4^+$). S tím rozdílem, že průměrné hodnoty se po celou dobu pokusu pohybovaly v rámci fyziologické normy udávanou Smyth *et al.* (1994). Nejvyšší a zároveň průkazný ($P < 0,05$) nárůst o 58,6 % byl zaznamenán u skupiny E2, která byly dotována organicky vázaným selenem na řasu rodu *Chlorella*. V pořadí druhý nejvyšší nárůst byl prokázán u skupiny E1 a to o 45,6 % a poslední v pořadí s nárůstem o 15,3 % je skupina kontrolní. Nejrychlejší pokles hodnot byl opět prokázán u skupiny E2 a to o 25 %. Průběh hodnot u této skupiny podporuje tvrzení Beck (1999) o stabilizačním působení selenu. Jak je patrné z výsledků zastoupení obou subpopulací tak statisticky významných rozdílů pouze a vždy dosahovala skupina E2. Důvod proč k této průkaznosti došlo právě u skupiny E2 může být v důsledku efektivnějšího vstřebávání organicky vázaného selenu, která je diskutována v mnohých publikacích (Koenig *et al.* 1997, Leng *et al.* 2003, Boldižarová *et al.* 2005). Avšak hodnoty skupiny E2 se statisticky významně nelišily od skupin C a E1.

Graf 19 Zastoupení $CD8^+$ subpopulace T lymfocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,05$

Graf 20 Poměr $CD4^+/CD8^+$ subpopulací T lymfocytů v krvi jehňat u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



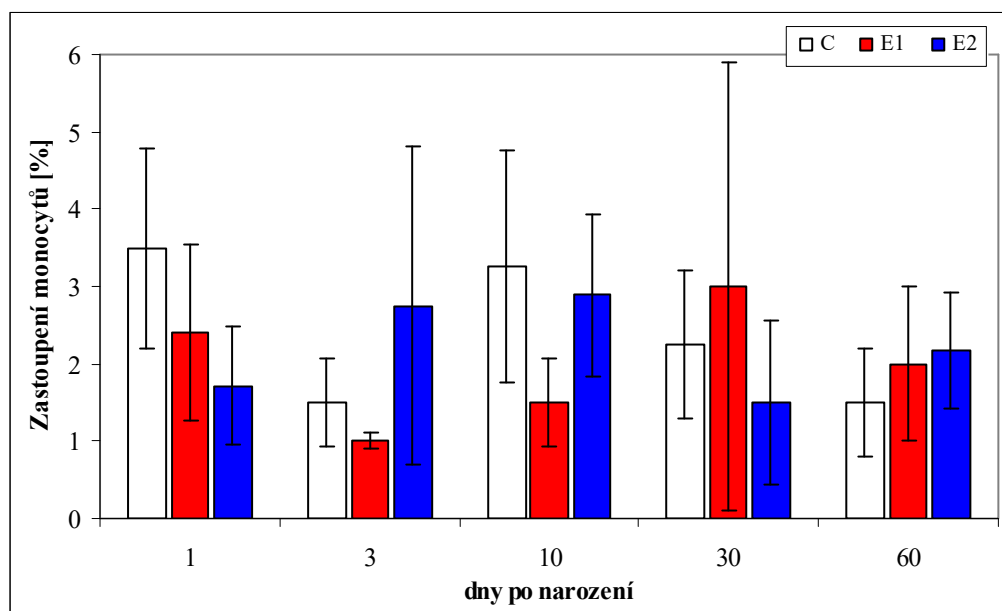
Poměr obou subpopulací $CD4^+/CD8^+$ (graf 20) dosahoval u všech skupin podobných hodnot v rozmezí od 2,0 do 3,2. Za fyziologický stav se považují hodnoty vyšší než 1,0

(Yuben *et al.* 2000, Samin *et al.* 2006, Samri *et al.* 2007, Yakoub-Agha *et al.* 2007), a proto můžeme vyloučit poruchu specifické buněčně zprostředkované imunity. Bylo zjištěno, že u jehňat hodnoty poměru nabývají vyšších hodnot než u ovcí (matek). Tento stav je v souladu s literárními údaji Tizard (2004).

5.3.1.5 Zastoupení monocytů v krvi

Procentické zastoupení **monocytů** v leukogramu je shrnuto v **grafu 21**. Hodnoty považované za fyziologickou normu uvádí Jelínek *et al.* (2003) v rozmezí od 1 do 4 % a Reece (1998) udává pouze horní hranici 5 %. Dle uvedených norem se průměry uvedené v grafu 21 po celou dobu nachází ve vytyčeném rozmezí. Nejvyšší souhrnné hodnoty zastoupení monocytů dosáhla (shodně jako u ovcí) skupina **C** ($2,5 \pm 1,29$ %), následovala skupina **E2** ($2,25 \pm 1,32$ %) a nejnižších hodnot dosáhla skupina **E1** ($1,95 \pm 1,54$ %).

Graf 21 Zastoupení monocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



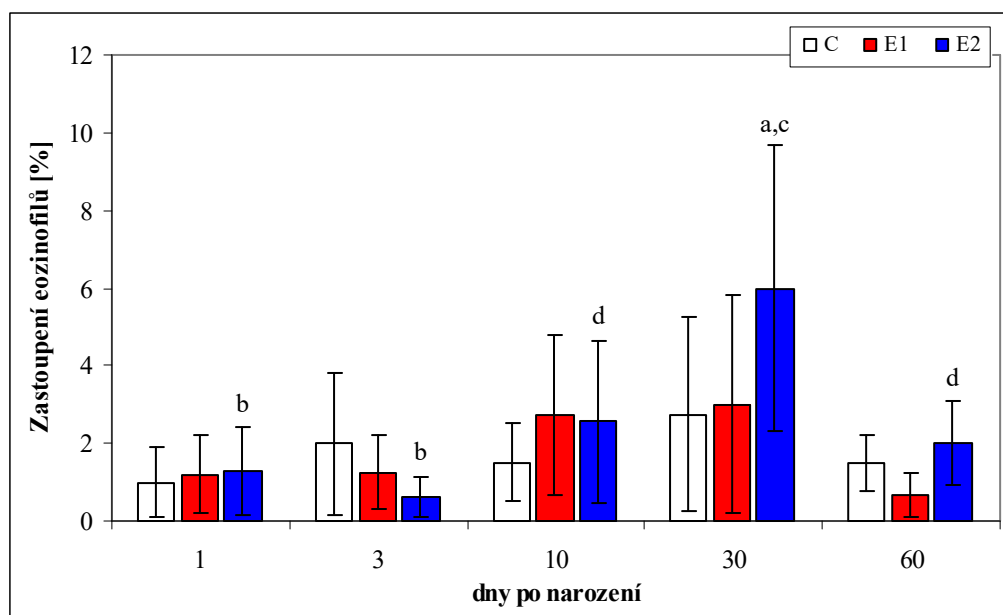
Zastoupení monocytů v leukogramu se v celém průběhu pokusu vyznačovalo (u všech skupin) nesourodým kolísáním bez výrazných tendencí a statisticky významných rozdílů v rámci skupiny i mezi skupinami. Nejvýraznější kolísavost průměrných hodnot byla pozorována v rámci skupiny kontrolní. U skupiny C byla zjištěna nejvyšší hodnota 1. (3,5

$\pm 1,29$ %), u skupiny E2 byl nejvyšší nárůst hodnot zjištěn 10. ($2,89 \pm 1,05$ %) a u skupiny E1 30. den po narození ($3,0 \pm 2,9$ %). Zjištěné kolísání je v souladu s publikacemi Procházková *et al.* (1986) a Saker *et al.* (1998), ve kterých uvádí velkou variabilitu v zastoupení monocytů ovlivněnou individualitou pokusných jedinců.

5.3.1.6 Zastoupení eozinofilních granulocytů v krvi

Rozpětí normy pro zastoupení **eozinofilních granulocytů** (graf 22) uvádí Jelínek *et al.* (2003) v rozmezí od 1 do 6 %. Průměrné hodnoty všech skupin se nacházely ve fyziologickém rozpětí, která byla překračována pouze extrémně. Nejvyšší průměrné hodnoty dosáhla skupina E2 a to $2,36 \pm 2,28$.

Graf 22 Zastoupení eozinofilních granulocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,01$; c:d $P < 0,05$

Statisticky významné rozdíly byly zjištěny pouze u skupiny E2 a to na dvou hladinách významnosti. Nárůst eozinofilů 30. den byl průkazný ($P < 0,01$) proti 1. a 3. dnu a ($P < 0,05$) proti 10. a 60. dnu po narození. Tento nárůst (o 57,4) byl způsoben dvěma jedinci, u kterých se mohlo jednat o krátkodobou reakci či citlivost na alergen (Fekete *et Kellems* 2007). O krátkodobosti mluvíme, protože hned při dalším odběru došlo ke statisticky

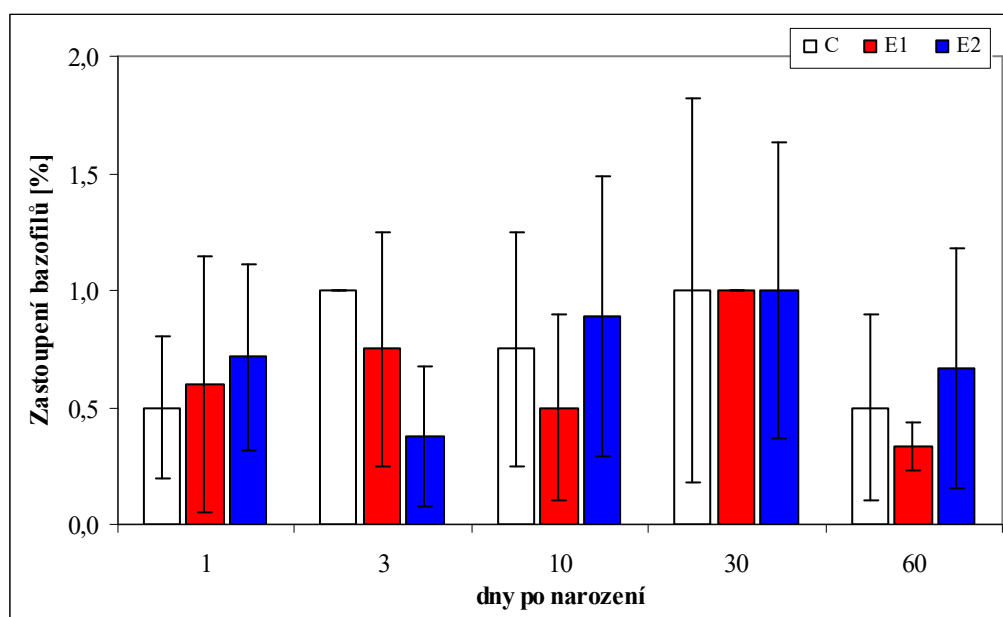
významnému poklesu (o 66,7). Z provedených rozborů výkalů můžeme předem vyloučit jako důvod zvýšení eozinofilů možnou invazi endoparazity.

5.3.1.7 Zastoupení bazofilních granulocytů v krvi

Průměrné zastoupení **bazofilních granulocytů** je uvedeno v **grafu 23**. Rozmezí fyziologické normy udává Jelínek *et al.* (2003) od 0 do 3 % a Reece (1998) od 0 do 1 %. Nejvyšší hodnotu průměru vykazovala skupina **C** ($0,78 \pm 0,55$), následovala **E2** ($0,72 \pm 0,7$) a **E1** ($0,63 \pm 0,5$). Souhrnné hodnoty za celou dobu pozorování se nalézaly v rámci normy a nebyly zde zjištěny významné rozdíly mezi skupinami.

U všech skupin je patrné velké kolísání hodnot doprovázené velkými rozptyly uvnitř skupin. K přechodnému vyrovnání průměrů došlo 30. den po narození, kdy všechny skupiny dosáhly maxima. Vysoké hodnoty eozinofilů 30. den u skupiny E2 dokumentuje spolupráci těchto dvou typů bílých krvinek v průběhu alergických reakcí (Reece 1998, Trojan *et al.* 2003). V porovnání s dynamikou počtu bazofilů a eozinofilů uvedenou v práci Batchelder *et al.* (2007) se jediná skupina E2 svým průběhem podobala. V uvedené práci došlo k přechodnému snížení obou zmíněných typů po 1. dnu po narození.

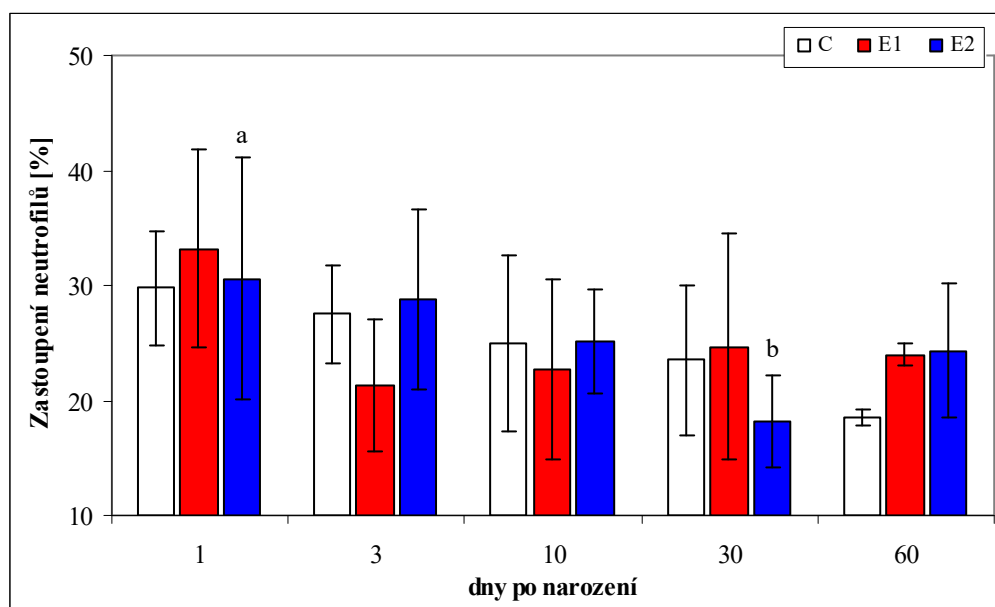
Graf 23 Zastoupení bazofilních granulocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



5.3.1.8 Zastoupení neutrofilních granulocytů v krvi a jejich fagocytární aktivita

Graf 24 shrnuje zastoupení neutrofilních granulocytů za celý průběh sledování u všech skupin. Dle Jelínka *et al.* (2003) se hodnoty považované za fyziologické nalézají v rozmezí od 20 do 50 %. Reece (1998) udává rozmezí od 25 do 30 %. Všechny hodnoty při porovnání s první zmiňovanou normou nalézají ve vytyčeném rozmezí. Nejvyšší průměrné hodnoty dosáhla skupina **E2** ($25,69 \pm 7,76$ %), následovala skupina **E1** ($25,68 \pm 8,12$ %) a nejnižších hodnot dosáhla skupina **C** ($25,56 \pm 6,1$ %). Již při prvním pohledu na uvedené hodnoty musí být zřejmé, že mezi nimi nemohou existovat statisticky průkazné rozdíly.

Graf 24 Zastoupení neutrofilních granulocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



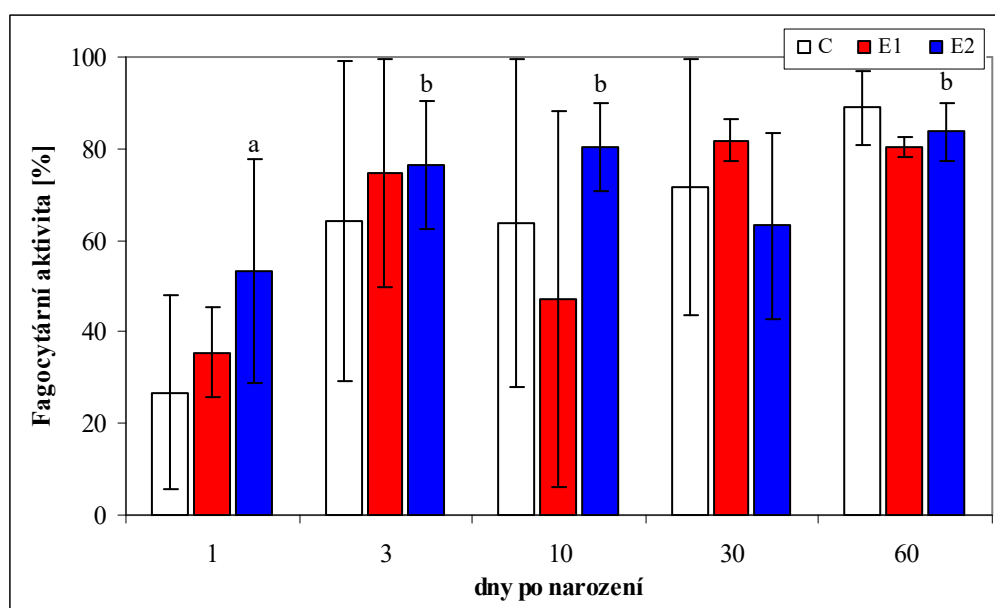
a:b $P < 0,05$

Dle normy uvedené Bock (1994) se počet neutrofilů 1. den po narození u obou pokusných skupin pohyboval nad horní hranicí normy. Toto zvýšení bylo pouze přechodné, jelikož hned další odběr byly hodnoty obou skupin v normálu. Největší pokles hodnot byl zaznamenán u skupiny E1 (o 36 %), obě ostatní skupiny dosáhly hodnot blízkých se 10 %. Tento průběh koresponduje se stavem uvedeným Bartůňkovou *et al.* (2007) kdy v okamžiku po narození dochází z důvodu snížené adhezivity (nízká exprese L-selektinu a β_2 integrinů) k novorozenecké neutrofilii, která se však do tří dnů po porodu vyrovnává a dosahuje hodnot nacházených u dospělých jedinců. Tento proces je patrný i ze

studie Batchelder *et al.* (2007) kdy došlo ke snížení na fyziologické hodnoty již po dvou dnech. V dalším průběhu pokusu se průměry udržovaly v rámci norem bez průkazných rozdílů mezi skupinami. Pouze u skupiny E2 byla zaznamenána statisticky průkazná diference ($P < 0,05$) mezi 1. a 30. dnem po porodu kdy došlo k poklesu relativních hodnot. Pokud se však podíváme na graf 16 zjistíme, že v tomto období došlo k nárůstu počtu leukocytů. Pokud relativní hodnoty přepočítáme na absolutní pak zjistíme velkou vyrovnanost počtu leukocytů, kdy počty z 30. odpovídají úrovni zjištěné 10. a 60. den po narození. Oproti 1. dnu se tedy o pokles jedná, ale není statisticky významný.

Fyziologické hodnoty **fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů - FA (graf 25)** se dle mnohých autorů udává (Sova *et al.* 1990, Bock 1994, Reece 1998, Jelínek *et al.* 2003, Bartůňková *et al.* 2005, Fekete *et al.* 2007) převážně spodní hranice normy – 80 %. Nejvyšší průměrné hodnoty FA dosáhla skupina **E2** ($71,03 \pm 19,62$), těsně následována skupinou **E1** ($61,29 \pm 30,68$) a poslední v pořadí byla skupina kontrolní **C** ($60,19 \pm 38,79$). Tento patrný avšak statisticky nevýznamný rozdíl průměrů se dá chápat ve spojení s nejnižší variabilitou hodnot uvnitř skupiny jako stabilizační účinek selenu (Beck 1999). Dále je v souladu s prací Arthur *et al.* (2003), který popisuje vyšší fagocytární aktivitu u selenem dotovaných jedinců.

Graf 25 Fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů v krvi jehňat [%] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



a:b $P < 0,05$

Tendence ke zvyšování fagocytární aktivity jsou patrné u všech skupin. Nárůst v rámci skupiny E2 byl vyšší než 40 % a u skupin E1 a C byl nárůst více než 50 %. Z důvodu nižší variability hodnot byl zmíněný nárůst statisticky průkazný pouze u skupiny E2 ($P < 0,05$). Již po 90. dnu gestace jsou neutrofilové schopny fagocytózy bakterií např. *Staphylococcus aureus*. Stále je zde ještě deficit v baktericidní aktivitě neutrofilů, která dosáhne hodnot dospělých zvířat o deset dnů později (Tizard 2004). Bartůňková *et al.* (2007) udává jako důvod snížené fagocytární aktivity neutrofilů u novorozenců nikoli hypofunkce fagocytů, ale sníženou hladinu opsoninů (chemotaxické látky). U skupiny E1 byl zaznamenán ojedinělý a přechodný pokles 10. (o 36,9 %) a u skupiny E2 30. den po narození (o 21,4 %). Ve zmiňovaných obdobích obě skupiny dosáhly maximální variability uvnitř skupin. Snížení hodnot u obou skupin nebylo statisticky významné. Dá se předpokládat, že zmíněné poklesy byly zapříčiněny pouze individuálními výkyvy a nejedná se o tendence skupin. Pokud pomineme tyto dva ojedinělé poklesy u pokusných skupin pak můžeme tvrdit, že úroveň FA byla velmi stabilní nad hranicí normy. U skupiny C je patrné pozvolné zvyšování FA až do 60. dne po narození kdy dosáhla fyziologické normy. Deficitní stav FA před 60. dnem byl způsoben vysokými odchylkami některých jedinců od průměru celé skupiny.

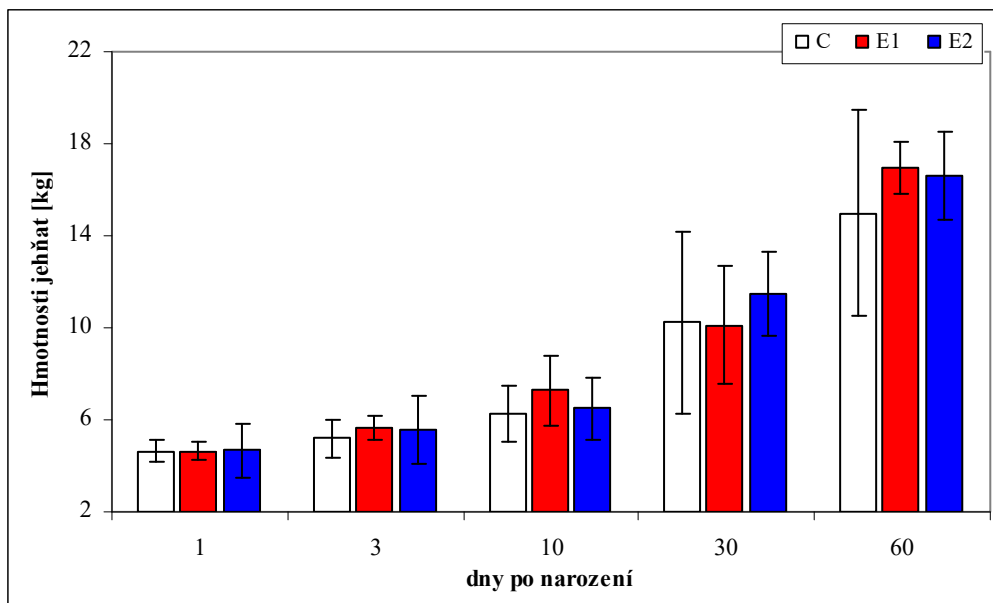
5.3.1 Doplnkové parametry

5.3.2.1 Hmotnost jehňat

Vývoj **průměrných hmotností jehňat** je znázorněn v **grafu 26**. Jak je patrné z grafu všechny skupiny dosahovaly podobné nárůsty hmotností bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami. Průměrné porodní hmotnosti byly u všech skupin srovnatelné a pohybovaly se v rozmezí od 4,4 do 4,7 kg. Nejvyšší průměrná hmotnost byla zjištěna u obou pokusných skupin E1 a E2 na úrovni 44,6 kg. U skupina C byla hodnota o 3,2 kg nižší. Na konci pokusu se průměrné hmotnosti nacházely v rozpětí 15,0 až 16,9. Nejnižší hodnota byla zaznamenána u skupiny C a nejvyšší u skupiny E1. Potěšitelné je zjištění, že průměr hmotností skupiny E2 se od ostatních skupin neodlišoval i přes 80 % zastoupení dvojčat. Nejvyššího denního průměrného přírůstku bylo dosaženo u skupiny E1 a to 0,205 kg, dále je v pořadí skupina E2 s 0,198 kg a poslední je skupina C s 0,172 kg. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi přírůstky jednotlivých skupin. Uvedené přírůstky

výrazně nezaostávají za hodnotami uváděnými v literatuře (Vejčík *et al.* 2001, Ochodnický *et al.* 2003, Horák *et al.* 2007).

Graf 26 Hmotnosti jehňat [kg] u skupiny kontrolní (C) a pokusných (E1, E2)



5.4 REGRESNÍ A KORELAČNÍ ANALÝZA

Jelikož jednotlivé skupiny dosahovaly velmi podobných korelačních a regresních koeficientů, proto jsou v dalším textu sumarizovány. Hodnoty koeficientů budou posuzovány dle škály uvedené v tabulce 13 (viz kapitola 4 MATERIÁL A METODY) a to při zjištění minimálně střední pozitivní či negativní hladiny závislosti. Všechna uváděná tvrzení byla již diskutována v předešlém textu a proto nebudou na tomto místě uváděny literární zdroje.

5.4.1 Ovce

U ovčí analýza prokázala jednu velmi vysoce negativní a jednu vysoce pozitivní závislost (tabulka 15).

Velmi vysoká negativní závislost byla zjištěna mezi zastoupením lymfocytů a neutrofilních granulocytů v leukogramu. Jelikož se jedná o dva nejvíce zastoupené typy z celé rodiny leukocytů, proto se prudší nárůst jednoho typu odrazí na jeho vyšším procentickém zastoupení v leukogramu a logicky i na snížení relativního zastoupení druhého typu. Tato dynamika je patrná z grafů 3 a 10. Pokud došlo ke snížení jednoho typu zároveň došlo u druhého typu ke zvýšení. Tyto rozdíly jsou podmiňovány funkcí obou typů. Zatímco neutrofilie jsou díky jejich fagocytárním funkcím řazeny do nespecifických mechanismů imunity, tak lymfocyty převážně zajišťují buněčně zprostředkované specifické mechanismy. Jsou mezi nimi velké rozdíly např. v rychlosti odpovědi na podráždění, způsobu aktivace jejich mechanismů, ve specifčnosti jejich působení, a mnoho dalších. Proto dochází k vyššímu nárůstu jednoho nebo druhého typu.

Tabulka 15 Regresní a korelační koeficienty ($r_{x,y}$) zjištěné mezi parametry ovcí

	Leu	Ly	CD4	CD8	CD4:8	Mo	Eo	Baz	Neu	FA	SA	CA	Se
Leu		-0,31	0,18	0,24	-0,17	0,03	0,04	0,01	0,28	-0,23	-0,30	-0,17	-0,16
Ly	-0,31		-0,02	-0,05	0,09	-0,13	-0,03	-0,19	-0,91	-0,08	0,15	0,21	-0,07
CD4	0,18	-0,02		0,75	0,30	0,25	-0,05	0,08	-0,01	0,09	-0,15	-0,21	0,08
CD8	0,24	-0,05	0,75		-0,32	0,33	-0,18	0,08	0,08	0,05	-0,10	-0,28	0,05
CD4:8	-0,17	0,09	0,30	-0,32		-0,10	0,15	-0,04	-0,16	0,05	-0,05	0,12	0,04
Mo	0,03	-0,13	0,25	0,33	-0,10		-0,22	0,04	0,06	0,01	-0,07	-0,17	-0,19
Eo	0,04	-0,03	-0,05	-0,18	0,15	-0,22		0,05	-0,33	-0,16	-0,17	0,06	0,01
Baz	0,01	-0,19	0,08	0,08	-0,04	0,04	0,05		0,06	0,05	0,07	-0,04	0,02
Neu	0,28	-0,91	-0,01	0,08	-0,16	0,06	-0,33	0,06		0,10	-0,04	-0,21	0,07
FA	-0,23	-0,08	0,09	0,05	0,05	0,01	-0,16	0,05	0,10		0,13	-0,01	0,18
SA	-0,30	0,15	-0,15	-0,10	-0,05	-0,07	-0,17	0,07	-0,04	0,13		0,14	0,05
CA	-0,17	0,21	-0,21	-0,28	0,12	-0,17	0,06	-0,04	-0,21	-0,01	0,14		-0,11
Se	-0,16	-0,07	0,08	0,05	0,04	-0,19	0,01	0,02	0,07	0,18	0,05	-0,11	

Leu – leukocyty, Ly – lymfocyty, CD4 – pomocné T lymfocyty, CD8 – cytotoxické T lymfocyty, Mo – monocyty, Eo – eozinofilní granulocyty, Baz – bazofilní granulocyty, Neu – neutrofilní granulocyty, FA – fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů, SA – baktericidní aktivita krve vůči *Staphylococcus aureus*, CA – baktericidní aktivita krve vůči *Candida albicans*, Se – koncentrace selenu v krevním séru

Vysoká pozitivní závislost byla zjištěna mezi subpopulací CD4⁺ a CD8⁺. Obě subpopulace představují buněčně zprostředkovanou specifickou imunitní odpověď organismu. Pokud se organismus nachází ve fyziologickém stavu, pak poměr obou subpopulací (4/8) dosahuje hodnot vyšších než 1. Z toho vyplývá závislost zastoupení jedné subpopulace na subpopulaci druhé.

5.4.2 Jehňata

U jehňat byly zjištěny stejné závislosti jako u jejich matek (Ly:Neu, $r_{x,y} = -0,92$ a CD4:CD8, $r_{x,y} = 0,75$), ale navíc byl zjištěn střední regresní koeficient mezi subpopulací CD8⁺ a poměrem subpopulací CD4⁺/CD8⁺. Důvody prvních dvou závislostí již byly vysvětleny u matek a proto je zbytečné je opakovat.

Mezi zastoupením CD8⁺ subpopulace T lymfocytů a poměrem subpopulací CD4⁺/CD8⁺ byl zjištěn střední regresní koeficient. To znamená, že pokud dojde k nárůstu jmenované subpopulace pak se střední pravděpodobností dojde ke snížení poměru subpopulací. Jelikož mezi CD4⁺ a CD8⁺ existuje vysoká závislost pak se dá s velkou pravděpodobností předpokládat, že při nárůstu CD4⁺ dojde i k ekvivalentnímu nárůstu CD8⁺. Z toho lze vyvodit hypotézu, že pokud dojde k nárůstu jednoho ukazatele o jednotku množství tak se o tuto jednotku také zvýší ukazatel druhý. Avšak z matematického pohledu dojde mezi nimi současně ke snížení poměru. A proto nebyla nalezena významná závislost mezi subpopulací CD4⁺, protože vzájemný poměr podobně se rozvíjejících ukazatelů je více ovlivňován dělitelem.

Tabulka 16 Regresní a korelační koeficienty ($r_{x,y}$) zjištěné mezi parametry jehňat

	Leu	Ly	CD4	CD8	CD4:8	Mo	Eo	Baz	Neu	FA	Se
Leu		-0,10	0,03	0,21	-0,12	-0,25	0,26	0,03	0,05	0,03	0,33
Ly	-0,10		0,14	0,06	0,07	-0,18	0,02	0,31	-0,92	0,12	-0,05
CD4	0,03	0,14		0,75	0,17	-0,25	0,36	-0,02	-0,24	-0,25	0,16
CD8	0,21	0,06	0,75		-0,50	-0,17	0,33	0,13	-0,18	-0,30	0,40
CD4:8	-0,12	0,07	0,17	-0,50		0,00	0,04	-0,31	-0,06	0,18	-0,34
Mo	-0,25	-0,18	-0,25	-0,17	0,00		-0,26	-0,11	0,04	-0,01	-0,23
Eo	0,26	0,02	0,36	0,33	0,04	-0,26		0,06	-0,28	-0,06	0,11
Baz	0,03	0,31	-0,02	0,13	-0,31	-0,11	0,06		-0,35	0,07	0,06
Neu	0,05	-0,92	-0,24	-0,18	-0,06	0,04	-0,28	-0,35		-0,15	0,04
FA	0,03	0,12	-0,25	-0,30	0,18	-0,01	-0,06	0,07	-0,15		-0,02
Se	0,33	-0,05	0,16	0,40	-0,34	-0,23	0,11	0,06	0,04	-0,02	

Leu –leukocyty, Ly – lymfocyty, CD4 – pomocné T lymfocyty, CD8 – cytotoxické T lymfocyty, Mo – monocyty, Eo – eozinofilní granulocyty, Baz – bazofilní granulocyty, Neu – neutrofilní granulocyty, FA – fagocytární aktivita neutrofilních granulocytů, Se – koncentrace selenu v krevním séru

6. ZÁVĚR

V průběhu pokusu se prokázal pozitivní účinek suplementace selenu na jeho koncentraci v krevním séru ve srovnání se skupinou kontrolní (C) u obou pokusných skupin a to jak u ovcí tak u jehňat. Podávání různých forem selenu, jak anorganického (Na_2SeO_3) tak organicky vázaného na řasu rodu *Chlorella*, neprokázalo u ovcí ani u jehňat statisticky významné rozdíly mezi pokusnými skupinami (E1 a E2).

Počty leukocytů, zastoupení jednotlivých typů leukocytů v leukogramu, zastoupení CD4^+ a CD8^+ subpopulací T lymfocytů ani jejich poměry, fagocytární aktivity, baktericidní aktivity ani hmotnosti nevykazovaly po celou dobu pokusu statisticky průkazné rozdíly mezi skupinou kontrolní a pokusnými skupinami u ovcí ani u jejich jehňat.

U ovcí byly zjištěny po porodu statisticky průkazné nárůsty hodnot počtu leukocytů, zastoupení neutrofilních granulocytů a subpopulací CD4^+ a CD8^+ .

U jehňat ze skupiny E2 byly prokázány statisticky významné nárůsty fagocytární aktivity po 3. dnu a zastoupení obou subpopulací T lymfocytů po 30. dnu po porodu.

7. SOUHRN

8. SUMMARY

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.
2. Abdelrahman, M.M., Kincaid, R.L. (1995): Effect of selenium supplementation of cows on maternal transfer of selenium to fetal and newborn calves. *J. Dairy Sci.*, 78: 625-630.
3. Aitken, R.J. (1994): A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fert. Dev.*, 6: 19-24.
4. Akesson, B., Bellew, T., Burk, R.F. (1994): Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochem. Biophys. Acta*, 1204: 243-249.
5. Anke, M., Partschefeld, M., Kursa, J., et al. (1983): Die Selenmangelmyopathie. *Wiss. Ztschr. Friedrich-Schiller-Univ., Jena*, 32(4/5): 809-820.
6. Apostolou, S., Klein, J.O., Mitsuuchi, Y., et al. (2004): Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype. *Oncogene*, 23: 5032-5040.
7. Arthur, J.R., McKenzie, R.C., Beckett, G.J. (2003): Selenium in the immune system. *J. Nutr.*, 133: 1457-1459.
8. Arthur, J.R., Nicol, F., Beckett, G.J. (1990): Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem. J.*, 272: 537-540.
9. Arvilommi, H., Poikonen, K., Jokinen, I., et al. (1983): Selenium and immune functions in humans. *Infect. Immun.*, 41(1): 185-189.
10. Atkinson, J.B., Hill, K.E., Burk, R.F. (2001): Centrilobular endothelial cell injury by diquat in the selenium-deficient rat liver. *Lab. Invest.*, 81: 193-200.
11. Avanzo, J.L., De Mendonca, X.C., Cerqueira, C.M. (2002): Role of antioxidant systems in induced nutritional pancreatic atrophy in chicken. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 131: 815-823.
12. Baggiolini, M. (1998): Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392: 565-568.
13. Baggiolini, M. (2001): Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.*, 250: 91-104.
14. Baggiolini, M., Dewald, B. (1985): The neutrophil. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 76(1): 13-20.

15. Balicka-Ramisz, A., Pilarczyk, B., Ramisz, A., et al. (2006): Effects of selenium administration on blood serum Se content and on selected reproductive characteristics of sheep. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 49: 176-180.
16. Bartůňková, J., Paulík, M., Hölzelová, E. et al. (2005): *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada Publishing. Praha, 1: 176s.
17. Bartůňková, J., Šedivá, A., Janda, A. (2007): *Imunodeficiency*. Grada Publishing. Praha, 2: 254s.
18. Batchelder, C.A., Bertolini, M., Mason, J.B., et al. (2007): Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Clon. Stem Cells*, 9(1): 83-96.
19. Baum, M.K., Shor-Posener, G., Lai, S., et al. (1997): High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 15(5): 370-374.
20. Beck, M.A. (1999): Selenium and host defence towards viruses. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 707-711.
21. Behne, D., Kyriakopoulos, A. (2001): Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 21: 453-473.
22. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meindhold, H., et al. (1990): Identifikace typu I iodothyronine 5'-deiodinase jako selenoenzymu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173: 1143-1149.
23. Berk, C., (1992): The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. *Immunol. Rev.*, 126: 5-19.
24. Berk, C., Ziegner, M. (1993): The maturation of the immune response. *Immunol. Today*, 14: 400-404.
25. Bock U. (1994): *Směrné hodnoty důležitých laboratorních vyšetření*. Vetpress, Jilove u Prahy, 1: 127s.
26. Boldižarová, K., Grešáková, L., Faix, S., et al. (2005): Antioxidant status of lambs fed on diets supplemented with selenite or Se-yeast. *J. An. Feed Sci.*, 14: 245-253.
27. Bopp, B.A., Sonders, R.C., Kesterson, J.W. (1982): Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man. *Drug Metab. Rev.*, 13: 271-318.
28. Borish, L., Rocklin, R.E. (1987): Effects of leukocyte inhibitory factor (LIF) on neutrophil phagocytosis and bactericidal activity. *J. Immunol.*, 138(5): 1475-1479.

29. Boyne, R., Arthur, J.R. (1979): Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J. Comp. Pathol.*, 89: 151-158.
30. Bringer, M., Pilawa, S., Flohé, L. (2002): Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 693-718.
31. Broome, C.S., McArdle, F., Kyle, J.A., et al. (2004): An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80(1): 154-62.
32. Brown, E.J. (1995): Phagocytosis. *Bioessays*, 17: 109-117.
33. Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., et al. (2007): Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*, 316(5824): 612-616.
34. Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., et al. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 276(24): 1957-1963.
35. Combs, G.F., Combs, S.B. (1986): Selenium in food and feeds. The role of selenium in nutrition, New York, NYA Academic Press: 41-126.
36. Cotton, R.B., Sundell, H.W., Zeldin, D.C., et al. (2006): Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic lung injury in lambs. *Pediatr. Res.*, 59(1):142-146.
37. Cummins, L.M., Kimura, E.T. (1971): Safety evaluation of selenium sulfide antidandruff shampoos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20: 89-96.
38. Cunningham-Rundles, S. (2002): Evaluation of the effects on nutrients on immune function. Eds. Calder, P.C., Field, C.J., Gill, H.S. In: *Nutrition and immune function*, CABI Publishing, New York, 1: 229-250.
39. Curran, J.E., Jowett, J.B., Elliot, K.S., et al. (2005): Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory process. *Nat. Genet.*, 37: 1234-1241.
40. Daniels, L.A. (1996): Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 54: 185-199.
41. Devereux, G. (2002): The immune system: an overview. Eds. Calder, P.C., Field, C.J., Gill, H.S. In: *Nutrition and immune function*, CABI Publishing, New York, 1: 229-250.
42. Doležel, R. (2003): Vybrané kapitoly z veterinární gynekologie a porodnictví. Skriptum, JU, České Budějovice, 1: 117s.

43. Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., et al. (2003): Veterinární hematologie. Noviko a.s., Brno, 1: 468s.
44. Doubek, J., Smutná, M., Svoboda, P., et al. (1995): Reaktivní formy kyslíku a jejich význam v medicíně. Veterinářství, Praha, 12: 528-530.
45. Doucha, J., Lívanský, K., Kajan, M., et al. (1992): Method and equipment for large-scale cultivation of phototrophic algae and cyanobacteria. Czech patent No. 276: 190s.
46. Doucha, J. (1998): Program Chlorella v České republice. Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň: 16s.
47. Dudek, N.L., Thomas, H.E., Mariana, L., et al. (2007): Cytotoxic T-cells from T-cell receptor transgenic NOD8.3 mice destroy beta-cells via the perforin and Fas pathways. Diabetes, 55(9): 2412-2418.
48. Edens, F.W., Carter, T.A., Parkhurst, C.R., et al. (2000): Effect of selenium source and litter type on broiler feathering. J. Appl. Poult. Res., 9: 407-413.
49. Elliott, W.H., Elliott, D.C. (1997): Biochemistry and molecular biology. Oxford University Press, New York, 1: 586s.
50. Entrican, G., Buxton, D., Longbottom, D. (2002): Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. J. R. Soc. Med., 94: 273-277.
51. Erickson, K.L., Medina, E.A., Hubbard, N.E. (2000): Micronutrients and innate immunity. J. Inf. Dis., 182(1): 5-10.
52. Erwig LP, Henson PM. (2007): Immunological Consequences of Apoptotic Cell Phagocytosis. Am. J. Pathol., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17513342&ordinalpos=14&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
53. FDA (1997): Selenium regulation finalized CVM uptake. FDA Center of Veterinary Medicine, Rockville.
54. Fekete, S.G., Kellems, R.O. (2007): Interrelationships of feeding with immunity and parasitic infection: a review. Vet. Med., 52(4): 131-143.
55. Fenton, H.J.H (1894): Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J. Chem. Soc., 65: 899-910.
56. Ferguson, A.D., Labunsky, V.M., Fomenko, D.E., et al. (2006): NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family. J. Biol. Chem., 281: 3536-3543.

57. Finch, J.M., Turner, R.J. (1989): Enhancement of ovine lymphocyte responses: a comparison of selenium and vitamin E supplementation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 23: 245-256.
58. Flora, S.J. (2007): Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.*, 53(1): 1-2.
59. Ganther, H.E. (1986): Pathway of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 5: 1-5.
60. Ganther, H.E., Lawrence, J.R. (1997): Chemical transformations of selenium in living organisms: Improved forms of selenium for cancer prevention. *Tetrahedron*, 53(36): 12299-12310.
61. Gao, Y., Hannan, N.R., Wanyonyi, S., et al. (2006): Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by proinflammatory cytokines in HepG2 cell. *Cytokine*, 33: 246-251.
62. Gomberg, M. (1900): An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.*, 22(11): 757-771.
63. Gomberg, M. (1924): Organic Radicals. *Chemical Reviews*, 1: 91-97.
64. Grace, N.D., Ankenbauer-Perkins, K., Alexander, A.M., et al. (2001): Relationship between blood selenium concentration or glutathione peroxidase activity, and milk selenium concentrations in New Zealand dairy cows. *N. Z. Vet. J.*, 49: 24-28.
65. Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2000): *Algae*. Prentice Hall Inc., New Jersey, 2: 640s.
66. Grasso, P.J., Scholz, R.W., Erskine, R.J., et al. (1990): Phagocytosis, bacterial activity and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium deficient diets. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 269-274.
67. Griffin, R.S., Costigan, M., Brenner, G.J., et al. (2007): Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *J. Neurosci.*, 27(32): 8699-8708.
68. Grunig, G., Barbis, D.P., Zang, C.H. et al. (1994): Correlation between monoclonal antibody reactivity and expression of CD4 and CD8 alpha genes in the horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42: 61-69.
69. Gu, Q.P., Beilstein, M.A., Barofsky, E., et al. (1999): Purification, characterization, and glutathione binding selenoprotein W from monkey muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 361: 25-33.
70. Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., et al. (1996): Identification of novel Seld homolog from eukaryotes, bacteria, and archea: Is there an autoregulatory

- mechanism in selenocysteine metabolism? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 15086-15091.
71. Gurdogan, F., Yildiz, A., Balikci, E. (2006): Investigation of serum Cu, Zn, Fe and Se concentrations during pregnancy (60,100 and 150 days) and after parturition (45 days) in single and twin pregnant sheep. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 30: 61-64.
 72. Gyang, E.O., Stevens, J.B., Olsen, W.G., et al. (1984): Effects of selenium-vitamin E injection on bovine polymorphonucleated leukocyte phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. Am. J. Vet. Res., 45: 175-178.
 73. Gyetvai, A., Emri, T., Fekete, A., et al. (2007): High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and superoxide-generating agent menadione. Yeast Res., 7: 265-275.
 74. Haber, F., Willstatter, R. (1931): Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 64: 2844-2856.
 75. Hawkes, W.C., Turek, P. (2001): Effect of dietary selenium on sperm motility in healthy men. J. Androl., 22(5): 764-772.
 76. Hawkes, W.C., Willhite, C.C., Craig, K.A., et al. (1992): Effect of excess selenomethionine on selenium status indicators in pregnant long-tailed macaques. Biol. Trace Elem. Res., 35(3): 281-297.
 77. Hawkes, W.C., Willhite, C.C., Omaye, S.T., et al. (1994): Selenium kinetics, placental transfer, and neonatal exposure in cynomolgus macaques. Teratology, 50: 148-159.
 78. Hein, W.R., Mackay, C.R. (1991): Prominence of $\gamma\delta$ T cells receptor in the ruminant immune system. Immunol. Today, 12: 30-34.
 79. Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., et al. (2003): Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. J. Biol. Chem., 278: 13640-13646.
 80. Hoffman, J.E., King, M.G. (1997): Selenium and selenium compounds. In: Kroschwitz, J.I., Howe-Grant, M.H., ed. Encyklopedia of chemical technology. J.Wiley, New York: 686-719.
 81. Horák, F., et al. (2007): Ovce a jejich chov. Brázda, Praha, 1: 304s.
 82. Hořejší, V., Bartůňková, J. (2002): Základy imunologie. Triton, Praha, 2: 260s.

83. Howard, E.G. (1999): Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20(9): 1657-1666.
84. Hwang, D.Y., Cho, J.S., Oh, J.H., et al. (2005): Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2 (N141I): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, 30: 1009-1019.
85. Chan, S.S., McConell, I., Blacklaws, B.A. (2002): Generation and characterization of ovine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology*, 107: 366-372.
86. Chang, W.P., Hom, J.S.H., Dietert, R.R., et al. (1994): Effect of dietary vitamin E and selenium deficiency on chicken splenocyte proliferation and cell surface marker expression. *Immunopharm. Immunot.*, 16: 203-223.
87. Chiaradia, E., Gaiti, A., Scaringi, L., et al. (2002): Antioxidant systems and lymphocyte proliferation in the horse, sheep and dog. *Vet. Res.*, 33: 661-668.
88. Cheung, T.H., Chung, T.K., Poon, C.S., et al. (1999): Allelic loss on chromosome 1 is associated with tumor progression of cervical carcinoma. *Cancer*, 86: 1294-1298.
89. Chitko-McKown, C.G, Blecha, F. (1992): Pulmonary intravascular macrophages: a review of immune properties and functions. *Ann. Rech. Vet.*, 23: 201-214.
90. Choudhary, M.I., Jalil, S., Todorova, M., et al. (2007): Inhibitory effect of lactone fractions and individual components from three species of the *Achillea millefolium* complex of Bulgarian origin on the human neutrophils respiratory burst activity. *Nat. Prod. Res.*, 21(11): 1032-1036.
91. Ishikawa, H., Naito, T., Iwanaga, T., et al. (2007): Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol. Rev.*, 215: 154-165.
92. Ivanova-Todorova, E., Aivazova, N., Mekhandzhiev, T., et al. (2007): Changes of activation in T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood during pregnancy. *Akush. Gynecol. (Sofia)*, 46(2): 3-8.
93. Jabri, B., Ebert, E. (2007): Human CD8⁺ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunol. Rev.*, 215: 202-214.
94. Jacques, K.A. (2001): Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. In: Lyons, K. A. Jacques (Ed.):

- Science and technology in the feed industry, Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium, Nottingham University Press: 319-348.
95. Jaffe, W.G., Mondragon, C. (1975): Effect of ingestion of organic selenium adapted and non-adapted rats. *Br. J. Nutr.*, 33: 387-397.
 96. Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., et al. (2003): *Fyziologie hospodářských zvířat*. MZLU, Brno, 1: 414s.
 97. Jeong, D., Kim, T.S., Chung, Y.W., et al. (2002): Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett.*, 517: 225-228.
 98. 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.
 99. Jonnalagadda, S.B., Rao, P.V. (1993): Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 106: 585-595.
 100. Jukola, E., Hakkarainen, J., Saloniemi, H., et al. (1996): Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J. Dairy Sci.*, 79: 838-845.
 101. Kapraun, D.F. (2007): Nuclear DNA content estimates in green algal lineages: chlorophyta and streptophyta. *Ann. Bot. (Lond.)*, 99(4): 677-701.
 102. Kalimonchuk, O., Bird, A., Winge, D.R. (2007): Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. www.jbc.org/cgi/reprint/M702379200v1.
 103. Kim, H.Y., Gladyshev, V.N. (2004): Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol. Biol. Cell*, 15: 1055-1064.
 104. Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M. (1998): Selenium and immune function. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37(1): 50-56.
 105. Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Glickman, R. (2000): Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol. Trace Elem. Res.*, 73: 97-111.
 106. Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Wishe, H.I., et al. (1994): Supplementation with selenium and human immune functions. II. Effect of cytotoxic lymphocytes and natural killers cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 41: 115-127.

107. Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Wishe, H.I., et al. (1996): Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 52: 227-239.
108. Knowles, S.O., Grace, N.D., Wurms, K., et al. (1999): Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.*, 82: 429-437.
109. Knowles, T.G., Edwards, J.E., Bazeley, K.J., et al. (2000): Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet. Rec.*, 147(21): 593-598.
110. Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., et al. (2002): Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 39(25): 15932-15936.
111. Koenig, K.M., Rode, L.M., Cohen, R.D., et al. (1997): Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.*, 75(3): 817-827.
112. Koller, L.D., Exon, J.H. (1986): The two faces of selenium-deficiency and toxicity-are similar in animals and man. *Can. J. Vet. Res.*, 50: 297-306.
113. Korotkov, K.V., Novoselov, S.V., Hatfield, D.L., et al. (2002): Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a form of Sec insertion sequence element. *Mol. Cell Biol.*, 22: 1402-1411.
114. Kotrbáček, V., Filka, J., Krajča, J., et al. (1994a): Vliv krmného premixu Fytocolu na líhnivost kuřat. Konference „Současné a perspektivní trendy v drůbežnictví“, Brno: nestránkováno.
115. Kotrbáček, V., Halouzka, R., Jurajda, V., et al. (1994b): Zvýšení obranyschopnosti brojlerů po podání biologických krmných doplňků. *Vet. Med.- Czech*, 39: 321-328.
116. Kotrbáček, V., Filka, J., Doucha, J., et al. (1996): Possibilities of utilization of chlorella in animal production. *Proceedings of the 7th international conference „Opportunities for Micro and Macroalgae“*. South Africa: 16.
117. Kotrbáček, V., Chmelař, L., Vizárová, G., et al. (1998): Influence of cytokinin isolated from chlorella on cell reproduction of RK – 13 cell line. *Summary of 13th Congress of Pathological and Clinical Physiology*, Brno: 69.
118. Kroenke, M.A., Segal, B.M. (2007): Th17 and Th1 responses directed against the immunizing epitope, as opposed to secondary epitopes, dominate the autoimmune repertoire during relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis.

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17465017&query_hl=14&itool=pubmed_docsum.

119. Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., et al. (2003): Charakterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300: 1439-1443.
120. Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K.V., et al. (2000): Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene: possible role of the protein cancer etiology. *J. Biol. Chem.*, 275: 35540-35547.
121. Kursá, J. (1969): Nutritive degeneration of muscle in young cattle in Sumava region. *Vet. Med.*, 14: 549-553.
122. Kursá, J., Kroupová, V. (1975): Obsah selenu v srsti skotu v oblasti výskytu nutriční svalové dystrofie. *Vet. Med.*, 20(2): 75-81.
123. Kvíčala, J., Zamrazil, V., Bílek, R., et al. (1997): Low selenium status of inhabitants of South Bohemia and its relation to iodine and thyroid hormone metabolism. *Biomarkers and Environment*, 1: 12-20.
124. Kvíčala, J., Zamrazil, V., Soutorová, M., et al. (1995): Correlations between Parameters of Body Selenium Status and Peripheral Thyroid Parameters in the Low Selenium Region. *Analyst*, 120: 959-965.
125. Lee, S.J., Namkoong, S., Ha, K.S., et al. (2007): Colchicine-derived compound CT20126 promotes skin allograft survival by regulating the balance of Th1 and Th2 cytokine production. *Exp. Mol. Med.*, 39(2): 230-238.
126. Leng, L., Bobcek, R., Kuricová, S., et al. (2003): Comparative metabolic and immune responses of chickens fed diets containing inorganic selenium and Sel-PlexTM organic selenium. http://www.engormix.com/comparative_metabolic_and_immune_e_articles_121_AVG.htm.
127. Lobinski, R., Edmonds, J.S., Suzuki, K.T., et al. (2000): Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure Appl. Chem.*, 72(3): 447-461.
128. Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., et al. (2006): Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. *FEBS Lett.*, 580: 5189-5197.
129. MacDonald, H.R. (2002): T before NK. *Science*, 296: 481-482.
130. MacPherson, A. (1994): Selenium, vitamin E and biological oxidation. In: *Recent Advances Nutrition*, Eds. Carnsworthy, P.C., Cole, D.J.A., Nottingham University Press, Nottingham: 3-30.

131. Mackay, C.R., Maddox, J.F., Brandon, M.R. (1986): Thymocyte subpopulations during early fetal development in sheep. *J. Immunol.*, 136: 1592-1599.
132. Marsh, J.A., Combs, J.R., Whitacre, M.E., et al. (1986): Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chick lymphoid organ development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 182: 425-436.
133. Marsh, J.A., Dietert, R.R., Combs, J.R. (1981): Influence of dietary Selenium and vitamin E on the humoral immune response of the chick. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 166: 228-236.
134. Marshall, A.L. (1926): Photosensitization by optically excited mercury atoms. *J. Phys. Chem.*, 30: 33-46.
135. Marvan, F., Hampl, A., Kresan, J., et al. (1998): *Morfologie hospodářských zvířat. Nakladatelství Brázda s.r.o., Praha: 303s.*
136. Masopust, J. (1998a): *Klinická biochemie 1. Karolinum, Praha, 1: 429s.*
137. Masopust, J. (1998b): *Klinická biochemie 2. Karolinum, Praha, 1: 402s.*
138. Matsushita, M., Fujita, T. (1992): Activation of the classical complement pathway by monnose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.*, 176: 1497-1502.
139. McGorum, B.C., Dixon, P.M., Halliwell, R.E. (1993): Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 36: 207-222.
140. McKenzie, R.C., Arthur, J.R., Beckett, G.J. (2002a): Selenium and the regulation of cell signalling, growth and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxidant and Redox Signalling*, 4: 339- 351.
141. McKenzie, R.C., Arthur, J.R., Miller, S.M. (2002b): Selenium and the immune system. Eds. Calder, P.C., Field, C.J., Gill, H.S. In: *Nutrition and immune function*, CABI Publishing, New York, 1: 229-250.
142. McKenzie, R.C., Rafferty, T.S., Beckett, G.J. (1998): Selenium: an essential element for immune function. *Immunol. Today*, 19: 342-345.
143. Medzhitov, R., Janeway, C.A. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-298.
144. Medzhitov, R., Janeway, C.A. (2000): Innate immunity. *N. Engl. J. Med.*, 343: 338-343.

145. Miller, J.K., Brzezinska-Slebozinska, E, Madsen, F.C. (1993): Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy. Sci.*, 76: 2812-2823.
146. Miller, W.T., Willeams, K.T. (1940): Minimum lethal dose of selenium as sodium selenite for horses, mules, cattle and swine. *J. Agri. Res.*, 60: 163-173.
147. Mills, G.S. (1957): Hemoglobin catabolism. I. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, 229: 189-197.
148. Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., et al. (2001): Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat. Genet.*, 29: 17-18.
149. Mushak, P. (1985): Potential impact of acid precipitation on arsenic and selenium. *Environ. Health Perspect.*, 63: 105-113.
150. Nandakumaran, M., Al-Saleh, E., Al-Shammari, M., et al. (2006): Maternal-fetal transport and disposition of copper, iron, molybdenum, selenium and zinc in experimentally induced diabetic rats. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 19(1): 57-64.
151. Nasar, A., Rahman, A., Meeusen, N.T., et al. (2002): Peri-partum changes in the intraepithelial lymphocyte population of sheep interplacentomal endometrium. *A.J.R.I.*, 47: 132-141.
152. Ochodnický, D., Poltársky, J. (2003): *Ovce, kozy a prasata*. Studiopress, Čáslav, 1: 104s.
153. O'Toole, D., Rainsbeck, M.F. (1995): Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J. Vet. Diag. Inv.*, 7: 364-373.
154. Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., et al. (2007): From selenium to selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants and Redox signaling*, 9(7): 775-806.
155. Park, Y.H., Fox, L.T, Hamilton, M.J. et al. (1992): Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.*, 75: 998-1006.
156. Paulík, Š., Mojžišová, J., Valocký, I., et al. (1998): The blastogenic response of lymphocytes and phagocytic activity of neutrophils in dogs in relation to age and sex. *Folia Veterinaria*, 42(4): 189-193.
157. Pavlata, L. (2004): *Poruchy metabolismu selenu a vitamínu E a jejich vztah ke zdraví u velkých zvířat*. Habilitační práce, VFU, Brno: 185s.

158. Pavlata, L., Illek, J., Pechová, A. (2001): Blood and tissue selenium concentrations un calves treated with inorganic and organic selenium compounds- a comparison. *Acta Vet., Brno*, 70: 19-26.
159. Pavlata, L., Prášek, J., Filípek, J., et al. (2004): Influence of parenteral administration of selenium and vitamin E during pregnancy on selected metabolite parameters and colostrum quality in dairy cows at parturition. *Vet. Med. Czech*, 49: 149-155.
160. Pavlata, L., Prášek, J., Podhorský, A., et al. (2003): Selenium Metabolism in Cattle: Maternal Transfer of Selenium to Newborn Calves at Different Selenium Concentrations in Dams. *Acta Vet., Brno*, 72: 639-646.
161. Peretz, A., Neve, J., Desmedt, J., et al. (1991): Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subject with selenium-enriched yeast. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(5): 1323-1328.
162. Pescovitz, M.D., Sakopoulos, A.G., Gaddy, J.A. et al. (1994): Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43: 53-62.
163. Peters, M.M., Hill, K.E., Burk, R.F., et al. (2006): Altered hippocampus synaptic function of selenoprotein P deficient mice. *Mol. Neurodegener.*, 1: 12.
164. Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., et al. (2003): Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with early developmental expression pattern. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1045-1053.
165. Pletnikova, I.P. (1970): Biological effect and safe concentration of selenium in drinking water. *Hyg. Sanit.*, 35: 176-180.
166. Procházková, J., John, C., Ticháček, B., et al. (1987): Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie. *Avicenum, Praha*, 1: 368s.
167. Puls, R. (1988): Minerals levels in animal health. *Diagnostic data, Sherpa Int., Clearbook*: 53s.
168. Raisbeck, M.F., Schamber, R.A., Belden, E.L. (1998): Immunotoxic effect of selenium in mammals. In: Garland, T., Barr, A.C., eds. *Toxic plants and other natural toxicants*, CABI publishing, New York: 260-266.
169. Raume, A., Elliott, J., Hoffman, E., et al. (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after injury. *Nat.Genet.* 13(1): 43-47.
170. Read, R., Bellew, T., Yang, J.G., et al. (1990): Selenium and amino acids composition of selenoprotein P: the major selenoprotein in rat serum. *J. Biol. Chem.*, 265: 17899-17905.

171. Rederstorff, M., Krol, A., Lescure, A. (2006): Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol. Life Sci.*, 63: 52-59.
172. Reece, W.O. (1998): *Fyziologie hospodářských zvířat*. Grada Publishing, Praha, 2: 456s.
173. Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., et al. (2002): Killing activity of neutrophils is mediated through activation proteases by K⁺ flux. *Nature*, 416: 291-297.
174. Reiterová, K., Tomašovicová, O., Dubinský, P. (2004): Post-parturitional changes in the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in *Toxocara canis*-infected mice and their offspring. *Vet. Med.*, 49: 103-108.
175. Reynolds, A., Laurie, C., Lee Mosley, R., et al. (2007): Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.*, 82: 297-325.
176. Rigano, R., Buttari, B., Profumo, E., et al. (2007): *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.*, 75(4): 1667-1678.
177. Risher, J., McDonald, A.R. (2003): Toxicological profile for selenium. Public Health Service, USA: 57s.
178. Rivera, M.T., De Souza, A.P., Araujo-Jorge, T.C., et al. (2003): Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41(8): 1020-1025.
179. Robinson, R.T., Gorham, J.D. (2007): TGF-beta 1 regulates antigen-specific CD4⁺ T cell responses in the periphery. *J. Immunol.*, 179(1): 71-79.
180. Rodriguez, A.B., Pedrera, M.I., Barriga, C. (1996): In vivo effect of teicoplanin and vancomycin upon haemolytic and bactericidal activity of serum against *Staphylococcus aureus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 19(4): 283-288.
181. Rogers, L.B., Kaack, M.B., Henson, M.C., et al. (2005): Hematologic and lymphocyte immunophenotypic reference values for normal rhesus monkey (*Macaca mulatta*) umbilical cord blood; gravidity may play a role in study design. *J. Med. Primatol*, 34: 147-153.
182. Rosenfeld, I., Beath, O.A. (1964): *Selenium: Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition*. Acad. Press, New York, 1: 411s.
183. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., et al. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathion peroxidase. *Science*, 179: 588-590.
184. Roy, M., Kiremidjian-Schumacher, L., Wishe, H.I., et al. (1994): Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte

- proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol. Trace Elem. Res.*, 41: 103-114.
185. Roy, M., Kiremidjian-Schumacher, L., Wishe, H.I., et al. (1995): Supplementation with selenium restores age-related decline in immune cell function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 209: 369-375.
 186. Saalmüller, A., Bryant, J. (1994): Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43: 45-52.
 187. Saito, E., Bielski, B.H.J. (1961): The electron paramagnetic resonance spectrum of HO₂ radical in aqueous solution. *J. Chem. Soc.*, 83: 948-950.
 188. Saker, K.E., Allen, V.G., Kalnitsky, J., et al. (1998): Monocyte immune cell response and copper status in beef steers that grazed endophyte-infected tall fescue. *J. Anim. Sci.*, 76: 2694-2700.
 189. Sammin, D.J., Markey, B.K., Quinn, P.J., et al. (2006): Comparison of fetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydia abortus*. *J. Comp. Pathol.*, 135(2-3): 83-92.
 190. Samri, A., Goodall, R., Burton, C., et al. (2007): Three-year immune reconstitution in PI-sparing and PI-containing antiretroviral regimens in advanced HIV-1 disease. *Antivir Ther.*, 12(4): 553-558.
 191. Sarkar, S., Fox, D.A. (2007): Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56(3): 710-713.
 192. Shamberger, R.J. (1983): *Biochemistry of selenium*. Plenum Press, New York: 334s.
 193. Schenkel, H., Flachowsky, G. (2000): Zur Diskussion um Höchstwerte für Spurenelemente aus Sicht der Tierernährung. In: *Mengeln- und Spurenelemente*, Friedrich-Schiller-Univ., Jena, 20: 1018-1033.
 194. Schrauzer, G.N. (1998): Selenomethionine and selenium yeast: appropriate forms of selenium for use in infant formulas and nutritional supplements. *J. Med. Foods*, 1: 201-206.
 195. Schrauzer, G.N. (2000): Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.*, 130: 1653-1656.
 196. Schwarz, K., Foltz, C.M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 3292-3293.
 197. Smith, H.E., Jacobs, R.M., Smith, C. (1994): Flow cytometric analysis of ovine peripheral blood lymphocytes. *Can. J. Vet. Res.*, 58: 152-155.

198. Smith, K.L., Hogan, J.S., Weiss, W.P. (1997): Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.*, 75: 1659-1665.
199. Smyth, J.B., Wang, J.H., Barlow, R.M., et al. (1990): Experimental acute selenium intoxication in lambs. *J. Comp. Pathol.*, 102(2): 197-209.
200. Sova, Z., Bukvaj, J., Koudela, K., et al. (1990): *Fyziologie hospodářských zvířat*. SZN, Praha, 2: 469s.
201. Spallholz, J.E., Boylan, L.M., Larsen, H.S. (1990): Advances in understanding selenium's role in the immune system. *An. Acad. Sci.*, 587: 123-139.
202. Squadrito, G.L., Pryor, W.A. (1998): Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 25: 392-403.
203. Stabel, J.R., Nonnecke, B.J., Reinhardt, T.A. (1990): Effect of in vitro selenium supplementation on bovine lymphocyte proliferation. *Nutr. Res.*, 10: 1053-1059.
204. Stadtman, E.R. (2006): Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.*, 40: 1250-1258.
205. Steinbrenner, H., Alili, L., Bilgic, E., et al. (2006a): Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 40: 1513-1523.
206. Steinbrenner, H., Bilgic, E., Alili, L., et al. (2006b): Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic. Res.*, 40: 936-943.
207. Stites, D.P., Terr, A.I. (1994): *Základní a klinická imunologie*. Victoria Publishing, Praha, 1: 744s.
208. Stowe, H.D., Herdt, T.H. (1992): Clinical-Assessment of selenium status of livestock. *Journal of Animal Science*, 70: 3928-3933.
209. Sunde, R.A. (1994): Molecular biology of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 10: 451-478.
210. Surai, P. (2001): Organic selenium: benefits to animals and humans, a biochemist's view. In: T.P. Lyons, K.A. Jacques (Eds): *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium "Biotechnology in the feed industry"*, Nottingham University Press, Nottingham: 205-260.
211. Surai, P. (2006): *Selenium in nutrition and health*. Nottingham University Press, Nottingham, 1: 974s.

212. Surai, P.F., Cerolini, S., Wishart, G.J., et al. (1998): Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poult. Avian Biol. Rev.*, 9: 11-23.
213. Surai, P.F., Kutz, E., Wishart, G.J., et al. (1997): The relationship between the dietary provision of α -tokopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *J. Reprod. Fertil.*, 110: 47-51.
214. Šimek, M., Krása, A. (2007): Nedostatky v minerální výživě skotu a jejich eliminace. *Farmář, Profi Press, Praha*, 5: 35-38.
215. Štípek, S., Borovanský, J., Čejková, J., et al. (2000): Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada Publishing, Praha*: 314s.
216. Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., et al. (2000): Selenium in higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 401-432.
217. Thorp, B.H., Seneque, S., Staute, K. et al. (1991): Characterization and distribution of lymphocyte subsets in sheep hemal nodes. *Dev. Comp. Immunol.*, 15: 393-400.
218. Tizard, I.R. (2004): *Veterinary immunology*. Elsevier, USA, 7: 494s.
219. Trauslsen, H., Steinbrenner, H., Buchczyk, D.P., et al. (2004): Selenoprotein P protect low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radic. Res.*, 38: 123-128.
220. Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V., et al. (2003): *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, Praha, 4: 771s.
221. Turan, B., Hotomaroglu, O., Kilic, M., et al. (1999a): Cardiac dysfunction induced by low and high diet antioxidant levels comparing selenium and vitamin E in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 29: 142-150.
222. Turan, B., Saran, Y., Can, B., et al. (1999b): Effect of high dietary slenium on the ultrastructure of cardiac muscle cells in the rabbit. *Med. Sci. Res.*, 27: 795-799.
223. Turner, R.J., Finch, J.M. (1991): Selenium and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.*, 30: 275-285.
224. Turner, R.J., Wheatley, L.E., Beck, N.F.G. (1985): Stimulatory effects of selenium on mitogen responses in lambs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 8: 119-124.
225. Undewood, E.J., Suttle, N.F. (1999): Selenium. In: *Mineral nutrition of livestock*. 3rd ed. CABI Publishing, New York: 421-475.
226. Urban, T., Jarstrand, S. (1986): Selenium effects on human neutrophilic granulocyte function in vitro. *Immunopharmacology*, 12: 167-170.

227. Usmar, V.D., Halliwell, B. (1996): Blood radicals. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and vascular system. *Pharm. Res.* 13: 649-662.
228. Van Camp, W., Inzé, D., Van Montagu, M. (1997): The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free. Radic. Biol. Med.*, 23(3): 515-520.
229. Van Dael, P., Davidsson, L., Ziegler, E.E., et al. (2002): Comparison of selenite and selenate apparent absorption and retention in infants using stable isotope methodology. *Ped. Res.*, 51(1): 71-76.
230. Van Saun, R.J., Herdt, T.H., Stowe, H.D. (1989): Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. *J. Nutr.*, 119: 1156-1164.
231. Vega, L., Rodríguez-Sosa, M., García-Montalvo, E.A., et al. (2007): Non-optimal levels of dietary selenomethionine alter splenocyte response and modify oxidative stress markers in female mice. *Food Chem. Toxicol.*, 45(7): 1147-1153.
232. Vejčík, A., Frelich, J., Matoušek, V., et al. (2001): Chov hospodářských zvířat. ZF JU, České Budějovice, 1: 176s.
233. Vendeland, S.C., Beilstein, M.A., Chen, C.L. (1993): Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J. Biol. Chem.*, 268: 17103-17107.
234. Vodrážka, Z. (2002): *Biochemie. Academia, Praha*, 2: 191s.
235. Vrzgula, L., Augustinský, V., Šulík, F., et al. (1972): Prvý hromadný výskyt nutričnej svalovej degenerácie u mladého hovädzieho dobytku na Slovensku. *Veterinárství*, 22: 56-60.
236. Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, J., et al. (2002): A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science*, 298: 2392-2395.
237. Walport, M.J. (2001): Complement. *N. Engl. J. Med.*, 334: 1140-1144.
238. Weaver, C.T., Unanue, E.R. (1990): The costimulatory function of antigen presenting cells. *Immunol. Today*, 11: 49-55.
239. Whanger, P.D. (2000): Selenoprotein W: a review. *Cell Mol. Life Sci.*, 57: 1846-1852.
240. Whanger, P.D. (2001): Selenium and brain: a review. *Nutr. Neurosci.*, 4: 81-97.
241. Whist, S.K., Storset, A.K., Larsen, H.J. (2002): Functions of neutrophils in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86(3-4): 183-193.

242. White, K.L. Jr., Germolec, D.R., Booker, C.D., et al. (2005): Dietary methoxychlor exposure modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response and phenotypic marker expression in F0 and F1 generations of Sprague Dawley rats. *Toxicology*, 207(2): 271-281.
243. Williams, P.P. (1993): Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 57: 1-8.
244. Wolfram, S. (1999): Absorption and metabolisms of selenium: difference between inorganic and organic sources. In: Lyons, T. P., Jacques K. A. (Ed): *Biotechnology in the Feed industry*. Proc. of the 15th Annual Symposium, Nottingham University Press, Nottingham, UK: 547-566.
245. Wolfram, S., Berger, B., Grenacher, B., et al. (1989a): Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane. *J. Nutr.*, 119: 706-712.
246. Wolfram, S., Berger, B., Scharerr, E. (1989b): Transport of selenomethionine and methionine across the intestinal brush border membrane. In: *Selenium in biology & Medicine*, Proceedings of the 4th International Symposium on selenium in Biology and Medicine. (Ed.: A. Wendel), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 109-113.
247. www.google.com (Selenium)
248. www.pubmed.com (Selenium)
249. www.sinecearasy.cz (Chlorella)
250. www.wikipedia.org (Selenium)
251. Yager, M.J., Neiger, R.D., Holler, L., et al. (1998): The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10: 268-273.
252. Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., et al. (2007): Comparative analysis of naive and memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics. *Exp. Hematol.*, 35(6): 861-871.
253. Yamada, T., Onimatsu, H., Van Etten, J.T. (2006): Chlorella viruses. *Adv. Virus Res.*, 66: 293-336.
254. Yu, B.P. (1994): Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.

255. Yuben, P.M., Dorasamyb, T., Venketasamyb, S., et al. (2000): Correlation of CD4:CD8 ratio and tumour necrosis factor (TNF α) levels in induced sputum with bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis. *Thorax*, 55: 696-699.
256. Zhang, Y., Zhao, Y., Wang, J., et al. (2004): Effects of zinc, copper, and selenium on placental cadmium transport. *Biol. Trace Elem. Res.*, 102(1-3): 39-49.
257. Zhong, L., Arnér, E.S.J., Holmgren, A. (2000): Structure and mechanisms of mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97: 2521-2526.
258. Zöller, M. (1988): Tolerization during pregnancy: impact on the development of antigen-specific help and suppression. *Eur. J. Immunol.*, 18(12): 1937-1943.

10. PŘÍLOHY

Životopis	i
Seznam publikací	iii
Čísla a hmotnosti ovcí a jehňat	vi
Plánek pokusné stáje	xiii
Foto dokumentace	ix
Souhrnné tabulky	xi
Užitečné odkazy	