

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Vliv selenu na lymfatický systém králíků

Ing. Roman Konečný

2012

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Roman Konečný

Studijní program: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Název práce: Vliv selenu na lymfatický systém králíků

Školitel: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
ZF JU v Českých Budějovicích

Školitel specialista: prof. MVDr. František Jelínek, CSc. Dipl. ECVP
Veterinární histopatologická laboratoř Praha

Oponenti: prof. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.
ZF JU v Českých Budějovicích

MVDr. Petr Fictum, Ph.D.
VFU Brno

Ing. Petr Sláma, Ph.D.
MENDELU Brno

Obhajoba disertační práce se koná 12. 12. 2012 v místnosti vědecké rady ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 4 |
| 2 | CÍL PRÁCE..... | 4 |
| 3 | MATERIÁL A METODY | 4 |
| 3.1 | Metody zpracování vzorků biologického materiálu | 6 |
| 3.2 | Statistické zpracování dat | 8 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 8 |
| 4.1 | Živá hmotnost pokusných zvířat..... | 9 |
| 4.2 | Koncentrace selenu v krevním séru..... | 9 |
| 4.3 | Histologické nálezy v lymfatických orgánech..... | 10 |
| 4.3.1 | Histologické nálezy v mizních uzlinách..... | 10 |
| 4.3.2 | Histologické nálezy v Peyerových placích..... | 11 |
| 4.3.3 | Histologické nálezy v apendixu | 11 |
| 4.3.4 | Histologické nálezy ve slezině | 11 |
| 4.3.5 | Histologické nálezy v thymu | 12 |
| 4.4 | Imunohistochemické vyšetření | 13 |
| 4.5 | Relativní hmotnost sleziny pokusných králíků..... | 13 |
| 4.6 | Zastoupení leukocytů v krvi | 14 |
| 4.7 | Zastoupení lymfocytů a neutrofilů v krvi | 15 |
| 4.8 | Fagocytární aktivita | 17 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 17 |
| 6 | SUMMARY | 19 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 19 |
| 8 | SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ | 21 |

1 ÚVOD

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

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

2 CÍL PRÁCE

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

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

Práce zahrnuje následující dílčí cíle:

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

3 MATERIÁL A METODY

Experimenty

Byly uskutečněny dva devítitýdenní experimenty, v prvním experimentu byla použita anorganická forma, ve druhém organická forma selenu.

Odběr krve

Krev byla za účelem stanovení obsahu selenu v krevním séru, fagocytární aktivity a diferenciálního rozpočtu odebírána standardní technikou z *vena auricularis* v 0, 4 a 9 týdnu experimentu.

Zjišťování živé hmotnosti zvířat

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

Pokusná zvířata a ustájení

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

Tabulka 1 Průměrná živá hmotnost zvířat na začátku experimentu a obsah selenu v krmné dávce

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

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

Výživa experimentálních zvířat

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

V experimentu s anorganickou formou selenu byl používán Se ve formě seleničitanu sodného (Na_2SeO_3). V experimentu s organickou formou selenu byl selen podáván vázaný v řase rodu *Chlorella* (255 mg/kg sušiny) (Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR v Třeboni). Obsah selenu v komponentech krmné směsi byl 0,17 mg/kg sušiny. Voda a krmivo byly zvířatům k dispozici *ad libitum*.

Ukončení pokusu a odběr vzorků k histologickému a imunohistochemickému vyšetření

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

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

3.1 Metody zpracování vzorků biologického materiálu

Stanovení koncentrace selenu v krvi

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

Určení celkového počtu leukocytů

Celkový počet leukocytů byl stanoven na automatickém hematologickém analyzátoru Alvet 2000 (AL Systeme).

Určení fagocytární aktivity neutrofilů

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

Vyhodnocení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek

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

Vyhodnocení hmotnosti sleziny

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

Histologické a imunohistochemické vyšetření vzorků

Vzorky tkání odebrané k histologickému a imunohistochemickému vyšetření byly fixovány v 10% formalinu nebo v Davidsonově tekutině. Dále byly zpracovány běžnou histologickou technikou, obarveny hematoxylinem a eozinem a v indikovaných případech byla provedena PFAS reakce a barvení dle Ziehl-Neelsena. Pro stanovení CD79 buněk bylo využito křížové reaktivity primární monoklonální myší protilátky proti humánnímu CD79 α cy.

Imunohistochemické zpracování vzorků

Použité protilátky

Primární protilátka

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

Sekundární protilátka

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

Použité detekční systémy

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

Ředění primární protilátky

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

Použité pufrы

Citrátový pufr pH 6,0

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

Vlastní metodika imunohistochemických reakcí

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

Kontroly

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

Metody hodnocení histologických nálezů

Procentuální zastoupení CD79⁺ buněk

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

Histometrie

Stanovení metrických údajů bylo provedeno v pěti zorných polích u tří zvířat v každé pokusné skupině (Tabulka 2).

Tabulka 2 Hodnocení histologických nálezů (μm)

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

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

Celulizace

Stanovení celulizace bylo provedeno v ploše 1 mm^2 v pěti zorných polích u tří zvířat v každé skupině (Tabulka 3).

Tabulka 3 Hodnocení celulizace - počet buněk v $1 \mu\text{m}^2$

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

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

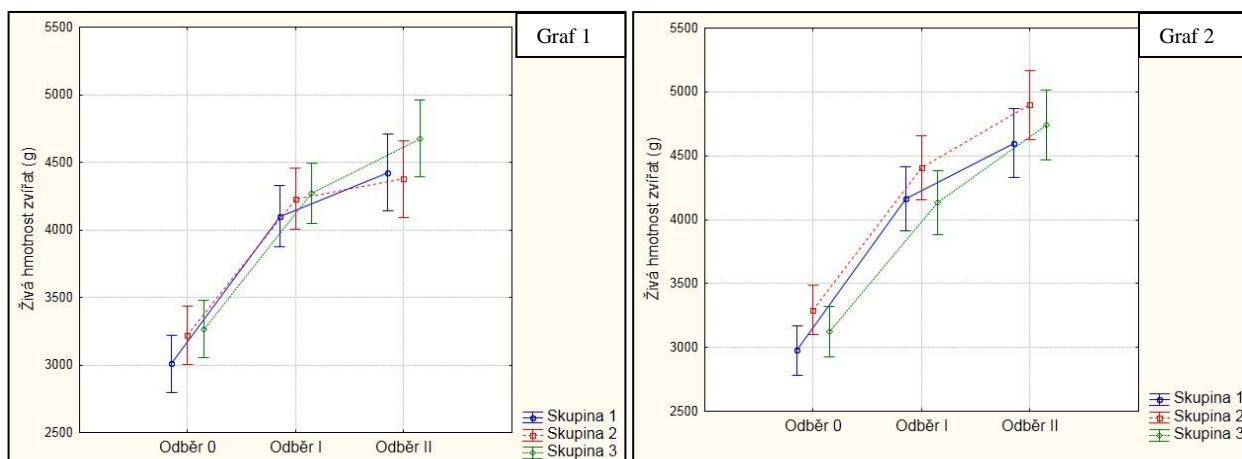
3.2 Statistické zpracování dat

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

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

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

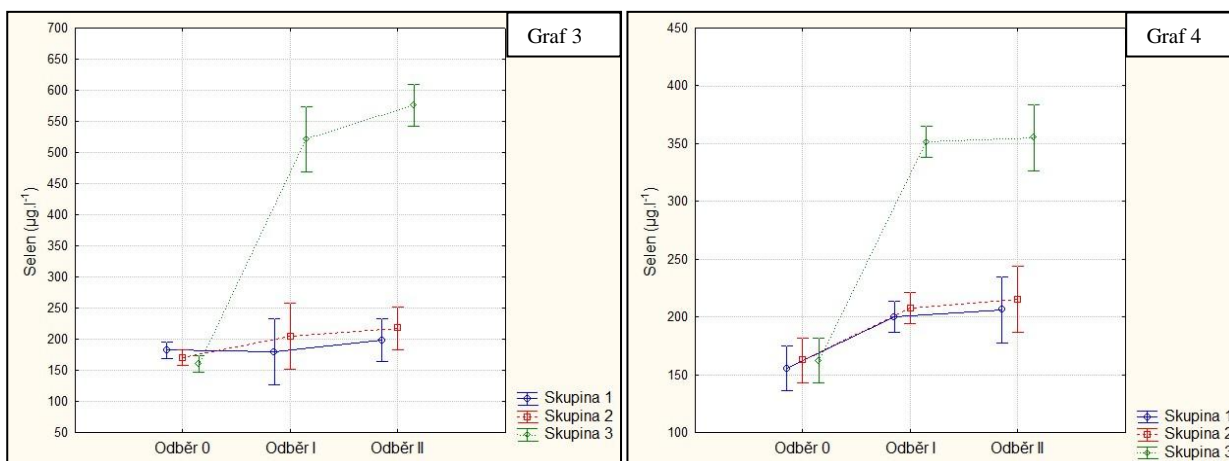
4.1 Živá hmotnost pokusných zvířat



Graf 1 Průměrná živá hmotnost králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 2 Průměrná živá hmotnost králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti).

V živé hmotnosti zvířat nebyl mezi jednotlivými skupinami prokázán statisticky významný rozdíl (Graf 1, 2). Podobné výsledky zaznamenali Turan et al. (1997) v experimentu s anorganickou formou Se, kdy byla králíkům po dobu 12-15-ti týdnů podávána Se deficitní dieta (9,8 µg/kg krmiva) a dieta s vysokým obsahem Se (4,2 mg/kg krmiva). Rovněž Muller et al. (2002) po 10-ti týdenní suplementaci králíků Se deficitní dietou (<0,030 mg Se/kg krmiva) a dietou se zvýšeným obsahem Se (0,40 mg/kg krmiva) nepozorovali statisticky významný rozdíl v živé hmotnosti králíků.

4.2 Koncentrace selenu v krevním séru



Graf 3 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 4 Průměrná koncentrace selenu v krevním séru králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti).

V experimentu s anorganickou formou selenu došlo u skupiny s nejvyšší dávkou (9 mg Se/kg sušiny krmiva) k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,05$) koncentrace selenu v krevním séru po prvních čtyřech týdnech pokusu (počáteční hodnota $160,08 \pm 11,79$ µg/l, po čtyřech týdnech $521,42 \pm 92,24$ µg/l). Prodloužení zvýšeného přísunu selenu o dalších pět týdnů již nevedlo k jeho významnému zvýšení v krevním séru ($576,13 \pm 55,07$ µg/l) (Graf 3).

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

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

U prasat při suplementaci jak organickou, tak anorganickou formou selenu (5; 10; 15 mg Se/kg krmiva) došlo k signifikantnímu zvýšení ($P < 0,01$) koncentrace selenu v krevní plazmě (Kim a Mahan, 2001). K podobným výsledkům dospěli také Ibeagha et al. (2009) v experimentu prováděném na kravách.

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

4.3 Histologické nálezy v lymfatických orgánech

4.3.1 Histologické nálezy v mízních uzlinách

Histologická stavba kůry povrchových (krčních a popliteálních) mízních uzlin často zcela neodpovídala uspořádání u domácích zvířat. V kompartmentech s vyvinutým parakortexem se nejednou vyskytovaly pouze primární nebo atrofické lymfatické noduly (LN), případně LN zcela absentovaly. Tento fenomén byl pozorován zejména v popliteálních mízních uzlinách skupiny s nejvyšší dávkou (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) organické formy selenu (tři králíci; 50 %). U čtyř zvířat (67 %) skupiny se suplementací 0,3 mg Se/kg sušiny krmiva byly některé kompartmenty popliteálních mízních uzlin tvořeny parakortexem s atrofickými nebo absentujícími LN a jiné naopak s LN a atrofickým nebo chybějícím parakortexem. Z uvedených nálezů by bylo možno usuzovat na deficienci koordinace buněčné a imunitní reakce. V některých povrchových mízních uzlinách byla patrná mírná hyperplazie LN a hyperplazie parakortexu, avšak nebyl patrný vztah mezi dávkou a formou selenu. Například v popliteálních mízních uzlinách králíků bez suplementace selenem se mírná hyperplazie LN vyskytovala u tří králíků (50 %), naproti tomu u zvířat suplementovaných selenem (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva) u dvou králíků (33 %). V experimentu s organickou formou selenu byla mírná hyperplazie LN pozorována pouze u jednoho králíka (17 %) dotovaného 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva. Hyperplazie parakortexu v krčních mízních uzlinách byla nejčastěji pozorována u skupiny suplementované 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva (tři králíci; 50 %). Z uvedených výsledků lze předpokládat, že se jednalo o nespecifickou antigenní stimulaci, protože v experimentu byla použita laboratorní zvířata z konvenčního chovu.

V povrchových mízních uzlinách králíků suplementovaných organickou formou selenu byl pozorován vztah mezi obsahem selenu v krmivu a celulizací a šíří medulárních trámčů. V popliteálních mízních uzlinách při zvyšujícím se obsahu selenu v krmivu byly častěji patrné úzké a slabě celulizované medulární trámce. Naproti tomu v krčních mízních uzlinách se vzrůstající dávkou selenu výskyt hustě celulizovaných medulárních trámčů klesal. Výskyt zúžených medulárních trámčů by mohl naznačovat sníženou imunitní transformaci v mízních uzlinách. Při suplementaci anorganické formy selenu nebyly tyto vztahy pozorovány.

V mezenterálních mízních uzlinách přispěla suplementace organické formy selenu ke zvýšení četnosti výskytu mírné hyperplazie LN. Podobně jako v povrchových mízních uzlinách byl také v mezenterálních mízních uzlinách pozorován vztah mezi celulizací a šíří

medulárních trámčů. Při zvyšující se dávce selenu se zvyšovala četnost výskytu úzkých medulárních trámčů a klesala silná celulizace medulárních trámčů. Při suplementaci anorganické formy selenu byly v mezenterálních mízních uzlinách častěji pozorovány makrofágy fagocytující pigment (MFP).

Abdo (1994) pozoroval u myši (B6C3F1) a potkanů (F344/N) suplementovaných vysokou dávkou selenu (32 mg Na₂SeO₃/l pitné vody) snížený počet lymfocytů v mízní uzlině a snížení velikosti LN. V našich experimentech jsme pozorovali při suplementaci organické formy selenu nezávisle na dávce atrofii LN a parakotexu, ale vždy pouze u jednoho zvířete z experimentální skupiny.

4.3.2 Histologické nálezy v Peyerových placích

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

Přítomnost MFP nebyla výrazně ovlivněna ani obsahem ani formou selenu v krmivu. V MFP byl prokázán zvýšený obsah lipopigmentů (ceroid/lipofuscin). Ve většině MFP lze pigment považovat za ceroid. Jeho přítomnost souvisí zejména s deficiencí vitamínu E a se zvýšeným příjmem nenasycených mastných kyselin. Ceroid je také spojován s oxidačním poškozením buněk (Sitte et al., 2000). Produkce reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) je považována za jeden z možných mechanismů toxického působení selenu (Spallholz, 1997). V našich experimentech nelze přítomnost ceroidu v MFP spojovat s toxickým působením selenu, neboť byl pozorován v MFP u zvířat bez rozdílu dávky selenu.

V Peyerových placích zvířat suplementovaných anorganickou formou selenu byl zjištěn určitý vztah mezi dávkou selenu a množstvím lymfocytů v epitelu dómu. Se vzrůstající dávkou selenu v krmivu rostl výskyt výrazné exocytózy lymfocytů do epitelu dómu. U organické formy selenu tento vztah pozorován nebyl. Tento nálezy nelze jednoznačně spojit se suplementací selenem. Depozita hyalinní substance byla v experimentu s anorganickou formou selenu pozorována u jednoho zvířete (17 %) skupiny přijímající selen (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva). V experimentu s organickou formou selenu se depozita hyalinní substance vyskytovala u jednoho zvířete (17 %) suplementovaného 0,15 mg Se/kg sušiny krmiva.

4.3.3 Histologické nálezy v apendixu

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

4.3.4 Histologické nálezy ve slezině

V našich experimentech nebyly prokázány jednoznačné vztahy mezi histologickou stavbou sleziny a formou či dávkou selenu. V experimentu s anorganickou formou selenu byl pozorován zvýšený výskyt střední hyperplazie periarterioálních lymfatických plášťů (PALP) u zvířat suplementovaných selenem (0,15 a 9 mg Se/kg sušiny krmiva). U organické formy selenu se vzrůstající dávkou (0,15; 0,3 a 4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) rostl výskyt střední

hyperplazie PALP. Dané výsledky by mohly poukazovat na pozitivní působení selenu na proliferaci T lymfocytů, kterou popisují autoři Hoffmann et al. (2010). V našem případě se však spíše jednalo o nespecifickou antigenní aktivaci.

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

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

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

4.3.5 Histologické nálezy v thymu

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

U experimentálních králíků suplementovaných vysokou dávkou anorganické formy selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) nebyly výše popisované léze pozorovány. Naše výsledky se shodují s autory O'Toolem a Raisbeckem (1995), kteří nezaznamenali při vysokých dávkách organické a anorganické formy selenu patologické změny v thymu. U zvířat suplementovaných organickou formou selenu v dávce 0,3 mg Se/kg sušiny krmiva jsme pozorovali v jednom případě (17 %) makrofágy fagocytující apoptotická tělíska (TBM), dále mírně hypocelulární kůru a dřev thymu. Při suplementaci vysoké dávky organické formy selenu (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) byly pozorovány TBM u dvou experimentálních zvířat (33 %) a u jednoho zvířete (17 %) mírně hypocelulární dřev thymu. Tyto nálezy nelze jednoznačně dát do souvislosti se suplementací selenem. TBM jsou běžně v thymu pozorovány (De Waal et al., 1997). Na druhé straně oxidační stres vyvolaný vysokými dávkami selenu je předpokládánou příčinou mitochondriálního poškození a zvýšení apoptózy buněk a také zvýšení počtu TBM (Kim et al., 2003; Elmore, 2006b).

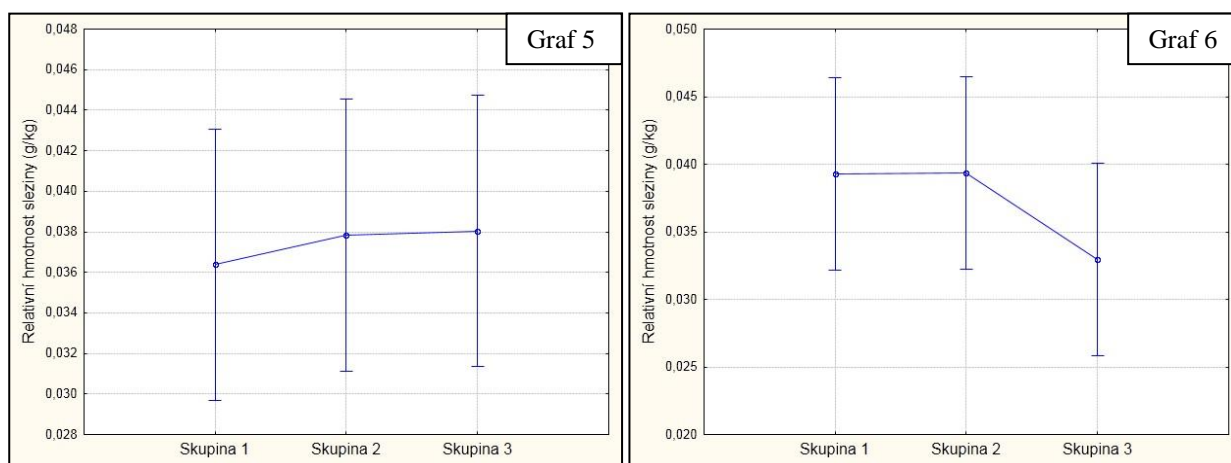
Peng et al. (2011a) pozorovali u kuřat dotovaných selen deficitní dietou lymfocytodepleci kůry a dřev thymu.

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

4.4 Imunohistochemické vyšetření

Pouze v oblasti dómu Peyerových plaků byl pozorován vztah mezi četností CD79⁺ buněk a dávkou selenu. Se zvyšující se dávkou selenu rostl počet CD79⁺ buněk v této oblasti zejména při suplementaci organické formy selenu. Tento nálezn by mohl nasvědčovat tomu, že při suplementaci organické formy selenu v dávce vyšší nežli je doporučena (0,15 mg Se/kg sušiny krmiva) dochází ke stimulaci transformace buněk B řady. Tento nálezn je však nespecifický, souvisí s nespecifickou antigenní stimulací. V dalších vyšetřovaných lymfatických orgánech nebyl pozorován jednoznačný vztah mezi dávkou a formou selenu a četností CD79⁺ buněk.

4.5 Relativní hmotnost sleziny pokusných králíků

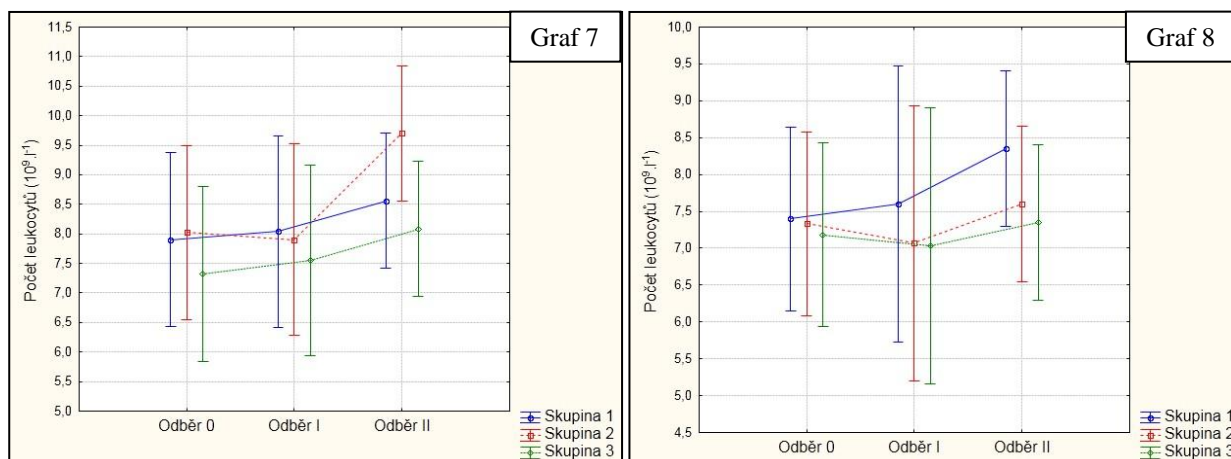


Graf 5 Průměrná relativní hmotnost sleziny králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval polehlivosti). Graf 6 Průměrná relativní hmotnost sleziny králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti).

Hmotnost sleziny je považována za citlivý parametr imunotoxicity (Elmore, 2006a). Podle Peng et al. (2011b) velmi vysoké či naopak velmi nízké dávky selenu v krmivu vedou ke snížení relativní hmotnosti sleziny. V našem experimentu s anorganickou formou selenu byla u pokusné skupiny s nejvyšším přísunem selenu (9 mg Se/kg sušiny krmiva) zaznamenána naopak nejvyšší relativní hmotnost sleziny (Graf 5) a v pokusu s organickou formou selenu jsme u skupiny s nejvyšší dávkou selenu (4,3 mg Se/kg sušiny krmiva) prokázali statisticky nevýznamný pokles relativní hmotnosti sleziny (Graf 6). Obdobně, sice malý, ale měřitelný úbytek hmotnosti sleziny zaznamenali u myši s příjmem 0,5 mg Se/kg krmiva Benko et al. (2012). Johnson et al. (2000) vliv zvýšených dávek organické formy selenu na relativní hmotnost sleziny myši nepotvrdili.

V našich experimentech nebylo zvýšení nebo snížení hmotnost sleziny doprovázeno histologickými změnami ve slezině.

4.6 Zastoupení leukocytů v krvi



Graf 7 Průměrný počet leukocytů v krvi králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchyškami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti). Graf 8 Průměrný počet leukocytů v krvi králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchyškami (průměr \pm 0,95 interval spolehlivosti).

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

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

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

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

Obdobně Písek et al. (2008) nezaznamenali markantní rozdíly v počtu leukocytů u jalových, březích nebo laktujících bahnic v případě diety obsahující v 1 kg sušiny 0,16 mg Se v organické nebo anorganické formě.

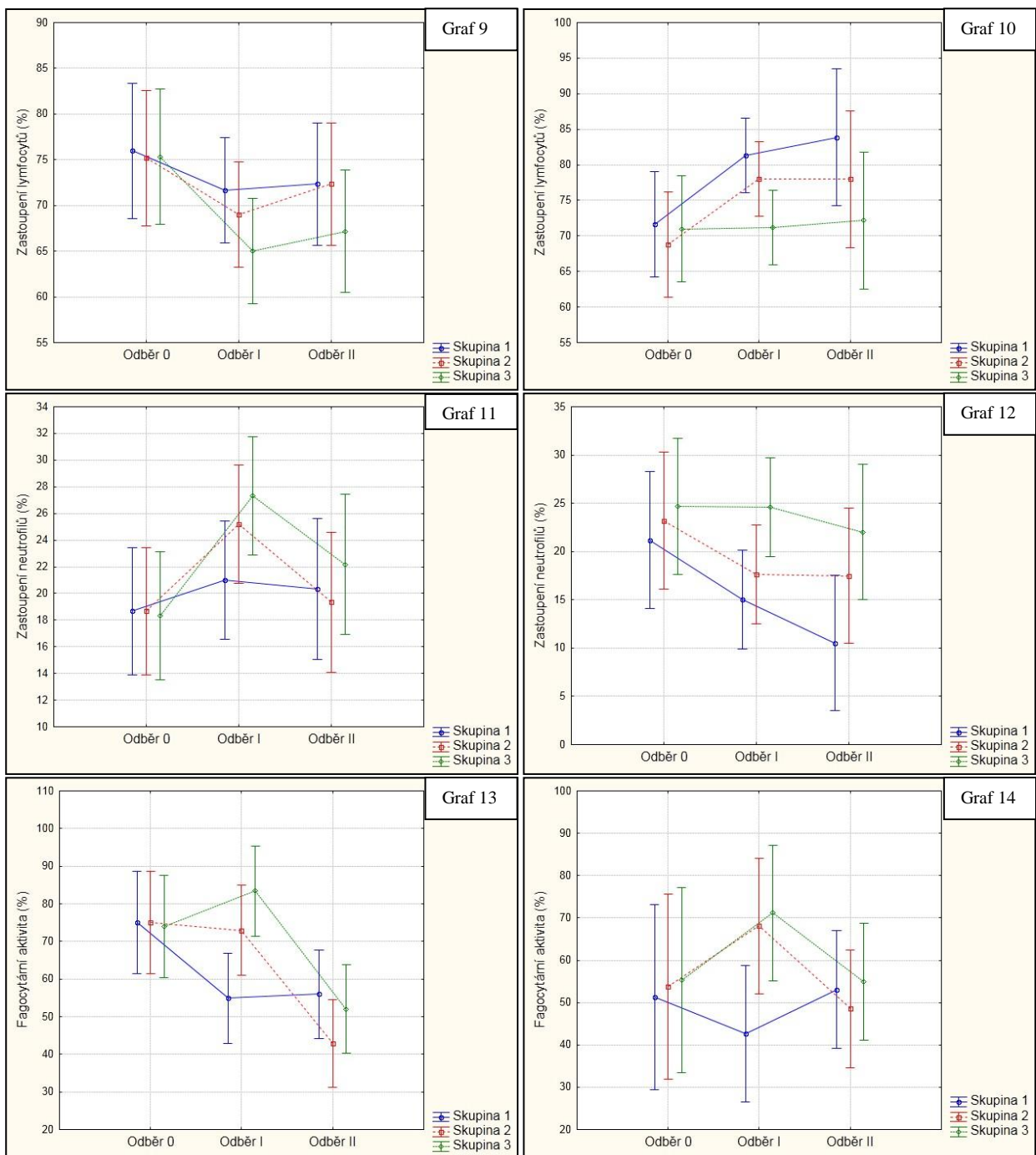
4.7 Zastoupení lymfocytů a neutrofilů v krvi

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

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

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

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



Graf 9 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval polehlivosti). Graf 10 Průměrné zastoupení lymfocytů v krvi králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 11 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi králíků suplementovaných anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 12 Průměrné zastoupení neutrofilů v krvi králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 13 Průměrná fagocytární aktivita neutrofilů králíků suplementovaných s anorganickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti). Graf 14 Průměrná fagocytární aktivita neutrofilů králíků suplementovaných organickou formou selenu s odchylkami (průměr ± 0,95 interval spolehlivosti).

4.8 Fagocytární aktivita

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

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

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

5 ZÁVĚR

Koncentrace selenu v krevním séru

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

Živá hmotnost zvířat

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

Histologická stavba lymfatických orgánů

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

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

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

V popliteálních a mezenterálních mízních uzlinách bylo při suplementaci organické formy selenu v souvislosti se zvyšující se dávkou pozorována vyšší četnost zúžených, níže

celulizovaných medulárních trámců. Tento nálezn by mohl naznačovat negativní dopad vyšších dávek selenu na transformaci buněk v mízních uzlinách.

Forma ani dávka selenu neměla vliv na strukturu thymu.

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

Imunohistochemické vyšetření

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

Zastoupení leukocytů

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

Fagocytární aktivita

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

Hmotnost sleziny

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

Zastoupení lymfocytů a neutrofilů

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

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

Pro další výzkum doporučujeme:

Vzhledem k negativním nálezům v histologické stavbě lymfatických orgánů při daných dávkách selenu, doporučujeme dále se zaměřit na stanovení počtu buněk imunitního systému v buněčné suspenzi lymfatických orgánů za použití průtokové cytometrie. Průtokovou cytometrií by bylo rovněž možno sledovat jednotlivé populace a subpopulace lymfocytů v krvi v průběhu experimentu.

Vzhledem k tomu, že se nepotvrdil účinek různých forem a dávek selenu v rozmezí 0,15 - 9 mg Se/kg sušiny krmné dávky, doporučujeme při studii vlivu selenu na imunitní

system králíků vyšší dávky 10-15mg Se/kg sušiny a do pokusu zařadit více experimentálních zvířat.

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

6 SUMMARY

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

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

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdo, M., K. (1994):** NTP Toxicity Studies of Sodium Selenate and Sodium Selenite (CAS Nos. 13410-01-0 and 10102-18-8) Administered in Drinking Water to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser*, 38, 1-55.
- Boyne, R., Arthur, J. R. (1979):** Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J Comp Pathol*, 89, 151-158.
- De Waal, E. J., Schuurman, H. J., Van Loveren, H., Vos, J. G. (1997):** Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(tri-n-butyltin) oxide and cyclosporine on thymus histophysiology. *Crit Rev Toxicol*, 27, 381-430.
- Elmore, S. A. (2006a):** Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 34, 648-655.
- Elmore, S. A. (2006b):** Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol*, 34, 656-665.
- Felix, K., Gerstmeier, S., Kyriakopoulos, A., Howard, O. M., Dong, H. F., Eckhaus, M., Behne, D., Bornkamm, G. W., Janz, S. (2004):** Selenium deficiency abrogates inflammation-dependent plasma cell tumors in mice. *Cancer Res*, 64, 2910-2917.
- Green, D. E., Albers, P. H. (1997):** Diagnostic criteria for selenium toxicosis in aquatic birds: histologic lesions. *J Wildl Dis*, 33, 385-404.
- Hawkes, W. C., Kelley, D. S., Taylor, P. C. (2001):** The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. *Biol Trace Elem Res*, 81, 189-213.

- Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., Shafer, L. A., Dow, S., Berry, M. J., Hoffmann, P. R. (2010):** Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4⁺ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J Nutr*, 140, 1155-1161.
- Hu, M. L., Chung, C., Spallholz, J. E. (1984):** Hematologic data of selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Inorg Biochem*, 22, 165-173.
- Ibeagha, A. E., Ibeagha-Awemu, E. M., Mehrzad, J., Baurhoo, B., Kgwatalala, P., Zhao, X. (2009):** The effect of selenium sources and supplementation on neutrophil functions in dairy cows. *Animal*, 3, 1037-1043.
- 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.
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. (2001):** Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*, 79, 942-948.
- Kvíčala, J. (2003):** Zvýšení příjmu mikronutrientu selenu - utopie, fikce, prozřetelnost či nutnost? - I. část. *Interní medicína pro praxi*, 5, 295-300.
- Kvíčala, J., Zamrazil, V., Soutorová, M., Tomáška, F. (1995):** Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst*, 120, 959-965.
- Muller, A. S., Pallauf, J., Most, E. (2002):** Parameters of dietary selenium and vitamin E deficiency in growing rabbits. *J Trace Elem Med Biol*, 16, 47-55.
- O'Toole, D., Raisbeck, M. F. (1995):** Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest*, 7, 364-373.
- Peng, X., Cui, Y., Cui, W., Deng, J. L., Cui, H. M. (2009):** The Decrease of Relative Weight, Lesions, and Apoptosis of Bursa of Fabricius Induced by Excess Dietary Selenium in Chickens. *Biol Trace Elem Res*, 131, 33-42.
- Peng, X., Cui, H., Cui, Y., Deng, J., Zuo, Z., Fang, J. (2011a):** Lesions of thymus and decreased percentages of the peripheral blood T-cell subsets in chickens fed on diets excess in selenium. *Hum Exp Toxicol*, 30, 1972-1978.
- Peng, X., Cui, H., Deng, J., Zuo, Z., Lai, W. (2011b):** Histological lesion of spleen and inhibition of splenocyte proliferation in broilers fed on diets excess in selenium. *Biol Trace Elem Res*, 140, 66-72.
- Peng, X., Cui, Y., Cui, W., Deng, J., Cui, H., Yang, F. (2011c):** The cell cycle arrest and apoptosis of bursa of Fabricius induced by low selenium in chickens. *Biol Trace Elem Res*, 139, 32-40.
- Peng, X., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Pan, K., Lai, W., Zhou, Y. (2012):** Low selenium diet alters cell cycle phase, apoptotic population and modifies oxidative stress markers of spleens in broilers. *Biol Trace Elem Res*, 148, 182-186.
- Pisek, L., Travnicek, J., Salat, J., Kroupova, V., Soch, M. (2008):** Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. *Vet Med Czech*, 53, 255-259.
- Rampal, S., Kumar, R., Randhawa, C. S., Sood, N. (2008):** Maturation arrest of neutrophils-a possible reason for the leucopenia in sodium selenite induced sub-chronic selenosis in cow calves. *Environ Toxicol Pharmacol*, 25, 39-42.
- Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W. D., Von Zglinicki, T., Davies, K. J. (2000):** Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J*, 14, 1490-1498.
- Spallholz, J. E. (1997):** Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci*, 10, 260-270.

- Tiwary, A. K., Stegelmeier, B. L., Panter, K. E., James, L. F., Hall, J. O. (2006):** Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. *J Vet Diagn Invest*, 18, 61-70.
- Turan, B., Zaloglu, N., Koc, E., Saran, Y., Akkas, N. (1997):** Dietary selenium- and vitamin E-induced alterations in some rabbit tissues. *Biol Trace Elem Res*, 58, 237-253.
- Zimmerman, K. L., Moore, D. M., Smith, S. A. (2010):** Hematology of Laboratory Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*). In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, s. 862-869. ISBN 978-0-8138-1798-9.

8 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace v časopisech s IF:

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

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

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

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

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

Publikace v odborných recenzovaných časopisech:

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

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

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

Certifikované metodiky:

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