

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Vliv stresu na buněčnou imunitu ptáků

Effect of stress on cell-mediated immunity of birds

Bakalářská práce

Autor práce: Petra Parmová

Vedoucí práce: Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

2018

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Petra Parmová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Vliv stresu na buněčnou imunitu ptáků

Název anglicky

Effect of stress on cell-mediated immunity of birds

Cíle práce

Stres se významným způsobem promítá do nejrůznějších fyziologických pochodů živočichů, tedy i na zdravotní stav jedince (Al-Murrani et al. 2006). Ačkoliv existuje mnoho způsobů jak stanovovat zdravotní stav, hematologické vyšetření patří mezi nejpoužívanější metody (Ardia & Schat 2008, Vinkler et al. 2010). Například studie prováděná na kuru domácím ukázala vyšší hladinu H/L u slepic chovaných bez podestýlky a krmených granulovanou stravou než u slepic chovaných na slaměné podestýlce a krmených kašovitou stravou (El Lethey et al. 2000). Nicméně hematologické metody při studiu volně žijících živočichů nebyly zatím dostatečně využity.

Metodika

Náš tým disponuje daty o mláďatech sýkory koňadry (hmotnost, základní míry, hematologická data, vzorky peří), která byla odchycena v hnízdních budkách na studijní ploše Čimický-Ďáblický háj. Mláďatům byl do pravého křídla injektován lipopolysacharid a do levého fyziologický roztok. Hematologické parametry budou vyhodnoceny standardními postupy pomocí mikroskopu (mikroskop CX41, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus).

Práce podá ve stručnosti přehled o hlavních změnách hematologických parametrů ptáků v důsledku stresových stavů (např. při změnách teplot, infekci, v souvislosti s manipulací s jedincem).

Cílem praktické části práce bude testovat, zda existuje vztah mezi kondicí a hematologickými parametry mláďat sýkory koňadry, jejichž imunitní systém byl stimulován lipopolysacharidem (LPS).

Doporučený rozsah práce

ca 30 stran včetně příloh

Klíčová slova

hematologie, kondice, lueukocyty, Parus major, sýkora koňadra, záněť

Doporučené zdroje informací

- Al-Murrani WK, Al-Rawi AJ, Al-Hadithi MF, Al-Tikriti B 2006. Association between heterophil/lymphocyte ratio, a marker of 'resistance' to stress, and some production and fitness traits in chickens. *British Poultry Sci* 47:443-448
- Ardia DR, Schat KA 2008. Ecoimmunology. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (eds) *Avian immunology*. Academic/Elsevier, London, pp 421-441
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22:760-772
- El Lethy H, Aerni V, Jungi TW, Wechsler B 2000. Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *British Poultry Sci* 41:22-28
- Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, Votypka J, Albrecht T 2010. Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *J Ornithol* 151:841-849

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2018

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2018

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 25. 03. 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením vedoucí bakalářské práce Ing. Jany Svobodové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze dne 23. 4. 2018

.....

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své vedoucí práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu za poskytnutá data a v neposlední řadě Ing. Petře Bauerové a RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D. za jejich pomoc během hematologického vyšetření vzorků.

Abstrakt

Stres je nedílnou součástí života většiny živých organismů, ptáků nevyjímaje. Jedná se o přirozenou reakci těla na fluktuace a nestálost prostředí, jejímž cílem je udržení homeostázy a znásobení šance na přežití. Při dlouhodobém stresu však může docházet i k nenávratným poškozením a zvýšenému riziku úmrtí. Takovéto stresory jsou často antropogenního charakteru. Ptáci jsou tak nuceni čelit výzvám jako je například znečištění, hluk, zatížení těžkými kovy nebo i úplná ztráta původních biotopů na čemž se člověk významně podílí. Jedním ze systémů, na které má stres vliv, je buněčná imunita. O těchto bílých krvinkách pojednává rešeršní část této práce. Především se pak zaměřuje na H/L index, často užívaný indikátor stresu. Dále podává informace o různých stresorech a jejich vlivu na buněčnou imunitu i na celkový zdravotní stav. Tato část se také zmiňuje o variabilitě imunitní odpovědi. V praktické části byl zkoumán vliv kondice na sílu imunitní odpovědi, která byla stimulována pomocí lipopolysacharidu (LPS) aplikovaného do patagia mláďat sýkory koňadry (*Parus major*, n=132). Bylo zjištěno, že jedinci s vyšším absolutním počtem leukocytů a větší standardizovanou hmotností si byli schopni vyvinout silnější imunitní odpověď, vyjádřenou velikostí otoku. Jedinci s větším otokem a silnější imunitní odpovědí měli zároveň tendenci k nižším hodnotám H/L indexu. Tyto výsledky ukazují, že jedinci, kteří jsou v lepší kondici a lépe odolávají dlouhodobému stresu, jsou schopni vyvinout silnější imunitní odpověď.

Klíčová slova: hematologie, kondice, leukocyty, *Parus major*, zánět

Abstract

Stress is indivisible part of most living organism's lifes, birds included. It is natural body reaction to environment's fluctuations and inconstancy which leads to maintance of homeostase and increases the chance of survival. However longterm stress can cause irreclaimable damage or even increases risk of dying. These stressors are often antropoghenic. Thanks to mankind birds have to face the challanges such as pollution, noise, heavy metals contamination or even destruction of original biotops. One of the systems influenced by stress is the cell-mediated immunity. Theoretical part of this thesis is devoted to these white blood cells. It is focused primarily on H/L ratio, often used stress indicator. It also deals with variety of stressors and their effects on the cell-mediated immunity and the health status. Variability of the immune reaction is also mentioned in this part. Research included in this thesis deals with the effect of condition on strength of immune reaction after LPS dose in *Parus major* nestling's patagium (n=132). Birds that had increased values of total white blood cells count and greater standardised weight were able to develop stronger immune reaction expressed as size of swelling. Individuals with greater swelling and stronger immune responses tended to have lower H/L ratio. These results tend to conclude that individuals who are in better condition and are better able to resist longterm stress can develop a stronger immune response.

Klíčová slova: hematology, fitness, leukocytes, *Parus major*, inflammation

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	10
3. Imunitní systém ptáků.....	11
4. Struktura imunitního systému	11
4.1 Nespecifická imunita.....	11
4.2 Specifická imunita	12
4.3 Buněčná imunita	12
4.3.1 Leukocyty	13
5. Stres.....	14
5.1 Měření stresu.....	15
5.2 Stres a imunitní systém	16
5.3 Variabilita imunitní odpovědi na stres	19
5.4 Projevy stresu.....	22
6. Vlastní výzkum	24
6.1 Metodika	25
6.1.1 Studovaná data.....	25
6.1.2 Analýza leukocytů	26
6.1.3 Statistická analýza.....	26
6.2 Výsledky	27
6.3 Diskuze	30
7. Závěr	33
8. Přehled literatury a použitých zdrojů.....	34
9. Přílohy.....	44

1. Úvod

Lidská aktivita se velkou měrou podepisuje na struktuře a kvalitě prostředí, jehož stav se následně projevuje na celkové kondici i imunitě ptáků. Antropogenní znečištění, fragmentace krajiny a nevhodný management vedou často k nižšímu výskytu potravy, vyššímu počtu konkurujících si druhů a tím i energeticky náročnějšímu způsobu života (Ruiz et al. 2002; Acevedo-Whitehouse et Duffus 2009; Martin et al. 2010; Bańbura et al. 2013). Také přímý kontakt s lidmi může vést k narušení přirozeného režimu spojeného především s pravidelným krmením během hnízdění. Takovéto podmínky mohou u ptáků vyvolat stres, který se může projevit na buněčné imunitě (Bańbura et al. 2013). Z hlediska ochrany roste měření stresu pomocí hematologických vyšetření na popularitě. Představuje totiž užitečný nástroj při předpovídání potencionálních problémů u jedinců i v populacích a díky včasnému odhalení pak mohou být navrženy vhodné managementy, které by mohly těmto problémům předejít (Davis et al. 2008).

Tato bakalářská práce se zabývá stresem ve spojení s imunitním systémem ptáků. Konkrétně se zaměřuje na buněčnou část imunity. Je zde snaha o její začlenění do celkového kontextu imunitních mechanismů a nalezení možných vztahů a interakcí v rámci celého těla při její aktivaci během stresu. V rešeršní části je podán stručný přehled struktury a funkce ptačího imunitního systému s kladeným důrazem na buněčnou složku. Další kapitoly si kladou za cíl představit nejběžnější stresové faktory a ukázat, jak se mohou projevit na buněčné složce imunity i na celkovém zdravotním stavu. Tato část práce se vše zároveň snaží doložit konkrétními studiemi, které mezi sebou porovnává a hledá jejich možná úskalí.

Druhou částí práce je vlastní výzkum, v rámci něhož byl zkoumán vztah mezi kondicí, určenou standardizovanou hmotností a hematologickými parametry, a imunitní odpovědí na lipopolysacharid (LPS) u mláďat sýkory koňadry (*Parus major*). Tato práce rozhodně nepředstavuje vyčerpávající shrnutí v oblasti stresu a buněčné imunity. Může však posloužit jako stručné uvedení do této problematiky.

2. Cíle práce

Cílem rešeršní části této práce je shrnout základní informace o vlivu stresu na buněčnou imunitu ptáků.

Cílem vlastního výzkumu bylo testovat, zda existuje vztah mezi velikostí otoku po aplikaci LPS a kondicí mláďat sýkory koňadry. Kondice byla vyjádřena jako hodnota H/L indexu, absolutní počet leukocytů a standardizovaná hmotnost. Předpokladem bylo, že mláďata v lepší kondici jsou si schopna vyvinout silnější imunitní odpověď na LPS. Jedinci s menším H/L indexem, větší standardizovanou hmotností a větším absolutním počtem leukocytů by tedy zároveň měli mít vyšší otok v místě vpichu.

3. Imunitní systém ptáků

Imunitní systém ptáků se v mnoha ohledech funkčně i morfologicky podobá imunitnímu systému savců (Rose 1979). Přesto zde lze najít určité rozdílnosti, díky nimž je ptačí imunitní systém unikátní (Davison et al. 2008).

Mezi primitivní znaky u ptáků patří organizace systému lymfoidních orgánů a tkání, které jsou roztroušeny po celém těle a absence lymfatických uzlin podobných savcím (Rose 1979). Výjimkou je řád vrubozobých (*Anseriformes*), u kterého se takové uzliny v malém počtu vyskytují (Toman et al. 2009).

Obdobně jako u savců dochází k vývoji T lymfocytů v brzlíku. B lymfocyty potřebné k tvorbě protilátkového repertoáru jsou však poskytovány Fabriciovou burzou, což je výhradně ptačí orgán (Toman et al. 2009). Ekvivalentem u savců je jí kostní dřeň (Davison et al. 2008). Další odlišností jsou heterofily, které funkčně odpovídají savcím neutrofilům (Toman et al. 2009). Také bazofily, které lze u normálních zdravých savců pozorovat zřídka, jsou v periferní krvi normálních ptáků nalézány často (Campbell et Ellis 2007).

4. Struktura imunitního systému

Zprostředkování imunitních reakcí probíhá pomocí mnoha různých druhů buněk a molekul. Mechanismy týkající se imunitního systému je možné zjednodušeně rozdělit na specifické neboli adaptivní a nespecifické či neadaptivní nebo také vrozené (Hořejší et Bartůňková 2005).

4.1 Nespecifická imunita

V různém rozsahu se nespecifické mechanismy vyskytují u všech mnohobuněčných organismů a evolučně se řadí ke starším (Hořejší et Bartůňková 2005). Jejich princip funkce spočívá v rozpoznání patogenu a následné reakci předem připravených buněk a molekul. Od specifické imunity se liší absencí imunologické paměti. Tyto imunitní buňky si tedy nejsou schopny pamatovat předešlé setkání s patogenem (Nieuwenhuis 1996). Nespecifické odpovědi jsou

zahrnuty v první obranné linii těla, která eliminuje patogeny a zajišťuje prevenci před infekcí. Tyto reakce probíhají řádově v minutách (Hořejší et Bartůňková 2005).

Nespecifická imunita je reprezentována buněčnými a humorálními složkami. Pod buněčnou imunitu patří makrofágy, monocyty, NK buňky, dendritické buňky a fagocytující buňky jako jsou heterofily, basofily a eozinofily (Hořejší et Bartůňková 2005; Demas et al. 2011). Pod humorální imunitu, která se vypořádává s protilátkovou produkcí, se řadí především komplementový systém, dále pak interferony, lektiny a jiné sérové proteiny (Hořejší et Bartůňková 2005).

4.2 Specifická imunita

Tyto evolučně mladší imunitní mechanismy jsou vyvinuty u obratlovců až při reakci na specifický antigen. K úplnému rozvoji těchto reakcí je potřeba několik dnů až týdnů a složky této imunity jsou vybaveny imunologickou pamětí, díky které je sekundární reakce na již známý antigen rychlejší a efektivnější (Hořejší et Bartůňková 2005). Specifickou imunitu lze také rozdělit na buněčnou část, jejíž hlavní složkou jsou lymfocyty, a humorální část, kam patří imunoglobuliny produkované prostřednictvím B lymfocytů a cytokininy produkované T lymfocyty (Demas et al. 2011).

Další kapitoly pojednávají již pouze o buněčné složce imunity.

4.3 Buněčná imunita

Funkce buněčné imunity spočívá především v odstraňování buněk napadených virem, ale také v obraně proti houbám, prvokům i intracelulárním bakteriím (Weiss 1972; Nieuwenhuis 1996).

Hlavní součástí imunitního systému jsou různé druhy leukocytů - bílých krvinek (Hořejší et Bartůňková 2005). V krvi se nacházejí ještě erytrocyty, které jsou jakožto neimunitní buňky také schopny se účastnit některých imunitních reakcí a trombocyty, které mají fagocytickou schopnost a pravděpodobně i nějakou funkci v nespecifické imunitě (Edmonds 1968; Bounous et Stedman 2000; Passantino et al. 2007).

Všechny leukocyty mají původ v pluripotentních kmenových buňkách nacházejících se v kostní dřeni. Při působení různých faktorů se jejich část diferencuje na konkrétní typy leukocytů (Hořejší et Bartůňková 2005). Leukocyty v ptačí krvi zahrnují lymfocyty, monocyty a granulocyty, které jsou klasifikovány jako heterofily, eozinofily a bazofily. Tvorba leukocytů je u normálních zdravých ptáků podobná savčí, ve které jsou leukocyty uvolněny do periferní cirkulace teprve potom, co dozrají (Campbell et Ellis 2007).

Největší podíl a to asi 80 % bílých krvinek u ptáků tvoří nejčastěji součet lymfocytů a heterofilů (Rupley 1997). Normální hodnoty se však mezidruhově liší (Davis et al. 2008). U racka šedokřídleho (*Larus glaucescens*) tyto počty v procentech vypadaly následovně: lymfocyty: 43.0; heterofily: 53.0; bazofily: 3.0; eozinofily: 0.0; a monocyty: 1.0; (Newman et al. 1997). U brhlíka lesního (*Sitta europaea*) se pohybovaly pro změnu takto: lymfocyty: 79.5; heterofily: 12.7; bazofily: 3.8; eozinofily: 1.4; a monocyty: 2.6; (Zábojníková 1996).

4.3.1 Leukocyty

Struktura ptačích leukocytů byla již hojně popsána v předešlých publikacích (např. Lucas et Jamroz 1961; Campbell et Ellis 2007). Tato kapitola proto bude zaměřena pouze na funkce a stavy, které ovlivňují počty těchto buněk.

Heterofily jsou fagocytární buňky se širokým spektrem antimikrobiální aktivity (Harmon 1998). Počty heterofilů se mění v závislosti na sezoně, denním rytmu, pohlaví, věku i potravě. Jejich nárůst je spojen s infekcí způsobenou spektrem infekčních agens jako jsou bakterie, houby, chlamydie, viry a paraziti a nebo neinfekčně při zranění nebo stresu (Campbell et Ellis 2007). Vysoká hladina heterofilů je proto indikátorem špatného zdravotního stavu (Loyau et al. 2005).

Bazofily jsou v kontrastu se savci v periferní krvi normálních ptáků nalézány často (Campbell et Ellis 2007). Extrémním příkladem je zdravý hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*), v jehož krvi byla nalezena vysoká hladina bazofilů tvořící 86-91% všech leukocytů (Vinkler et al. 2010b). O funkci ptačích bazofilů se mnoho neví. Zdá se, že hrají roli na začátku zánětu a u imunopatologické reakce I. typu (Maxwell et Robertson 1995). Jejich nárůst značí raný zánět nebo i stres (Campbell

et Ellis 2007). Bazofily mohou u některých druhů také sloužit jako indikátor zdravotního stavu (Vinkler et al. 2010b).

Funkce ptačích eozinofilů je také málo prozkoumána (Claver et Quaglia 2009). Hrají roli v zánětlivém procesu a jsou spojeny s obranou proti parazitům (Maxwell 1987; Jain 1993). Jejich nárůst je pozorován při odpovědi na interní nebo externí parazitismus nebo vystavení cizímu antigenu. Jejich pokles je možné pozorovat při stresu (Campbell et Ellis 2007).

Monocyty jsou fagocytární buňky spojené s obranou proti infekci a bakteriím (Campbell 1995; Davis et al. 2004). Mohou také hrát významnou roli při přípravě antigenů k prezentování specifickým buňkám (Dieterlen-Lievre 1988). Jejich nárůst značí akutní nebo chronický zánět, reakci na cizí strukturu nebo jisté nutriční nedostatky jako je například nedostatek zinku (Wight et al. 1980 in Campbell et Ellis 2007). Pokles v monocytech se může vyvinout v reakci na stres (Jain 1993).

Hlavní populaci lymfocytů tvoří T a B lymfocyty (Hořejší et Bartůňková 2005). Konečné stádium B lymfocytů produkuje protilátky, zatímco T lymfocyty jsou zapojeny do buněčné imunity (Dieterlen-Lievre 1988; Hořejší et Bartůňková 2005). Lymfocyty hrají klíčovou roli v ochraně proti infekci a ve specifické imunitě (Davison et al. 2008). Nárůst lymfocytů je spojen s rozrušením nebo lymfatickou leukemií (Campbell et Ellis 2007). K poklesu lymfocytů dochází během stresu (Davis et al. 2008).

5. Stres

Většina živočichů žije v nestálém prostředí, kde probíhají předvídatelné změny jako je například den a noc. Zvířata jsou na ně všeobecně dobře adaptována, ale potýkají se i se změnami jako je počasí, dostupnost jídla a počty predátorů a konkurentů, které nelze předvídat. K vyrovnaní se s těmito hrozbami si organizmy musely vyvinout soubor stresových reakcí, díky nimž udržují homeostázu a maximalizují tak svou možnost přežití (Wingfield et al. 1998). Stres může být tedy definován jako porucha homeostázy nebo ohrožení životní pohody a podle délky expozice je nazýván akutním nebo chronickým (Dallman et al. 2003).

Aktivace stresory má za následek hormonální změny, které vypnou aktuálně méně důležité aktivity a stimulují ty potřebné. Zvíře se nachází v „pohotovostním

režimu“, ve kterém jsou aktivity jako je růst nebo reprodukce pozastaveny a energie je přeměrována ke zničení hrozícího nebezpečí (Wingfield et al. 1998). Takovéto dlouhodobé pozastavení při chronickém stresu může být však pro organismus vysoce škodlivé (Sapolsky 2000).

5.1 Měření stresu

Stres je důležitým faktorem souvisejícím s welfarem zvířat a jeho měření napomáhá včasnému odhalení potencionálních problémů (Davis et al. 2008). Často užívanou metodou je hematologické vyšetření (Vinkler et al. 2010b). Mezi hlavní hematologická vyšetření zahrnující buněčnou složku imunity patří H/L index (poměr heterofilů k lymfocytovým počtům) a absolutní a relativní počty bílých krvinek. Jako další indikátory stresu lze jmenovat například kortikosteronové hladiny, hladinu glukózy v krvi nebo hladinu proteinů teplotního šoku (Merino et al. 1998; Ruiz et al. 2002; Davis et al. 2008).

H/L index se mění v odpovědi na velké množství rozličných stresorů. Takovýto přehled je uveden v Příloze. č. 1. Často se používá u drůbeže. Stále více se však tento indikátor uplatňuje i u volně žijících ptáků a to zejména u drobných pěvců. H/L index je považován za spolehlivý indikátor chronického stresu (Gross et Siegel 1983). Jeho vyšší hodnoty je však možné pozorovat i při krátkodobém stresu jako je tomu například při transportu (Příloha č. 1). H/L index je také spojován s kondicí a zdravotním stavem. Jeho vyšší hodnoty proto můžou značit stresovaného jedince nebo i jedince ve špatné kondici. Nízký H/L index naznačuje stav opačný (Davis et al. 2008; Svobodová et al. 2016).

Relativní počty leukocytů jsou z krevních roztěrů obvykle získány pomocí světelného mikroskopu, kdy je napočítáno celkem 110-140 leukocytů a procentuálně je potom vyjádřen podíl zastoupení každého typu bílých krvinek. Absolutní počty jsou vyhodnocovány pomocí Bürkerovy počítací komůrky (Vinkler et al. 2010b). Leukocytóza neboli nárůst tohoto absolutního počtu je spojena se stresem nebo zánětem (McFarlane et Curtis 1989; Davis et al. 2008).

Interpretace naměřených výsledků se však často setkává s problémy, protože zde vyvstávají otázky, na které je těžké odpovědět. Tímto případem jsou i zvýšené počty leukocytů, které můžou být sice spojovány se stresem, ale mohou také

indikovat jedince se silným a zdravým imunitním systémem nebo jedince, který právě bojuje s infekcí. Také existuje evidence, že počty leukocytů ne vždy korelují s jejich aktivitou (Ladics et al. 1998; Wilson et al. 2001; Salvante 2006). S opatrností by také mělo být nahlíženo na heterofilii neboli přebytek heterofilů. Vědci zde řeší dilema, zda tento stav indikuje stres a nemoc a může tedy značit jedince s nízkou zdatností, nebo zda by mohlo jít o kvalitnější schopnost odpovídat na infekci a tedy by jí měli disponovat naopak jedinci v dobré kondici. Stejně tak je tomu u lymfopenie, sníženého počtu lymfocytů, která může znamenat buď aktivní stresovou odpověď, nebo i absenci parazitů. U mnoha druhů nejsou navíc známy normální hodnoty a leukocytové počty jsou velmi variabilní dokonce i mezi jednotlivci (Davis et al. 2008). Mnozí autoři varovali i před zobecňováním imunity na základě výsledků výzkumu, který zkoumá jen jeden komponent imunitního systému (Lochmiller 1995; Adamo 2004).

5.2 Stres a imunitní systém

Tato kapitola uvádí konkrétní příklady stresorů a pojednává o tom, jaký mají vliv na imunitní systém ptáků.

Městské prostředí, turismus a znečištění

Zvířata žijící v městském prostředí jsou nucena čelit velkému množství stresorů (hluk, hustota lidí, znečištění). Imunitní odpovědi jsou zde silně závislé na dostupnosti zdrojů a výskytu parazitů, které se zde v porovnání s přírodním prostředím často velice liší (Bonier 2012).

U strnadce ranního (*Zonotrichia capensis*) bylo zjištěno, že jedinci žijící v městských oblastech měli vyšší H/L index než jedinci odchycení v rurálním prostředí. Stres byl v tomto případě pravděpodobně zapříčiněn vyšší energetickou náročností při hledání potravy a vyšší kompeticí o potravu s jinými druhy (Ruiz et al. 2002). Také hodnoty H/L indexu sýkory koňadry a sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) z městské oblasti byly vyšší než hodnoty jedinců žijících v lese. Tyto rozdíly mohly být způsobeny kvalitou potravy, jejíž výskyt byl v městské oblasti negativně ovlivněn fragmentací a managementem (Baňbura et al. 2013).

Také značné množství kontaminantů jako jsou například těžké kovy nebo radioaktivní znečištění může způsobit stres a ovlivnit imunitní systém. Studie prováděná na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*) z Černobylu, oblasti se zvýšeným radioaktivním znečištěním, ukázala, že tito jedinci měli oproti kontrolním jedincům redukovány koncentrace lymfocytů a vyšší H/L index (Camplani et al. 1999).

U tučňáků oslíků (*Pygoscelis papua*) z oblasti zatížené turismem a větším zatížením kovy byl však naměřen naopak nižší H/L index a nižší hladina kortikosteronu než v kontrolní oblasti bez vlivu lidí. V této studii je tento fakt přisuzován návyku na lidi (Barbosa et al. 2013). Ve výzkumu, jehož subjektem byl lejssek černohlavý (*Ficedula hypoleuca*) z oblasti zatížené těžkými kovy, bylo zjištěno, že mláďata měla zvýšený H/L index. Samci v této oblasti však vykazovali silnější humorální odpovědi na nový antigen než samci v kontrolní oblasti. Také u nich po imunizaci došlo k většímu nárůstu lymfocytů a zároveň ke snížení H/L indexu (Eeva et al. 2005). Podobné výsledky byly ve stejné oblasti interpretovány i u samic a mláďat sýkory koňadry, jejichž kortikosteronové hladiny nebyly ve znečištěné oblasti zvýšeny (Eeva et al. 2003).

Transport a manipulace

Dalšími faktory, které mohou způsobit stres, jsou transport a manipulace s jedincem (Parga et al. 2001). Manipulace zahrnuje proces od odchyty až přes odběry krve, vážení nebo měření ptáků (Vleck et al. 2000). Transport zase může být spojen s nedostatkem potravy, sociálním narušením nebo hlukem (Mitchell et al. 1992 in Parga et al. 2001).

Například u netrénovaných jedinců káněte Harrisova (*Parabuteo unicinctus*) a sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*) byl po transportu z krve vyhodnocen signifikantně zvýšený H/L index. U trénovaných sokolů pak nebyly nalezeny změny v krevních parametrech, ale u trénovaných kánat byla zaznamenána monocytóza (Parga et al. 2001). Také při transportu a manipulaci s jedinci papouška ara hyacintového (*Anodorhynchus hyacinthinus*) bylo nalezeno signifikantní zvýšení H/L indexu (Speer 1995).

Ve studii, ve které bylo opakovaně manipulováno s jedinci tučňáků kroužkových (*Pygoscelis adeliae*) během období líhnutí mláďat však nedošlo

k navýšení H/L indexu ani hladin kortikosteronu (Vleck et al. 2000). Davis (2005), který také zkoumal manipulaci na hýlu mexickém (*Haemorrhous mexicanus*), zase tvrdí, že běžná manipulace s jedinci, která netrvá déle než jednu hodinu H/L index neovlivní. Ukázalo se ale, že to neplatí pro zimující sýkory koňadry. V této studii se leukocytové počty změnily rychleji. Byl zde nalezen signifikantní nárůst v heterofilech a pokles lymfocytů již od třicáté minuty po odchytu (Cīrule et al. 2012).

Infekce

Infekce může také vyvolat fyziologický stres (Davis et al. 2004). Počet cirkulujících leukocytů může narůst v důsledku infekce bakteriemi, krevními prvky nebo třeba makroparazity (Roitt et al. 2001 in Davis et al. 2004).

U hýla mexického infikovaného bakterií *Mycoplasma gallisepticum*, která způsobuje oční onemocnění - konjunktivitidu, byly počty heterofilů a monocytů značně vyšší a počty těchto buněk také vzrůstaly se závažností infekce stejně jako absolutní počty leukocytů. H/L index těchto jedinců byl také zvýšený (Davis et al. 2004). Ve studii prováděné na strnadu cvrčivém (*Emberiza cirrus*) byli jedinci infikováni krevními parazity *Plasmodium relictum* a *Leucocytozoon cambournaci*. Tito jedinci však vykazovali vyšší proporce lymfocytů a nižší proporce heterofilů než jedinci bez parazitů. Také prezentovali vyšší absolutní leukocytové počty, i když signifikantní rozdíly v této hodnotě byly prokázány pouze u jedinců infikovaných *Plasmodiem* (Figuerola et al. 1999).

Teplotní stres

Bylo zjištěno, že vysoké teploty prostředí můžou u drůbeže vyvolávat stres s následnými škodlivými účinky. Například Kadymov et Aleskerov (1988) ve své studii uvádějí, že při vystavení drůbeže vysokým teplotám dochází k inhibici v syntéze T a B lymfocytů a ke snížení fagocytické aktivity leukocytů. Mashaly (2004) ale zjistil, že u nosnic v komerčním chovu vysoké teploty B a T lymfocytární proliferaci signifikantně neovlivnily. Byl zde však pozorován pokles absolutního počtu leukocytů a zvýšení H/L indexu. Nathan (1976) také u drůbeže potvrdil inhibici absolutního počtu leukocytů po tepelné expozici. Se zvýšeným H/L indexem

se pak setkali také McFarlane et Curtis (1989) u brojlerů vystavených teplotnímu stresu. Tato data indikují, že teplená expozice může redukovat počty i aktivitu leukocytů.

Denzita a nedostatek potravy

O hustotě osazení, faktoru souvisejícím s welfarem drůbeže, je známo, že ovlivňuje chování těchto ptáků. Když hustota vzroste, jsou jedinci nuceni soutěžit o potravu a prostor (Jong et al 2003 in Kang et al. 2011). Nicméně u většiny studií bylo zjištěno, že hustota osazení neovlivní hematologické hodnoty, jako jsou diferenciální počty leukocytů a H/L index (Kang et al. 2011). Například Thaxton et al. (2006) zjistili, že při zvýšení této hustoty nedošlo u brojlerů ke změně H/L indexu ani jiných indikátorů stresu. Hustota sama o sobě u ptáků tedy nemusí vyvolat stres.

Ohledně stresu způsobeného snížením množství potravy opět existují konfliktní data. Hematologické parametry byly například ovlivněny ve studii, kde byl u mladých kuřat zjištěn zvýšený H/L index, kterým tak reagovali na periodu bez jídla. Tento vztah však nebyl potvrzen u kuřat starších (Katanbaf et al. 1989). Dokonce ani kombinace těchto dvou stresorů neměla v případě snášejších slepic efekt na diferenciální počty leukocytů. Jejich H/L poměr byl také v normě (Kang et al. 2011).

Celkově lze tedy konstatovat, že imunitní odpověď může být velice variabilní. Různé stresory s odlišnou dobou expozice v odlišných podmínkách mohou působit na rozličné organizmy různými způsoby. O této variabilitě související s imunitou ptáků pojednává další kapitola.

5.3 Variabilita imunitní odpovědi na stres

U imunitní funkce existuje určitá variabilita zahrnující mimo jiné počty cirkulujících buněk, se kterou souvisí i rozdílný vývoj imunitní odpovědi na stres. Tato variabilita je mezidruhová, souvisí s věkem, pohlavím, anuálním nebo diurnálním cyklem (Vinkler et al. 2010b; Markowska et al. 2017).

Věk

Imunitní funkce s věkem kolísá. Podle výzkumu prováděného na křepelce japonské (*Coturnix japonica*) měli nejslabší imunitní odpovědi nejmladší a nejstarší jedinci a nejlépe na tom byli mladí dospělci. Se stárnoucím organismem stárne i imunitní systém. Jedinec tak může ztrácet schopnost bojovat s patogeny a stává se náchylnější k infekcím (Lavoie 2006). U hnízdících jespáků bojovných (*Philomachus pugnax*) byl s rostoucím věkem pozorován pokles T lymfocytární imunity (Lozano et Lank 2003). U mláďat buřňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) bylo zase zjištěno, že s věkem vzrostl jejich H/L index (Quillfeldt et al. 2008). Často pozorovaným jevem je také vyšší intenzita parazitů u juvenilů (Hudson et Dobson 1997). Důvodem může být značně vyvinutější získaná imunita dospělců v porovnání s mláďaty (Gregory et al. 1992). Tato hypotéza je v souladu například s výsledky výzkumu, jehož subjektem byl holub skalní (*Columba livia*), kdy si jedinci vyvinuli imunitu proti parazitům až po určité délce expozice (Sol et al. 2003).

Pohlaví

Sexuální dimorfismus se odráží i v imunitních odpovědích. Slabšími se v tomto ohledu jeví samci (Alexander et Simon 1989). Může se jednat o následek činnosti androgenů (Testosteron), které ve vysokých koncentracích potlačují imunitu (Müller et al. 2005). Dalším vysvětlením může být větší intenzita sexuální kompetice (Møller et al. 1998).

Například ve výzkumu zabývajícím se stresem během vývoje byl H/L index u mladých samců poštolky jižní (*Falco naumanni*) vyšší než u samic (Ortego et al. 2009). Také hnízdící samci sýkory koňadry, u nichž bylo experimentálně manipulováno se zátěží parazitů *Ceratophyllus gallinae*, měli oproti samicím signifikantně sníženou imunitní reakci na PHA (Tschirren et al. 2003).

Sezónnost

Imunitní funkce kolísají v rámci roku v souvislosti se změnami prostředí, hnízdní sezónou a také během dne v rámci aktuálních fyziologických potřeb (Milenkaya et al. 2013; Zylberberg 2015). Zvířata se s těmito fluktuacemi

vyrovnávají pomocí hormonu melatoninu, který podporuje vývoj buněčné imunitní odpovědi (Halдар et Saxena 1988; O'Neal 2013).

Účinky melatoninu byly experimentálně ověřeny například u kuřat, kterým byl injektován během temné a světelné fáze. Signifikantně vyšší H/L index měli jedinci, kterým byl tento hormon vpraven během světelné fáze (Brennan et al. 2002). Moore et Siopes (2000) zase zjistili, že poté, co se zkrátila u křepelky japonské (*Coturnix japonica*) fotoperioda, absolutní počet leukocytů signifikantně vzrostl a H/L index se snížil.

Zima je období doprovázené nehostinnými podmínkami jako jsou nedostatek potravy nebo nízké okolní teploty. Tyto stresory jsou však kompenzovány větší sekrecí melatoninu díky krátkým světelným periodám (Nelson et Demas 1996). U křepelky křovinné (*Perdicula asiatica*) byla krátká zimní fotoperioda doprovázena vysokým imunitním stavem zahrnujícím velkou hmotost sleziny, vysoký absolutní počet leukocytů a vysoký počet lymfocytů (Singh et Halдар 2007). Také ve studii prováděné na zimující sýkoře koňadře byla naměřena zvýšená hladina lymfocytů a snížené hodnoty heterofilů (Hauptmanová et al. 2002).

Hnízdní sezona je pro zvířata náročná z hlediska reprodukčního úsilí a rodičovské péče (Christe et al. 2012). Ve výzkumu prováděném na hnízdící sýkoře koňadře byly v porovnání se zimním obdobím naměřeny vyšší hodnoty heterofilů a nižší počty lymfocytů (Dufva et Allander 1995). Hůrak et al. (1998) také zjistili, že u sýkory koňadry počet lymfocytů poklesl se vzrůstem rodičovské péče. Reprodukční úsilí tedy může vést k imunosupresi (Christe et al. 2012).

Mezidruhová variabilita

V neposlední řadě se může imunitní odpověď lišit i mezidruhově. Studie zabývající se hodnotami bílých krvinek u příbuzných druhů holuba například odhalila, že H/L index spojený s dlouhodobými účinky stresu v zajetí byl vyšší u hrdličky chechtavé (*Streptopelia roseogrisea*), než u holuba domácího (*Columba livia domestica*). Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnou životní strategií (Lashev et al. 2009). Tento jev pozorovali také Fokidis et al. (2008). U pipila šedozeleného (*Pipilio fuscus*) tvořily majoritní složku krve heterofily a tito jedinci

měli vyšší H/L index než jedinci drozdce mnohohlasého (*Mimus polyglottos*), u nichž byly v krvi naopak nejvíce zastoupeny lymfocyty.

5.4 Projevy stresu

Stres se na leukocytových počtech projevuje především vzrůstem heterofilů a poklesem lymfocytů. Redukce cirkulujících lymfocytů však není způsobena zánikem buněk. Vlivem hormonů dochází k nalepení lymfocytů na endoteliální buňky stěn krevních cév a následné transmigraci do tkání jako jsou slezina nebo kostní dřeň (Herring et al. 2014). Nasledující kapitola uvádí, jaké další projevy mohou při stresu doprovázet zvýšený H/L index.

Glukokortikoidy

Jak již bylo řečeno, při stresu dochází ke změnám hladin glukokortikoidů, především kortikosteronu. Právě tyto hormony mají na svědomí změny v leukocytových počtech. Koncentrace kortikosteroidů v krvi se může zvýšit během několika minut po vystavení stresoru, zatímco změny v leukocytových počtech se objeví asi za 1-2 hodiny (Davis et al. 2008). Takto zvýšenou hladinu kortikosteronu a zároveň zvýšený H/L index bylo možné sledovat například u samců kura bankivského (*Gallus gallus*) stresovaných sexuální kompeticí nebo u kuřat vystavených teplotnímu stresu nebo elektrickým šokům (McFarlane et Curtis; 1989 Dhabhar et al. 1995).

Existují však také případy, kdy spolu H/L index a hladina kortikosteronu nekorelují. Tento jev byl pozorován například u tučňáků kroužkových, kdy drobná zranění a podmínky související s vysokou denzitou u hnízdící kolonie zvýšily H/L index, ale výchozí hladinu kortikosteronu neovlivnily (Vleck et al. 2000). Vysvětlením může být fakt, že H/L index a hladina kortikosteronu reagují na stres v různých časových obdobích a mohou se lišit v sensitivitě k různým stresorům (Vleck et al. 2000; O'Neal 2013). U kortikosteronu také dochází k návratu k normálním hodnotám po opakovaném vystavení stresoru, zatímco pro H/L index toto platit nemusí (Müller et al. 2011). Kortikosteron bývá tedy používán spíše jako indikátor akutního stresu, kdežto leukocytové počty jsou považovány za spolehlivější indikátor dlouhodobého stresu (Vleck et al. 2000; Davis et al. 2008).

Humorální imunita

Byla nalezena souvislost také mezi humorální a buněčnou imunitou. U sýkory koňadry H/L index silně koreloval se silou protilátkové odpovědi na bakterii *Brucella abortus*. Čím vyšší byla hodnota H/L indexu, tím nižší byly protilátkové titry (Krams et al. 2013). Ve výzkumu prováděném na nosnicích vystavených teplotnímu stresu byla také protilátková odpověď na SRBC snížena. Zároveň došlo ke zvýšení H/L indexu (Mashaly et al. 2004).

Lymfoidní orgány

U ptáků také existuje vztah mezi velikostí a kvalitou lymfoidních orgánů a počty leukocytů. Při stresu může dojít k regresi těchto orgánů (Siegel 1980). Ve výzkumu prováděném na drůbeži, došlo vlivem termálního stresu k ovlivnění vývoje burzy Fabriciovy díky redukci množství parenchymu. Navíc se v burze zvýšil index programované lymfocytární smrti (Guimarães et al. 2001). Také jiný výzkum termálního stresu na kuřatech prokázal snížení počtu cirkulujících lymfocytů, které bylo doprovázeno existencí menších lymfatických žláz (Garren et Shaffner 1954).

Ornamenty

Hematologické a ornamentální znaky spolu také souvisí. Ptáci vyjadřují širokou škálu nápadných barevných ornamentů (Svobodová et al. 2016). Ty obsahují karotenoidy, které jsou využívány v různých fyziologických mechanismech jako je například imunoregulace a proliferace lymfocytů (Møller et al. 2000). To vede k hypotéze, že pouze jedinci se silnou imunitou si můžou vyvinout nápadné ornamenty (Rowe et Houle 1996). V souladu s tímto tvrzením je například studie, kde bylo u odchycených samců koroptve polní (*Perdix perdix*) zjištěno, že jedinci se světlejším karotenoidovým ornamentem měli zároveň vyšší H/L index (Svobodová et al. 2016).

Chování

Chování může se stresem a imunitou úzce souviset, protože jsou integrovány přes neuroendokrinní systém. Bylo zjištěno, že jedinci sýkory koňadry, kteří měli

vyšší H/L index vykazovali nižší toleranci k odchytu, předváděli častější mrskání proti kleci a trpěli větším poškozením ocasních per. Tito ptáci zároveň produkovali více poplašných křiků, což je indikátor úzkosti (Krams et al. 2013).

Glukóza v krvi

V odpovědi na glukokortikoidy dochází při stresu také ke zvýšení glukózy v krvi jako následek rozpadu glykogenu v játrech. Například u holuba domácího (*Columba livia domestica*) bylo zjištěno, že při transportu a manipulaci s jedinci došlo k výraznému nárůstu heterofilů a zároveň ke zvýšení hladin glukózy (Scope et al. 2002).

Celkový zdravotní stav

Aktivace imunity při stresu potřebuje určité zdroje energie, o které se musí dělit s jinými důležitými aktivitami souvisejícími se zdatností. (Martin et al. 2003; Viney et al. 2005 in Bailly et al. 2016). Díky zvýšení H/L indexu při stresu dochází ke zvýšení rezistence na bakterie, ale také k jejímu snížení k onemocněním virového původu (Rindoni et Selye 1953 in Siegel 1980). Růst a skeletální vývoj jsou potlačovány. Také může docházet ke snížení schopnosti reprodukce a uzdravování (Bartov et al. 1980 in Siegel 1980). Dlouhodobý stres tedy redukuje celkovou kondici jedince a pravděpodobnost přežití (Siegel 1980). S tímto tvrzením je konzistentní například studie prováděná na lejsku černohlavém, kde bylo zjištěno, že nízké počty heterofilů odráží jeho dobrý zdravotní stav a zvyšují pravděpodobnost pozdějšího přežití ve volné přírodě (Lobato et al. 2005).

6. Vlastní výzkum

Výzkum týkající se praktické části bakalářské práce je součástí grantu GAČR P506/15-11782S a byl prováděn na 132 mláďatech sýkory koňadry. Jeho cílem bylo zjistit, zda existuje u těchto jedinců vztah mezi kondicí a silou imunitní odpovědi na LPS.

6.1 Metodika

6.1.1 Studovaná data

Sběr dat pro tento výzkum se uskutečnil na jaře roku 2015 na území Ďáblického a Čimického háje v Praze v České republice (50°08'13.0"N 14°27'57.1"E). Jedná se o lesoparky o celkové rozloze asi 90 hektarů, nacházejících se v blízkosti souvislé městské zástavby ve výšce 315-360 m nad mořem. Nejčastěji zastoupené dřeviny jsou zde dub zimní (*Quercus robur*), modřín opadavý (*Larix decidua*) a lípa srdčitá (*Tilia cordata*). Studovaným druhem byla mláďata sýkory koňadry. Na studijní ploše byly pro hnízdící sýkory rozmístěny budky v síti 50x50 m. Od dubna zde probíhaly pravidelné kontroly obsazenosti budek, byly zaznamenávány počty vajec a den líhnutí. Po vylíhnutí byl pak kontrolován stav a počty mláďat.

Patnáctidenním mláďatům byl předem vyheparinizovanou injekční stříkačkou z jugulární žíly odebrán vzorek 50 μ l krve, přičemž 15 μ l bylo napipetováno do roztoku Natt-Heric na analýzu absolutního počtu leukocytů. Z 10 μ l krve byly vyhotoveny krevní nátěry. Mláďatům byla poté změřena délka běháku pomocí šuplery (Kinex, typ 6040.2 s přesností 0.01mm) a byla zvážena na digitální váze (Pesola PPS200 s přesností 0.01g). Následně byla mláďata označena kroužkem. Patnáctý den jim byla zároveň píchnuta do středu levého patagia injekce 0.1 mg LPS *Salmonella enterica serotype enteritidis* rozpuštěného v 0.02 ml PBS (produkt No. L2880, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Lipopolysacharid (LPS) působí jako antigen napodobující infekci a aktivuje tak měřitelnou imunitní reakci (Bonneaud et al. 2003). Ve výzkumu, který prováděl Rychlý (2015), byl jedincům sýkory koňadry do jednoho patagia aplikován LPS, druhé patagium s injektovaným fyziologickým roztokem PBS sloužilo jako kontrolní. Reakce na LPS byla potvrzena díky výrazně vyššímu otoku tohoto křídla. V této práci již proto nebyla reakce na LPS testována a kontrolní křídlo nebylo injektováno. Patagium s aplikovaným LPS bylo změřeno po 24 hodinách mikrometrem (Mitutoyo 547-313s přesností 0.01mm) a byla provedena biopsie. Tato data mi byla pro účely vypracování praktické části poskytnuta.

6.1.2 Analýza leukocytů

Vzorek krve v roztoku Natt Herick byl vyšetřen na absolutní počet leukocytů v Bürkerově počítací komůrce. Krevní nátěry byly obarveny Wright-Giemsa barvivem (produkt No. WG128; Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) a následně vyhodnocovány metodou diferenciálního počtu leukocytů pod imerzním objektivem (zvětšení 100x) světelného mikroskopu Olympus CX-31. Při této metodě je počítán procentuální výskyt každého z pěti uvedených leukocytů z celkového počtu 110-140 napočítaných bílých krvinek v krevním nátěru (Vinkler et al. 2010b). Jednotlivé buňky byly určovány podle znaků uvedených v publikaci Lucas et Jamroz (1961).

Kvůli standardizaci výsledků byly počty jednotlivých typů leukocytů přepočítány na procenta a byl spočítán H/L index, který je pro tento výzkum klíčovou hodnotou (Davis et al. 2008). Pro ověření správnosti počítání byla spočítána repeatabilita u 20 vzorků (Lessells et Boag 1987; Tab. č. 1) jejíž hodota byla pro H/L index vyhovující.

Tab. č. 1: Repeatabilita pro jednotlivé druhy leukocytů, $n = 20$, r = koeficient repeatability, p = hladina významnosti:

Leukocyt	r	p
Lymfocyt	0.85	<0.001
Heterofil	0.78	<0.001
Bazofil	0.60	0.002
Eozinofil	0.30	0.09
Monocyt	0.25	0.14

6.1.3 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena v programu R studio verze 1.0.136 (R Development Core Team 2017). Nejprve byla ověřena normalita dat. K tomuto účelu byl použit Shapiro-wilkův test. Dalé bylo pomocí Pearsonova korelačního koeficientu zjišťováno, zda mezi sebou jednotlivé znaky nekorelují. Významná korelace mezi nezávislými proměnnými nebyla nalezena (Tab. č. 2). Následně bylo testováno, zda existuje vztah mezi otokem, H/L poměrem, absolutním počtem

leukocytů, standardizovanou hmotností a hnízdem, ze kterého jedinci pocházeli pomocí lineárního modelu (LM). Závisle proměnná byla výška otoku a nezávisle proměnnými pak H/L poměr, absolutní počet leukocytů, standardizovaná hmotnost a příslušnost k hnízdu. Model byl následně zjednodušován o neprůkazné proměnné, až bylo dosaženo minimálního adekvátního modelu (MAM), tj. modelu s pouze signifikantními proměnnými (Pekár et Brabec 2012).

Tab. č. 2: Pearsonův korelační koeficient mezi nezávislými proměnnými, n=132, Abs. l.=absolutní počet leukocytů, St. hm.=standardizovaná hmotnost, hladina významnosti $p>0.05$:

Proměnná	St. hm.	Abs. l.
H/L index	-0.44	-0.04
Abs. l.	0.09	

6.2 Výsledky

Tabulka č. 3 prezentuje základní statistické údaje týkající se jednotlivých leukocytů a H/L poměru. Z vyhodnocení metodou diferenciálního počtu vyplývá, že zde byly nejvíce zastoupeny lymfocyty a to průměrně 54 %. Následovány jsou heterofily, bazofily, eozinofily a nejmenší část pak tvoří monocyty a to asi 0.9 %. Průměrný H/L index byl 0.54, přičemž maximální hodnota tohoto poměru byla 3.00. Průměrná hodnota absolutního počtu leukocytů byla rovna 10.83 a maximální hodnota pak byla 38.00.

Tab. č. 3: Variabilita hematologických znaků, n=132:

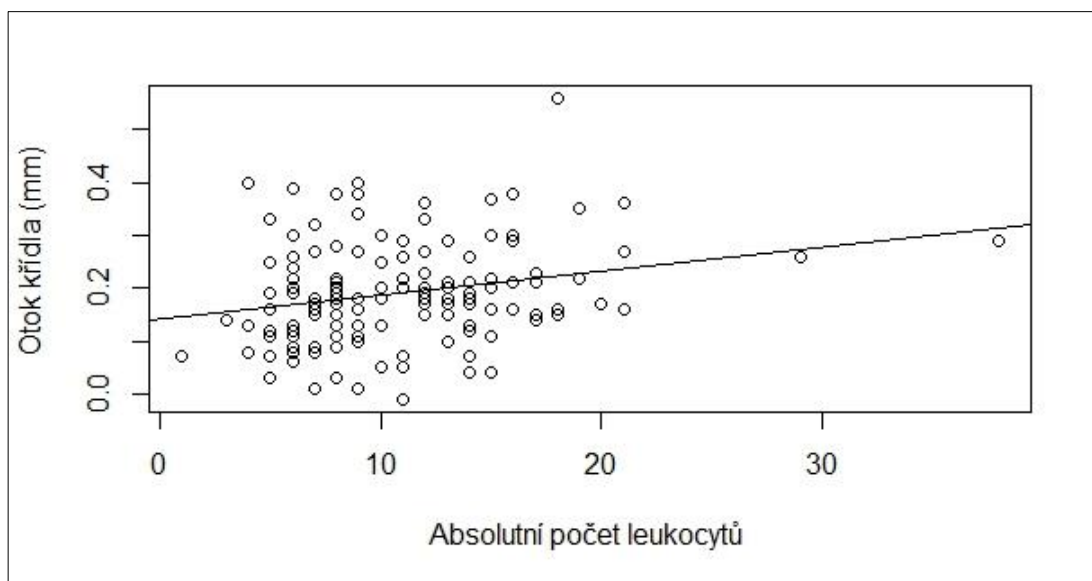
Proměnná	Min	Max	Průměr	Medián	SE	CV
H/L	0.02	3.00	0.54	0.39	0.48	0.89
Lymfocyty (%)	17.74	81.20	53.87	54.14	12.63	0.23
Heterofily (%)	1.53	59.13	23.85	22.27	11.75	0.49
Bazofily (%)	2.61	30.60	13.29	13.27	5.48	0.41
Eozinofily (%)	1.60	24.58	8.05	7.14	4.38	0.54
Monocyty (%)	0.00	4.76	0.94	0.84	1.00	1.07
Abs. l. (n)	1.00	38.00	10.83	10.00	5.19	0.48

Pomocí lineárního modelu bylo zjištěno, že zde existuje pozitivní vztah mezi absolutním počtem leukocytů a výškou otoku (Tab. č. 4, Obr. č. 1). Jedinci s větším absolutním počtem leukocytů tedy vykazovali větší otok. Také mezi standardizovanou hmotností a otokem byl nalezen pozitivní vztah (Tab. č. 4, Obr. č. 2), mláďata s větší standardizovanou hmotností otekla více. Mezi H/L indexem a výškou otoku byl nalezen pouze marginálně signifikantní negativní trend (Tab. 4, Obr. č. 3). Mláďata s větším otokem měla tendenci k nižším hodnotám H/L indexu.

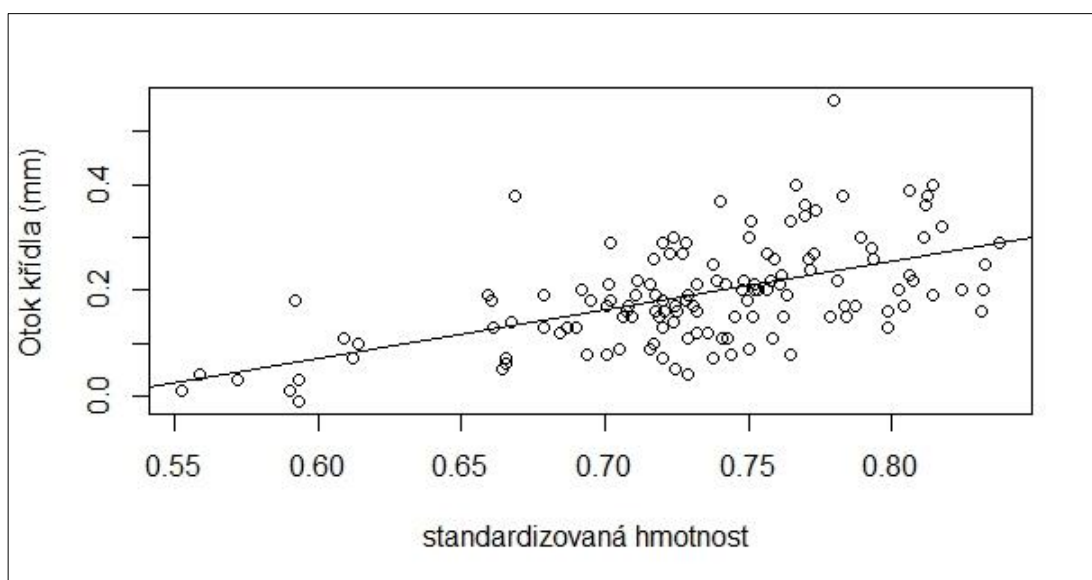
Tab. č. 4: Vztah mezi kondicí a silou imunitní reakce na LPS, lineární model, n=132:

Proměnná	Směrnice	SE	F	P
Hnízdo	<0.001	<0.001	0.103	0.918
H/L	-0.027	0.016	-1.685	0.093
Abs. l.	0.004	0.001	2.651	0.009
St. hm.	0.894	0.118	7.565	<0.001

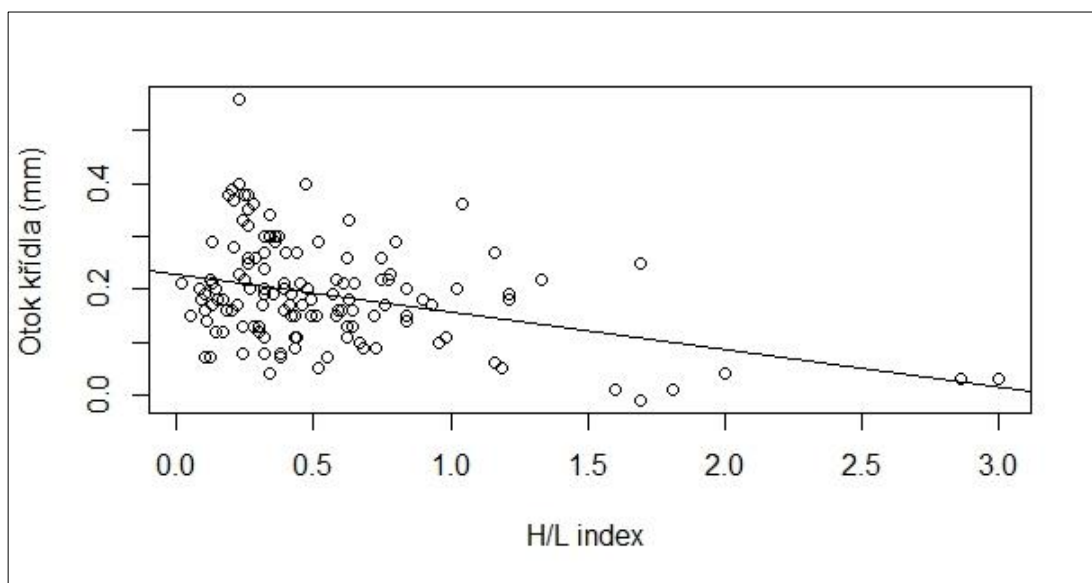
Obr. č. 1: Graf závislosti výšky otoku křídla po aplikaci LPS na absolutním počtu leukocytů, n=132.



Obr. č. 2: Graf závislosti výšky otoku křídla po aplikaci LPS na standardizované hmotnosti, n=132.



Obr. č. 3: Graf závislosti výšky otoku křídla po aplikaci LPS na H/L indexu, n=132.



6.3 Diskuze

Z našich výsledků vyplývá, že u mláďat sýkory koňadry existuje pozitivní vztah mezi standardizovanou hmotností, absolutním počtem leukocytů a silou imunitní odpovědi na lipopolysacharid (LPS). Mláďata s nižšími hodnotami H/L indexu měla zároveň tendenci k silnější imunitní odpovědi, přestože tento výsledek byl pouze marginálně signifikantní.

LPS působí jako antigen, pomocí něhož je vyvolána měřitelná imunitní reakce (Bonneaud et al. 2003). V odpovědi na imunitní stimul jsou různými leukocyty syntetizovány cytokiny fungující jako signály mezi jednotlivými komponenty imunitního systému. Tento proces vede ke zprostředkování zánětlivé reakce regulováním leukocytové proliferace a diferenciaci. Tato metoda proto bývá interpretována jako měření komplexní imunitní reakce (Lee et al. 1992; Roitt et al. 1998). Nejsilnější vztah byl v naší populaci nalezen mezi standardizovanou hmotností a silou imunitní odpovědi na LPS. Jedinci s větší standardizovanou hmotností měli zároveň více oteklé křídlo a měli tedy lepší imunitní odpověď. Jelikož imunitní systém pomáhá ptákům bojovat s parazity a patogeny, mohou být jedinci s lepším imunitním systémem těmito faktory méně zatíženi a mohou zároveň disponovat větší hmotností (Alonso-Alvarez et Tella 2001). Pomocí fytohematoglutininu (PHA) může být podobně jako v případě LPS měřena

komplexní imunitní odpověď (McCorkle et al. 1980; Lee et al. 1992; Salvante 2006; Vinkler et al. 2010a). Těžší jedinci vykazovali lepší imunitní odpověď na PHA také v případě mlád'at vlaštovky obecné (Saino et al. 1997). Negativní vztah mezi PHA odpovědí a hmotností byl naopak nalezen u lejska černohlavého během hnízdní sezóny, kde měly samice s nižší hmotností silnější imunitní odpověď na PHA. Tento jev mohl být způsoben velkými investicemi hnízdicích samic do imunitní funkce, které vedly ke snížení hmotnosti (Moreno et al. 1999).

Dále jsme zjistili pozitivní vztah mezi silou imunitní odpovědi na LPS a absolutním počtem leukocytů. Mlád'ata, která si nebyla schopna vyvinout tak silnou imunitní odpověď na LPS, měla zároveň nižší absolutní počty leukocytů v periferní krvi. V kontextu s hmotností a H/L indexem (viz. níže) se tento fakt přiklání k tvrzení, že vysoký absolutní počet leukocytů značí jedince v dobré kondici s kvalitním imunitním systémem (Salvante 2006). S podobnými výsledky se setkali Hůrak et al. (1999) také u sýkory koňadry, kdy si mlád'ata z větších hnízd vyvinula slabší imunitní odpověď na PHA a měla zároveň tendenci k nižším počtům cirkulujících leukocytů. Ve studii zabývající se parazitální infekcí prováděné na jedincích kosa černého (*Turdus merula*) nebyl naopak nalezen vztah mezi absolutním počtem leukocytů a silou imunitní odpovědi na PHA (Biard et al. 2015). Vztah mezi absolutním počtem leukocytů a silou imunitní odpovědi by tedy mohl být druhově specifický. V naší populaci byli nalezeni dva jedinci s vysokými hodnotami absolutního počtu leukocytů (>29). Podobné hodnoty zjistili například také Mashaly et al. (2004) u nosnic v komerčním chovu nebo Hauptmanová et al. (2002) u sýkory koňadry. Je tedy zřejmé, že se jedinci s extrémními hodnotami absolutního počtu leukocytů v periferní krvi v přirozených populacích vyskytují a proto byly ponechány ve statistickém hodnocení. I přes odstranění těchto hodnot však zůstává vztah mezi silou imunitní odpovědi na LPS a absolutním počtem leukocytů signifikantní.

H/L index bývá interpretován jako indikátor dlouhodobého stresu a zdravotního stavu (Davis et al. 2008). V naší populaci měla mlád'ata se zvýšenou hodnotou H/L indexu v periferní krvi tendenci k menšímu otoku. Lze tedy konstatovat, že více stresovaní jedinci nebo jedinci v horším zdravotním stavu měli sklon vyvinout si slabší imunitní odpověď na LPS. Vztah mezi H/L indexem a silou imunitní odpovědi zjistili například Ilmonen et al. (2003). U mlád'at lejska

černošavlého se s manipulativním zvětšením snůšky zvýšil také H/L index a snížila se imunitní odpověď na PHA. Tento vztah naopak nebyl nalezen u mlád'at šoupálka dlouhoprstého (*Certhia familiaris*). Zatímco H/L index se zvýšil se zvětšením snůšky, na imunitní odpověď na PHA to nemělo žádný vliv. Stejně jako u absolutního počtu leukocytů jsme zjistili dva jedince s vysokými hodnotami H/L indexu (>2.8). Podobné hodnoty zjistili například také Ots et Hōrak (1996) v přirozené populaci sýkory koňadry. I v tomto případě byly proto hodnoty ponechány ve statistickém hodnocení, nicméně po odstranění těchto hodnot byl vztah mezi H/L indexem a výškou otoku již nesignifikantní.

7. Závěr

- Stres a imunita jsou spolu velmi úzce provázány. Krátkodobý stres stimuluje dočasně její funkci, zatímco dlouhodobý stres má účinek opačný.
- Měření stresu napomáhá předpovídat potencionální problémy u jednotlivců a v populacích a přispívá tak k navrhování vhodných managementů.
- Tato práce je zaměřena především na jeden z indikátorů tohoto stresu - H/L index. K navýšení jeho hodnot dochází v souvislosti s velkým množstvím stresorů a odráží se v něm také kondice a zdravotní stav.
- Tento indikátor hrál svou roli také v praktické části. Mláďata sýkory koňadry s vyššími hodnotami H/L indexu měla zároveň tendenci ke slabším imunitním odpovědím na LPS. Podle předpokladu zde byl nalezen také pozitivní vztah mezi standardizovanou hmotností, absolutním počtem leukocytů a silou imunitní odpovědi. V tomto případě se lze tedy přiklonit k tvrzení, že jedinci v lepší kondici jsou si schopni vyvinout silnější imunitní reakci.
- V oblasti měření stresu se však můžeme také setkat s obtížnostmi. Z této práce vyplývá, že imunitní odpověď může být velice variabilní. Různé stresory s odlišnou dobou expozice v různých podmínkách můžou na organismy působit odlišně. Některé stresory jako například vysoká hustota osídlení se na buněčné složce imunity dokonce většinou ani neprojeví. Také v rámci interpretace výsledků existují určité problémy, kdy mohou být například vysoké hodnoty absolutního počtu leukocytů spojovány s jedinci s kvalitním imunitním systémem nebo to naopak můžou být jedinci prodávající stres.
- K imunologickým výzkumům je tedy třeba přistupovat individuálně a při konstruování zobecněných závěrů postupovat s opatrností a přihlídnout k těmto faktům. Budoucí studie by se tak díky některým nekonsistentním datům mohla zaměřit právě na tyto problémy.

8. Přehled literatury a použitých zdrojů

Acevedo-Whitehouse K. & Duffus A. L. J. 2009: Effects of environmental change on wildlife health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 3429-3438.

Adamo S. A. 2004: How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity. *Animal Behaviour* 68: 1443-1449.

Alexander J. & Stimson W. H. 1988: Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology Today* 4: 189-193.

Alonso-Alvarez C. & Tella J. L. 2001: Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Canadian Journal of Zoology* 79: 101-105.

Altan O., Altan A., Cabuk M. & Bayraktar H. 2000: Effects of heat stress on some blood parameters in broilers. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 24: 145-148.

Bailly J., Scheifler R., Belvalette M., Garnier S., Boissier E., Clément-Demange V. A., Gète M., Leblond M., Pasteur B., Piget Q., Sage M. & Faivre B. 2016: Negative impact of urban habitat on immunity in the great tit *Parus major*. *Oecologia* 182: 1053-1062.

Bañbura J., Skwarska J., Bañbura M., Gładalski M., Hołysz M., Kaliński A., Markowski M., Wawrzyniak J. & Zieliński P. 2013: Spatial and temporal variation in heterophil-to-lymphocyte ratios of nestling passerine birds: comparison of blue tits and great tits. *Plos One* 8: e74226.

Barbosa A., De Mas E., Benzal J., Diaz J., Motas M., Jerez S., Pertierra L., Benayas J., Justel A., Lauzurica P., GarciaPeña F. & Serrano T. 2013: Pollution and physiological variability in Gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. *Antarctic Science* 25: 329-338.

Bauerová P., Vinklerová J., Hraníček J., Čorba V., Vojtek L., Svobodová J. & Vinkler M. 2017: Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species. *Science of the Total Environment* 601-602: 1556-1565.

Biard C., Monceau K., Motreuil S. & Moreau J. 2015: Interpreting immunological indices: the importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds (*Turdus merula*). *Methods in Ecology and Evolution* 6: 960-972.

Bókony V., Seress G., Nagy S., Lendvai Á. Z. & Liker A. 2012: Multiple indices of body condition reveal no negative effect of urbanization in adult house sparrows. *Landscape and Urban Planning* 104: 75-84.

Bonier F. 2012: Hormones in the city: endocrine ecology of urban birds. *Hormones and Behavior* 61: 763-772.

- Bonneaud C., Mazuc J., Gonzalez G., Haussy C., Chastel O., Faivre B. & Sorci G. 2003:** Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist* 161: 367-379.
- Bounous D. I. & Stedman N. L. 2000:** Normal avian hematology: Chicken and turkey. In: Feldman B. F., Zinkl J. G. & Jain N. C. (eds): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 1145-1154.
- Brennan C. P., Hendricks G. L., El-Sheikh T. M. & Mashaly M. M. 2002:** Melatonin and the enhancement of immune responses in immature male chickens. *Poultry Science* 81: 371-375.
- Campbell T. W. 1995:** *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State University Press, Ames.
- Campbell T. W. & Ellis C. K. 2007:** *Avian and exotic animal hematology and cytology*, 3. vyd. Blackwell, Ames.
- Camplani A., Saino N. & Möller A. P. 1999:** Carotenoids, sexual signals and immune function in barn swallows from Chernobyl. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 1111-1116.
- Carbó-Ramírez P. & Zuria I. 2017:** Leukocyte profile and body condition of the house finch (*haemorhous mexicanus*) in two sites with different levels of urbanization in central Mexico. *Ornitología neotropical* 28: 1-10.
- Čirule D., Krama T., Vrublevska J., Rantala M. J. & Krams I. 2012:** A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: A more practical measure of stress? *Journal of Ornithology* 153: 161-166.
- Claver J. A. & Quaglia A. I. E. 2009:** Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18: 87-97.
- Clinchy M., Zanette L., Boonstra R., Wingfield J. C. & Smith J. N. M. 2004:** Balancing food and predator pressure induces chronic stress in songbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271: 2473-2479.
- Dallman M. F., Pecoraro N., Akana S. F., Fleur S. E. I., Gomez F., Houshyar H., Bell M. E., Bhatnagar S., Laugero K. D. & Manalo S. 2003:** Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11696-11701.
- D'Amico V. L., Bertellotti M., Baker A. J. & González P. M. 2010:** Hematologic and plasma biochemistry values for endangered red knots (*Calidris canutus rufa*) at wintering and migratory sites in Argentina. *Journal of Wildlife Diseases* 46: 644-648.
- Davis A. K. 2005:** Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76: 334-338.

- Davis A. K., Cook K. C. & Altizer S. 2004:** Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth* 1: 362-373.
- Davis A. K., Maney D. L. & Maerz J. C. 2008:** The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760-772.
- Davison F., Kaspers B. & Schat K. A. (Eds.) 2008:** *Avian Immunology*. Elsevier, London.
- Demas G. E., Zysling D. A., Beechler B. R., Muehlenbein M. P. & French S. S. 2011:** Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology* 80: 710-730.
- Dieterlen-Lievre F. 1988:** Birds. in Rowley A. F. & Ratcliffe N. A. (eds): *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge University Press, Cambridge: 257-336.
- Dufva R. & Allander K. 1995.** Intraspecific variation in plumage coloration reflects immune response in Great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785-789.
- Edmonds R. H. 1968:** Electron microscope studies on the hemostatic process in bird embryos I: the initial plug. *Journal of Ultrastructural Research* 24: 295-310.
- Eeva T., Hasselquist D., Langefors Å., Tummeleht L., Nikinmaa M. & Ilmonen P. 2005:** Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of avian biology* 36: 405-412.
- Eeva T., Lehikoinen E. & Nikinmaa M. 2003.** Pollution induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecological Application* 13: 1242-1249.
- Ewenson E. L., Zann R. A. & Flannery G. R. 2001:** Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captiverearing. *Naturwissenschaften* 88: 391-394.
- Figuerola J., Munoz E., Gutierrez R. & Ferrer D. 1999:** Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirlus*. *Functional Ecology* 13: 594-601.
- Fokidis H. B., Greiner E. C., Deviche P., 2008:** Interspecific variation in avian blood parasites and haematology associated with urbanization in a desert habitat. *Journal of Avian Biology* 39: 300-310.
- Garren, H. W. & Shaffner C. S. 1954:** Factors concerned in the response of young New Hampshires to muscular fatigue. *Poultry Science* 33: 1095-1104.
- Gregory R. D., Montgomery S. S. J. & Montgomery W. I. 1992:** Population biology of *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematoda*) in the wood mouse. *Journal of Animal Ecology* 61: 749-757.

Gross W. B. 1990. Effect of exposure to a short-duration sound on the stress response of chickens. *Avian Diseases* 34: 759-61.

Gross W. B. & Siegel P. B. 1983: Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chicken. *Avian Diseases* 27: 972-979.

Guimarães E. B., Vasconcelos A. C., Martins N. R. S. & Moro L. 2001: Porcentagem de parênquima e índice apoptótico da bolsa cloacal em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 178-186.

Haldar C. & Saxena N. 1988: Pineal and humidity effect on testicular function of Indian palm squirrel *F. pennanti*. *Journal of Pineal Research* 5: 411-418.

Harmon B. G. 1998: Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77: 972-977.

Hauptmanová K., Literák I. & Bártová E. 2002: Haematology and Leucocytozoonosis of Great Tits (*Parus major L.*) During Winter. *Acta Veterinaria* 71: 199-204.

Hinam H. L. & St. Clair C. C. 2008: High levels of habitat loss and fragmentation limit reproductive success by reducing home range size and provisioning rates of Northern saw-whet owls. *Biological Conservation* 141: 524-535.

Hoi-Leitner M., Romero-Pujante M., Hoi H. & Pavlova A. 2001: Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 333-339.

Hörak P., Tegelmann L., Ots I. & Moller A. P. 1999: Immune function and survival of great tit nestlings in relationship to growth conditions. *Oecologia* 121: 316-322.

Hörak, P., Ots, I. & Murumägi, A. 1998: Haematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* 12: 750–756.

Hořejší V. & Bartůňková J. 2005: *Základy imunologie*, 3. vyd. Triton, Praha.

Hudson P. J. & Dobson A. P. 1997: Host-parasite processes and demographic consequences. In Clayton D. H. & Moore J. (eds): *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford: 128-154.

Christe P., Glaizot O., Strepparava N., Devevey G. & Fumagalli L. 2012: Twofold cost of reproduction: an increase in parental effort leads to higher malarial parasitaemia and to a decrease in resistance to oxidative stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1142–1149.

Ilmonen P., Hasselquist D., Langefors Å. & Wiehn J. 2003: Stress, immunocompetence and leucocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia* 136: 148-154.

Jain N. C. 1993: Essentials of Veterinary Hematology. Blackwell Publishing, Philadelphia.

Kadymov R. A. & Aleskerov Z. A. 1988: Immunological reactivity of poultry organism under high temperature conditions. Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina Akademii Sel'skokhozyaistvennykh nauk Imeni V. I. Lenina 5: 33-35.

Kang S. Y., Ko Y. H., Moon Y. S., Sohn S. H. & Jang I. S. 2011: Effects of the combined stress induced by stocking density and feed restriction on hematological and cytokine parameters as stress indicators in laying hens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 24: 414-420.

Katanbaf M. N., Dunnington E. A. & Siegel P. B. 1989: Restricted feeding in early and late-feathering chickens. 1. Growth and physiological responses. Poultry Science 68: 344-351.

Krams I., Vrublevska J., Cirule D., Kivleniece I., Krama T., Rantala M. J., Kaasik A., Hõrak P. & Sepp T. 2013: Stress, behaviour and immunity in wild-caught wintering great tits (*Parus major*). Ethology 119: 397-406.

Ladics G. S., Smith C., Elliott G. S., Slone T. W. & Loveless S. E. 1998: Further evaluation of the incorporation of an immunotoxicological functional assay for assessing humoral immunity for hazard identification purposes in rats in a standard toxicology study. Toxicology 126: 137-152.

Lashev L., Hubenov H., Nikolov Y., Lasheva V. & Mihailov R. 2009: Comparison of some haematological parameters between three bird species from the Columbidae family - short communication. Veterinarski Arhiv 79: 409-414.

Lavoie E. T. 2006: Avian immunosenescence. AGE 27: 281-285.

Lazarević M., Žikić D. & Ušćebrka G. 2000: The influence of long term sound stress on the blood leukocyte count, heterophil/lymphocyte ratio and cutaneous basophil hypersensitive reaction to phytohemagglutinin in broiler chickens. Acta Veterinaria Beograd 50: 63-75.

Lee C. E., Neuland M. E., Teaford H. G., Villacis B. F., Dixon P. S., Valtier S., Yeh C. H., Fournier D. C. & Charlesworth E. N. 1992: Interleukin-6 is released in the cutaneous response to allergen challenge in atopic individuals. Journal of Allergy and Clinical Immunology 89: 1010-1020.

Lessells C. M. & Boag P. T. 1987: Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. The Auk 104: 116-121.

Lobato L., Moreno J., Merino S., Sanz J. J. & Arriero E. 2005: Hematological variables are good predictors of recruitment in nestling Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). Ecoscience 12: 27-34.

Lochmiller R. L. 1995: Testing the immunocompetence handicap theory. Trends in Evolutionary Ecology 10: 372-373.

- Loyau A., Saint Jalme M., Cagniant C. & Sorci G. 2005:** Multiple sexual advertisements honestly reflect health status in peacocks (*Pavo cristatus*). Behavioral Ecology and Sociobiology 58: 552-557.
- Lozano G. A. & Lank D. B. 2003:** Seasonal trade-offs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270: 1203-1208.
- Lucas A. M. & Jamroz C. 1961:** Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, Washington.
- Markowska M., Majewski P. M. & Skwarlo-Sońta K. 2017:** Avian biological clock - Immune system relationship. Developmental and Comparative Immunology 66: 130-138.
- Martin L. B., Hopkins W. A., Mydlarz L. D. & Rohr J. R. 2010:** The effects of anthropogenic global change on immune functions and disease resistance. Annals of the New York Academy of Sciences: The Year in Ecology and Conservation Biology 1195: 129-148.
- Martinez-Padilla J., Martinez J., Davila J. A., Merino S. & Moreno J. 2004:** Within-brood size differences, sex and parasites determine blood stress protein levels in Eurasian Kestrel nestlings. Functional Ecology 18: 426-434.
- Mashaly M. M., Hendricks G. L., Kalama M. A., Gehad A. E., Abbas A. O. & Patterson P. H. 2004:** Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poultry Science 83: 889-894.
- Maxwell M. H. 1987:** The avian eosinophil: a review. World Poultry Science Journal 43: 190-207.
- Maxwell M. H. 1993:** Avian blood leukocyte responses to stress. World Poultry Science Journal 49: 34-43.
- Maxwell M. H. & Robertson G. W. 1995:** The avian basophilic leukocyte: a review. World Poultry Science Journal 51: 307-325.
- Mazerolle D. F. & Hobson K. A. 2002:** Physiological ramifications of habitat selection in territorial male ovenbirds: consequences of landscape fragmentation. Oecologia 130: 356-363.
- McCorkle F., Olah I. & Glick B. 1980:** Morphology of the phytohemagglutinin induced cell response in the chickens wattle. Poultry Science 59: 616-623.
- McFarlane J. M. & S. E. Curtis 1989:** Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil:lymphocyte ratio. Poultry Science 68: 522-527.
- Merino S., Martínez J., Barbosa A., Møller A. P, de Lope F., Pérez J. & Rodríguez-Caabeiro F. 1998:** Increase in a heat-shock protein from blood cells in response of nestling house martins (*Delichon urbica*) to parasitism: An experimental approach. Oecologia 116: 343-347.

- Milenkaya O., Weinstein N., Legge S. & Walters J. R. 2013:** Variation in body condition indices of crimson finches by sex, breeding stage, age, time of day, and year. *Conservation Physiology* 1: cot020.
- Mitchell M. & Kettlewell P. J. 1998:** Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: Solutions not problems. *Poultry Science* 77: 1803-1814.
- Møller A. P., Biard C., Blount J. D., Houston D. C., Ninni P., Saino N. & Surai P. F. 2000:** Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian Poultry Science Reviews* 11: 137-159.
- Møller A. P., Sorci G. & Erritzoe J. 1998:** Sexual dimorphism in immune defense. *The American Naturalist* 152: 605-619.
- Moore C. B. & Siopes T. D. 2000:** Effects of light conditions and melatonin supplementation on the cellular and humoral immune responses in Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *General and comparative endocrinology* 119: 95-104.
- Moreno J., Sanz J. J. & Arriero E. 1999:** Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 266: 1105-1109.
- Müller C., Jenni-Eiermann S. & Jenni L. 2011:** Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Functional Ecology* 25: 566-576.
- Müller W., Groothuis T. G. G., Kasprzik A., Dijkstra C., Alatalo R. V. & Siitari H. 2005:** Prenatal androgen exposure modulates cellular and humoral immune function of black-headed gull chicks. *Proceedings Biological Sciences* 272: 1971-1977.
- Nathan D. B., Heller E. D. & Perek M. 1976:** The effect of short heat stress upon leucocyte count, plasma corticosterone level, plasma and leukocyte ascorbic acid content. *British Poultry Science* 17: 481-485.
- Nelson R. J. & Demas G. E. 1996.** Seasonal changes in immune function. *The Quarterly Review of Biology* 71: 511-548.
- Newman S. H., Piatt J. F. & White J. 1997:** Hematological and plasma biochemical reference ranges of Alaskan seabirds: their ecological significance and clinical importance. *Colonial Waterbirds* 20: 492-504.
- Nieuwenhuis P. 1996:** Histophysiology of The Lymphoid System: The Thymus and T Cells. In: Marsh J. A. & Kendall M. D. (Eds.) 1996: *The Physiology of Immunity*. CRC Press, New York: 3-32.
- Norte A. C., Araujo P. M., Sampaio H. L., Sousa J. P. & Ramos J. A. 2009:** Haematzoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health. *Ibis* 151: 677-688.

O'Neal D. M. 2013: Eco-endo-immunology across avian life history stages. *General and comparative endocrinology* 190: 105-111.

Ortego J., Zapero L., Calabuig G., Cordero P. J. & Aparicio J. M. 2009: Physiological response to stress in fledgling Lesser Kestrels *Falco naumanni*: the role of physical condition, sex and individual genetic diversity. *Ibis* 151: 559-567.

Ots I. & Hõrak P. 1996: Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 263: 1443-1447.

Owen J. C. & Moore F. R. 2006: Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *Condor* 108: 389-398.

Pap P. L. & Markus R. 2003: Cost of reproduction, T-lymphocyte mediated immunocompetence and health status in female and nestling barn swallows *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology* 34: 428-434.

Parga M. L., Pendl H. & Forbes N. A. 2001: The effect of transport on hematologic parameters in trained and untrained Harris's Hawks (*Parabuteo unicinctus*) and Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 15: 162-169.

Passantino L., Massaro M. A., Jirillo F., Di Modugno D., Ribaud M. R., Di Modugno G., Passantino G. F. & Jirillo E. 2007: Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 29: 141-152.

Quillfeldt P., Ruiz G., Aguilar Rivera M. & Masello J. F. 2008: Variability in leucocyte distributions and stress index in Thin-billed prions *Pachyptila belcheri* during a poor season. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 150: 26-31.

Roitt I., Brostoff J. & Male D. (Eds.) 1998: *Immunology*, 5. vyd. Mosby international, London.

Rose M. E. 1979: The immune system in birds. *Journal of the Royal Society of Medicine* 72: 701-705.

Rowe L. & Houle D. 1996: The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 263: 1415-1421.

Ruiz G., Rosenmann M., Novoa F. F. & Sabat P. 2002: Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *Condor* 104: 162-166.

Rupley A. E. 1997: *Manual of Avian Practice*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.

Rychlý M. 2015: Vliv stresu na imunitní funkce ptáků. Česká zemědělská univerzita, Fakulta životního prostředí, Praha, nepublikováno.

Salvante K. G. 2006: Techniques for studying integrated immune function in birds. *The Auk* 123: 575-586.

Saino N., Calza S. & Møller A. P. 1997: Immuno-competence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology* 66: 827-836.

Sapolsky R. M. 2000: Stress hormones: good and bad. *Neurobiology of Disease* 7: 540-542.

Scope A., Filip T., Gabler C. & Resch F. 2002: The Influence of Stress from Transport and Handling on Hematologic and Clinical Chemistry Blood Parameters of Racing Pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Diseases* 46: 224-229.

Siegel H. S. 1980: Physiological Stress in Birds. *BioScience* 30: 529-534.

Singh S. S. & Haldar Ch. 2007: Peripheral melatonin modulates seasonal immunity and reproduction of Indian tropical male bird *Perdicula asiatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 446-450.

Sol D., Jovani R. & Torres J. 2003: Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135: 542-547.

Speer B. 1995: The influence of travel on the hematologic parameters in hyacinth macaws. In: *Proceedings of Association of Avian Veterinarians*, Philadelphia: 43-49.

Stanclova G., Schwendenwein I., Merkel O., Kenner L., Dittami J., Fritz J. & Scope A. 2017: The effects of migratory flight on hematologic parameters in northern bald ibises (*Geronticus eremita*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 48: 1154-1164.

Suorsa P., Helle H., Koivunen V., Huhta E. & Hakkarainen H. 2004: Effects of forest patch size on physiological stress and immunocompetence in an area-sensitive passerine, the Eurasian treecreeper (*Certhia familiaris*): an experiment. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 271: 435-440.

Svobodová J., Gabrielová B., Hyršl P., Albrecht T. & Vinkler M. 2016: Melanin and carotenoid ornaments are related to the individual condition in free-living grey partridges (*Perdix perdix*). *Journal of Ornithology* 157: 1007-1015.

Thaxton J. P., Dozier W. A. III., Branton S. L., Morgan G. W., Miles D. W., Roush W. B., Lott B. D. & Vizzier-Thaxton Y. 2006: Stocking density and physiological adaptive response of broilers. *Poultry Science* 85: 819-824.

Toman M. a kol. (Eds.) 2009: *Veterinární imunologie*, 2. vyd. Grada, Praha.

Tripathi A. & Bhati D. P. S. 1997: The effect of nutritional state on the differential leukocyte count of the Indian Little Brown Dove. *Geobios* 24: 66-67

Tschirren B., Fitze P. S. & Richner H. 2003: Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* 72: 839-845.

Vinkler M., Bainová H. & Albrecht T. 2010a: Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology* 24: 1081-1086.

Vinkler M., Schnitzer J., Munclinger P., Votýpka J. & Albrecht T. 2010b: Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology* 151: 841-849.

Vleck C. M., Vertalino N., Vleck D. & Bucher T. L. 2000: Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie Penguin. *The Condor* 102: 392-400.

Weiss L. 1972: *The Cells and Tissues of the Immune System: Structure, Function, Interactions.* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Wilson S. D., McCay J. A., Butterworth L. F., Munson A. E., & White Jr. K. L. 2001: Correlation of suppressed natural killer cell activity with altered host resistance models in B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177: 208-211.

Wingfield J., Maney D., Breuner C., Jacobs J., Lynn S., Ramenofsky M. & Richardson R. 1998: Ecological bases of hormone-behavior interactions: the 'emergency life history stage'. *American zoologist* 38: 191-206.

Zábojníková P. 1996: Srovnávací hematologická studie u vybraných druhů pěvců. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Brno.

Zylberberg M. 2015: Common measures of immune function vary with time of day and sampling protocol in five passerine species. *The Journal of Experimental Biology* 218: 757-766.

9. Přílohy

Příloha č. 1: Stres a H/L index:

Druh	Stresor	H/L	Zdroj
Hýl mexický (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	Parazitismus	+	Davis et al. 2004
Lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	Parazitismus	+	Lobato et al. 2005
Poštolka obecná (<i>Falco tinnunculus</i>)	Parazitismus	0	Martinez-Padilla et al. 2004
Strnad cvrčivý (<i>Emberiza cirrus</i>)	Parazitismus	-	Figuerola et al. 1999
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	Parazitismus	-	Norte et al. 2009
Strnadc ranní (<i>Zonotrichia capensis</i>)	Městské prostředí	+	Ruiz et al. 2002
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	Městské prostředí	+	Bañbura et al. 2013
Hýl mexický (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	Městské prostředí	0	Carbó-Ramírez et Zuria 2017
Vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>)	Městské prostředí	-	Bókony et al. 2011
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	Těžké kovy	+	Bauerová et al. 2017
Lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	Těžké kovy	0	Eeva et al. 2003
Lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	Těžké kovy	-	Eeva et al. 2005
Tučňák oslí (<i>Pygoscelis papua</i>)	Turismus, těžké kovy	-	Barbosa et al. 2013
Vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	Radioaktivní kontaminace	+	Camplani et al. 1999
Sýc americký (<i>Aegolius acadicus</i>)	Fragmentace prostředí	+	Hinam et Clair 2008
lesňáček zlatotemenný (<i>Seiurus aurocapillus</i>)	Fragmentace prostředí	0	Mazerolle et Hobson 2002
Ibis skalní (<i>Geronticus eremita</i>)	Migrace	+	Stanclová et al. 2017

Jespák rezavý (<i>Calidris canutus</i>)	Migrace	+	D'Amico et al. 2010
Drozd malý (<i>Catharus ustulatus</i>)	Migrace	+	Owen & Moore 2006
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Transport	+	Mitchell et Kettlewell 1998
Ara hyacintový (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>)	Transport	+	Speer 1995
káně Harrisovo (<i>Parabuteo unicinctus</i>)	Transport	+	Parga et al. 2001
sokol stěhovavý (<i>Falco peregrinus</i>)	Transport	0	Parga et al. 2001
Holub domácí (<i>Columba livia domestica</i>)	Manipulace a transport	+	Scope et al. 2002
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	Manipulace	+	Cirule et al. 2012
Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	Opakovaná manipulace	0	Vleck et al. 2010
Koroptev polní (<i>Perdix perdix</i>)	Zajetí	+	Svobodová et al. 2016
Zebříčka pestrá (<i>Taeniopygia guttata</i>)	Zajetí	-	Ewenson et al. 2001
Lejsek černohlavý samec (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	Zvýšená rodičovská péče	+	Ilmonen et al. 2003
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	Zvýšená rodičovská péče	+	Hõrak et al. 1998
Vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	Neodostatek potravy	0	Pap et Markus 2003
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Neodostatek potravy	0	Maxwell 1993
Hrdlička senegalská (<i>Spilopelia senegalensis</i>)	Neodostatek potravy	+	Tripathi and Bhati 1997
Zvonohlík zahradní (<i>Serinus serinus</i>)	Neodostatek potravy	+	Hoi-Leitner et al., 2001;
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Teplotní stres	+	Altan et al. 2000
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Teplotní stres	+	Mashaly et al. 2004
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Hustota osazení	0	Thaxton et al. 2006
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Hustota osazení, nedostatek potravy	0	Kang et al. 2011

Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Zvukový stres	+	Gross 1990
Kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Zvukový stres	+	Lazarević et al. 2000
Poštolka obecná (<i>Falco tinnunculus</i>)	Kompetiční stres	0	Martinez-Padilla et al. 2004
Strnavec zpěvný (<i>Melospiza melodia</i>)	Predační tlak	0	Clinchy et al. 2004
