

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biologie**

**Vztah rychlosti metabolismu  
a frekvence nezralých erytrocytů  
v ptačí krvi**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Tomáš Vrkoslav  
Vedoucí práce: doc. RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.  
Studijní program: B 1501 Biologie  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Hradec Králové  
2021

## Zadání diplomové práce

**Autor:** Bc. Tomáš Vrkoslav

Studium: S17BI028NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

**Název diplomové práce:** **Vztah rychlosti metabolismu a frekvence nezralých erytrocytů v ptačí krvi**

Název diplomové práce AJ: **The relationship between metabolic rate and the frequency of immature erythrocytes in bird blood**

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Z dosud dostupné nepřímé evidence vyplývá, že křevetvorba u ptáků reflektuje rychlost metabolismu. Cílem navrženého diplomového projektu je na základě korelačních dat ověřit tento předpoklad. Za použití krevních nátěrů získaných od spolupracující skupiny prof. Mariusz Cichoña student ověří vztah mezi rychlostí bazálního metabolismu a frekvencí nezralých erytrocytů v ptačí krvi. Nezralé erytrocyty se do krve ptáků uvolňují i u klinicky zdravých jedinců a to patrně v odpovědi na aktuální metabolické potřeby. Krevní nátěry pocházejí z pokusů prof. Cichoña na zebříčkách pestrých (*Taenipygia guttata*) a sýkorách koňadrách (*Parus major*), při kterých byla měřena rychlost bazálního metabolismu. Frekvenci nezralých erytrocytů stanoví student, který také ve své práci statisticky zhodnotí získaná data a interpretuje výsledky.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Oponent: Ing. Petra Bauerová, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 6.1.2018

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně. Veškeré použité podklady, ze kterých jsem čerpal informace, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a citovány v textu podle normy ČSN ISO 690.

V Hradci Králové dne 11. 1. 2021

.....

Bc. Tomáš Vrkoslav

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat doc. RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání diplomové práce.

# **Zadání Diplomové práce**

## **Bibliografická identifikace**

Název závěrečné práce: Vztah rychlosti metabolismu  
a frekvence nezralých erytrocytů v ptačí krvi

Název závěrečné práce AJ: Association between metabolic rate  
and frequency of immature erythrocytes in abian blood

Garantující pracoviště: Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta  
Katedra biologie

Autor: Bc. Tomáš Vrkoslav

Studijní program: B 1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Michal Andreas, Ph.D.

Oponent: Ing. Petra Baurová, Ph. D.

Datum zadání závěrečné práce: 6. 1. 2018

Datum odevzdání závěrečné práce: 11. 1. 2021

# Abstrakt

Krvetvorba a metabolismus u ptáků jsou důležité faktory, které mají vliv na přežití těchto živočišných druhů v různých životních prostředích a při změnách vnějších podmínek, které v současné době pozorujeme. Důležitou otázkou bude též jejich vzájemný vztah. Dostupná literatura a výzkum naznačují, že by krvetvorba u ptáků mohla reflektovat rychlost jejich metabolismu. Cílem diplomového projektu bylo na základě korelačních dat testovat tento předpoklad.

Na základě spolupráce s Jagellonskou univerzitou v polském Krakově, konkrétně se skupinou prof. Mariusze Cichońa, která měřila rychlost bazálního metabolismu u zebřiček pestrých (*Taeniopygia guttata*), byly získány vzorky krve těchto ptáků. Student ověřoval vztah mezi rychlostí bazálního metabolismu a frekvencí nezralých erytrocytů. V první fázi stanovil frekvenci nezralých erytrocytů, následně výsledky porovnal s rychlostí bazálního metabolismu, statisticky zhodnotil získaná data a provedl interpretaci výsledků.

Student nedospěl k jednoznačným výsledkům, zda existuje vazba mezi množstvím nezralých erytrocytů v krvi zkoumaných ptáků a rychlostí jejich metabolismu, tento vztah se ukázal jako slabý, neprůkazný.

Klíčová slova: frekvence nezralých erytrocytů, rychlost bazálního metabolismu, BMR, erytropoeza

## Abstract

Blood-production and bird metabolism are important factors that have an effect on survival of these animal species in different environments and upon changes of outer conditions which we observe nowadays. The important question is also their mutual relation. The available literature and research indicate that the bird blood-production could reflect the speed of their metabolism. Target of the diploma project was to test this premise based on correlation data.

Based on cooperation with Professor Mariusz Cichoń's group at the Jagellonian university in Krakow Poland who measured the speed of basal metabolism of "zebra finch" (*Taeniopygia guttata*) were obtained blood samples of these birds. A student checked the link between the speed of basal metabolism and a frequency of immature erythrocytes. In the first phase he had established a frequency of immature erythrocytes, following with the results which he compared with the speed of basal metabolism, statistically marked the obtained data and executed interpretation of the outcome.

Student did not come to the definite results whether there is an existing link between the frequency of immature erythrocytes in bird's examined blood and a pace of their metabolism. This relation was shown as weak and inconclusive.

Key words: frequency of immature erythrocytes, speed of basal metabolism, BMR, erythropoiesis

# OBSAH

Úvod .....	8
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>9</b>
1.1 Zebříčka pestrá ( <i>Taeniopygia guttata</i> ) jako modelový druh .....	9
1.2 Endotermie u ptáků .....	11
1.3 Bazální rychlost metabolismu (BMR) .....	12
1.3.1 Faktory ovlivňující BMR .....	14
1.4 Krev ptáků .....	17
1.4.1 Buněčné složení krve ptáků .....	17
1.4.2 Odběr vzorků krve, injekce a následné ošetření .....	18
1.4.3 Tvorba krevního roztěru a jeho vyhodnocení .....	18
1.4.4 Erytrocyty – červené krvinky .....	19
1.4.5 Trombocyty .....	25
1.4.6 Leukocyty – bílé krvinky .....	26
1.4.7 Anémie .....	28
<b>2 Praktická část .....</b>	<b>31</b>
2.1 Metodika .....	31
2.1.1 Postup měření BMR u zebříček pestrých .....	31
2.1.2 Odběr krevních vzorků .....	32
2.1.3 Vyhodnocení vzorků .....	33
<b>3 Výsledky .....</b>	<b>38</b>
<b>4 Diskuse .....</b>	<b>42</b>
<b>5 Závěr.....</b>	<b>44</b>
<b>6 Seznam použité literatury .....</b>	<b>46</b>
<b>7 Přílohy.....</b>	<b>53</b>



# Úvod

Biologové se zabývají termoregulačními vlastnostmi ptáků v horkých pouštích více než 60 let. Toto prostředí vytváří extrémní podmínky způsobené nedostatkem zdrojů pro organismus, a proto umožňuje určit limity ptačích druhů. Zkoumají se informace o termoregulačním výkonu, včetně změn v metabolismu, a tím i případných změnách v počtu krevních buněk. Výzkum přispívá k pochopení tolerance této skupiny organismů ke změně klimatu, což se považuje za aktuální téma současnosti. Studium zaměřené na metabolické hodnoty u jedinců přímo v terénu je velmi náročné kvůli nesrovnatelným podmínkám, proto je většina výzkumů prováděna v laboratoři, kde jsou hodnoty lépe kontrolovatelné. (Smith et al., 2017)

**Tato diplomová práce se věnuje výše zmíněné tematice a jejím cílem bylo testovat hypotézu, že rychlost metabolismu u ptáků souvisí s množstvím nezralých erytrocytů.** Na začátku práce bylo potřeba provést analýzu krevních vzorků zebřiček pestrých (*Taenipygia guttata*). Zjišťovali jsme množství krevních buněk, z nichž nás hlavně zajímaly imaturní erytrocyty. Následně jsme tyto hodnoty porovnali s daty, ke kterým dospěli vědci na přírodovědecké fakultě Jagelonské univerzity v Krakově, konkrétně s hodnotami rychlosti bazálního metabolismu. Byla tak porovnána korelační data nezralých erytrocytů v krvi ptáků s jejich hodnotou bazálního metabolismu, srovnávali jsme vzájemný vztah dvou veličin. Snažili jsme se dokázat, že obě hodnoty na sobě závisí. Nulovou hypotézu jsme si stanovili tak, že rychlost metabolismu ptáků neovlivňuje erytrocyty v krvi.

Toto téma jsem si vybral z dlouhodobého zájmu o ornitologii a rozšíření znalostí v daném oboru. Proto jsem přijal nabídku spolupráce s katedrou zoologie na Karlově univerzitě v Praze, kde proběhl výzkum zabývající se vztahem metabolismu k vývoji krevních buněk u ptáků, konkrétně u zebřiček pestrých.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*) jako modelový druh

Při pokusech profesora Cichoña byla měřena rychlost bazálního metabolismu na zebříčkách pestrých, (*Taeniopygia guttata*) (Vieillot, 1817). Na úvod představuji tohoto pěvce a vysvětluji důvody, proč právě on byl vybrán k těmto biologickým pokusům.



**Obrázek 1:** Modelový druh: zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*)  
(zdroj: <https://ebird.org/species/zebfin2?siteLanguage=cs>)

### **Taxonomické zařazení:**

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: strunatci (*Chordata*)

Třída: ptáci (*Aves*)

Řád: pěvci (*Passeriformes*)

Čeleď: astrildovití (*Estrildidae*)

Rod: zebříčka (*Taeniopygia*)

Druh: zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*)

Velikost: délka 100 až 110 mm, křídlo 50 až 55 mm, ocas 30 až 35 mm

Zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*) patří do čeledi astrildovití a vyskytuje se běžně na celém území Austrálie a v jižní části Indonésie. Jsou známy umělé populace, jež unikly z klecových chovů ve Spojených státech amerických (Kalifornie, Oregon) a v Evropě (Portugalsko). Tento druh obvykle přebývá v keřích, husté i řídké vege-

taci v relativně otevřených oblastech. Rychle se přizpůsobil člověku. Jedná se o zcela běžný druh, který není v žádných částech světa předmětem ochrany. V divočině často migrují na velké vzdálenosti. (Griffith and Buchanan, 2010; Zann, 1996)

Zebřičky pestré se staly modelovým typem pro mnoho druhů biologických výzkumů, ať už ve volné přírodě, tak v zajetí. Důvodem je jejich snadný chov a rychlé dospívání do reprodukčního věku. Tito ptáci vytvářejí složité vokální prvky a jsou dobrým modelovým organismem při neuroanatomii a behaviorálních procesech při učení těchto dovedností (Boumans et al., 2008).

Jedním z nejatraktivnějších výzkumů, prováděných na tomto druhu, je pozorování jejich sexuálního výběru (Rutstein et al., 2007; Swaddle, 1996; Swaddle and Cuthill, 1994). Dále jsou zebřičky zkoumány v oblasti toxikologie. V tomto případě bývají jedinci exponováni toxickým látkám jako PCB apod. a vyhodnocován jejich dopad na výslednou reprodukci (Whitney a Cristol., 2017). Z mnoha dalších výzkumů lze uvést, jak na ně působí smyslové stresory, např. hluk, světlo a teplota (Andrew et al., 2017; Potvin et al., 2016). Z genetického hlediska byl genom tohoto ptačího druhu publikován už v roce 2008 jako druhý, hned po kuru domácím (*Gallus gallus domesticus*) (Backstroem et al., 2008; Warren et al., 2010).

Pohlavní dimorfismus není vcelku moc výrazný. Samci se pouze odlišují od samic zabarvením zobáku (nápadná červená) a také výrazným oranžovým zbarvením kolem očí. Výrazným znakem je zpěv, samci jsou schopni zpívat dlouhé a komplikované skladby, kdežto u samic tomu tak není. Obě pohlaví spolu mohou velice dobře komunikovat a vytváří velké spektrum zvuků, například při výskytu predátorských hrozeb, poplachů, teritoriální obrany a také při mezipárové komunikaci. Jejich hlasový repertoár je díky dlouhodobému výzkumu velice dobře pochopen. (Patterson and Fee, 2015)

Tento pták se v přírodě může dožít až pěti let. V zajetí je jeho průměrná délka života mezi 8 až 10 lety, ale není neobvyklé, že dosáhne věku 12 let. Jedná se převážně o semenožravý druh, nepohrdnou však ani ovocem či zeleninou, a to jak v přírodě, tak v zajetí. Chovatelé je nejčastěji krmí směsí prosa doplněné o čerstvou zeleninu a ovoce. Potrava obohacená o bílkoviny a vápník podporuje u jedinců snášení vajec. (Příhoda, 2013)

V přírodě je doba hnízdění ovlivňována nepředvídatelně silnými dešti. Zebřičky jsou proto fyziologicky připraveny tak, aby se mohly rozmnožovat v kterémkoliv ročním období. To znamená, že ptáci mohou být snadno udržováni na dlouhodobých fotoperiodách s nedostatečným jídlem a vodou, aby v zajetí mohli zahrnout kdykoliv je potřeba. Tato fyziologická vlastnost přispěla k oblibě zebřiček v behaviorálních

studiích, protože není nutné přizpůsobovat výzkum hnízdícímu období ptáků. Ptáci jsou do značné míry připraveni se zahnídit kdykoliv. (Griffith and Buchanan, 2010)

Námluvy jsou značně rituální, protahování krku, kroucení těla, poskakování, švihání ocasu a specifické zvukové projevy. Díky tomu, že námluvy probíhají v zajetí stejně jako ve volné přírodě, jsou tyto znaky dobře zdokumentované. Z intenzity tohoto chování lze i s určitou přesností odhadnout, zda párování proběhne úspěšně. (Holveck and Riebel, 2007; Rutstein et al., 2007)

Zebřičky mohou hnízdit v širokém spektru biotopů, od přírodních dutin ke keřům, roštím a byly zaznamenány případy i v termištích. Divoké populace mohou hnízdit i v umělých hnízdních boxech. Hnízda si nejčastěji staví ze sušených trav, tkaných do těsných a klenutých misek. Zebřičky se běžně rozmnožují v nezávislých koloniích při proměnlivé hustotě populace, takže chov ptáků ve voliérách a klecích v malých skupinkách může představovat adekvátní podobnost s volnou přírodou. Tento druh tvoří páry na celý život a zřídka jsou viděni po spárování jako jednotlivci. Často však páry opouštějí své hejno. (McCowan et al., 2015)

Samička snáší 3 až 12 vajec, obvykle jich je ale 5 nebo 6. Tato vejce se líhnou po 14 až 16 dnech a kuřata jsou krmena oběma rodiči po dobu 3 až 4 týdnů. Po opuštění hnízda jsou mláďata závislá na rodičích. Do nezávislého stavu na rodičích se samci dostanou po 70 dnech od vylíhnutí, samice po 100 dnech. Pohlavní dospělost nastává u samců 8 až 10 týdnů po opuštění hnízda. Díky relativně rychlému dospívání je tento druh schopný dosáhnout značné populace v relativně krátké době, zejména pokud mají v zajetí ideální podmínky, jako je dostatek vody, potravy, materiálu pro tvorbu hnízd a upravený fotoperiodismus. (Zann, 1996)

Existují dva běžně uznávané poddruhy. *Taeniopygia guttata guttata* se nachází v Indonésii a v pobřežních oblastech Austrálie a je poněkud menší a postrádá některé ze samčích vzorů pruhování krku. *Taeniopygia guttata castanotis* je mnohem běžnější na australském kontinentu. (Zann, 1996)

## 1.2 Endotermie u ptáků

Podle schopnosti regulovat svoji tělesnou teplotu existují základní typy živočichů: poikilotermní, homoiotermní, ektotermní a endotermní. Poikilotermním organismům teplota těla kolísá s teplotou okolí a homoiotermní zachovávají stálou tělesnou teplotu (Hoffmann et al., 2013). Ektodermové mají organismus s tělesnou teplotou, která závisí na vnějších zdrojích tepla (přímo nebo nepřímo ze slunce) a aktivita této skupiny roste se zvyšující se teplotou. Endotermní organismy mají tělesnou teplotu,

která závisí hlavně na vnitřních metabolických procesech. (McCafferty et al., 2017)

K **endotermním živočichům** patří savci (teplota 26–38 °C) a ptáci (34–44 °C). Ptáci jsou dokonalá endotermní skupina a mnozí z nich, zejména zpěvní ptáci, udržují nejvyšší tělesné teploty a rychlost metabolismu ze všech čtyřnožců (*tetrapoda*). Fosilní nálezy naznačují, že tento evoluční znak se vyvinul již před 60 milióny lety (Carroll, 1988). Některé teorie naznačují, že už se tato schopnost mohla vyvinout mnohem dříve u některých skupin savců a nelétavých ptáků před více než 150 milióny lety (Legendre and Davesne, 2020).

Tělní teplota endotermních živočichů slabě kolísá během dne až o 2 °C. Důležitým aspektem je fyziologický stav, díky kterému dochází k regulaci tělní teploty, která je většinou vyšší než teplota prostředí. Ke komplexní kontrole tělesné teploty v endotermách dochází prostřednictvím autonomní regulace průtoku krve v kombinaci s řadou procesů, včetně třesové a netřesové termogeneze, dýchání, pocení a řady termoregulačního chování, např. slunění, pobyt ve stínu (Yahav, 2015).

Výhodou endotermních živočichů je to, že jejich vnitřní teplota organismu je nezávislá na okolí a tím mají možnost aktivity i za teplotně nepříznivých podmínek, např. v noci nebo v zimě. Dále mají vytrvalost pohybu díky výkonnému aerobnímu metabolismu, zvýšená reprodukční rychlost a populační růst. Mezi nevýhody pak patří energetické nároky. Teplokrevní mají 4 až 10krát vyšší klidový metabolismus než studenokrevní o stejné hmotnosti, hlavně malá zvířata mají nepříznivý poměr povrchu a objemu těla a mají omezenou morfologii těla. Z toho plyne, že tvar těla bude vždy u endotermů zavalitější s menší celkovou plochou oproti ektodermům (Clarke and Pörtner, 2010).

### 1.3 Bazální rychlost metabolismu (BMR)

Metabolismus (z řec. *metabolē* – změna, přeměna) jsou všechny energetické a chemické přeměny, které probíhají v organismu po přijetí potravy do organismu. Zahrnují všechny enzymové reakce, které vedou k přeměně látek a energií v buňkách a v živých organismech. (Kittnar, 2011)

Měření metabolických rychlostí poskytuje cenné informace o fyziologické výkonnosti organismu v konkrétním prostředí a nabízí univerzální metriku pro srovnání taxonů. (Speakman and Krol, 2010)

Energetický výdej (EE = energy expenditure) organismu můžeme definovat jako energii, která je potřebná k udržení základních životních pochodů v organismu a jeho přežití. Dal by se rozdělit na základní výdejové části, energii potřebnou k práci, ter-

moregulaci, vydanou ve formě tepla po příjmu potravy (TEF – termic effect of food) a energii, která je definovaná jako bazální rychlost metabolismu (Holeček, 2006).

### **EE = BMR + TEF + termoregulace + práce**

Bazální metabolismus (BMR) je minimální míra energetického výdeje normo-termních homeoterm za termoneutrálních a postabsorpčních podmínek v neaktivní fázi cirkadiálního cyklu (McNab, 1997). Tato hodnota bývá až 63 % celkového energetické výdeje (McNab, 2019). Jejím hlavním určujícím činitelem je tělesná hmotnost, ale BMR také koreluje s řadou behaviorálních (způsob získávání potravy, chování, migrační tendence, reprodukční výkon) a ekologických (zeměpisná šířka, klima, stanoviště, roční období, teplota, srážky, produktivita ekosystému) faktorů (Gutiérrez, 2012; McNab, 2012).

U savců se BMR nezávisle na hmotnosti zvyšuje, když je podíl svalové hmoty větší než 40 %, pak je BMR  $\geq$  100 % odhadované hodnoty vypočítané z tělesné hodnoty. Savci se svalovými hodnotami  $<$  30 % tělesné hmotnosti mají nižší BMR, mají sníženou schopnost regulace tělesné teploty a často mají sníženou úroveň aktivity. U ptáků je to překvapivě naopak. Při svalovém podílu  $<$  42 % tělesné hmotnosti mají ptáci tělesnou teplotu a bazální rychlost vyšší než savci se stejným svalovým poměrem. Jejich vysoké metabolické hodnoty jsou způsobeny vysokou tepovou frekvencí, z toho vyplývá vysoký průtok krve a zvýšená činnost mitochondrií ve svalech. Vše je přizpůsobeno k jedinému účelu, letu. Potvrzuje to i fakt, že podobně jsou na tom netopýři, kteří mají stejnou schopnost letu. Transport kyslíku do prsních svalů ptáků je usnadněn zvýšením hmotnosti srdce a hematokritu. Hmotnost nejdůležitějšího svalu se odvíjí z faktu, zda je pták létavý či nelétavý. U rodu kiwi je tato hodnota  $<$  9 % tělesné hmotnosti. (McNab, 2019)

K analýze bazálního metabolismu (BMR) u ptáků mohou být použity různé metody, které pracují na různých principech. Nejčastěji je využíván spirometr. Spirometr je nádoba naplněna kyslíkem a obsahuje zařízení absorbující oxid uhličitý, napojené na zapisovač, který zaznamenává dané hodnoty průtoku CO<sub>2</sub>. Záznam může být digitální, nebo je tvořen čarou s výchylkami (spíše starší spirometry). Výsledná hodnota je pak přepočítána tím, že se vynásobí 4,82 kcal/l spotřebované O<sub>2</sub> (Ganong, 2005). Další možností je měření za použití kalorimetru, kdy je využíváno faktu, že měřený jedinec produkuje určitý objem tepla. Toto teplo je přesně změřeno a poté přepočítáno na potřebnou hodnotu metabolismu (Oshima et al., 2017). Další možností je výpočet skrz známé hodnoty, jako je hmotnost, stáří jedince, pohlaví apod. Tyto metody se však pro vědecké účely často nepožívají, protože jsou dosti nepřesné (Brand, 1997). Za určitých podmínek lze k měření použít těžkou vodu, která je vpichována



jedincům do oběhu. Ta je ideální pro studium syntézy a degradace různých molekul. Jediným nedostatkem deuteria je, že je pro organismus ve větším množství toxické (Dufner and Previs, 2003).

### 1.3.1 Faktory ovlivňující BMR

Celková rychlost metabolismu nám může napovědět o jedinci řadu informací, kupříkladu jeho kondici, chování, ekologii či celkový vývoj. Tato věda však zahrnuje mnoho faktorů, které se navzájem ovlivňují. Z tohoto důvodu je však obtížné zkoumat je jednotlivě. (McNab, 2019)

#### Hmotnost

Ze všech známých faktorů má na ptačí BMR největší účinek tělesná hmotnost a to vzhledem k jejímu velkému rozsahu, která tvoří až 75 % důležitosti ve výpočtu BMR. Pštros dvouprstý (*Struthio camelus*) váží mezi 100 až 120 kg, což je asi 60 000krát více, než kalypta nejmenší (*Mellisuga helenae*), která má necelé 2 g (McNab, 2008). Doposud publikované záznamy naznačují, že i přes všechnu snahu vytvořit vzorec pro výpočet metabolické rychlosti, taková „univerzální“ hodnota neexistuje (Glazier, 2005; Bokma, 2004). Některé podobné výzkumy tuto hodnotu prosazovaly u savců (White and Seymour, 2003; West et al., 1997), avšak došlo k vyvrácení i těchto výzkumů (White et al., 2007).

#### Fylogeneze a morfogeneze

Největší rozdíl v BMR byl zaznamenán mezi pěvci a nepěvci (McKechnie and Wolf, 2004). Ačkoliv skupina nepěvců není jednotná kategorie, jak by se mohlo očekávat podle morfologické, ekologické a behaviorální rozmanitosti, mezi těmito řády nejsou výrazné rozdíly. Metabolické hodnoty těchto řádů jsou pravděpodobně ovlivněny prostřednictvím variací ve složení těla, v těchto případech existuje korelace mezi BMR a součtu hmotností srdce a ledvin (Daan et al., 1990). Byla prokázána závislost mezi zmenšením velikosti prsního svalu u nelétavých druhů a BMR (McNab and Ellis, 2006). Dalším faktorem je i tvar těla. Například štíhlejší postava u dvou poddruhů jespáka rezavého (*Calidris canutus*) může částečně snížit hodnoty bazálního metabolismu (Piersma et al., 1996).

#### Potrava

Největší variace BMR je však závislá na druhu potravy a způsobu lovu. Druhy živící se ovocem, létajícím hmyzem či obratlovci, listy a semeny (např. srostloprstí, lelkovi-

tí nebo krátkokřídlí) mají jeden z nejnižších bazálních výdejů metabolismu. Naopak ptáci konzumující nektar, pyl, vodní vegetaci apod. mají vyšší bazální dávky (McNab, 2008). Otázkou zůstává, zda je to způsobeno stravovacími návyky, nebo pouze způsobem lovu a životu k němu přizpůsobenému. Tato teorie se stává spornou ve chvíli, kdy ptáci kombinují různé způsoby stravování. V případě, že jsou čistě hmyzožravci či semenožravci, mají průměrné hodnoty BMR, zatímco kombinace tohoto stravování vede k nejvyšším bazálním hodnotám (McNab, 1988, 2014).

Nejspíš je to způsobeno tím, že samotná konzumace uhlohydrátů (semen a ovoce) nebo bílkovin (hmyz) nedokáže pokrýt vysoký výdej metabolismu, kdežto kombinace stravy ano. Příkladem tohoto stravování jsou rody ptáků z oblasti Papui Nové Guinei. (McNab, 2013)

Důležitým aspektem může být též dostupnost potravy. Ovocné plody a hmyz jsou čistě sezónní záležitostí a tak nastávají i období, kdy jsou ptáci nuceni se uskromnit ve svých stravovacích návycích. K rozřešení těchto otázek by též pomohla analýza „stravitelnosti“ potravy, u níž by byl zohledněn rozdíl kalorií, které je schopen organismus přijmout. Problém však je, že metody výzkumu nám to stále neumožňují. Závislost BMR na stravovacích návycích je typickým příkladem, kdy se lze zabývat asociacemi a ne nutně příčinami faktorů, které by měly být popsány v rámci experimentálních studií. Jedná se však o zdánlivý odhad, při němž nám mohou tyto studie pomoci. (McNab, 2008)

### **Prostředí, krajinná ekologie – výskyt v určitých biotopech**

Dalším faktorem, který ovlivňuje hodnoty bazálního metabolismu, je klima a prostředí, ve kterém se ptáci vyskytují. Ptáci žijí na zemi ve všech podnebných pásmech, od polárních oblastí, přes mírné a subtropické podnebí až po tropické klima, najdeme je ve vodním prostředí i na otevřeném moři, v lesích, tundrách, ve vysokohorské krajině a dokonce i na poušti. Zdá se, že čím severněji ptáci žijí, tím větší bazální dávky potřebují. To znamená, že mají v průměru o 16 % vyšší hodnoty BMR ptáci vyskytující se v mírném až polárním pásu, oproti druhům, které žijí v subtropickém a tropickém pásu. Tento fakt platí i při porovnání řádů pěvců a ostatních druhů. (McNab, 2009)

Druhům mírného pásu pozitivně korelují hodnoty BMR s vysokou potenciální energií a energetickými výdaji jedince (Gavrilov, 1999). Tento fakt souvisí s tím, že ptáci mírného pásu mají větší možnosti regulace tělní teploty ve chvílích, kdy kolísá okolní teplota, a tím dokáží tolerovat nižší okolní teplotu při migraci, hnízdění i reprodukci. Tato výhoda však mizí při hmotnostech nad 150 g u dospělého jedince.



V důsledku toho je nejspíš možné vysvětlit absolutní dominanci zástupců jednotlivých druhů stejné velikosti (5 až 150 g) v mírném podnebí. Mohlo by to vysvětlovat fakt, proč má největší zástupce rodu pěvců krkavec velký (*Corvus corax*) pouhých 1,2 kg a je nestěhovavý/stálý. U některých rodů (dlouhokřídli, vrubozobí, veslonozí) jsou vysoké hodnoty BMR spojené s vysokou snahou o reprodukci, čímž se snaží vykompenzovat vysokou úmrtnost v chladném prostředí a též rizika při migraci (Gavrillov, 1999). Stálé druhy naopak oproti migraci musí investovat do udržení stálé tělesné teploty i při nepřízní počasí v zimním období.

Hodnoty můžou být ovlivněny i tím, zda se jedná o druh suchozemský (terestrický), nebo druhy vázané na vodu. Tento rozdíl může být způsoben tím, že druhy vázané na vodu jsou mnohem aktivnější a jejich energetický výdej souvisí s jejich životním stylem (McNab, 2008, 2015).

Rozdíl mezi stěhovavými a stálými druhy však není absolutní. Je totiž plno druhů, které migrují na malou vzdálenost, nebo se stěhují v okruhu, aby se přizpůsobili zdrojům potravy (Dolnik and Gavrillov, 1973).

Ptáci tropů nemusí zpravidla nikam migrovat, nemusí ani snášet tak nízké teploty v průběh roku, a proto mají v průměru nižší BMR, než je u ptáků standardem (Tielman et al., 2006).

Někteří vědci poukázali na fakt, že maximální hodnota příjmu energie je přímo úměrná bazálnímu metabolismu u pěvců mírného pásu. (Lindström and Kvist, 1995)

Porovnáme-li hodnoty výzkumů ohledně BMR u savců a ptáků (dvě odlišné fylogenetické větve, ve kterých se nezávisle na sobě objevila endotermie), dojdeme k prostému závěru, že výše uvedené faktory, jako například tělesná hmotnost, podnebí, stanoviště výskytu (polární oblasti, subtropy, nebo nížiny versus hory), stravovací návyky, typy pohybu (letci, běžci), lze vždy s určitou přesností rozdělit do dvou skupin, které jsou specifické hodnotami jejich BMR. U savců je to podobné. Na základě kombinace tělesné hmoty, klimatu, stanoviště, stravovacích návyků, hibernace, ostrovní/kontinentální rozšíření, výskyt v nížinách/horách apod., lze odhadnout s určitou přesností jejich BMR. Tento fakt naznačuje, že obě skupiny endotermů nezávisle na sobě reagovaly na stejné faktory prostředí, přestože neexistuje důkaz, že by ptáci a savci měli společného endotermního předka. Bližší zkoumání však ukazuje na některé základní rozdíly v energetické hodnotě metabolismu, z nichž jedním je to, že ptáci mají oproti savcům stejné hmotnosti vyšší hodnotu BMR. (King and Farner, 1961; Aschoff and Pohl, 1970)

## 1.4 Krev ptáků

Objem krve u ptáků se odhaduje mezi 4,4 až 8,3 % tělesné hmotnosti (přepočteno gramů na mililitry), u mladších ptáků je vyšší objem krve než u dospělých jedinců (Martinho, 2012).

### 1.4.1 Buněčné složení krve ptáků

Krev všech ptáků obsahuje erytrocyty, leukocyty a trombocyty. V porovnání se savci si každá buňka zachovává své jádro po celou dobu života. Drtivá většina ptačích druhů vyžaduje vysokou koncentraci erytrocytů v krvi z důvodu efektivního zásobení svalů kyslíkem při letu. Střední objem erytrocytů (MCV – mean corpuscular volume) se uvádí okolo 150 fL, což do počtu se jedná o číslo  $2-3 \times 10^{12}/l$  krve (Clark et al., 2009). Oproti savcům je toto číslo přibližně o polovinu větší, savci mají hodnotu MCV cca 90 fL a z hlediska počtu je to  $1,5-3 \times 10^{12}/l$ . Tyto hodnoty se však liší podle druhu a jen velice obtížně lze určit univerzální střední hodnotu (Campbell, 2015). Případné zjištění odlišných hodnot krevních buněk nás ale může upozornit na měnící se zdravotní stav u jedince.

Vzhledem k jejich přizpůsobení extrémně různorodým podmínkám (od deštného lesa, přes pouště, hory, lesy až k mořím) najdeme plno fyziologických rozdílů mezi druhy. Tyto rozdíly jsou spojeny i s různými hodnotami kyslíku v prostředí (Rosse and Waldmann, 1966). Z tohoto důvodu jsou také relativně velmi rozdílné hematologické hodnoty u jedinců odlišného druhu, kde jsou porovnány různé hodnoty buněk a látek v ptačí krvi u vybraných druhů. Kompletní krevní výsledky jsou však známy pouze u zlomku druhů, hlavně u jedinců, kteří se používají k vědeckým účelům. Počet studií ohledně hematologických onemocnění včetně anémií je též velice malý.

Český název druhu	Latinský název druhu	Podíl objemu tvořený erytrocyty (PCV) L/L	Počet červených krvinek (RBC) $\times 10^{12}/L$	Koncentrace hemoglobinu (Hb) g/L	Střední objem erytrocytu (MCV) fL	Počet bílých krvinek (WBC) $\times 10^9/L$
Pižmovka bělokřídlá	<i>Asarcornis scutulata</i>	0,46–0,57	2,60–3,48	122–181	163–177	4,7–9,4
Racek mořský	<i>Larus marinus</i>	0,38–0,50	1,40–3,10	103–165	142–270	4,30–31,00
Ibis andský	<i>Plegadis ridgwayi</i>	0,36–0,51	2,54–3,68	132–214	136–145	1,40–7,60
Káně Harrisova	<i>Parabuteo unicinctus</i>	0,40–0,55	2,63–3,50	121–171	147–163	4,80–10,0
Jestřáb lesní	<i>Northern goshawk</i>	0,43–0,53	2,60–3,80	121–177	141–156	4,00–11,00
Tetřívka prériová	<i>Tympanuchus cupido</i>	0,35–0,63	X	X	X	5,50–27,70
Jeřáb mandžuský	<i>Grus japonensis</i>	0,38–0,50	1,90–2,70	126–168	180–204	5,70–11,60
Drop obojkový	<i>Chlamydotis undulata</i>	0,43–0,55	2,09–3,36	133–163	153–228	3,20–7,85
Pelikán severoamerický	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	0,33–0,45	1,90–2,70	98–166	152–182	5,00–15,00
Ara araraura	<i>Ara ararauna</i>	0,41–0,51	2,70–3,50	148–189	132–157	4,50–15,40
Plameňák růžový	<i>Phoenicopterus roseus</i>	0,38–0,58	1,12–1,85	92–177	234–419	1,53–15,90
Chaluha velká	<i>Stercorarius skua</i>	0,39–0,51	2,08–3,52	X	135–222	3,55–23,8
Papoušek šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	0,43–0,51	3,00–3,60	142–170	137–155	3,30–10,30
Tučňák oslí	<i>Pygoscelis papua</i>	0,34–0,49	1,40–1,90	133–192	238–302	3,20–10,20
Sova pálená	<i>Tyto alba</i>	0,42–0,51	2,20–3,00	127–164	145–216	11,50–22,30
Nandu pampový	<i>Rhea americana</i>	0,44–0,54	X	X	X	4,22–17,70

**Obrázek 2:** Tabulka hematologické rozdíly u specifických druhů ptáků

(zdroj: upraveno podle Clark et al., 2009)

### 1.4.2 Odběr vzorků krve, injekce a následné ošetření

Kapku krve potřebnou k provedení krevního roztěru nebo určení pohlaví lze získat z krční, brachiální či jugulární žíly za použití heparizované inzulinové stříkačky. U této metody se zpravidla používají mikrohematokritické kapiláry. (Owen, 2011; de Matos and Morrisey, 2005)

Odběr krve stříháním špiček prstů na nohou je bolestivý a nepříjemný u takových ptáků jako zebříčka. Dříve se tato metoda používala u nejmenších zástupců čeledi kolibříkovití. Pokud je zapotřebí větší množství krve (500–800  $\mu$ l v případě menších zástupců), je vyžadována anestezie živočicha, či přímo usmrcením jedince. Hodně však záleží na velikosti jedince a tím i celkovém objemu krve v daném organismu. Pro některé jedince může být tato hodnota smrtelná. V případě zebříčky pestré hodnota 800  $\mu$ l tvoří více než jednu polovinu celkového objemu krve, což by pro savce mohlo být smrtelné, ptáci však obecně snášejí ztráty krve mnohem lépe než savci. Krev se pak zpravidla odebírá injekcí přímo ze srdce (srdeční punkce), či už zmiňovanou metodou z jugulární žíly. V případě, že je jedince nutné uspat, anestetika se podávají buď do hrudního svalu jedince, nebo jako subkutánní injekce pod kůži. Aby nedošlo po odebrání krve u jedince k dehydrataci, musí pták po dobu dvou až tří dnů obdržet tekutinu (50 ml/kg za den), aby doplnil vodní deficit v krvi. (Owen, 2011; Doneley, 2011)

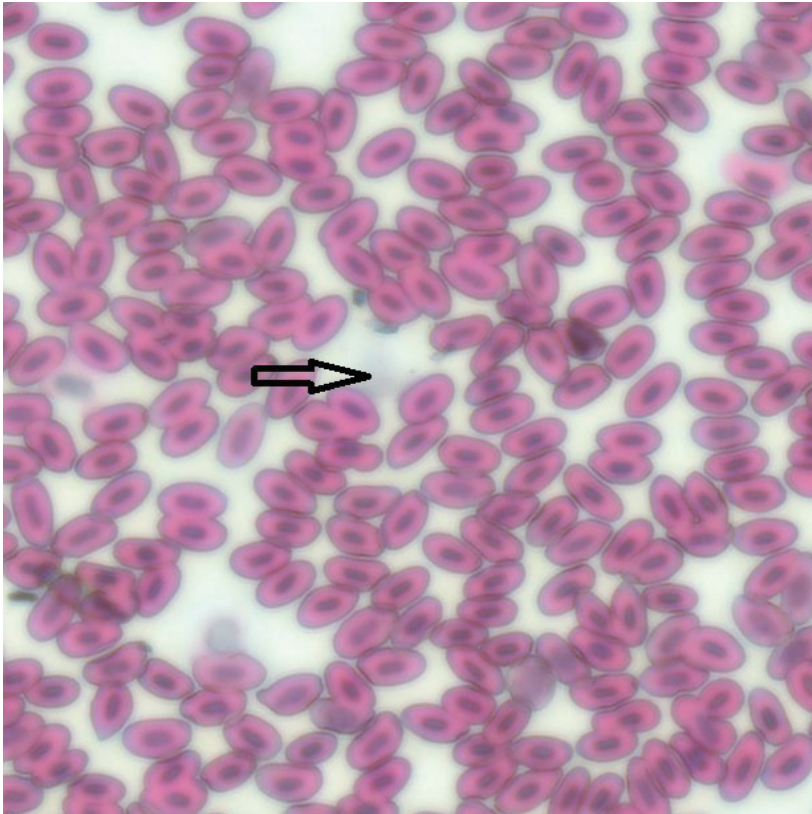


**Obrázek 3:** Odebrání krve u ptačího jedince  
(foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)

### 1.4.3 Tvorba krevního roztěru a jeho vyhodnocení

Pokud chceme zkoumat složení krve, je důležité, abychom zajistili co nejkvalitnější krevní roztěr. Při roztěru musí krevní buňky zůstat neporušené a vrstva musí být dostatečně tenká, aby umožňovala světlu jimi projít. Pokud jsou buňky popraskané, můžeme to považovat za důležitý znak, který nám poukazuje na napadení organi-

smu virem. Lyzované buňky se však mohou vyskytovat v krevním roztěru běžně, zpravidla to bývá při špatně provedeném roztěru, kdy dojde k poškození těchto buněk. Některé mohou být pouze naprasklé, jiné mohou být komplexně zničené, což je v důsledku činí nerozpoznatelnými a neidentifikovatelnými. V nejhorším případě se tyto buňky nazývají „smudge cells“, tedy „rozmázlé buňky“, v některých případech jsou také nazývány jako Gumprechtovy stíny. (Jones, 2015)



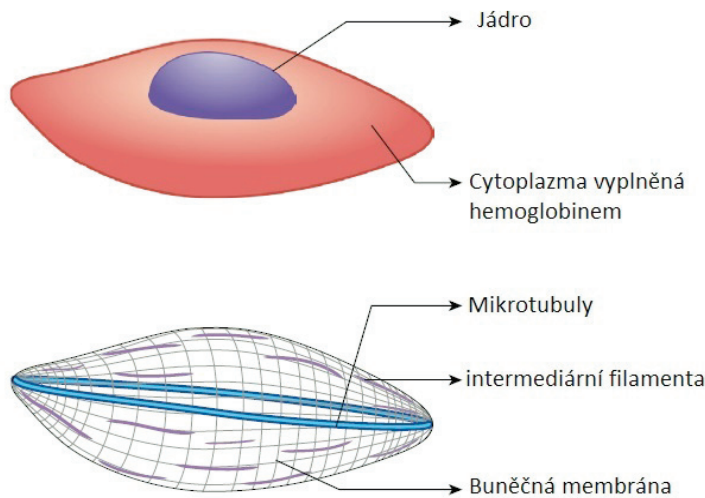
**Obrázek 4:** „Smudge cells“ nebo-li rozmázlé buňky na ptačím krevním roztěru (foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)

Tyto vzorky pak můžeme pozorovat pod světelným mikroskopem, nebo vzorky naskenovat v dostatečném rozlišení a vyhodnocení provádět na počítači.

#### 1.4.4 Erythrocyty – červené krvinky

Červená krvinka (erythrocyt) je nejpočetnější krevní buňkou, která zajišťuje přenos kyslíku z plic do ostatních tkání těla. Erythrocyt obsahuje červené krevní barvivo hemoglobin, které se skládá z železité složky (hemu), jež váže kyslík, a z bílkovinné složky (globinu). Hlavní funkcí červených krvinek je transport kyslíku do tkání prostřednictvím cévních kapilár, jež jsou krevní cévy s velmi tenkou stěnou. Tento

děj se významně uplatňuje při homeostázi, což je schopnost organismu udržovat stabilní vnitřní prostředí nezbytné pro jeho přežití. (Clark et al., 2009)



**Obrázek 5:** Struktura ptačího erytrocytu

(zdroj: Clark et al., 2009)

### Vlastnosti erytrocytů u ptáků

Jádro erytrocytu je složené z hrubě shlukovaných chromatinů a bývá homogenní. Cytoplazma je obvykle zahuštěná hemoglobinem. Většinou se jedná o ploché buňky, které jsou ve středu drobně vypouklé. Tato výdutina je zřetelná u některých druhů, např. u krocana divokého (*Meleagris gallupavo*) (Hawkey et al., 1989), někdy tato vypouklina není patrná, například u sovy pálené (*Tyto alba*). (Clark et al., 2009)

Erytrocyty u ptáků jsou větší než ty, které najdeme u savců. Rozměry erytrocytů u motáka pochopa (*Circus aeruginosus*) jsou  $13,78 \pm 0,50 \mu\text{m}$  na délku a  $7,95 \pm 0,35 \mu\text{m}$  na šířku (Lavin et al., 1992). U dalších zástupců rorohá loveckého (*Falco rusticolus*) jsou podobné,  $14,82 \pm 0,07 \mu\text{m}$  na délku a  $7,21 \pm 0,4 \mu\text{m}$  na šířku (Samour et al., 2005). U běžnějšího druhu kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) je velikost  $7,3 \mu\text{m}$  na šířku a  $12,1 \mu\text{m}$  na délku (Khan et al., 2016). Pro porovnání lidský erytrocyt má přibližně  $7,5 - 8,7 \mu\text{m}$  na délku a  $1,7 - 2,2 \mu\text{m}$  na šířku (Diez-Silva et al., 2010).

Ptačí červené krvinky oproti savcím mají kratší životnost (25 až 45 dní). Tato rychlá přeměna buněk může být spojena s vyšší tělesnou teplotou ptáků a vyšší metabolickou rychlostí, která spotřebovává větší množství kyslíku a živin, než jejich protějšky savců (Campbell, 1995).

### Měření počtu erytrocytů

Celkový počet erytrocytů u ptáků se obvykle odhaduje manuálními metodami,



což znamená počítání buněk pod světelným mikroskopem v Bürkerově počítací komůrce. Tato metoda je pracná a velmi zdlouhavá. Nověji lze použít průtokový cytometrický analyzátor, tedy zařízení, které je schopno provést analýzu krevního vzorku včetně počtu buněk daleko rychleji (Bearhop et al., 1999). Toto řešení má však úskalí, které brání častějšímu využití. Kvůli jádrům erytrocytů nejdou erytrocyty u ptačích druhů lyzovat a na odlišení od leukocytů se používají speciální protilátky, které jsou vysoce druhově specifické a dostupné jenom na určité druhy ptáků např. na kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) (Suni and Maino, 2011).

Automatický analyzátor funguje na principu průniku laseru skrz danou buňku. Díky rozdílné propustnosti buněk je čidlo schopno zaznamenat průchozí vlnovou délku a podle toho i rozeznat danou buňku. Touto metodou jdou analyzovat nejen krevní buňky, ale také lze cytometrií detekovat mikroorganismy. Princip je takový, že flouorescenční barvivo se naváže na specifickou protilátku (Lochmanová et al., 2017).

Tato metoda počítání se v praxi uplatňuje u vzorků krve lidských a některých savců. Hlavním důvodem je absence jader v buňkách a tedy relativně velká přesnost počítání. Současný systém však nemůže rozlišovat mezi jadernými ptačími erytrocyty, trombocyty a leukocyty. Výjimkou je analýza krevních vzorků kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), kdy se do krve přimíchají specifické protilátky, které slouží jako markery. (Lindenwald, 2019; Seliger et al., 2012)



**Obrázek 6:** Automatický hematologický analyzátor

(zdroj: [https://portal.medesa.cz/Produkty/DetailProduktu/1694359/Mindray\\_BC6200\\_CT](https://portal.medesa.cz/Produkty/DetailProduktu/1694359/Mindray_BC6200_CT))

Celkový počet červených krvinek je u ptáků podobný ( $2,4-5 \times 10^6$  buněk/ $\mu\text{l}$ ), jako

u člověka ( $4,05\text{--}5,5 \times 10^6$  buněk/ $\mu\text{l}$ ). Oproti ostatním savcům je toto číslo nižší, drobní hlodavci mají  $6,5\text{--}10 \times 10^6$  buněk/ $\mu\text{l}$ . Tyto hodnoty se mohou opět lišit podle věku, pohlaví, hormonů, hypoxie a dalších faktorů. (Campbell, 1995; Mitchell and Johns, 2008)

Poměr červených krvinek může být klinicky hodnocen. Hematokrit je poměr mezi objemem červených krvinek a krví. Můžeme též použít termín PCV (PCV = packed cell volume). Hodnota je vyjádřena jako procento, nebo zlomek buněk v krvi. Například 40 % PCV znamená, že ve 100 mililitrech krve je 40 mililitrů buněk. PCV se počítá odstředěním kapilárních zkumavek mikrohematokritu a u ptáků kolísá mezi 35 až 55 %. PCV menší než 35 % naznačuje anémii, vyšší hodnota než 55 % naznačuje dehydrataci nebo polycitémii. U stejného druhu se PCV liší podle věku, pohlaví, hormonů a dalších fyziologických faktorů. Například samci a starší ptáci mají obvykle vyšší PCV (Campbell, 1995; Mitchell and Johns, 2008).

Další hodnota, která se dá měřit, je průměrný objem erytrocytu, u něhož se používá MCV (fL) = střední objem erytrocytu (MCV = mean cell volume). U ptáků tato hodnota koreluje okolo 150 fL. Samozřejmostí je drobná odchylka, která závisí na měřeném druhu. Například u jeřába panenského (*Grus virgo*) je tato hodnota mezi 154–162 fL (Hawkey et al., 1989), u sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*) 118–146 fL a u chaluhy velké (*Stercorarius skua*) 135–222 fL (Bearhop et al., 1999).

### **Abnormality v krevní analýze erytrocytů**

V rámci hodnocení krevních roztěrů můžeme nalézt i krevní buňky, které vzhledově neodpovídají buňkám ostatním. Tyto abnormality jsou často spojeny s poruchami krvetvorby. Buňky hodnotíme podle morfologických znaků (struktura, tvar, velikost).

### **Změny buněk podle velikosti**

Klasický roztěr obsahuje 3 až 5 % abnormálních buněk dle velikosti a to i u zdravých jedinců. Pokud je tato hodnota vyšší než 10 %, označujeme tento fakt jako anizocytóza. (Campbell, 1995; Mitchell and Johns, 2008; Clark et al., 2009)

### **Změny buněk z hlediska tvaru**

Nezřídka se stává, že při analýze nalezneme buňky různého někdy až bizarního tvaru. Takovéto buňky mohou mít mnoho podob nejčastěji však tvar hrušky nebo kapky. Takovou buňku pak označujeme jako poikilocyt. (Campbell, 1995; Mitchell and Johns, 2008)

## Degenerující buňka

Často se nachází v kostní dřeni. Jsou to zbytky poškozených těl, megakaryocytů nebo myeloblastů. Jedná se především o artefakty preparátu z dřene.

## Erytropoeza – vývojové fáze erytrocytů

Erytropoeza je děj, při kterém se červené krvinky vyvíjí v krevních ostrůvcích kostní dřene z multiploidních myeloidních progenitorových buněk (hemopoetická kmenová buňka). Takto nezralé buňky se někdy označují jako **immaturní erytrocyty**. V průběhu vyzrávání erytrocytů dochází ke zmenšování objemu buňky, hromadění hemoglobinu a konečně k vyloučení jádra. Pro vývoj je zásadní přítomnost hormonu erythropoetinu, železa a vitamínu B12. (Jones, 2015; Rosse and Waldmann, 1966)

K normální erytropoeze dochází v kostní dřeni až na výjimky, přičemž ektopická erytropoeza (tvorba krevních buněk mimo kostní dřeň, zpravidla při chronické anémii) se občas vyskytuje ve slezině a v játrech (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012).

Proces erytropoezy zahrnuje několik sekvenčních fází vývoje buněk. Obecně lze však říci, že jak buňka dozrává, jaderná velikost se zmenšuje a mění se z tvaru kulatého na elipsoidní. Zvyšuje se množství cytoplazmy. (Clark et al., 2009)

**Rubryblasty** (nebo proerytroblasty) jsou první fází vývoje. Jedná se o velké buňky s centrálními a kulatým jádrem s hrubým chromatinem. Poměr jádra ku cytoplazmě (N : C) je vysoký a cytoplazma je hluboce bazofilní s čistými prostory (mitochondriální prostory). (Campbell, 1995)

**Prorubricity** jsou druhou fází vývoje erytrocytů a připomínají stále rubryblasty. Lze je však odlišit absencí mitochondriálního prostoru a bazofilní cytoplazma často obsahuje skvrny načervenalého materiálu připomínajícího začátek vývoje hemoglobinu. Jádro má středně zrnitou strukturu chromatinu a zaujímá většinu buňky. Tmavomodrá cytoplazma tvoří pouze tenký okraj kolem jádra. Nucleolus není ještě přítomen. Liší se od pozdějších fází vývoje nedostatkem jader a mitochondriálních prostorů v cytoplazmě. (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012)

**Rubricity** jsou kulaté buňky, které jsou menší než obě předchozí fáze vývoje. Tyto buňky jsou rozděleny do tří fází založených především na vzhledu cytoplazmy.

- **Bazofilické rubricity** (počáteční polychromatické rubricity) představují nejmladší fázi rubricity z hlediska vývoje. Tyto buňky jsou charakterizovány ho-

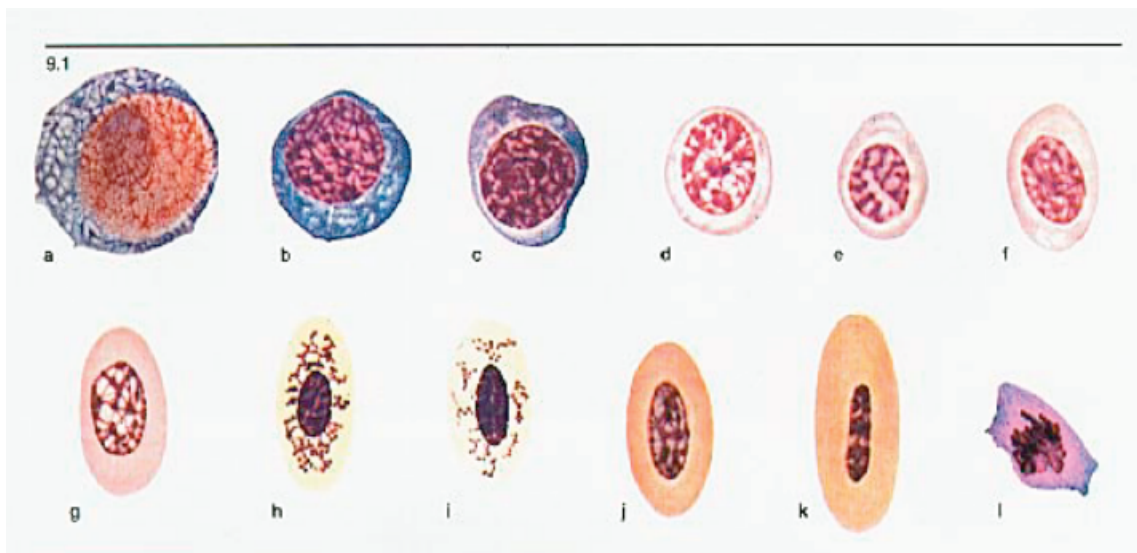


mogenní bazofilní cytoplazmou a kulatým jádrem se shlukovaným chromatinem. (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012)

- **Polychromatofilní rubricyty** (pozdní polychromatické erytroblasty) tyto buňky jsou menší než bazofilní rubricyty a mají nižší poměr jádra ku cytoplazmě ve srovnání s finální fází rubricytu. Jádro se může lišit od kulatého po mírně elipsoidní, nukleární chromatin je nepravidelně shluknutý a cytoplazma je šedá kvůli zvýšené produkci hemoglobinu. (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012)
- **Pozdní polychromatofilní rubricyty** (ortochromní erytroblast) jedná se o elipsoidní buňky šedavé barvy. (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012)

**Retikulocyty** (polychromatofilní erytrocyty) jsou předposlední fází dozrávání. Ve srovnání se zralými červenými krvinkami jsou polychromatofilní erytrocyty charakteristické svojí cytoplazmou, která má namodralé zbarvení kvůli zvýšenému obsahu ribozomální RNA. Tyto buňky tvoří 1 až 5 % všech erytrocytů u zdravých ptáků (Campbell and Dein, 1984; Campbell, 1995). Zvýšený počet může být pozorován při rychlejší erythropoeze v reakci na případnou anémii (regenerativní odezva) a je nazýván polychromasie, nebo polychromatofilie. (Campbell and Ellis, 2007)

**Zralý erytrocyt** má zploštělý, elipsoidní tvar. Jaderný chromatin je kondenzovaný.



**Obrázek 7:** Vývojové fáze erytrocytu

a) Rubriblast, b) Prorubricyt, c-g) Rubricyt, h,i) Retikulocyt, j, k) Zralý erytrocyt,

l) Erytrocyt ve fázi mitózy

(zdroj: Campbell, 1995)

## Regulace erythropoezy

Erythropoeza je řízena řadou faktorů, jako jsou hormony a koncentrace kyslíku ve tkáních. Hypoxie stimuluje produkci a uvolňování erythropoetinu, glykoproteinu produkovaného v ledvinách, který má přímý pozitivní účinek na erythropoezu. Pozitivní vliv na tento proces mají také další hormony, jako jsou androgeny a adrenokortikoidy. (Campbell, 1995, 2015; Martinho, 2012)

Případný deficit některých látek v organismu může vést k poruchám erythropoezy. Krátkodobý nedostatek vede k deformacím a abnormalitám ve tvaru některých buněk, dlouhodobý nedostatek může zpomalit až zastavit celkovou erythropoezu, což může mít v některých extrémních případech za následek smrt. Řada těchto faktorů, které tento proces ovlivňují, je společná s krvetvorbou u savců. Jsou to převážně chemické látky, které by neměly při krvetvorbě chybět, jsou totiž většinou pro krvetvorbu nezbytné. Patří sem vitamín B12 (důležitý pro zrání erytrocytů, významný pro syntézu DNA a tak pro dělení buněk červené krevní řady, při jeho nedostatku vzniká perniciózní anémie), kyselina listová (je součástí koenzymů nutných k syntéze DNA, uplatňuje se při buněčném dělení a diferenciaci, při jejím nedostatku vzniká makrocytární anémie), vitamin B6 (nutný pro syntézu hemu), vitamin C, zinek (potřebný pro transport železa ze zásobních míst), kobalt (součástí vitamínu B12) a dále některé transkripční faktory (např. GATA1). (Clark et al., 2009; Davison et al., 2008)

Dalším důležitým faktorem je hormonální regulace. Hlavním hormonem je glykoprotein s názvem erythropoetin, který urychluje a stimuluje proliferaci a diferenciaci erytrocytů, zvyšuje expresi receptorů pro transferin (což vede k většímu příjmu železa buňkou), dále zvyšuje i expresi genů pro globinové řetězce a enzymy nutné k syntéze hemu. Receptory pro erythropoetin nalezneme na erytroblastech a progenitorových buňkách. (Fried, 2009)

Hlavní místo tvorby erythropoetinu je v játrech a ledvinách, kde je největší koncentrace erythropoetinového mRNA. Největším stimulantem tohoto hormonu je hypoxie (nízká úroveň kyslíku v orgánech a krvi). Faktorů, které ovlivňují hladinu kyslíku v krvi, je více. (Clark et al., 2009)

Intenzita erythropoezy je řízena nároky tkání na zásobení kyslíkem. Snížená koncentrace kyslíku ve tkáních má za následek sekreci hormonu erythropoetinu v ledvinách (95 %) a také v játrech. Erythropoetin stimuluje kostní dřeň k zahájení tvorby nových červených krvinek. Erythropoetin přetrvává v nezměněné formě v krvi po dobu jednoho dne. Tato krátká doba jeho působení umožňuje větší pružnost a přesnost při přizpůsobování počtu erytrocytů požadavkům tkání na zásobení kyslíkem. Nově vzniklé červené krvinky se neobjevují v krvi dříve než za 4 až 5 dní po zahájení jejich

tvorby. V tomto mezičase se tak může vytvořit nový erythropoetin, který zajistí kontinuální tvorbu erytrocytů. Po vyplavení červených krvinek do krevního oběhu, jsou tkáně nasyceny kyslíkem a další erythropoetin se již nesekreneje. (Beug et al., 1997; Martinho 2012)

#### **1.4.5 Trombocyty**

Trombocyty jsou malé, oválné nebo kulaté buňky, s hustým jaderným chromatiem a čirou, slabě modře nebo světle šedou cytoplazmou, která obsahuje jednu nebo více zřetelných granulí na pólech. Z hlediska početnosti se jedná o druhou nejpočetnější buňku v periferní krvi. Trombocyty jsou v porovnání se zralými erytrocyty menší, kdy hlavním znakem při rozpoznávání je kulaté a sytě obarvené jádro. Ptáčí erytrocyty pocházejí z kmenových buněk na rozdíl od trombocytů savčích, které vznikají z megakaryocytů v kostní dřeni. Stejně jako u lymfocytů je početnost trombocytů v krvi individuální, záleží na konkrétním druhu. (Cambell and Ellis, 2007; Doneley, 2011; Mitchel and Johns, 2008)

Trombocyty u ptáků jsou také schopny do krve produkovat a uvolňovat velké množství bioaktivních proteinů. Hlavní funkce trombocytů je však úplně jiná. Při poranění jedince a následném krvácení se v organismu vyvolá řada biochemických procesů, které vedou ke změně některých rozpustných látek na nerozpustné a tím zastavují případné krvácení jedince. (Altman et al., 1997)

Některé studie naznačují, že trombocyty nejenom pomáhají udržovat vnitřní homeostázu, jsou ale považovány za fagocytující buňky a tím pomáhají při eliminaci cizích buněk v krvi (Mitchel and Johns, 2008).

#### **1.4.6 Leukocyty – bílé krvinky**

Bílá krvinka (leukocyt) je krevní element mnohých živočichů, tedy i ptáků, který určuje fungování imunitního systému. Bílé krvinky chrání organismus proti bakteriím, virům, nádorovým buňkám a dalším cizorodým částicím a patogenům. Bílé krvinky, podobně jako ostatní buňky krvetvorby, pochází z tkáně mezenchymu, kde vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk a účastní se obranných reakcí organismu. Jsou to bezbarvé kulovité buňky, které obsahují jádro. U bílé krevní složky, na rozdíl od červené, rozlišujeme několik druhů morfologicky, funkčně a svým původem mnohdy vzdálených a značně odlišných konečných stádií krvinek. (Altman et al., 1997; Cambell and Ellis, 2007; Doneley, 2011; Pecka, 2006; Mitchel and Johns, 2008)

Při rozpoznávání těchto buněk, rozlišujeme pět základních druhů (eosinofil, bazofil, neutrofil, lymfocyt a monocyt). Důležité jsou znaky, které nám pomáhají při diferenciaci buněk, tedy jejich tvar a velikost buněčného jádra, barevné zbarvení buněk, anebo přítomnosti či absence granul v cytoplazmě. Podle posledního znaku můžeme buňky dělit na granulocyty, které mají tyto granuly v cytoplazmě, a na agranulocyty, které je nemají nebo jich mají velmi málo. (Carrick and Begg, 2008)

### **Eosinofil**

Jedná se o buňky, které se řadí mezi granulocyty. Z celkového počtu lymfocytů tvoří 1–3 %. Stejně jako monocyty jsou tyto buňky schopny migrovat do tkání a tam bojovat proti případným patogenním látkám a parazitům. (Mitchell and Johns, 2008)

### **Bazofil**

Velikostí patří mezi největší granulocyty. Co do počtu tvoří méně než 1% celkového počtu leukocytů. V rámci druhové variability však tato hodnota velice kolísá a může dosáhnout i desetinásobku. Při rozpoznávání těchto buněk je patrné neložnaté centricky umístěné jádro s tmavě fialovými granuly. V porovnání se savci mají ptáci výrazně větší počet těchto buněk. O bazofilech je známo jen velmi málo informací ohledně toho, jak se zapojují do imunitní odpovědi organismu. Jsou však částečně zodpovědné za reakci při zánětlivých onemocněních a za určité alergické reakce organismu. (Altman et al., 1997; Doneley, 2011)

### **Neutrofil a heterofil**

Přestože se jedná o dva typy buněk, můžeme kvůli jejich podobnosti používat jediný název. Tyto buňky patří k nejčastěji se vyskytujícím leukocytům v periferní krvi. Při barvení podle Romanowského je poznávacím znakem cytoplazma, která se zpravidla neobarví a tím pádem je bezbarvá. Někdy se i stává, že barvivo jen částečně pronikne do cytoplazmy a tím pádem je výsledná barva růžová. (Latimer et al., 2003; Stockham and Scott, 2002)

Souvisí to s tím, že pH cytoplazmy je odlišné od jádra. Jádro obsahuje hrubě shlukovaný chromatin a obvykle má dva až tři jaderné laloky. Větší četnost těchto buněk je spojena se závažnými chorobami, jako jsou akutní záněty, bakteriální či virová onemocnění, či toxické onemocnění spojené s kumulací těžkých kovů v organismu. Ve výsledné tabulce č. 3 je množství heterofilů a eosinofilů uvedeno ve sloupci „Typ VI“. (Campbell, 2015)

## **Lymfocyt**

Tento typ buněk se řadí do agranulocytů. Z hlediska početnosti je to nejčastěji se vyskytující se bílá krvinka. Tvoří až 70 % všech leukocytů. Lymfocyty jsou obvykle kulaté buňky s velkým jádrem v poměru s malou cytoplazmou. Celková velikost může být různorodá. Proto je snadno můžeme zaměnit kupříkladu s trombocyty, které jsou v porovnání s ostatními buňkami relativně malé velikosti. Charakteristické jsou tím, že mají dosti nepravidelný tvar s excentrickým jádrem a hustě shlukovaným jaderným chromatinem, který mívá výraznou mřížkovitou strukturu. V případě barvení těchto buněk, je zapotřebí použít specifické barvení protilátkami. (Campbell and Ellis, 2007; Clark et al., 2009)

## **Monocyt**

Monocyty jsou největší z hlediska všech leukocytů, tudíž by je mělo být snadné spatřit a identifikovat pod mikroskopem. Z celkového počtu bílých krvinek tvoří 3–8 % z celkového počtu. Obtíž je ale ta, že se zřídka kdy vyskytují u roztěrů periferní krve. Od lymfocytů se však liší světlejším jádrem, které může být kulovité až laločnaté a obsahuje méně shlukovitý chromatin. Důvod malého výskytu v krvi je ten, že tento typ buněk může vycestovat z krevního oběhu a dostat se do tkání, kde se mění na makrofága, který může provádět fagocytózu (fagocytóza je proces zajišťující pohlcení a zpracování cizích, nefunkčních, mrtvých či nemocných buněk). Bývají to kulaté buňky s excentrickým jádrem, kdy jádro může být protaženo do oválu. (Latimer et al., 2003; Stockham and Scott, 2002)

Ptáci v porovnání se savci mají vyšší koncentraci leukocytů. Na tuto hodnotu však neexistuje žádný obecný vzorec. Dokazuje to i tabulka 1, kde jsou porovnané hodnoty leukocytů u několika vybraných ptačích druhů. Tyto hodnoty však mohou kolísat v průběhu roku. (Campbell and Ellis, 2007)

### **1.4.7 Anémie**

Anémie je definována jako snížení celkového počtu buněk, a tím i případné snížení počtu červených krvinek v krvi, nebo snížení koncentrace hemoglobinu. Konečným důsledkem je zpomalení přenosu kyslíku v organismu. Anémie lze podle patofyziologie klasifikovat jako hemolytické (zvýšení destrukce červených krvinek), hemoragické (ztráta krve), nebo hypoplastické (snížení produkce červených krvinek nebo deprese hematopoézy) (Campbell, 2015; Mitchell and Johns, 2008). Klinické příznaky se liší v závislosti na závažnosti anémie. Obvyklými příznaky jsou slabost, tachykardie, bezvědomí či tachypnoe (zrychlené dýchání) (Martinho, 2012).

**Anémie při ztrátě krve** (hemoragická) se v akutní fázi jeví jako neregenerativní, postupem času ale přechází v regenerativní druh. Možné příčiny zahrnují přímé poranění jedince, parazity nebo kaogulopatie (poruchy srážlivosti krve). (Morrisey et al., 2003; Murray and Tseng, 2008)

Ptáci se však mohou s porovnáním se savci velice dobře vypořádat s akutní ztrátou krve. Některé experimenty potvrdily, že i po odstranění 60 % objemu krve jedinec neumírá, ale je schopen tento objem doplnit do sedmi dnů. Jedná se o druhy holubů a kachen (Finnegan et al., 1997; Lichtenberger et al., 2005). Někdy však tyto symptomy mohou být způsobeny akutní otravou toxickými látkami, či virovým onemocněním (Szabó et al., 2002).

Pří **regenerativní** (hemolytické anémii) dochází ke zvýšení erythropoezy v kostní dřeni, stimulované hypoxií a ke zvýšení hladiny erythropoetinu. Na periferní krvi je obvykle vidět zvýšený počet polychromatofilních krvinek a jiných dozrávajících buněk. Tento typ anémie je zpravidla způsoben infekčním onemocněním, hemoparazity (*Plasmodium*, *Aegyptianella*) či kumulující se toxicitou v organismu (aflatoxiny, některé toxiny rostlin, chemikálie používané při lékařských ošetřeních, těžké kovy a ropné produkty). (Powers, 2000)

Při **neregenerativní anémii** (hypoplastická anémie) obvykle neexistuje žádná reakce z kostní dřene. V krvi není zaznamenán nárůst dozrávajících erytrocytů. Tento typ anémie se u ptáků velice rychle vyvíjí z důvodu kratšího poločasu rozpadu červených krvinek. Anémie se může vyvinout u jedinců postižených zánětlivými chorobami – tuberkulózou, aspergilózou, chlamydofilózou, chronickým onemocněním jater nebo ledvin, hypotyreózou, neoplazií a dalšími chronickými onemocněními. (Helmer et al., 2000)

Ptáci mají jedinečné fyziologické mechanismy, které jim pomáhají vyrovnat se s těmito situacemi a rychle se zotavují. V kosterních svalech je velká kapilární hustota, která absorbuje intersticiální tekutiny (tkáňový mok) a rychle je uvolňuje do vasculárního prostoru, čímž se zvyšuje objem krve v případě potřeby. Kostní dřeň je schopna mobilizovat velké množství nezralých erytrocytů do periferní krve již dvanáct hodin po významné ztrátě krve. (Lichtenberger et al., 2005)

Některé reakce však mají ptáci od savců odlišné. Při hypovolemickém šoku (vnitřním krvácení) ptáci postrádají kupříkladu splénické kontrakce sleziny. (Mitchell and Johns, 2008; Ploucha et al., 1981) Hypovolemický šok se může vyvinout buď při sníženém objemu krve, nebo při nedostatečné distribuci krevního toku. Důvodů k tomu může být více, zranění jedince, narušení homeostázy, či dehydratace. (Martinho,

2016) Podle dostupných výsledků výzkumů, jsou schopni ptáci zvládat ztrátu krve překvapivě lépe než savci. To může být způsobeno i krátkým poločasem rozpadu ptačích erytrocytů. (Campbell and Dein, 1984)



## 2 Praktická část

### 2.1 Metodika

Na dané problematice, která je předmětem diplomové práce, spolupracovalo několik autorů. Základní výzkum proběhl na Jagellonské univerzitě v polském Krakově. Edyta T. Sadovská a kolektiv (tým okolo profesora Mariusze Cichoña) na 81 jedinci samiček zebřiček pestrých provedli měření bazální rychlosti metabolismu, odebrali vzorky krve a připravili krevní roztěry. O metodice těchto výzkumů pojednávají kapitoly 1.4.2 a 1.4.3.

Následně byly krevní roztěry zpracovány na pracovišti katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kde byly krevní vzorky skenovány a skeny analyzovány.

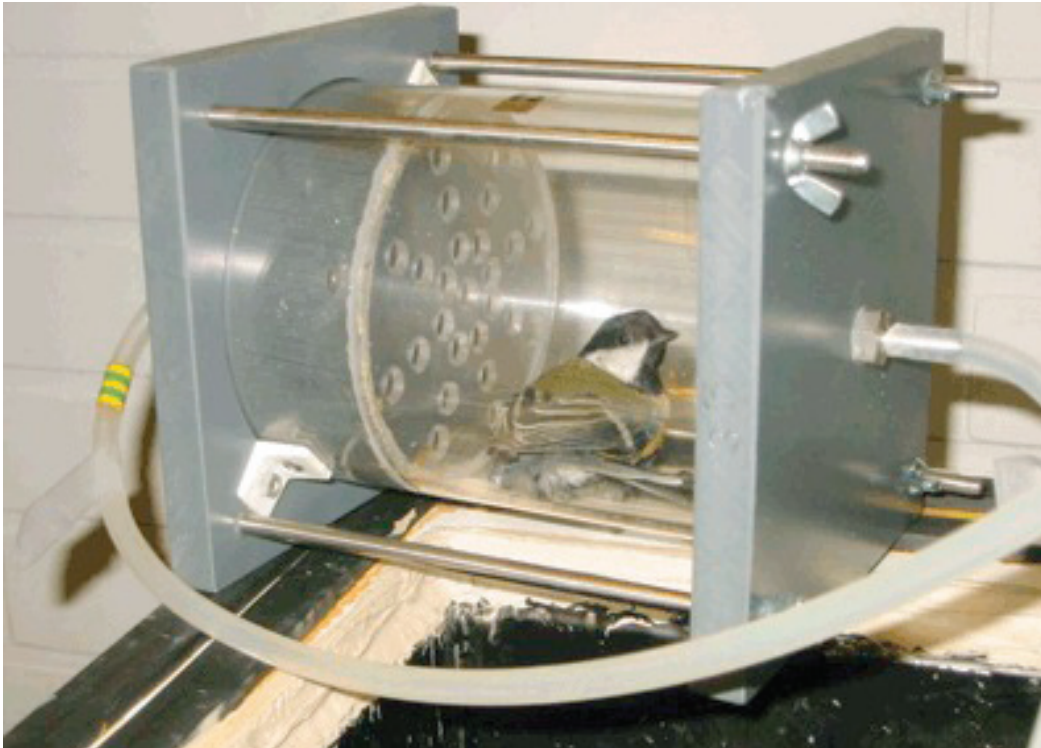
#### 2.1.1 Postup měření BMR u zebřiček pestrých

Postup měření BMR u jedinců zebřiček pestrých probíhal v několika fázích. Nejprve byli jedinci zváženi, byla jim změřena délka běháku pomocí posuvného měřítka (*tarsometatarsus*) a byli umístěni do jedné ze dvou respirometrických komor. První komora byla skleněná nádoba o obsahu 550 ml, v druhém případě se jednalo o plastový box o velikosti 850 ml. Obě nádoby měly v dolní části vstup pro přívod vzduchu a v horní části byl otvor pro vývod oxidu uhličitého a byly opatřeny dvojitým dnem a víkem, horní část byla umístěna asi 3–4 cm od horního okraje nádoby, spodní dno bylo tedy 10–11 cm od spodního okraje. Toto opatření zamezovalo testovaným jedincům vdechovat přímo kyslík z přívodní trubice a též nemohli vydechovat do vývodní trubice a tím ovlivnit hodnoty CO<sub>2</sub>. Jedinci však měli dostatek prostoru pro pohyb po komoře. (Sadowska et al., 2015)

Míra spotřeby kyslíku a produkce CO<sub>2</sub> (ml/h) byla měřena pomocí osmikanálového respirometrického systému s otevřeným průtokem, založeného na S-3A / II O<sub>2</sub> analyzátoru (AMETEK, Pittsburgh, PA, USA) a analyzátoru CO<sub>2</sub> CA2A (Sable Systems Inc., Las Vegas, NV, USA). Čerstvý vzduch byl sušen silikagelem a čerpán do sedmi komor se zvířaty a do jednoho prázdného kontrolního boxu. Rychlost proudění vzduchu do komor byla stabilizována buď 300 ml / min (s komorou 550 ml) nebo 350 ml / min (s 850 ml komorou) (STPD) tepelnými regulátory hmotnostního toku GFC-17 (AALBORG, Orangeburg, NY, USA), zvláště pro každý kanál. Skutečný průtok na každém měřicím kanálu byl korigován po kalibrování regulátorů hmotnostního toku vůči přesnému rotametu LO 63/33 (Rota, Německo). Vzorky vzduchu vyté-



kajícího z jednoho referenčního a sedmi měřících kanálů byly odebírány postupně pomocí inteligentního multiplexoru V3 (Sable Systems Inc.), předem vysušeného nechemickou sušárnou ND2 (Sable Systems Inc.), vysušeného malým množstvím chemické látky absorbent ( $\text{NaClO}_4$ ) a prošel analyzátory  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ . Průměrné hodnoty analogových výstupů z analyzátorů  $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$  byly zaznamenávány jednou za sekundu pomocí rozhraní UE-9 AD (LabJack Corporation, Lakewood, CO, USA). Hodnota spotřebovaného kyslíku byla vypočtena pro každou sekundu a zprůměrována pro období 20 sekund jako základ pro další výpočty. Protože cílem měření bylo odhadnout klidové metabolické rychlosti spojené se stabilními odečty, vědomě jsme na odečty nepoužili „okamžitou korekci“ (Lighton, 2008). Při výpočtech bylo zohledněno i to, že hodnota vypočtená pro krátkou dobu záznamu 20 sekund, ve skutečnosti odráží rychlost metabolismu v předchozích několika minutách. (Sadowska et al., 2015)



**Obrázek 8:** ukázková metabolické komory s jedincem  
(zdroj: Broggi et al., 2009)

### 2.1.2 Odběr krevních vzorků

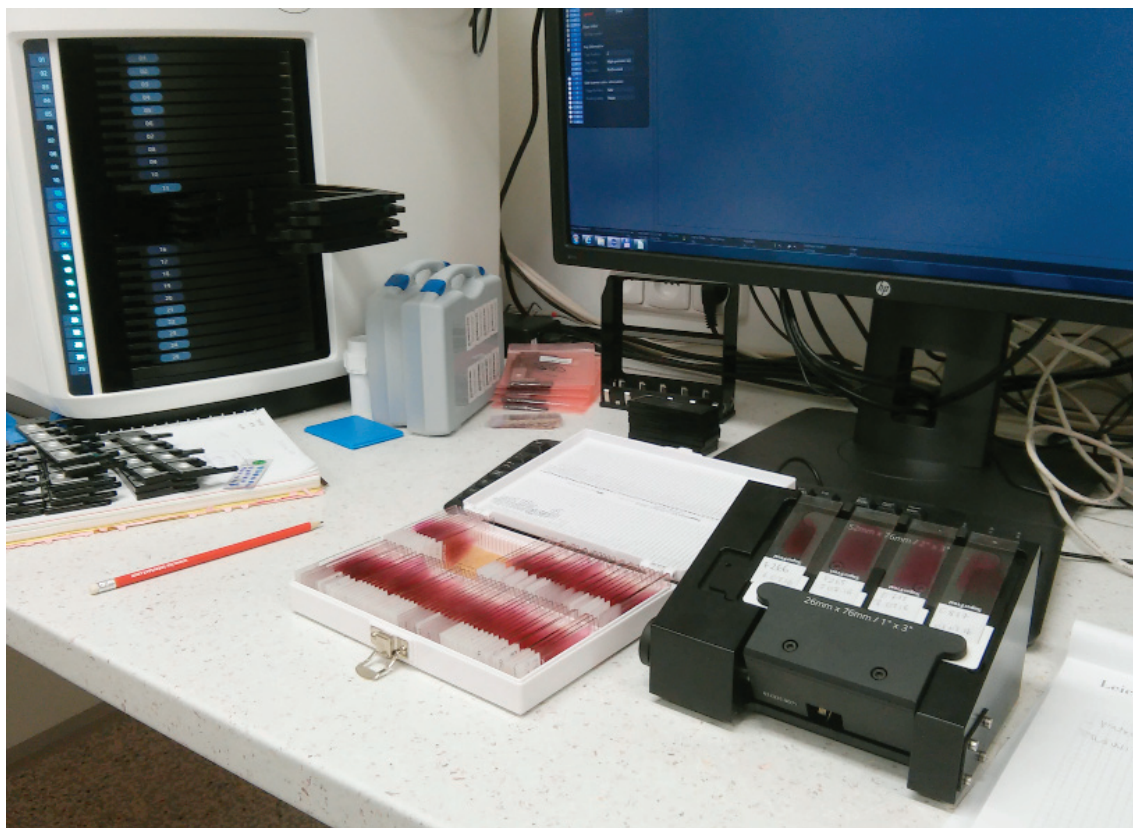
Krevní vzorky ptáků byly odebírány bezprostředně po experimentu s BMR. Odběr probíhal heparinizovanou injekční stříkačkou z jařmové žíly. Byl proveden krevní roztěr, který se nechal na sklíčku zaschnout, a poté byl zafixován methyllalkoholem. Následným krokem bylo obarvení jednotlivých vzorků ponořením do roztoku

May–Grunwaldova roztoku (eosin-methylenová modř 1 g, methanol 100 ml, glycerol 50 ml) po dobu tří minut. Následně byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou a ponechány jednu minutu oschnout. Posledním krokem bylo vložení nátěrů do kyvety se zředěným roztokem Giemsy–Romanovského (azureosin II, glycerol, methanol) a působení tohoto roztoku po dobu patnácti až dvaceti minut k dokončení procesu barvení. Hotové vzorky byly archivovány v boxech. (Sadowska et al, 2015)

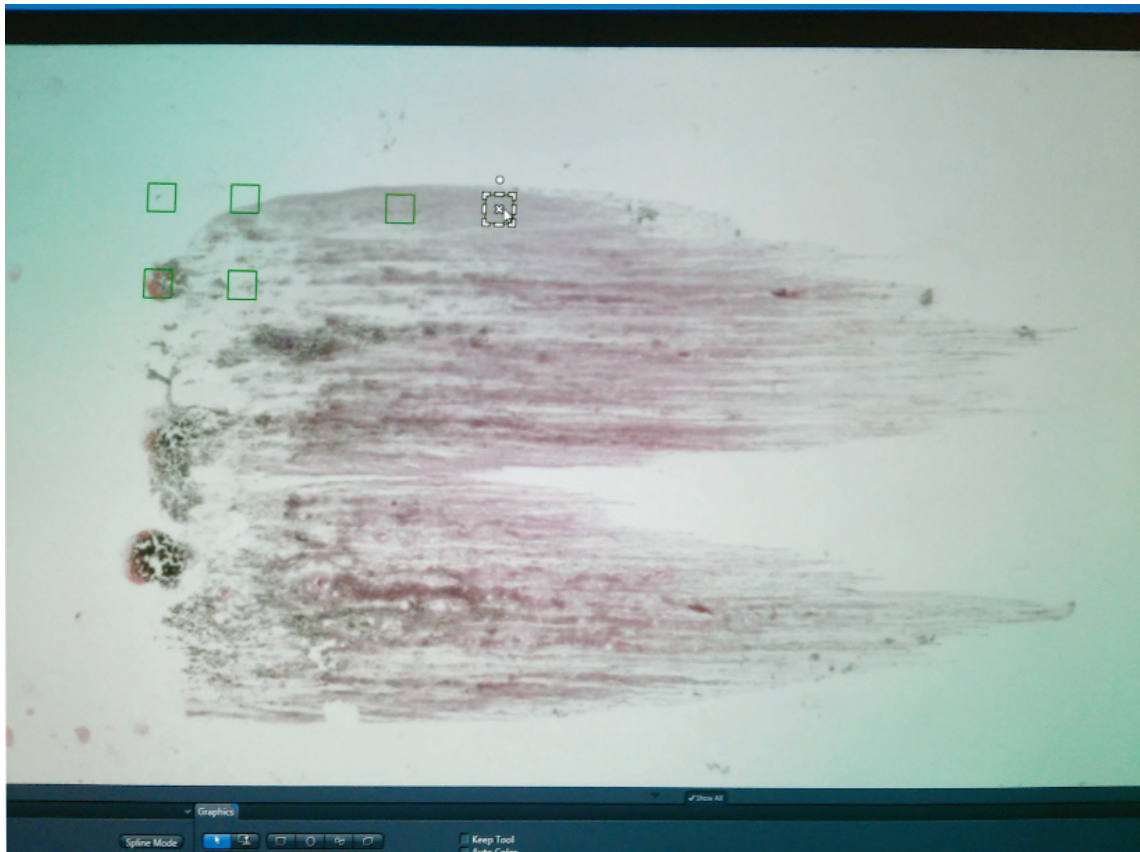
### 2.1.3 Vyhodnocení vzorků

Vzorky krevních roztěrů vytvořených Jagelonskou univerzitou v Krakově byly transportovány na pracoviště katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity v Praze k následným vyhodnocením, jichž jsem se osobně zúčastnil.

Na skenování krevních nátěrů na podložních sklíčkách jsem použil zařízení ZEISS Axio Scan.Z1. Jedná se o rychlý a flexibilní skener sklíček pro mikroskopii, systém je navržen speciálně pro digitalizaci mikroskopických preparátů. Pomocí mikroskopického skeneru diapozitivů jsem vzorky spolehlivě a reprodukovatelně digitalizoval a vznikly tak kvalitní virtuální snímky.



**Obrázek 9:** Zařízení ZEISS Axio Scan s vzorky krevních roztěrů  
(foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)



**Obrázek 10:** Ukázka prvotního skenu, na němž je vidět šest čtverců, které byly následně ručně „přesunuty“ na místa s předpokladem nejlepší koncentrace výsledného skenu v požadované kvalitě  
(foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)

Nejprve jsem vytvořil náhled skenu, kde bylo ručně označeno šest vzorových „počítacích“ čtverců v nejlepších místech nátěru, tedy v místech, kde byl nátěr v ideální koncentraci, nebyl nijak poškozený, špatně obarvený apod. Následně jsem vybral čtyři čtverce pro skenování a z nich jsem použil dva nejlepší. Celkem jsem k analýze použil 182 souborů ve formátu jpg o průměrné velikosti 15 MB ve velikosti 5000 x 5000 pixelů. Celý roztěr nebylo možné skenovat kvůli značné velikosti souboru, práce s takovým souborem by byla značně pomalá. Takto složitý proces jsem zvolil z toho důvodu, aby naskenované vzorky měly potřebnou kvalitu. Jednalo se hlavně o hloubku ostrosti, která byla potřebná pro následnou analýzu erytrocytů. V ideálním případě je jádro erytrocytu jinak zbarvené, má jinou velikost.

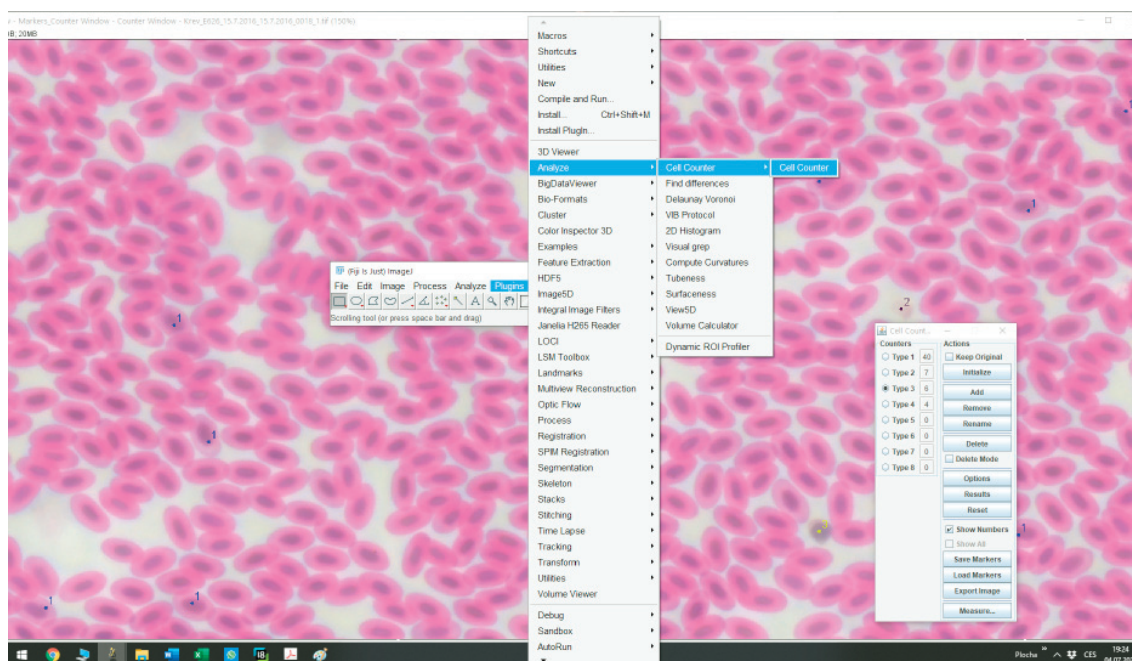
Tyto čtverce jsem následně zpracoval v programu ImageJ (Schneider et al., 2012), který byl vyvinutý v Národních ústavech zdraví a Laboratoři optických a výpočetních přístrojů na Wisconsinské univerzitě. Jedná se o program pro zpracování obrázků založený na platformě Java.



1. V prvním kroku jsem na počítači překontroloval údaje o skle; správnost údajů o vzorku, datu vzniku, předběžně jsem zhodnotil kvalitu nátěru.

2. Druhým krokem bylo otevření všech šesti čtverců a vybrání dvou nejlepších výřezů z nich. Rozhodovala ostrost vzorku a síla nátěru. Ten nesmí být příliš tenký, protože by na něm bylo málo buněk, opačným problémem je velká vrstva nátěru, sken by byl neprosvícený a málo čitelný.

3. Z těchto dvou nejlepších vzorků se vybral čtverec o velikosti 2273 x 2273 pixelů, který obsahoval 2500 až 3500 buněk. Toto pole jsem naskenoval a uložil do počítače k následné analýze.



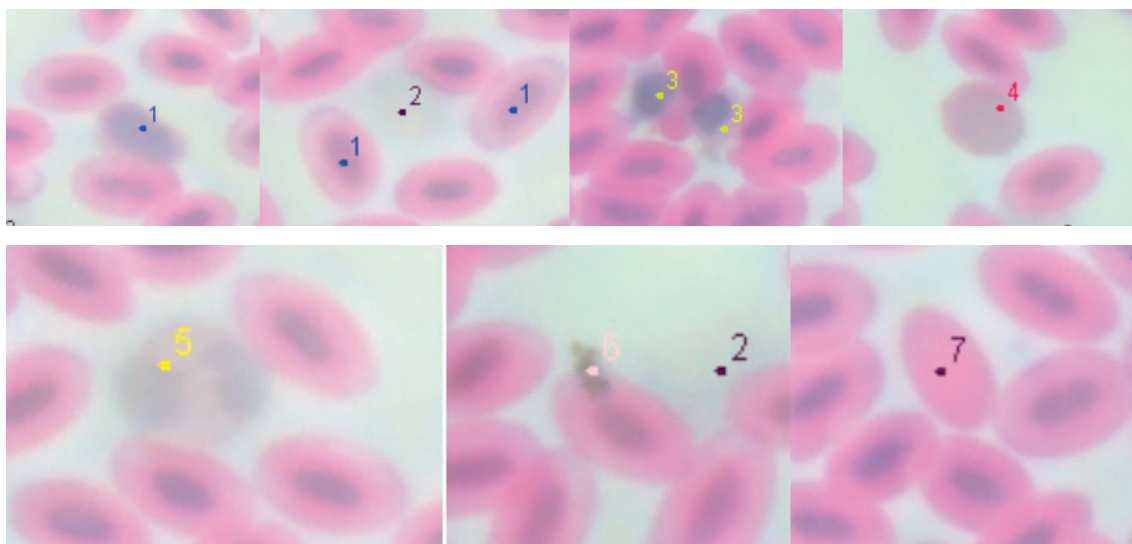
**Obrázek 11:** *Náhled obrazovky při práci s programem ImageJ. Na pravém okně je vidět plugin Cell counter (foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)*

### **Následná analýza proběhla ve dvou základních krocích.**

Prvním krokem bylo počítání celkového počtu buněk. K usnadnění práce při počítání byl vytvořen script (ve spolupráci s Dr. Martinem Schätzem z Univerzity Karlovy), který dokázal ve většině případů dopočítat celkový počet buněk. Úspěšnost byla zhruba 95%, proto se výsledky musely ručně zkontrolovat a opravit.

Druhá část spočívala v diferenciaci celkového počtu buněk. K tomuto kroku byl použit plugin Cell counter (počítadlo buněk) do programu ImageJ (autor: Kurt De Vos), který se v tomto ohledu velice osvědčil. Jedná se o zásuvný modul pro ruční počítání buněk, kdy lze tyto buňky odlišit do druhů podle čísel. Je ovládán pomocí

vlastního grafického uživatelského rozhraní a může exportovat a načítat výsledky. Při analýze jsme označili šest typů buněk. Prvním typem byli immaturní jedinci, druhým lyzogenní erythrocyty, které už dožívají a pomalu se rozpadají, třetím trombocyty tedy krevní destičky, čtvrtým lymfocyty, tedy bílé krvinky, pátým heterofil s eosinofilem, šestým typem jsou zbytky rozpadajících se buněk a případně neidentifikovatelné buňky a sedmým bezjaderné erythrocyty, které se vyskytují relativně vzácně.



**Obrázek 12:** Ukázky druhů buněk.

1: Nezralý erythrocyt, 2: Lyzogenní erythrocyt, 3: Trombocyt, 4: Lymfocyt, 5: Heterofil nebo eosinofil, 6: Zbytky rozpadajících se buněk, 7: Bezjaderné erythrocyty  
(foto: Bc. Tomáš Vrkoslav)

V rámci analýzy jsme celkem obdrželi 91 krevních roztěrů zebříček pestrých. Jednalo se pouze o samičky, které byly chovány v zajetí na univerzitě v Krakově. Počet zkoumaných jedinců byl ale 81, tedy o deset méně, protože někteří ptáci měli provedené roztěry dvakrát. Čtyři skla nemohla být analyzována z důvodu nekvalitního roztěru. Do statistické analýzy bylo však zahrnuto pouze 45 skel, která měla nejlepší kvalitu tedy skeny s hodnocením 8 a 9 (1 = nejhorší, 10 = nejlepší). Při hodnocení byla převážně zvažována ostrost výsledného skenu, hustota atp., zároveň k nim nesměly chybět žádné údaje ohledně první části výzkumu (basal metabolic rate, body mass = hmotnost jedinců), které jsme znali z výzkumu polského týmu dr. Cichóna.

Z každého vzorku proběhla analýza dvou čtverců. Výsledná hodnota tvořila průměr hodnot nezralých erythrocytů a celkového počtu buněk. Tyto hodnoty jsme pak statisticky porovnávali s výsledky výzkumu Mariusze Cichóna a jeho týmu, který měřil bazální rychlost metabolismu u zebříček pestrých.

Ke zhodnocení jsme používali program R (R version 3.6.0 [2019-04-26] – „Planting of a Tree“, Copyright (C) 2019 The R Foundation for Statistical Computing), konkrétně jsme využili lineární smíšené modely implementované v balíčku Lme4 package LmerTest.

První částí bylo ověření korelace mezi hmotností a délkou běháku. Tato standardizovaná hmotnost je nazvána jako „mass.“

Model číslo 1 obsahuje většinu známých hodnot.

```
>m1<-lm(ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Treatment + Basal.metabolic.rate:Mass + Basal.metabolic.rate:Tarsus).
```

Plný model byl zjednodušován sestupnou eliminací členů až na minimální adekvátní model (MAM; tj. model se všemi členy statisticky signifikantními, tj.  $P < 0,05$  anebo marginálně nesignifikantními  $0,10 < P \leq 0,05$ ) na základě hodnot Akaikeho kritéria (AIC). Kandidátní modely byly porovnávány na základě změn deviance s příslušnou změnou stupňů volnosti s využitím analýzy rozptylu (ANOVA) a F statistiky.

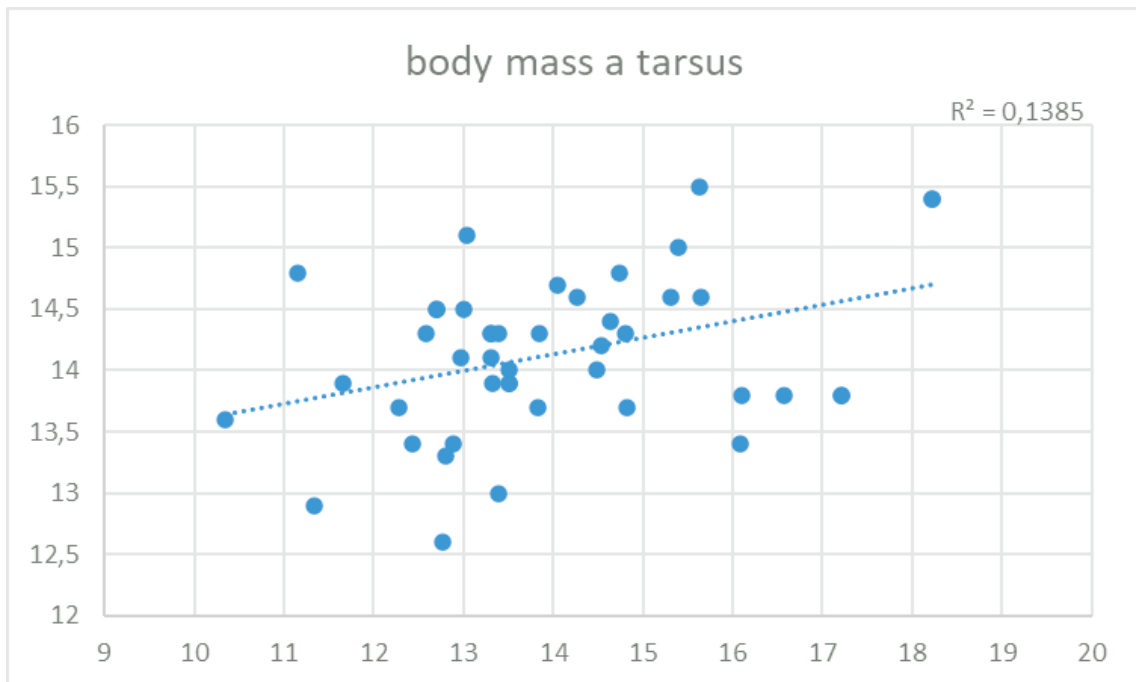
Výsledný MAM porovnává hodnoty s nulovým modelem, aby se zjistila signifikance celého modelu

Hodnoty byly testovány na normální rozdělení reziduálů pomocí Shapiro–Wilko-va testu. Za hranici statistické signifikance bylo považována hodnota  $p = 0,05$

### 3 Výsledky

#### Korelace mezi hmotností a délkou běháku (body mass/tarsus)

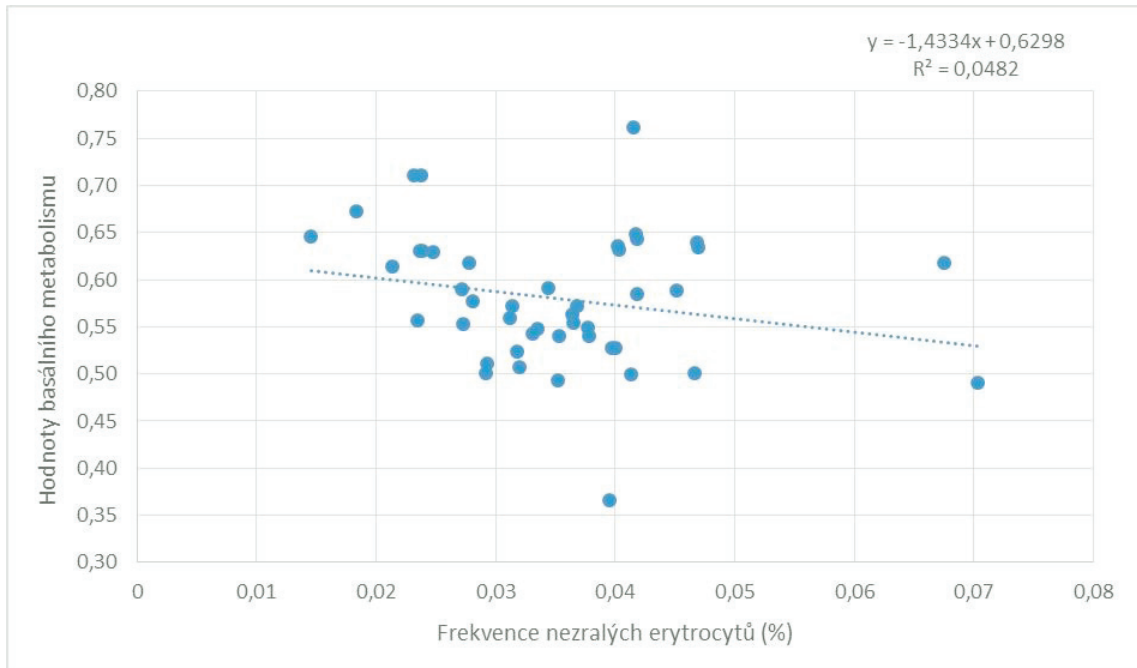
Ve vybraném modelu zebřičky pestré je zjištěna závislost hmotnosti těla a běháku (DF = 43,  $t = 2,6296$ ,  $p = 0,01181$ ). Z výsledku lze usuzovat, že byl nalezen signifikantní pozitivní vztah mezi délkou běháku a hmotností jedince.



**Obrázek 13:** Graf korelace mezi hmotností a délkou běháku u zebřičky pestré,  $n = 45$

## Vztah mezi imaturními erytrocyty a hodnotami bazálního metabolismu

V modelu lineární regrese s počtem 45 vzorků docházím k porovnání imaturních erytrocytů s hodnotami bazálního metabolismu. ( $Df = 41$ ,  $F = 4,6268$ ,  $Pr(>F) = 0,03742$ ). Tato hodnota vyšla signifikantní.

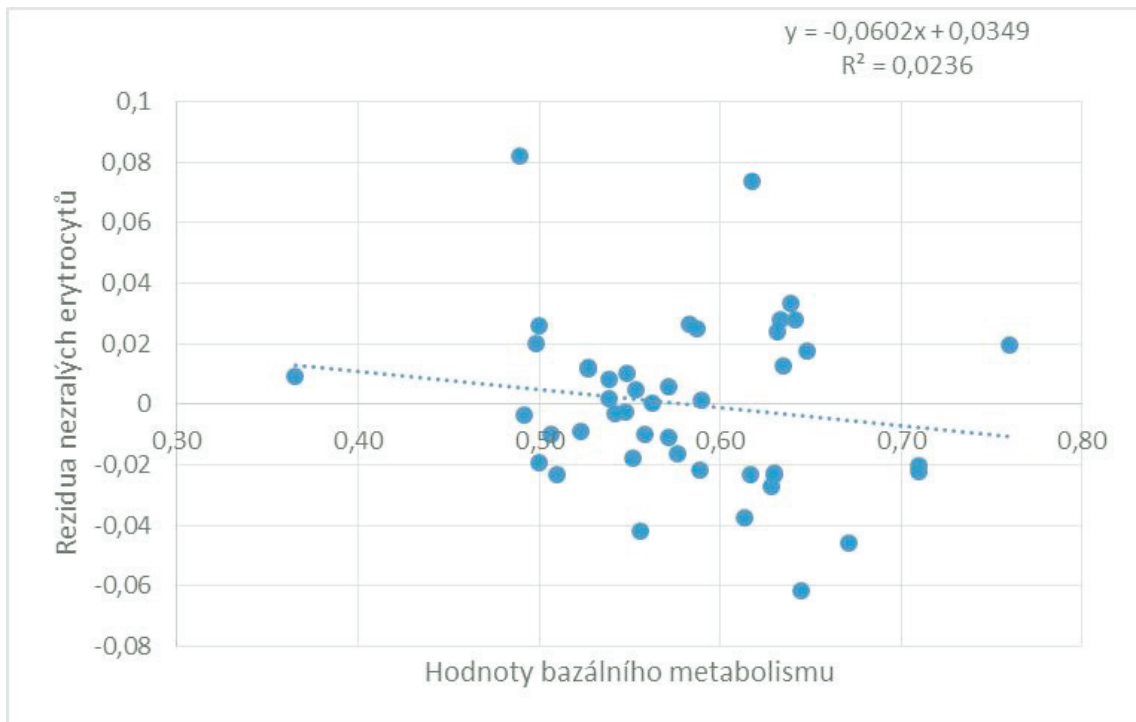


**Obrázek 14:** Graf závislost bazálního metabolismu na frekvenci nezralých erytrocytů u zebřičky pestré,  $n = 45$



## Rozdělení reziduálů

Vizualizace vztahu mezi reziduály minimálního adekvátního modelu bez imaturních erytrocytů a bazálním metabolismem. Test je statisticky nesignifikantní ( $W = 0,97981$ ,  $p = 0,6119$ )



**Obrázek 15:** Graf reziduálů minimálního adekvátního modelu bez imaturních erytrocytů a bazálního metabolismu,  $n=45$

Obsah modelu	Hodnota Pr(> t )
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Treatment + Basal.metabolic.rate:Mass + Basal.metabolic.rate:Tarsus Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Basal.metabolic.rate:Mass + Basal.metabolic.rate:Tarsus	0.8713
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Basal.metabolic.rate:Mass Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Basal.metabolic.rate:Mass + Basal.metabolic.rate:Tarsus	0.5642
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Basal.metabolic.rate:Mass Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Basal.metabolic.rate:Mass	0.1164
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Basal.metabolic.rate:Mass	0.03742
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Basal.metabolic.rate:Mass	0.1087
Model 1: ImmEryt ~ Mass Model 2: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Basal.metabolic.rate:Mass	0.05228
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Tarsus + Treatment + Basal.metabolic.rate:Mass + Basal.metabolic.rate:Tarsus Model 2: ImmEryt ~ 1	0.134
Model 1: ImmEryt ~ Basal.metabolic.rate + Mass + Basal.metabolic.rate:Mass Model 2: ImmEryt ~ 1	0.06604

**Obrázek 16:** Tabulka modelů, který byl zjednodušován sestupnou eliminací členů až na minimální adekvátní model

## 4 Diskuse

Bazální metabolismus (BMR) je jednou z nejpoužívanějších metabolických proměnných v endotermické, ekologické a evoluční fyziologii (Jacobs and McKechnie, 2014). Bohužel však většina znalostí o ptačí energetice je založena na studiích ptáků z mírných a polárních zeměpisných šířek (Bushuev et al., 2018). Jeden z výzkumů potvrzuje, že tělesná hmotnost rezidua významně koreluje s rezidui s maximální metabolickou rychlostí, klidovou srdeční frekvencí či délkou života (White and Seymour, 2004). Faktorem s největším dopadem na BMR je vždy tělesná hmotnost (tvoří 96,8 % její variace) (McNab, 2008). Dále tyto hodnoty korelují se stravovacími návyky, podnebím a prostředím (McNab, 2008). Proti těmto údajům je však výzkum, který říká, že ptačí BMR vykazuje značné rozdíly, které jsou nezávislé na tělesné hmotnosti (Jetz et al., 2008). Naopak tato hodnota je silně spjata s různými stanovišti a způsobem života (Gutiérrez et al., 2012; McNab, 2008). To potvrzuje i výzkum jedinců mírného pásu, podle kterého druhy mající vyšší BMR mají lepší reprodukční výsledky (McNab, 2008). Vyšší rychlost metabolismu o 15 % byla také zaznamenána i u druhů vyskytujících se na pobřeží, oproti těm, které žijí ve vnitrozemí (Gutiérrez et al., 2012). Výsledky v této práci dokazují to, že vývoj erytrocytů v ptačí krvi není prokazatelně ovlivněn bazálními metabolickými hodnotami.

Některé studie potvrdily, že cílená regulace BMR je důležitá pro celkové přežití jedinců (McKechnie, 2008). U malých druhů ptáků žijících v severních zeměpisných šířkách je aklimatizace na prostředí životně důležitá (Dubois et al., 2016). V zimním období jedinci zvětšují velikost prsního svalu a úroveň hematokritu, což má za následek sezónní zvýšení rychlosti metabolismu (Petit and Vézina, 2014). S tím je spojené i zvětšení zažívacích a vylučovacích orgánů, které vedlo ke zvýšení zimního BMR a zhmotnění svalstva (Petit et al., 2014). Jedinci sýkory černohlavé (*Poecile atricapillus*), kteří měli maximální termogenní kapacitu pod 1,26 W, měli 50% šanci na přežití, zatímco ptáci s velikostí nad 1,35 W měli alespoň 90% šanci na přežití přes zimu (Petit et al., 2017). Oproti tomu někteří drobní pěvci volí alternativu migrace, při které se vyhnou stresovému faktoru zimního období (Dawson et al., 1983). Ptačí BMR však koreluje s migračními návyky, pokud se z analýzy vyloučí klima a horské prostředí (McNab, 2008). Některé migrující druhy na dlouhé vzdálenosti vykazují zvláště vysoké BMR (Jetz et al., 2008). To potvrdil i výzkum žijících tropických druhů (Bushuev et al., 2018). Dalším aspektem je taxonomická příslušnost, protože mnoho taxonů se vyznačuje svými ekologickými a behaviorálními charakteristika-

mi (McNab, 2008). U tropických druhů však tento fakt nebyl potvrzen (Bushuev et al., 2018). Ve většině zkoumaných druhů je BMR vykazována fenotypovou flexibilitou (McKechnie, 2008; McKechnie and Swanson, 2010). Fenotypová flexibilita v BMR také představuje důležitou složku krátkodobé tepelné aklimatizace v laboratorních podmínkách, přičemž ptáci chovaní v zajetí zvyšují BMR při aklimatizaci na nízkou teplotu vzduchu a naopak. Objevující se pohled na ptačí BMR má vysoce flexibilní fyziologický rys, který se neustále upravuje v reakci na faktory prostředí, jako je teplo (McKechnie, 2008). Vliv by na to mohla mít i potrava, která v případě vyššího obsahu bílkovin a cukrů zvyšuje danou rychlost metabolismu (McNab, 2008).

Někteří autoři poukázali na to, že složitým aspektem měření může být i to, zda je jedinec v aktivní, či klidové fázi dne. Tyto fáze představují v BMR velkou variabilitu např. sezónní variace (Ellis and Gabrielsen, 2019). Korelace mezi BMR a rychlostí metabolismu při denním výdeji energie u ptáků jsou proměnlivé, což naznačuje, že vazba mezi těmito vlastnostmi je podmíněna úpravou chování a chybí studie vztahů mezi rychlostí v přirozeném prostředí a maximálními rychlostmi metabolismu v zajetí (McKechnie and Swanson, 2010).

Co ovlivňuje celkový metabolismus lze jen obtížně od sebe oddělit a toto zkoumat pouze jedním faktorem je skoro nemožné. Musí se brát v úvahu i odlišnost jedinců v rámci jednoho druhu, protože výsledky může ovlivnit jejich individuální organismus, ale i nahodilost.

Přihlédneme-li ke vztahu krevních buněk a a bazálního metabolismu, výzkumy se zcela neshodují na tom, jak moc se tyto dvě veličiny ovlivňují.

Některé výsledky poukazují na skutečnost, že velikost metabolismu jedince přímo souvisí s vývojem a velikostí červené krvinky (Pis, 2008). Na druhou stranu jsou zde výsledky, že korelace mezi malými buňkami s malým množstvím DNA v buněčných jádrech souvisí s vysokou úrovní metabolismu. (Szarski, 1970)

Některé studie vyvrátily vztah mezi tělesnou hmotností jedince a koncentrací hemoglobinu v ptačích erytrocytech. Údaje od 75 druhů ptáků o hmotnosti mezi 6 g až 16 kg potvrdily, že množství hemoglobinu nezávisí na tělesné hmotnosti. (Kostelecka-Myrcha and Cholostiakow-Hromek, 2001)

Další studie poukázala, že hladina hemoglobinu a koncentrace erytrocytů kolísá v průběhu roku ve vztahu ke konstatní tělesné hmotnosti (Kostelecka-Myrcha, 1997).

## 5 Závěr

V úvodu jsem si stanovil za cíl práce potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že krve- tvorba ptáků ovlivňuje rychlost jejich metabolismu. Určil jsem nulovou hypotézu, která zní, že erythrocyty v krvi neovlivňují rychlost metabolismu. Po vyhodnocení výsledků jsem dospěl k závěru, že vztah erythrocytů k bazálnímu metabolismu je slabý. Základní otázkou je, zda vůbec tento vztah existuje. Pravděpodobně ano, ale model nebyl signifikantní, jen marginálně nesignifikantní, což může být způsobeno malým vzorkem. Sílu vztahu udává koeficient determinace, ten vztah byl opravdu slabý, ale to nemusí nutně znamenat, že není důležitý. Nicméně takto slabý vztah nebude dobrým markerem pro použití v ekologických studiích. Tato korelace je poněkud spekulativní.

U ostatních srovnání jednotlivých veličin jsme nedospěli k jednoznačným výsledkům, proto je jejich vztah slabý a neprůkazný.

Následný budoucí výzkum bych doporučoval provést na divokých zebříčkách pestrých, protože u ptáků chovaných v klecích můžou nastat faktory, například genetická variabilita, strava či prostředí chovu, které výsledky ovlivňují. Hlavní nedostatky byly převážně v kolísající kvalitě obarvených vzorků, některá skla byla obarvena příliš sytě, tudíž nebylo možno při analýze rozeznat jádra erythrocytů a tím odlišit zralou a nezralou buňku. Další důležitou závadou byla kolísající hustota buněk na skle, kterou jsem se snažil co nejvíce kompenzovat tím, že při skenu těchto skel jsem vybral pouze nejlepší části – tedy ukázkových šest čtverců. Bohužel někdy byla kvalita tak nízká, že ani to nebylo dostačující k získání spolehlivých snímků a tím pádem i dobrých výsledků. Tento problém s kvalitou zhoršoval následnou počítačovou analýzu buněk, některé vzorky se musely počítat ručně. Tím se práce na výzkumu komplikovala a vzrůstala pravděpodobnost faktoru lidské chyby.

Z hlediska budoucího výzkumu se budeme vždy snažit porozumět fungování organismu ptáků a odhalovat faktory, které jejich život ovlivňují. Zlepšování diagnostiky jejich problémů nám může pomoci zabránit negativním vlivům na jejich organismus a v konečném důsledku zachovat druhovou rozmanitost.

## 6 Seznam použité literatury

- ALTMAN, R. B. et al. Avian medicine and surgery. Saunders. 1997. ISBN: 0721654460.
- ANDREW, S. C. et al. Higher temperatures during development reduce body size in the zebra finch in the lab and in the wild. In: Journal of Evolutionary Biology 30(12): 2017, 2156 – 2164.
- ASCHOFF, J. and Pohl, H. Rhythmic variations in energy metabolism. In: Federation Proceedings 29(4): 1970, 1541 – 1552.
- BACKSTROEM, N. et al. Genomics of natural bird populations: A gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. In: Molecular Ecology 17(4): 2008, 964 – 980.
- BEARHOP, S. et al. Mean corpuscular volume (MCV) as a measure of condition in birds. In: Ecology Letters 2(6): 1999, 352 - 356.
- BEARHOP, S. et al. The normal haematology of great skuas (*Catharacta skua*) in the wild. In: Comparative Haematology International 9(2): 1999, 107 – 109.
- BEUG, H. et al. Avian erythropoiesis and erythroleukemia: Towards understanding the role of the biomolecules involved. In: Biochimica et Biophysica Acta 1288(3): 1997, 35 - 47.
- BOKMA, F. Evidence against universal metabolic allometry. In: Functional ecology 18: 2004, 184 – 187.
- BOUMANS, T. et al. Functional MRI of auditory responses in the zebra finch forebrain reveals a hierarchical organisation based on signal strength but not selectivity. In: PLoS ONE 3(9): 2008, 3 - 9.
- BROGGI, J. et al. Long-term repeatability of winter basal metabolic rate and mass in a wild passerine. In: British Ecological Society 23(4): 2009, 768 - 773.
- BRAND, M. D. Regulation analysis of energy metabolism. In: Journal of Experimental Biology 200: 1997, 193 - 202.
- BUSHUEV, A. et al. Basal metabolic rate in free-living tropical birds: the influence of phylogenetic, behavioral, and ecological factors. In: Current Zoology 64(1): 2018, 33 - 43.
- CAMPBELL, T. W. Avian hematology and cytology. Iowa State University Press, 1995. ISBN: 0813829704.
- CAMPBELL, T. W. Exotic animal hematology and cytology. Wiley-Blackwell. 2015. ISBN: 1118611276.
- CAMPBELL, T. W. and Dein, F. J. Avian hematology. In: Symposium on Caged Bird Medicine 14: 1984, 223 – 248.
- CAMPBELL, T. W. and Ellis, Ch. K. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3rd edition. Wiley-Blackwell. 2007. ISBN: 0813818117.
- CARRICK, J. and Begg, A. P. Peripheral blood leukocytes. In: The Veterinary clinics of North America. Equine practice 24(2): 2008, 239 - 259.
- CARROLL, R. L. Vertebrate Paleontology and Evolution. New York: W. H. Freeman and Company. 1988. ISBN: 0716718227.

- CLARK, P. et al. Atlas Of Clinical Avian Hematology. Oxford: Wiley-Blackwell. 2009. ISBN: 9781444316193.
- CLARKE, A. and Pörtner, H-O. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. In: Biological Reviews 85(4): 2010. 703 – 727.
- DAAN, S. et al. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. In: The American Journal of Physiology 259(2): 1990, 333 - 340.
- DAVISON, F. et al. Avian immunology. Academic Press. 2008. ISBN: 9780123706348.
- DAWSON, W. R. et al. Metabolic adjustments of small passerine birds for migration and cold. In: American Journal of Physiology 245(6): 1983, 755 - 767.
- DIEZ-SILVA, M. et al. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. In: MRS Bulletin 35(5): 2010, 382 - 388.
- DOLNIK, V. R. and Gavrilov, V. M. Caloric equivalent of body weight variations in chaffinch. In: Ecological and Physiological Factors 29: 1973, 273 - 287.
- DONELEY, B. Avian medicine and surgery in practice. Companion and Aviary Birds. London: Manson Publishing Ltd. 2011. ISBN: 9781840765922.
- DUBOIS, K. et al. Basal and maximal metabolic rates differ in their response to rapid temperature change among avian species. In: Journal of Comparative Physiology 186(7): 2016, 919 - 935.
- DUFNER, D. and Previs, S. F. Measuring in vivo metabolism using heavy water. In: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 6(5): 2003, 511 - 517.
- ELLIS, H. I. and Gabrielsen, G. W. Reasing the definition of basal metabolic rate: Circadian considerations in studies. In: Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology 237: 2019.
- FINNEGAN, V. M. et al. Evaluation of whole blood transfusions in domestic pigeons (*Columba livia*). In: Journal of Avian Medicine and Surgery 11(1): 1997, 7 - 14.
- FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. In: Experimental Hematology 37(9): 2009, 1007 - 1015.
- GANONG, W. F. Přehled lékařské fyziologie. Dvacáté vydání. Galén. 2005. ISBN: 8072623117.
- GAVRILOV, V. M. Ecological phenomena of *Passeriformes* as a derivative of their energetics. In: Acta Ornithologica 34(2): 1999, 165 – 172.
- GLAZIER, D. S. Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. In: Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 80(4): 2005, 611 – 662.
- GRIFFITH, S. C. and Buchanan, K. The zebra finch: the ultimate Australian supermodel. In: Emu 110(3): 2010, 5 - 12.
- GUTIÉRREZ, J. S. et al. Avian BMR in Marine and Non-Marine Habitats: A Test Using Shorebirds. In: PLoS ONE 7(7): 2012, 1 - 12.
- HAWKEY, C. M. et al. A Colour Atlas of Comparative Veterinary Hematology. Iowa State University Press. 1989. ISBN: 9780723409304.



- HELMER, P.J. et al. What is your diagnosis? In: Journal of Avian Medicine and Surgery 14(3): 2000, 200 – 203.
- HOFFMANN, A. et al. Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they? In: Functional Ecology 27(4): 2013, 934 – 49.
- HOLEČEK, M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha: Grada, 2006. ISBN: 8024715627.
- HOLVECK, M. J. and Riebel, K. Preferred songs predict preferred males: Consistency and repeatability of zebra finch females across three test contexts. In: Animal Behaviour 74(2): 2007, 297 – 309.
- JACOBS, P. J. and McKechnie, A. E. Experimental sources of variation in avian energetics: estimated basal metabolic rate decreases with successive measurements. In: Physiological and Biochemical Zoology 87(5): 2014, 762 - 769.
- JETZ, W. et al. Environment, migratory tendency, phylogeny and basal metabolic rate in birds. In: PLoS One 3(9): 2008, 3261.
- JONES, M. P. Avian Hematology. In: Clinics in Laboratory Medicine 35(3): 2015, 649 - 659.
- KING, J. R. and Farner, D. S. Energy metabolism, thermoregulation and body temperature. In: Biology and Comparative Physiology 2: 1961, 215 - 288.
- KITTNAR, O. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011. ISBN 9788024730684.
- KOSTELECKA-MYRCKA, A. The ratio of amount of haemoglobin to total surface area of erythrocytes in birds in relation to body mass, age of nestlings, and season of the year. In: Physiological Zoology 70(3): 1997, 278 - 282.
- KOSTELECKA-MYRCKA, A. and Cholostiakov-Hronek, J. Body mass dependence of the haemoglobin content to surface area ratio of avian erythrocytes. In: Acta Ornithologica 36(2): 2001, 123 - 128.
- KOSTELECKA-MYRCKA, A. and Maciak, S. Regularities of variation of the red blood indices characterizing the respiratory function of blood in selected fish. In: Zoological Poloniae 56(1-4): 2011, 35 - 48.
- LATIMER, K. S. et al. Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology. Iowa State Press. 2003. ISBN: 9780813820705.
- LAVIN, S. et al. Hematology and blood chemistry of the marsh harrier (*Circus aeruginosus*). In: Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 103(3): 1992, 493 – 495.
- LEGENDRE, L. and Davesne, D. The evolution of mechanisms involved in vertebrate endothermy. In: Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences 375(1793): 2020.
- LIGHTON, J. R. B. Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists. New York. Oxford University Press. 2008. ISBN: 9780195310610.
- LICHTENBERGER M. et al. Response to fluid resuscitation subsequent to acute blood loss in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Association of Avian Veterinarians. 2005. ISBN: 2950888593.

- LINDENWALD, R. et al. Flow-cytometric analysis of circulating leukocyte populations in turkeys: Establishment of a whole blood analysis approach and investigations on possible influencing factors. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 210: 2019, 46 – 54.
- LINDSTRÖM, Å. and Kvist, A. Maximum energy intake is proportional to basal metabolic rate in passerine birds. In: *Proceedings of Royal Society B* 261: 1995, 337 – 343.
- LOCHMANOVÁ, et al. Průtoková cytometrie v mikrobiologii. In: *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 66(4): 2017, 182 - 188.
- MARTINHO, F. Blood transfusion in birds, In: *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* 5: 2012, 1 - 30.
- MATOS, R. de and Morrissey, J. K. Emergency and critical care of small psittacines and passerines. In: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 14(2): 2005, 90 – 105.
- McCAFFERTY, D. J. et al. Animal thermoregulation: a review of insulation, physiology and behaviour relevant to temperature control in buildings. In: *Bioinspiration & Biomimetics* 13(1): 2017, 1 - 38.
- McCOWAN, L. S. C. et al. The size and composition of social groups in the wild zebra finch. In: *Emu - Austral Ornithology* 115(3): 2015, 191 - 198.
- McKECHNIE, A. E. Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: A review. In: *Journal of Comparative Physiology* 178(3): 2008, 235 - 247.
- McKECHNIE, A. E. and Swanson, D. L. Sources and significance of variation in basal, summit and maximal metabolic rates in birds. In: *Current Zoology* 56(6): 2010, 741 - 758.
- McKECHNIE, A. E. and Wolf, B. The allometry of avian basal metabolic rate: good predictions need good data. In: *Physiological and Biochemical Zoology* 77(3): 2004, 502 - 521.
- McNAB, B. K. An analysis of the factors that influence the level and scaling of mammalian BMR. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 151(1): 2008, 5 – 28.
- McNAB, B. K. Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 152(1): 2008, 22 – 45.
- McNAB, B. K. *Extreme Measures: The Ecological Energetics of Birds and Mammals*. Chicago. University of Chicago Press. 2012. ISBN: 0226561232.
- McNAB, B. K. Food habits and the basal rate of metabolism in birds. In: *Oecologia* 77(3): 1988, 343 – 349.
- McNAB, B. K. On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. In: *Physiological Zoology* 70(6): 1997, 718 – 720.
- McNAB, B. K. The ecological energetics of birds in New Guinea. In: *Bulletin of the Florida Museum of Natural History* 52(2): 2013, 95 – 159.

- McNAB, B. K. What determines the basal rate of metabolism?. In: Journal of Experimental Biology 222(15): 2019, 1 - 7.
- McNAB, B. K. and Ellis, H. I. Flightless rail endemic to islands have lower energy expenditures and clutch sizes than flighted rails on islands and continents. In: Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology 145(3): 2006, 295 - 311.
- MITCHELL, E. B. and Johns, J. Avian haematology and related disorders. In: Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 11(3): 2008, 501 - 522.
- MORRISEY, J. K. et al. Estimation of prothrombin times of hispaniolan amazon parrots (*Amazona ventralis*) and umbrella cockatoos (*Cacatua alba*). In: Journal of Avian Medicine and Surgery 17(2): 2003, 72 - 77.
- MURRAY, M. and Tseng, F. S. Diagnosis and treatment of secondary anticoagulant rodenticide toxicosis in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). In: Journal of Avian Medicine and Surgery 22(1): 2008, 41 - 46.
- OSHIMA, T. et al. Can calculation of energy expenditure based on CO<sub>2</sub> measurements replace indirect calorimetry?. In: Critical Care 21(1): 2017, 95.
- OWEN, J. C. Collecting, processing, and storing avian blood: a review. In: Journal of Field Ornithology 82(4): 2011, 339 - 354.
- PATTERSON, M. M. and Fee, M. S. Zebra Finches in Biomedical Research. In: American College of Laboratory Animal Medicine 23: 2015, 1109 - 1134.
- PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Finindr s. r. o. Český Těšín. 2006. ISBN: 8086682021.
- PETIT, M. and Vézina, F. Phenotype manipulations confirm the role of pectoral muscles and haematocrit in avian maximal thermogenic capacity. In: Journal of Experimental Biology 217(6): 2014, 824 - 830.
- PETIT, M. et al. How does flexibility in body composition relate to seasonal changes in metabolic performance in a small passerine wintering at northern latitude?. In: Physiological and Biochemical Zoology 87(4): 2014, 539 - 549.
- PETIT, M. et al. Increasing winter maximal metabolic rate improves intrawinter survival in small birds. In: Physiological and Biochemical Zoology 90(2), 2017, 166 - 177.
- PIERSMA, T. et al. Variability in basal metabolic rate of a long-distance migrant shorebird (red knot, *Calidris canutus*) reflects shifts in organ sizes. In: Physiological Zoology 69(1): 1996, 191 - 217.
- PIS, T. Resting metabolic rate and erythrocyte morphology in early development of thermoregulation in the precocial grey (*Perdix perdix*). In: Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology 151(2): 2008, 211 - 218.
- POTVIN, D. A. et al. Experimental exposure to urban and pink noise affects brain development and song learning in juvenile zebra finches (*Taenopygia guttata*). In: PeerJ 4(8): 2016, 2287 - 2287.
- POWERS, L. V. Diseases of the avian spleen. In: Journal of the American Veterinary Medical Association 22: 2000, 925 - 933.

- PLOUCHA, J. M. et al. Vascular and hematologic effects of hemorrhage in the chicken. In: *American Journal Physiology* 240(1): 1981, 9 - 11.
- PŘÍHODA, M. Zebříčky – Abeceda chovatele. Robimaus. 2013. ISBN: 9788087293324.
- ROSSE, W. F. and Waldmann, T. A. Factors controlling erythropoiesis in birds. In: *Blood* 27(5): 1966, 654 - 661.
- RUTSTEIN, A. N. et al. Evaluating mate choice in the zebra finch. In: *Animal Behaviour* 74(5): 2007, 1277 – 1284.
- SADOWSKA, E. T. et al. Evolution of basal metabolic rate in bank voles from a multi-directional selection experiment. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1806): 2015, 1 - 7.
- SADOWSKA, E. T. et al. Limits to sustained energy intake. XXIII. Does heat dissipation capacity limit the energy budget of lactating bank voles?. In: *Journal of Experimental Biology* 6(11): 2015, 805 - 815.
- SAMOUR, J. H. et al. Normal haematological values of captive gyrfalcons (*Falco rusticolus*). In: *The Veterinary Record* 157(26): 2005, 844 – 847.
- SELIGER, C. et al. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145(1-2):2012, 86 - 99.
- SCHNEIDER, C. A. et al. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. In: *Nature Methods* 9(7): 2012, 671 – 675.
- SMITH, E. K. et al. Avian thermoregulation in the heat: resting metabolism, evaporative cooling and heat tolerance in Sonoran Desert songbirds. In: *The Journal of Experimental Biology* 220(18): 2017, 3290 – 3300.
- SPEAKMAN, J. and Krol, E. Maximal heat dissipation capacity and hyperthermia risk. Neglected key factors in the ecology of endotherms. In: *Journal of Animal Ecology* 79(4): 2010, 726 - 746.
- STOCKHAM, S. L. and Scott T M. A. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Iowa State Press. 2002. ISBN: 081382561.
- SUNI, M. A. and Maino, V. C. Flow cytometric analysis of cell signaling proteins. In: *Methods in Molecular Biology* 717: 2011, 155 - 169.
- SWADDLE, J. P. Reproductive success and symmetry in zebra finches. In: *Animal Behaviour* 51(1): 1996, 203 – 210.
- SWADDLE, J.P. and Cuthill, I. C. Preference for symmetric males by female zebra finches. In: *Nature* 367(6459): 1994, 165 – 166.
- SZABÓ, K. et al. Effects of haematophagous mites on nestling house sparrows (*Passer domesticus*). In: *Acta Parasitologica* 47(4): 2002, 318 – 322.
- TIELEMAN, B. I. et al. Physiological and behavioural correlates of life-history variation: a comparison between tropical and temperate zone House Wrens. In: *Functional Ecology* 20: 2006, 491 - 499.
- WARREN, W. C. et al. The genome of a songbird. In: *Nature* 464(7289): 2010, 757 – 762.

- WEST, G. B. et al. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. In: *Science* 276(5309): 1997, 122 – 126.
- WHITE, C. R. and Seymour, R. Does basal metabolic rate contain a useful signal? Mammalian BMR allometry and correlations with a selection of physiological, ecological, and life-history variables. In: *Physiological and Biochemical Zoology* 77(6): 2004, 929 – 41.
- WHITE, C. R. and Seymour, R. Mammal basal metabolic rate is proportional to body mass  $2/3$ . In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(7): 2003, 4046 - 4049.
- WHITNEY, M. C. and Cristol, D. A. Impacts of sublethal mercury exposure on birds: A detailed review. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 244: 2017, 1 –51.
- WHITNEY, M. C. et al. Basal metabolic rate of birds is associated with habitat temperature and precipitation, not primary productivity. In: *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 274(1607): 2007, 287 - 293.
- YAHAV, S. *Sturkie's Avian Physiology* 6th edition. San Diego: Academic Press. 2015. ISBN: 9780124071605.
- ZANN, R. *The Zebra Finch: A Synthesis of Field and Laboratory Studies*. Oxford University Press. 1996. ISBN: 0198540795.

### **Seznam obrazových příloh z elektronických zdrojů:**

- Obr. 1: © Chris Wiley, Zebra Finch [cit. 25. 5. 2020], dostupné z: <https://ebird.org/species/zebfin?siteLanguage=cs>.
- Obr. 6: © Medesa s.r.o. 2020, [cit. 25. 5. 2020] dostupné z: [https://portal.medesa.cz/Produkty/DetailProduktu/1694359/Mindray\\_BC6200\\_CT](https://portal.medesa.cz/Produkty/DetailProduktu/1694359/Mindray_BC6200_CT).
- Obr. 8: Broggi, J., Hohtola, E., Koivula, K., Nilsson, J-A., Long-term repeatability of winter basal metabolic rate and mass in a wild passerine, [cit. 25. 5. 2020] dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Great-tit-Parus-major-inside-a-metabolic-chamber-where-BMR-is-measured-throughout-the\\_fig1\\_229797201](https://www.researchgate.net/figure/Great-tit-Parus-major-inside-a-metabolic-chamber-where-BMR-is-measured-throughout-the_fig1_229797201)



## 7 Přílohy

### Příloha 1: výsledky výzkumu na Jagellonské univerzitě v Krakově

Species	Ring no	Sex	Date	Body mass	Tarsus	Basal metabolic rate	Daily energy expenditure	Treatment
zebra finch	E756	Female	7/10/2016	18,23	15,4	0,63	36,22	thermoneutral zone
zebra finch	E913	Female	7/12/2016	14,26	14,6	0,55	40,73	thermoneutral zone
zebra finch	E895	Female	7/12/2016	12,77	12,6	0,59	30,53	thermoneutral zone
zebra finch	E769	Female	7/16/2016	17,21	13,8	0,71	80,78	cold temp
zebra finch	F200	Female	7/6/2016	12,59	14,3	0,62	72,15	cold temp
zebra finch	E727	Female	7/8/2016	15,31	14,6	0,55	40,75	thermoneutral zone
zebra finch	E813	Female	7/9/2016	13,83	13,7	0,63	69,82	cold temp
zebra finch	F262	Female	7/9/2016	10,35	13,6	0,51	42,61	thermoneutral zone
zebra finch	E756	Female	7/10/2016	18,23	15,4	0,63	36,22	thermoneutral zone
zebra finch	E688	Female	7/12/2016	13,3	14,3	0,53	59,89	cold temp
zebra finch	E688	Female	7/12/2016	13,3	14,3	0,53	59,89	cold temp
zebra finch	F091	Female	7/12/2016	14,49	14,0	0,64	71,35	cold temp
zebra finch	E626	Female	7/15/2016	13,03	15,1	0,56	37,01	thermoneutral zone
zebra finch	E828	Female	7/15/2016	13,51	13,9	0,54	31,70	thermoneutral zone
zebra finch	F093	Female	7/15/2016	13,31	14,1	0,52	58,47	cold temp
zebra finch	F085	Female	7/15/2016	14,64	14,4	0,58	63,30	cold temp
zebra finch	F153	Female	7/15/2016	12,43	13,4	0,63	62,51	cold temp
zebra finch	E828	Female	7/15/2016	13,51	13,9	0,54	31,70	thermoneutral zone
zebra finch	E716	Female	7/15/2016	13,32	13,9	0,56	60,02	cold temp
zebra finch	E769	Female	7/16/2016	17,21	13,8	0,71	80,78	cold temp
zebra finch	E970	Female	7/16/2016	11,66	13,9	0,49	33,66	thermoneutral zone
zebra finch	E703	Female	7/16/2016	16,11	13,8	0,58	34,71	thermoneutral zone
zebra finch	F103	Female	7/16/2016	11,15	14,8	0,56	33,34	thermoneutral zone
zebra finch	F255	Female	7/16/2016	12,88	13,4	0,62	63,20	cold temp
zebra finch	F218	Female	7/17/2016	14,05	14,7	0,65	31,10	thermoneutral zone
zebra finch	E880	Female	7/17/2016	13,39	14,3	0,59	36,96	thermoneutral zone
zebra finch	E648	Female	7/17/2016	16,58	13,8	0,63	64,37	cold temp
zebra finch	E973	Female	7/17/2016	15,65	14,6	0,65	69,00	cold temp
zebra finch	E624	Female	7/4/2016	13,51	14,0	0,55	47,82	thermoneutral zone
zebra finch	E971	Female	7/4/2016	12,28	13,7	0,63	65,18	cold temp
zebra finch	F164	Female	7/4/2016	13,85	14,3	0,57	62,54	cold temp
zebra finch	E927	Female	7/5/2016	14,53	14,2	0,55	76,55	cold temp
zebra finch	F092	Female	7/5/2016	14,74	14,8	0,54	68,97	cold temp
zebra finch	E724	Female	7/6/2016	15,4	15,0	0,61	78,54	cold temp
zebra finch	F265	Female	7/7/2016	14,82	13,7	0,67	77,96	cold temp
zebra finch	E719	Female	7/7/2016	13,39	13,0	0,50	66,11	cold temp
zebra finch	E975	Female	7/7/2016	14,8	14,3	0,49	74,55	cold temp
zebra finch	F203	Female	7/7/2016	13,01	14,5	0,51	41,69	thermoneutral zone
zebra finch	F102	Female	7/8/2016	12,7	14,5	0,50	45,11	thermoneutral zone
zebra finch	F102	Female	7/8/2016	12,7	14,5	0,50	45,11	thermoneutral zone
zebra finch	E976	Female	7/8/2016	15,63	15,5	0,76	75,43	cold temp
zebra finch	E678	Female	7/8/2016	12,8	13,3	0,59	65,06	cold temp
zebra finch	E710	Female	7/8/2016	12,97	14,1	0,57	65,21	cold temp
zebra finch	E705	Female	7/8/2016	11,34	12,9	0,37	27,66	thermoneutral zone
zebra finch	F033	Female	7/9/2016	16,08	13,4	0,64	91,40	cold temp

Vysvětlivky: species = druh, ring no = číslo kroužku na noze ptáka, sex = pohlaví (samičky), date = datum, body mass = hmotnost, tarsus = délka běháku, basal metabolic rate = hodnota bazálního metabolismu, daily energy expenditure = denní energetický výdej, treatment = teplotní podmínky (chladné a neutrální prostředí), ImmErytResidB = poměr mezi nezralými a zralými erytrocyty

## Příloha 2: tabulka s výsledky – 1. část      analýza krevních roztěrů

*	číslo kroužku	datum odběru	Čtve-rec	Kvalita **	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V	Typ VI	Typ VII	Celkem ***
2	E756	10. 7. 2016	6	9	50	129	0	32	2	0	2	2935
12	E913	12. 7. 2016	2	9	107	2	0	5	5	2	0	3409
14	E895	12. 7. 2016	5	9	106	42	1	19	3	0	1	3076
27	E769	16. 7. 2016	4	9	48	42	1	0	0	1	1	1889
58	F200	6. 7. 2016	6	9	83	8	0	0	0	2	0	3010
75	E727	8. 7. 2016	5	9	93	35	0	2	1	1	0	3180
82	E813	9. 7. 2016	4	9	66	29	1	1	1	2	0	2858
86	F262	9. 7. 2016	2	9	104	100	0	5	0	0	0	3411
90	E756	10. 7. 2016	2	9	59	92	0	5	0	1	0	2834
10	E688	12. 7. 2016	5	10	118	30	0	0	0	0	0	3000
11	E688	12. 7. 2016	6	10	92	12	0	3	1	2	2	2189
13	F091	12. 7. 2016	2	10	98	27	0	2	2	0	1	2227
18	E626	15. 7. 2016	3	10	105	8	0	7	0	1	0	3098
19	E828	15. 7. 2016	3	10	135	10	0	2	3	0	1	3962
21	F093	15. 7. 2016	5	10	95	5	0	1	0	0	1	2801
22	F085	15. 7. 2016	4	10	113	2	0	6	0	0	0	3166
23	F153	15. 7. 2016	4	10	92	8	0	0	2	1	0	2027
24	E828	15. 7. 2016	3	10	146	11	2	2	0	0	0	3284
25	E716	15. 7. 2016	4	10	91	47	0	0	0	0	0	2785
26	E769	16. 7. 2016	5	10	77	21	0	1	3	0	0	2768
30	F970	16. 7. 2016	6	10	115	34	0	8	3	2	0	2925
31	E703	16. 7. 2016	5	10	152	10	0	9	18	1	0	3425
32	F103	16. 7. 2016	5	10	73	82	0	8	6	1	0	3159
33	F255	16. 7. 2016	5	10	143	37	0	5	11	0	1	2080
36	F218	17. 7. 2016	4	10	125	56	0	0	6	0	0	3052
37	E880	17. 7. 2016	6	10	109	19	0	1	0	0	0	2364
38	E648	17. 7. 2016	6	10	100	46	0	4	2	0	0	2734
39	E973	17. 7. 2016	5	10	31	13	0	1	1	0	0	2384
43	E624	4. 7. 2016	2	10	83	6	0	2	1	0	0	2187
46	E971	4. 7. 2016	5	10	146	24	2	6	3	0	0	2655
48	F164	4. 7. 2016	4	10	90	11	1	19	1	3	0	3146
50	E927	5. 7. 2016	6	10	62	6	1	5	0	0	0	1931
51	F092	5. 7. 2016	6	10	99	32	0	9	0	0	0	2337
56	E724	6. 7. 2016	6	10	31	8	0	1	0	0	0	2937
62	F265	7. 7. 2016	5	10	52	17	1	1	0	1	0	2603
65	E719	7. 7. 2016	4	10	122	9	0	3	1	2	0	2789
68	E975	7. 7. 2016	5	10	192	5	0	10	0	1	0	2897
69	F203	7. 7. 2016	6	10	105	22	0	8	1	1	0	2809
71	F102	8. 7. 2016	6	10	159	15	0	5	1	0	0	3214
72	F102	8. 7. 2016	6	10	73	12	0	6	2	2	0	2923
74	E976	8. 7. 2016	3	10	82	9	0	5	2	4	0	2145
76	E678	8. 7. 2016	2	10	102	26	0	9	2	0	0	3238
77	E710	8. 7. 2016	4	10	136	19	1	3	0	0	0	3492
78	E705	8. 7. 2016	6	10	104	29	2	0	1	0	0	2626
85	F033	9. 7. 2016	5	10	143	9	0	5	8	3	0	3333

### Vysvětlivky:

\* číslo polského vzorku

\*\* kvalita:

1 nejhorší,

10 nejlepší

*erythrocyty*

*TYP I – imaturní erythrocyty*

*TYP II – lyzáty*

*TYP III – bezjaderné erythrocyty*

*trombocyty*

*TYP IV*

*– trombocyty*

*leukocyty*

*TYP V – lymfocyt*

*TYP VI – rozpadající se buňky*

*TYP VII – bazofil*



## Příloha 2: tabulka s výsledky – 2. část      analýza krevních roztěrů

*	Čtve- rec	Kvalita **	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V	Typ VI	Typ VII	Celkem ***	ImmErytT ****	ImmEryt ResidB
2	4	9	76	72	0	5	0	0	0	2506	0,024	-0,024
12	1	9	112	30	0	1	1	0	1	3139	0,034	-0,003
14	4	10	125	39	0	17	1	3	3	3633	0,034	0,001
27	2	10	43	19	0	0	1	1	1	1937	0,024	-0,021
58	5	10	82	49	0	1	0	1	0	2929	0,028	-0,023
75	3	9	78	25	0	5	1	0	0	3077	0,027	-0,018
82	2	9	87	22	0	1	1	1	0	3288	0,025	-0,027
86	1	9	79	94	0	4	1	0	0	2803	0,029	-0,024
90	1	10	72	36	1	7	0	0	0	2666	0,024	-0,023
10	2	9	117	20	0	6	1	3	0	2913	0,040	0,011
11	5	10	99	28	0	4	1	1	0	2604	0,040	0,012
13	1	9	125	8	1	7	8	1	0	2511	0,047	0,033
18	1	10	144	2	0	7	0	0	0	3687	0,036	0,000
19	1	10	145	4	0	0	1	0	0	3951	0,035	0,002
21	4	10	73	37	0	2	0	0	1	2458	0,032	-0,009
22	5	10	53	18	1	10	6	1	1	2584	0,028	-0,017
23	3	9	86	39	0	3	1	0	0	2450	0,040	0,013
24	1	10	97	12	0	8	2	0	0	3113	0,038	0,008
25	1	10	79	31	0	0	0	0	1	2645	0,031	-0,010
26	4	9	48	43	0	4	1	1	0	2580	0,023	-0,023
30	5	10	98	46	0	1	0	0	0	3137	0,035	-0,004
31	1	10	112	21	0	4	9	0	0	2844	0,042	0,026
32	2	10	76	128	0	18	4	7	0	3186	0,023	-0,042
33	1	10	139	29	0	15	13	3	0	2093	0,068	0,073
36	2	10	132	33	0	1	5	0	0	3106	0,042	0,017
37	5	10	132	28	0	1	5	0	0	2980	0,045	0,025
38	2	10	124	50	1	2	4	0	0	2814	0,040	0,024
39	4	10	37	12	0	0	1	0	0	2305	0,015	-0,062
43	1	9	101	5	0	3	0	1	0	2880	0,037	0,005
46	4	10	107	18	0	5	3	0	0	2740	0,047	0,028
48	1	10	151	6	0	9	0	1	0	3350	0,037	0,006
50	5	10	115	6	0	4	1	0	0	2655	0,038	0,010
51	3	10	65	26	0	18	1	0	0	2720	0,033	-0,003
56	2	10	98	18	0	3	3	0	0	3032	0,021	-0,038
62	3	10	44	6	0	8	1	0	0	2608	0,018	-0,046
65	2	10	103	8	2	1	1	0	0	2638	0,041	0,020
68	1	10	189	7	1	14	2	3	0	2536	0,070	0,082
69	3	10	96	19	1	2	0	3	0	3592	0,032	-0,010
71	5	10	134	20	1	4	6	1	0	3050	0,047	0,026
72	3	10	104	11	0	4	2	0	1	3115	0,029	-0,019
74	2	9	109	4	0	3	1	1	0	2427	0,042	0,019
76	1	10	85	21	0	11	0	0	0	3722	0,027	-0,022
77	3	10	85	39	0	10	0	0	0	3544	0,031	-0,011
78	3	10	101	48	1	0	0	0	0	2554	0,040	0,009
85	1	10	132	2	0	7	10	0	0	3234	0,042	0,028

\*\*\* počet buněk celkem

\*\*\*\* poměr nezralých erytrocytů k celkovému  
počtu buněk podle vzorce  $\frac{\text{Typ I}}{\text{celkový počet buněk}}$   
(průměrná hodnota z obou zvolených čtverců)