

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie



Vliv prostředí na zdravotní stav a ornamentaci  
samců sýkory koňadry

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Bauerová

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

Konzultant práce: RNDr. Michal Vinkler, PhD.

2014

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie  
Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bauerová Petra

Ochrana přírody

Název práce

**Vliv prostředí na zdravotní stav a ornamentaci samců sýkory koňadry**

Anglický název

**The effect of environment on individual health and ornamentation of great tit males**

---

### Cíle práce

Kvalita prostředí má výrazný vliv na zdraví jedinců (Janssens et al. 2003). Ačkoliv existuje mnoho způsobů jak stanovit zdravotní stav, hematologické vyšetření patří mezi nejpoužívanější metody (Ardia & Schat 2008, Vinkler et al. 2010). Např. bylo zjištěno, že hematologické parametry se mohou významně lišit mezi volně žijícími populacemi a populacemi chovanými v zajetí (Ewenson et al. 2001), protože spolehlivě indikují stres (Davis et al. 2008). Nicméně tyto metody v ochraně volně žijících živočichů nebyly zatím dostatečně využity.

Cílem práce:

1. Práce bude testovat, zda základní hematologické parametry samců sýkory koňadry (*Parus major*) souvisí s jejich dalšími kondičně závislými znaky.
2. Práce bude testovat, zda zdravotní stav jedinců souvisí s kvalitou prostředí.

### Metodika

Náš tým disponuje daty o 59 samcích sýkory koňadry (hmotnost, základní míry, hematologické vzorky, standardními digitální fotografie, vzorky peří karotenoidního i melaninového ornamentu), kteří byli odchyceni na 13 lokalitách o různém stavu kvality prostředí (stanoveno koncentrací PM10 částic v ovzduší). Práce bude vycházet z předchozí bakalářské práce, která zanalyzovala plochu melaninového břišního ornamentu (proužku) a barvu karotenoidního ornamentu u těchto jedinců. Z vzorků rýdovacích per bude dále provedena ptílochronologie jakožto další možný indikátor kondice (použití scanneru a nástrojů Adobe Photoshop??). Hematologické parametry budou vyhodnoceny standardními postupy pomocí mikroskopu (mikroskop CX41, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus). Vztah hematologických parametrů k prostředí a dalším kondičně závislým znakům bude analyzován pomocí zobecněných lineárních modelů.

### Harmonogram zpracování

Literární rešerše: leden – březen 2013

Práce v terénu: duben – květen 2013

Analýza dat: červen – prosinec 2013

Zpracování diplomové práce: leden – březen 2014

### **Rozsah textové části**

30 až 60 stran včetně příloh

### **Klíčová slova**

hematologie, karotenoidní a melaninové ornamenty, *Parus major*, ptilochronologie

---

### **Doporučené zdroje informací**

Ardia DR, Schat KA (2008) Ecoimmunology. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (eds) Avian immunology. Academic/Elsevier, London, pp 421–441

Janssens E et al. (2003) Effects of heavy metal exposure on the condition and health of nestlings of the great tit (*Parus major*), a small songbird species. *Environmen Pollution* 126:267–274.

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

Ewenson EL, Zann RA, Flannery GR (2001) Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. *Naturwissenschaften* 88:391–394

Vinkler M, Schnitzer J, Mundlinger 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

---

### **Vedoucí práce**

Svobodová Jana, Ing., Ph.D.

### **Konzultant práce**

RNDr. Michal Vinkler Ph.D.

---

Elektronicky schváleno dne 13.12.2013

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 18.12.2013

**prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.**

Děkan fakulty

---

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením vedoucího práce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze dne 22.4. 2014

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na sběru dat k této diplomové práci, jmenovitě Michalovi Vinklerovi, Hance Bainové, Jitce Vinklerové a Vojtovi Čorbovi. Děkuji svojí vedoucí práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za její odborné vedení, rady, trpělivost a čas, který mi vždy ochotně věnovala. Děkuji svému konzultantovi RNDr. Michalovi Vinklerovi, PhD. za jeho čas a pomoc během hematologického vyšetření krve zvířat. Poděkování patří i všem přátelům a spolužákům za podporu a skvěle strávené roky během vysokoškolského studia. V neposlední řadě děkuji své rodině, která mě vždy naplno podporovala a i nadále podporuje ať už ve sportu, vzdělání či v mém budoucím zaměstnání.

V Praze dne 22.4. 2014

.....

## Abstrakt

Kvalita prostředí může mít výrazný vliv na kondici a zdraví jedinců. Ačkoliv existuje mnoho způsobů jak stanovit zdravotní stav, hematologické vyšetření patří mezi nepoužívanější metody. Jak bylo zjištěno již v několika studiích, hematologické parametry jsou spolehlivým indikátorem dlouhodobého stresu u obratlovců. Přesto tato metoda v ochraně volně žijících živočichů nebyla prozatím dostatečně využita. V této studii byl analyzován zdravotní stav 57 dospělých samců sýkory koňadry (*Parus major*), kteří byli odchyceni na 13 lokalitách v ČR s různou hladinou znečištění ovzduší PM<sub>10</sub> prachovými částicemi. Cílem práce je zjistit, zda základní hematologické parametry (absolutní počet leukocytů, diferenciální počet leukocytů a počet imaturních erytrocytů), kondiční znaky (standardizovaná hmotnost, délka tarsu, šířka růstových proužků a tučnost) a ornamentace jedinců (velikost melaninového pruhu a intenzita karotenoidního zbarvení) souvisí se znečištěním ovzduší. U 23 jedinců byla také stanovena bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě. V této studii byl zjištěn pozitivní vztah mezi absolutním počtem leukocytů a standardizovanou hmotností samců, a to i v interakci se znečištěním ovzduší PM<sub>10</sub> částicemi. Čistý efekt znečištění ovzduší na zdravotní stav zvířat ovšem nebyl prokázán. Dále byl nalezen negativní vztah mezi zastoupením H/L v krvi a poměrovou hmotností samců, což naznačuje, že menší jedinci byli pravděpodobně ve větším stresu. Vliv kvality prostředí na poměrovou hmotnost či délku tarsu nebyl zjištěn. Bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě nesouvisela s prostředím ani kondičními znaky samců. U břišních ornamentů peří byla vysvětlena pouze velikost melaninového pruhu, která souvisela s délkou tarsu jedinců i se znečištěním ovzduší jejich lokality. Intenzita žlutého břišního zbarvení peří samců nijak nesouvisela s hematologickými ani kondičními znaky. U těchto samců bude dále ještě vyšetřován počet imaturních erytrocytů v krvi. Zde se předpokládá možný výskyt anemického onemocnění u samců pocházejících z lokalit s více znečištěným ovzduším prachovými částicemi.

### Klíčová slova

Hematologické vyšetření, *Parus major*, stres, PM<sub>10</sub>, karotenoidní a melaninové ornamenty

## **Abstract**

The individual condition and health can be significantly affected by the environmental quality. Although there are various ways how to assess the health status, haematological survey is one of the most widely used methods. Some studies have already shown that haematological parameters are reliable indicators of a long-term stress in vertebrate animals. Nevertheless, this method has not been yet sufficiently used in the wildlife protection. In this study, we analysed the individual health of 57 adult males of Great Tit (*Parus major*) captured in 13 different localities in Czech Republic that varied in level of air pollution. The aim of this study was to investigate whether the basic haematological parameters (total leukocyte count, differential leukocyte count and immature erythrocyte count), condition traits (standardised weight, tarsus length, average width of growth bars, fatness) and ornamentation of the individuals (size of melanin-based breast stripe, intensity of carotenoid-based coloration) are related to the air pollution. Moreover in 23 individuals, total bacteriolytic activity of plasma component was also measured. Our results revealed the positive relationship between the total leukocytes count and the standardised weight of males, and interaction between standardised weight and PM<sub>10</sub> pollution. Clear effect of air pollution on the animal health however was not found. Further, our result showed the negative relationship between H/L ratio in blood and standardised weight of males. This suggests that smaller males were probably exposed to higher stress. The effect of environment quality on standardised weight or tarsus length was not found. Bacteriolytic activity of plasma component was related neither to environmental quality or physical condition of males. In case of breast ornament expression, the size of melanin-based stripe was only related to tarsus length and air pollution. The intensity of carotenoid-based coloration was not associated with any haematological and conditional parameter. Furthermore, for these males there will be investigated the number of immature erythrocytes in the blood. Here we assumed the possible presence of anaemic disease in males from more polluted sites by dust particles.

## **Keywords**

Haematological assessment, *Parus major*, stress, PM<sub>10</sub>, carotenoid- and melanin-based ornaments

## Obsah:

1	Úvod.....	10
1.1	Úvod do imunologie ptáků.....	12
1.2	Metody stanovení zdravotního stavu ptáků.....	13
1.2.1	Měření hladiny stresových hormonů.....	13
1.2.2	Základní hematologické parametry.....	15
1.2.2.1	Diferenciální počet leukocytů.....	15
	Lymfocyty.....	16
	Heterofily.....	17
	Bazofily.....	19
	Eosinofily.....	20
	Monocyty.....	21
1.2.2.2	Diferenciální počet erytrocytů.....	21
1.2.2.3	Absolutní počet erytrocytů a leukocytů.....	22
1.2.2.4	Hematokrit.....	23
1.2.3	Antibakteriální aktivita komplementového systému.....	24
2	Cíle a předpoklady.....	26
3	Metodika.....	27
3.1	Studovaná oblast a materiály.....	27
3.2	Ptilochronologie rýdovacích per.....	28
3.3	Analýza zdravotního stavu.....	29
3.3.1	Hematologické vyšetření.....	29
3.3.2	Bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě.....	30
3.4	Statistické vyhodnocení.....	30
4	Výsledky.....	31
4.1	Popisná statistika a korelace jednotlivých proměnných.....	31
4.2	Vliv znečištění na kondici a zdravotní stav samců.....	33



4.3	Kondiční závislost ornamentů samců.....	37
5	Diskuze .....	39
6	Závěr .....	42
7	Přehled literatury a použitých zdrojů.....	43
8	Přílohy.....	50

# 1 Úvod

Znečištění ovzduší prachovými částicemi je jedno z nejnaléhavějších problémů měst a industriálních oblastí vyspělých zemí. Nepopiratelným důkazem toho jsou stále přibývající počty lidí postižených respiračními (Karakatsani et al. 2012) a kardiovaskulárními onemocněními (Baccarelli et al 2011, Stafoggia et al. 2013). Prachové částice často obsahují různé toxické a karcinogenní látky jako jsou především těžké kovy, ale i pesticidy, polyaromatické uhlovodíky a jiné (složení částic se liší podle vzniku; ČHMÚ 2013). Studie dokazují, že pro lidské zdraví jsou velice rizikové nejen jemné prachové částice  $PM_{2.5}$  (frakce  $\leq 2.5 \mu m$ ), ale stejně tak i ty hrubší  $PM_{10}$  či také  $PM_{2.5-10}$  (frakce  $\leq 10 \mu m$ ). Ve Švédsku například, zvýšené koncentrace hrubých částic  $PM_{10}$  v městském ovzduší souvisely se zvýšenou denní mortalitou lidí v letech 2000-2008 (Meister et al. 2012). Hodně sledovány jsou v tomto ohledu samozřejmě i děti, jejichž organismus je daleko náchylnější než u dospělých lidí a hrozí zde vznik chronických respiračních a jiných onemocnění. Studie Lin et al. (2005) ukazuje, že i při relativně nízkých hladinách, koncentrace prachových částic souvisela s počtem hospitalizovaných dětí s respiračními onemocněními. V naprosté většině vyspělých zemí jsou tedy koncentrace suspendovaných prachových částic v ovzduší pravidelně měřeny a monitorovány a společným dlouhodobým cílem je toto znečištění redukovat na nejnižší možnou míru.

Co se týče vlivu tohoto znečištění na zdravotní stav živočichů, není toho příliš známo. Dalo by se předpokládat, že zejména u poměrně malých živočichů, jako jsou např. ptáci či někteří savci, mohou zdravotní následky intenzivního vystavení vysokým koncentracím prachových částic mít daleko rychlejší průběh než u lidí a schopnost jejich přežití tak může být výrazně snížena. Existuje několik málo experimentálních studií, které se tímto tématem doposud zabývaly. Manipulační studie na potkanech ukázala, že krátkodobá aplikace (4 - 6 hodin) vysokých dávek koncentrovaných prachových částic (CAPs – concentrated ambient particles; dávky  $315 \mu g/m^3$  a  $684 \mu g/m^3$ ) se výrazně odrážela na zánětlivých markerech. Se zvyšující se hladinou expozice CAP se zvyšoval celkový počet leukocytů v periferní krvi. Stejně tak se signifikantně zvyšoval i poměr neutrofilů v bronchoalveolární tekutině (BAL analýza – Bronchoalveolar lavage; Lay et al. 2004). Obdobně, Upadhyay et al.

(2010) na potkanech testovali vliv různých dávek (250 - 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) jemných částic  $\text{PM}_{2.5}$ . I v tomto případě velikost dávky odpovídala hladině vybraných zánětlivých markerů (osteopontin, interleukin-6, CRP- plasmový protein, a makrofágový zánětlivý protein-2). Proteinová analýza vybraných markerů ukázala, že aplikace prachových částic vedla k aktivaci endotelního, renin-angiotensinového, a také koagulačního systému v plicích a srdečních tkáních. Tyto výsledky naznačují, že expozice velkému množství suspendovaných prachových částic může u slabších a náchylných jedinců vyvolávat akutní srdeční příhody, jako je infarkt myokardu. Mimo onemocnění dýchacího a kardiovaskulárního systému prachové částice poškozují i trávicí soustavu díky jejich příjmu v potravě a vodě (Beamish et al. 2011). Experimentální studie na myších ukázala, že prachové částice v trávicím traktu způsobují akutní a chronické záněty střeva (Kish et al. 2013). Městské a průmyslové znečištění ovzduší prachovými částicemi navíc přináší riziko zvýšení výskytu určitých forem dědičných mutací u zvířat. Konkrétně toto bylo otestováno u laboratorních myší, kdy byla zjištěna mutace DNA na tzv. ESTR lokusu (Ms6-hm a Hm-2), která byla dědičná, takže genetické poškození zárodečných buněk bylo přenášeno do dalších generací (Somers et al. 2004).

Všechny výše zmíněné studie na zvířatech probíhaly v laboratorních podmínkách, kdy byl použit prach (o určité velikosti) extrahovaný z vybraného městského prostředí. Pokusná zvířata byla přímo vystavována předem nadefinovaným, a nutno podotknout, extrémním dávkám, aby bylo možné jasně definovat zdravotní následky jejich aplikace. Po vyšetření zdravotního stavu byla pokusná zvířata usmrcena. Jak moc zásadní je ale vliv prachových částic na zdraví živočichů v jejich přirozeném prostředí (města, venkovy)? Existuje pouze několik málo studií, které se touto otázkou zabývaly.

V rámci své diplomové práce se zabývám vlivem suspendovaných prachových částic  $\text{PM}_{10}$  na zdraví a celkovou kondici volně žijících samců sýkory koňadry (*Parus major*) různého původu v ČR. Rešeršní část bude věnována především metodám stanovení zdravotního stavu u ptáků.

## 1.1 Úvod do imunologie ptáků

Jak historie dokazuje, znalost a pochopení fungování imunitního systému i u jiných druhů živočichů než u člověka je velice důležitá. Ptáci, v tomto případě byli výborným modelem pro studování základních imunologických procesů jako takových. Mimoto také hráli, a dodnes hrají, zásadní roli ve vývoji vakcín. První očkovací vakcíny totiž byly vyvinuty proti různým onemocněním drůbeže (cholera, Markova nemoc; Davison 2008). I v současnosti, kdy se neustále setkáváme s novými formami bakteriálních a virových onemocnění, které jsou v mnohých případech nebezpečné i pro lidský organismus, jsou nové poznatky z imunologie různých druhů živočichů zásadní (Kaiser 2010).

Ptáci a savci mají část imunologického systému velmi podobnou (vzhledem k vývoji ze společného předka), v některých částech ovšem ptáci mají své unikátní strategie (Davison 2008). U ptáků stejně jako u člověka fungují dva základní imunitní mechanismy, a to nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní; Schijns et al. 2008). Neadaptivní neboli vrozená část imunity je evolučně starší a je tvořena molekulami a buňkami, které mají zásadní význam v obraně proti infekci a jsou účinné proti mnoha různým patogenům, díky jejich reakci na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné (rozpoznatelnost patogenů zprostředkovaná prvky kódovanými v zárodečné DNA; Hořejší et Bartůňková 1998, Juul-Madsen et al. 2008). Buněčná složka vrozené imunity je tvořena fagocytujícími buňkami, jako jsou monocyty, makrofágy, heterofily (u člověka a jiných savců jsou to neutrofilny), eozinofily, bazofily a trombocyty, a přirozeně cytotoxickými buňkami (buňky NK, „přirození zabíječi“ – Natural killers; Hořejší et Bartůňková 1998, Juul-Madsen et al. 2008). Humorální neboli látková složka vrozené imunity je tvořena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sériovými proteiny. Všechny nespecifické složky imunity reagují na přítomnost určitých škodlivin prakticky okamžitě (řádově v minutách) a na rozdíl od specifických složek (adaptivní imunita) nemají tzv. imunologickou paměť, a tudíž jejich reakce není ovlivněna předchozím setkáním s patogenem (Hořejší et Bartůňková 1998, Juul-Madsen et al. 2008). Adaptivní neboli specifická imunita je evolučně mladší a reaguje na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky Ig, antigenně specifické receptory T a B lymfocytů), které se aktivují až po setkání s antigenem (Hořejší et Bartůňková 1998). Buněčnou složku specifické imunity

zprostředkovávají T a B lymfocyty, zatímco látková složka je tvořená protilátkami. B lymfocyty (u ptáků diferenciované ve Fabriciově burze – *Bursa Fabricii*) jsou zodpovědné za produkci protilátek (Ig- imunoglobuliny, specifické proteiny; Ratcliffe 2008), zatímco T lymfocyty s povrchovými T-buněčnými receptory (TCR – T-cell receptor) mají za úkol rozpoznávání antigenů (Viertlboeck et Göbel 2008). Specifická imunita je na rozdíl od vrozené imunity pomalejší (úplný rozvoj reakce během několika dní až týdnů) a je založená na imunologické paměti. Obecně platí, že složky vrozené imunity jsou důležité zejména v nejranějších fázích mikrobiální invaze, kdy omezují další šíření patogenů, dokud adaptivní složky imunity nezahájí čištění (odstraňování) infekce (Juul-Madsen et al. 2008). Oba mechanismy ovšem, jak vrozené tak specifické imunity, jsou životně důležité a navzájem spolu neustále kooperují, proto jejich funkce nelze striktně oddělovat (Hořejší et Bartůňková 1998).

## **1.2 Metody stanovení zdravotního stavu ptáků**

Zdravotní stav živočichů lze obecně odhadovat na základě přímých symptomů určitých typů onemocnění nebo například na základě zhodnocení celkového kondičního stavu zvířete (hmotnost v poměru k velikosti těla, tukové zásoby a jiné). Nejpřesnější používanou metodou je ovšem, stejně jako i u člověka, základní vyšetření krve. Jak ukazují mnohé imunologické studie, odchylky v jednotlivých hematologických parametrech mohou indikovat jak stres, tak vliv určitých patogenů či toxických látek (Davis et al. 2008, Vinkler et al. 2010, Yamato et al. 1996).

### **1.2.1 Měření hladiny stresových hormonů**

Jednou z používaných metod fyziologie ochrany přírody je měření hladiny stresových hormonů (Wikelski et Cooke 2006). Kdy se předpokládá, že určité odchylky v hormonální odezvě přímo souvisí s celkovým zdravotním stavem zvířete (Romero 2004). Zvýšený fyziologický stres může být způsoben zraněním, onemocněním, parazitem, infekcí, či extrémním působením některého (či některých) z faktorů prostředí (klimatické změny, nedostatek potravy, ztráta přirozeného biotopu, znečištění biotopu). Hlavními parametry stresu jsou zejména glukokortikoidní steroidní hormony tvořené kůrou nadledvinek, a to především

kortizol (u ryb a většiny savců) a kortikosteron (u ptáků, plazů, obojživelníků a mnoha hlodavců) v krevní plasmě (Romero 2004).

Studie na volně žijících populacích hýlů mexických (*Carpodacus mexicanus*) např. zjistila, že hladina kortikosteronu v plasmě zvířat souvisela jak s celkovou kondicí zvířat, tak s bakteriálním onemocněním mykoplazmózou (*Mycoplasma gallisepticum*, způsobující chronické respirační onemocnění u ptáků). Jedinci s vyšší bazální koncentrací kortikosteronu v krvi byli v horším kondičním stavu (nižší standardizovaná hmotnost neboli bodymass) a byli spíše nakaženi mykoplazmózou (Lindström et al. 2005). Také Männiste et Hõrak (2011) experimentálně potvrdili vliv fyziologického stresu na individuální kondici zvířat, kdy zvýšení koncentrace glukokortikoidních hormonů v krvi významně inhibovalo růst per u zvonků zelených (*Carduelis chloris*). Jednou z populárních otázek v oblasti stresu je i vliv stresových hormonů hnízdících samic na růst jejich potomstva. Americký experiment Haywarda et Wingfielda (2004) na samicích křepelek polních japonských (*Coturnix coturnix japonica*) dospěl k výsledkům, že množství kortikosteronu v plasmě hnízdících samic pozitivně koreluje s naměřenou koncentrací kortikosteronu obsaženou ve vaječném žloutku snůšky samice. Následně bylo zjištěno, že mláďata samic s uměle zvýšenou hladinou kortikosteronu v krvi rostla pomaleji a vykazovala vyšší aktivitu na hypotalamo-adrenální ose (Hypothalamo-adrenal axis – HPA) v reakci na odchytení a kontrolu později jako dospělci. Na základě těchto výsledků se dá předpokládat, že vysoce stresované nosnice, převodem vlastního kortikosteronu do vaječného žloutku, mohou výrazně ovlivňovat následný vývoj vlastních potomků a částečně i jejich fenotyp v dospělosti. To, že stres ovlivňuje jak chování zvířat, tak jejich imunitní odpověď na různé patogeny potvrzuje také např. Krams et al. (2013).

Nevýhodou aplikace metody měření stresových hormonů je, že hladina kortikosteronu v plasmě stoupá prakticky okamžitě po dané stresové události, což v případě volně žijících živočichů je samotný odchyt, odběr krve, popř. jiná manipulace s nimi (Davis et al. 2008). Během následné interpretace výsledků se tedy potýkáme s problémem, jak „odfiltrovat“ efekt samotného odchyty a získat tak základní (bazální) hladinu stresu daného zvířete ještě před jeho odchytením. Tuto problematiku v praxi podrobně studovali Romero et Reed (2005) u několika volně žijících druhů ptáků a jednoho druhu plazů. Jejich hypotézou bylo, že jsou-li krevní vzorky odebrány do 3 minut po odchytení zvířete, měla by zde být zachycena

bazální hladina kortikosteronu jedince, doposud nezkreslená odchylem jako stresovým stimulem. Výsledky ukázaly, že u většiny testovaných druhů ptáků (vrabce domácího, *Passer domesticus*; strnada severního, *Calcarius lapponicus*; a sněhule severní, *Plectrophenax nivalis*), se tzv. „bod zlomu“, kdy se hladina kortikosteronu v krvi razantně zvyšuje vlivem stresoru (odchyty), objevuje již okolo 2 minut po odchyty jedince. U migrujících jedinců strnadce bělokorunkatého (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) byla tato změna zaznamenána dokonce již po 1.5 minutě. Z tohoto pohledu se tedy tato velice přesná metoda stanovení stresu u obratlovců stává poněkud nepraktickou při její realizaci *in vivo*. Ekologové se proto v posledních letech zabývají užitím i jiných metod jako je vyšetření základních hematologických parametrů, které jsou mimo jiné ovlivňovány i stresovými hormony (Davis et al. 2008, viz dále).

## **1.2.2 Základní hematologické parametry**

### **1.2.2.1 Diferenciální počet leukocytů**

Jedním z velice populárních hematologických parametrů je stanovení diferenciálního počtu leukocytů (leukocytární profil neboli leukogram) z krevních roztěrů, kdy jsou stanovena poměrová zastoupení všech typů leukocytů v krvi (Lucas et Jamroz 1961, Campbell et Ellis 2007). Relativní zastoupení krevních buněk je důležitým ukazatelem „pohody“ u zvířat, jelikož odchylky od normálních počtů daných typů buněk jsou většinou znakem nemoci, infekce či všeobecně stresu. U ptáků se udávají relativní hodnoty zastoupení lymfocytů 50-60%, heterofilů 20-30%, bazofilů 1-10%, eosinofilů 1-10% a monocytů 1-5% z celkového počtu buněk (Davis 2009). Normální poměrové zastoupení ovšem nikdy není dáno s naprostou přesností, jelikož se liší nejen mezi různými druhy (Davis 2009), ale i v rámci jednoho druhu mezi pohlavími, různými věkovými kategoriemi (mláďata/dospělci) a sezónně (Norte et al. 2009).

Souhrnná studie Davise et al. 2008 vysvětluje, jak souvisí leukocytární profily s vyhodnocením stresu u různých druhů obratlovců. Diferenciální počet leukocytů totiž přímo souvisí hladinou glukokortikoidních stresových hormonů v krvi. Konkrétně, čím více glukokortikoidů se vyplavuje, tím vyšší je procento zastoupení neutrofilů (u ptáků a plazů jsou to heterofily), zatímco procentuální zastoupení lymfocytů v krvi se snižuje (tzv. lymfopenie). Z tohoto důvodu se

v praktických studiích jako nejvíce užívaný parametr pro identifikaci stresu (může být ovlivněno i různými onemocněními či infekcemi) zvířat uvádí poměr H:L (počet heterofilů ku lymfocytům) či N:L (počet neutrofilů ku lymfocytům). Tento fenomén je pozorovatelný u všech obratlovců (savci, plazi, ptáci, ryby a obojživelníci). Výhodou této metody je, že krevní obraz (tzv. diferenciál) odráží dlouhodobý stres, a není tedy zásadně ovlivněn odchylem zvířete (Davis et al. 2008). Jak vyplývá z různých experimentálních studií, první „odpověď“ krevních leukocytů na stres se projevuje v časovém rozpětí hodin až dnů (závisí na taxonu; Davis et al. 2008). U ptáků se uvádí, že stres se na poměru H/L v krvi projeví po zhruba 1 až 2 hodinách trvání. Výsledky studie na hýlu mexickém (*Carpodacus mexicanus*; Davis 2005), dokazují, že odchyt a následná manipulace se zvířetem se do jedné hodiny nijak neprojeví na leukocytárním profilu. Další výhodou je, že tato metoda nevyžaduje nijak velké odběry krve u zvířat. Na krevní roztěry jsou dostatečné vzorky o objemu 5-10  $\mu$ L (Davis et al. 2008), zatímco na otestování kortikosteroidních stresových hormonů je potřeba vzorek o objemu 30-60  $\mu$ L krve k získání dostatečného množství plasmy (Washburn et al. 2007, Davis et al. 2008). Různé hematologické parametry jsou tedy dobrým indikátorem fyzické kondice a celkového zdraví zvířat.

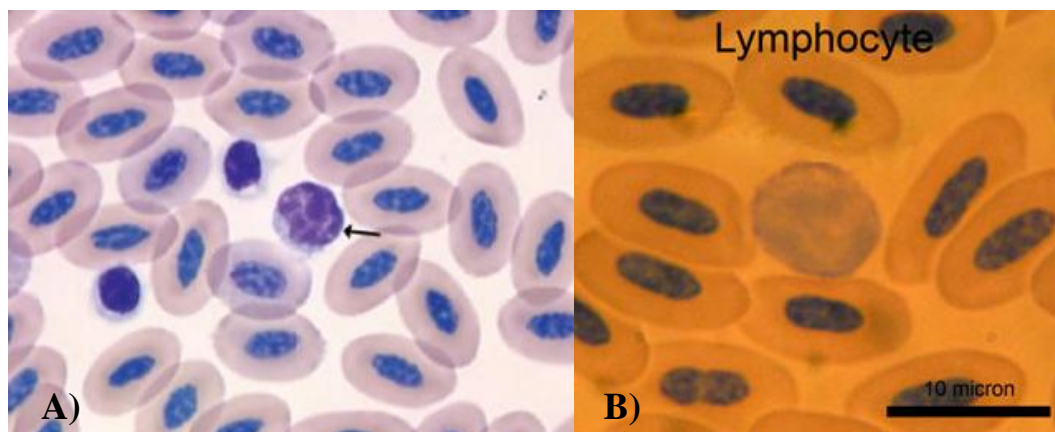
### *Lymfocyty*

Lymfocyty nemají, stejně jako monocyty, ve své cytoplasmě žádná granula (agranulocyty) a jsou, co do poměrového zastoupení leukocytů v krvi ptáků, nejpočetnější (okolo 60%). Jsou to kulaté buňky s velkým (kulatým) centrickým jádrem modré až modro-fialové barvy, které zaujímá okolo 90% celkového prostoru buňky (Lucas et Jamroz 1961, Davis 2009). Důležitým znakem je namodralá cytoplazma, která napomáhá odlišit např. malé lymfocyty od trombocytů (podobné, s průhlednou cytoplazmou se zřetelným „chromováním“; Davis 2009, Poplová 2011; Obr. č. 1).

Jak už bylo zmíněno, u ptáků, stejně jako u člověka, existují dva hlavní typy lymfocytů vznikající v kostní dřeni, a to lymfocyty T, které se dále diferenciují v brzlíku (*thymus*), a lymfocyty B, které se diferenciují ve Fabriciově burze (*bursa Fabricii*; Oláh et Vervelde 2008). Při hematologickém vyšetření krevních roztěrů světelným mikroskopem ovšem není možné tyto dva typy lymfocytů od sebe rozlišit či jakkoli určit jejich funkční specifikaci (Campbell et Ellis 2007, Poplová 2012).



Počet lymfocytů v krvi je mimo jiné ovlivňován i stresovými hormony (viz předešlá kapitola). Zvýšený počet lymfocytů v krvi se nazývá lymfocytóza, naopak snížená hladina lymfocytů pak lymfopenie. Schopností rozpoznávat patogeny a imunologickou paměť T lymfocytů u kuřat se zabývali např. Singh et al. (2010) v souvislosti s virem ptačí chřipky. Ptačí chřipka je velice sledovaným tématem onemocnění ptáků (ojediněle přenosná i na člověka) především vzhledem k vzniku různých nových patogenních forem. Tato studie se zabývala odpovědí T lymfocytů *ex vivo* na testované patogenní formy H5N9 a H7N2 AIV (Avian influenza virus). Výsledky ukázaly, že T-lymfocyty jsou schopné rozpoznat a reagovat na širší spektrum virů ptačí chřipky.



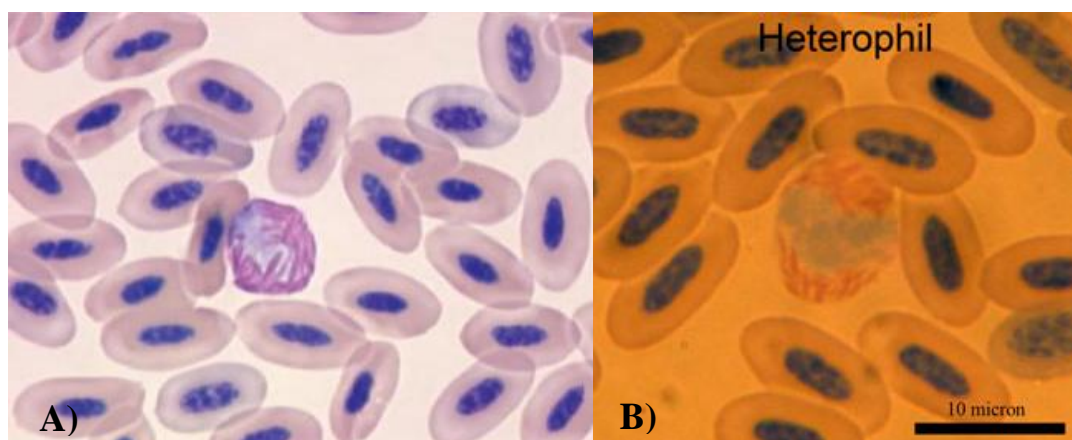
**Obr. č. 1:** **A)** Lymfocyt (označen šipkou), okolo erytrocyty a 2 trombocyty (obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007). **B)** Lymfocyt mezi erytrocyty (Wright Giemsa barvivo; Davis 2009).

### *Heterofily*

Heterofily jsou specifickým typem leukocytů (granulocytů) u ptáků (a plazů), které jsou funkční obdobou savčích neutrofilů (Davis 2009). Jsou zpravidla druhé nejpočetnější v krvi (po lymfocytech). Jejich charakteristickým znakem jsou cytoplazmatická granula vřetenovitého tvaru (vzácně mohou být viditelná pouze centrální kulatá granula; Lucas et Jamroz 1961), která po obarvení Wright-Giemsa barvivem (viz metodika, kapitola 4.2) získávají cihlově červenou barvu. Cytoplazma je bezbarvá nebo lehce narůžovělá. Jádro je členité (zpravidla 2 až 3 laloky) nebo úplně rozdělené, zbarvené do modro-fialova až fialova. Díky specifické barvě a tvaru

mnohočetných cytoplazmatických granul tento typ leukocytů patří k jednomu z nejlépe rozpoznatelných (Lucas et Jamroz 1961, Davis 2009; Obr. č. 2).

Heterofily mají významnou protizánětlivou funkci. Jsou vysoce fagocytujícími buňkami a mají široké spektrum antimikrobiální aktivity (Juul-Madsen et al. 2008). Heterofily údajně tvoří „první obrannou linii“ buněčné vrozené imunity ptáků proti mikrobiálním patogenům plic a vzdušných vaků, kde makrofágy chybí (Harmon 1998). Počet heterofilů (H/L poměr) v krvi ptáků vypovídá o dlouhodobém stresu různého původu (onemocnění, potrava, prostředí). Jak ukazuje studie Müller et al. 2011 na mláďatech poštolky obecné (*Falco tinunculus*) zvýšený H/L poměr byl zjištěn u mláďat, která se vylíhla později (snížená konkurenceschopnost), poté v případě, kdy měla nízkou zásobu tělesného tuku, byla napadena ektoparazity a se zásadními změnami environmentálních podmínek (deštivé období – nedostatek potravy, a při změnách sezóny – změny ročního podnebí; stejné výsledky např. i Banbura et al. 2013). Stresovou teorii potvrdil i Krams et al. (2013) u volně žijících sýkor koňader (*Parus major*), které byly odchyceny a drženy v zajetí. Následně byla pozorována souvislost mezi H/L poměrem v krvi, jejich chováním a imunitní odpovědí na nový antigen bakterie *Brucella abortus*. Jedinci, u kterých byly zjištěny nejvyšší H/L poměry měli nejvíce poničená ocasní pera po týdnu stráveném v zajetí a zároveň produkovali nejméně protilátek na specifický antigen. Obecně se dá předpokládat, že ptáci v městském prostředí (chronický stres) mají vyšší hodnoty H/L než ptáci ve venkovských oblastech (Ruiz et al. 2002).

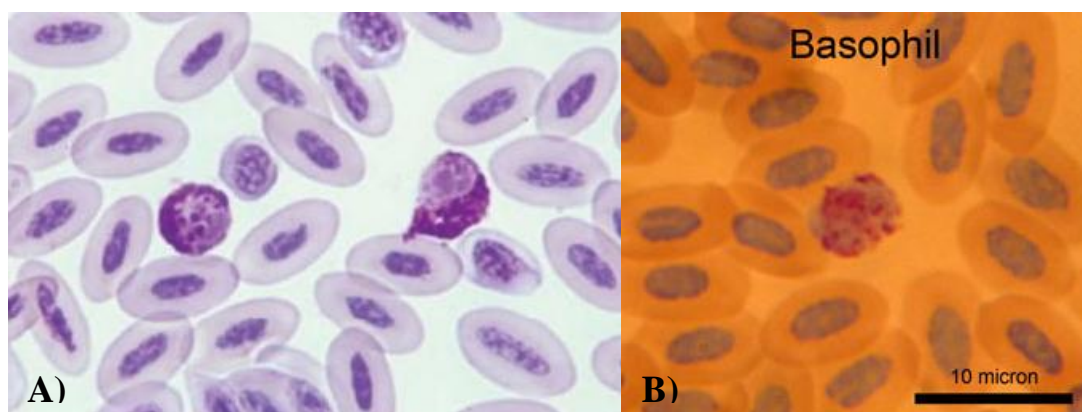


**Obr. č. 2:** **A)** Heterofil mezi erythrocyty. (obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007). **B)** Heterofil mezi erythrocyty (Wright Giemsa barvivo; Davis 2009).

### *Bazofily*

Dalším typem leukocytů (granulocytů), které jsou součástí buněčné vrozené imunity ptáků, jsou bazofily. Jejich charakteristickým znakem jsou početná a (po obarvení) výrazně fialová bazofilní granula (malá, kulatá). Cytoplazma je prakticky bezbarvá. Jádro je světle růžové až světle modré, zpravidla bývá centrické nelaločnaté, někdy může mít dva laloky (Lucas et Jamroz 1961, Davis 2009). Díky specifickému výraznému zbarvení granul je tento typ leukocytů opět velmi snadno rozpoznatelný (Obr. č. 3).

Bazofily pravděpodobně hrají důležitou roli při raných stádiích zánětů a při akutních hypersenzitivních reakcích (reakce přecitlivělosti). Jsou klíčovými účastníky kožní bazofilní hypersenzitivity a pasivní kožní a systémové anafylaxe (spouští produkci histaminu při alergických reakcích; Maxwell et Robertson 1995, Karasuyama et al. 2009). Jak souvisí bazofily s různými parazitickými onemocněními a se stresovou odpovědí u ptáků je stále zkoumáno a diskutováno (Falcone et al. 2001, Vinkler et al. 2010). Poměrové zastoupení bazofilů v krvi ptáků se mezi různými druhy liší (viz Davis 2009). Přestože jejich fyziologická funkce ještě není celkově objasněna, u některých druhů pěvců, jsou i u zdravých jedinců zastoupeny vysoké počty bazofilů v periferní krvi (15% a více; Davis 2009, Vinkler et al. 2010). Výsledky studie na hýlech rudých (*Carpodacus erythrinus*) ukazuje, že poměr bazofilů v krvi je kondičně závislý a je zvyšován působením krevních parazitů (*Haemoproteus*, *Leukocytozoon*; Vinkler et al. 2010).

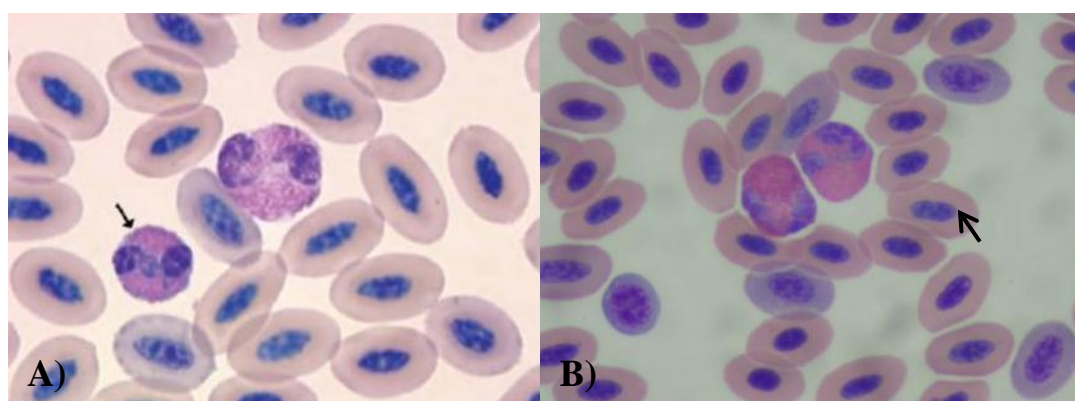


**Obr. č. 3:** **A)** Bazofily (2) mezi erythrocyty (obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007). **B)** Bazofil mezi erythrocyty (Wright Giemsa barvivo; Davis 2009).

### *Eosinofily*

Dalšími, již spíše minoritně zastoupenými, fagocytujícími leukocyty jsou eosinofily (granulocyty). Eosinofily mají (po obarvení) tmavě modré až modro-fialové laločnaté jádro (zpravidla 2 laloky do tvaru U, ale může být i rozděleno na 2 části), lehce namodralou cytoplazmu s mnoha kulatými narůžovělými, žluto-oranžovými, či někdy i bezbarvými granuly (Lucas et Jamroz 1961, Davis 2009). U některých druhů ptáků jsou tyto granula velmi špatně viditelná, proto rozeznání tohoto typu leukocytů v krevních nátěrech může být poměrně složité (Davis 2009; Obr. č. 4).

Zvýšené počty eosinofilů v krvi (tzv. eosinofilie) se u lidí často objevují ve spojení s alergickými reakcemi či parazitárními onemocněními. Eosinofily jsou (spolu s dalšími buňkami imunity) iniciátory alergické a zánětlivé reakce (zejména astmatu), kdy se začnou uvolňovat různé cytotoxické proteiny, volné kyslíkové radikály a cytokiny (Lim 1995). O tom, jak přesně tyto buňky vrozené imunity fungují u ptáků, se zatím ví velmi málo. Nicméně se předpokládá, že, stejně jako u lidí, odchylky poměrového zastoupení těchto leukocytů mohou indikovat určité formy onemocnění a zánětů u zvířete (Campbell et Ellis 2007, Vinkler et al. 2010).

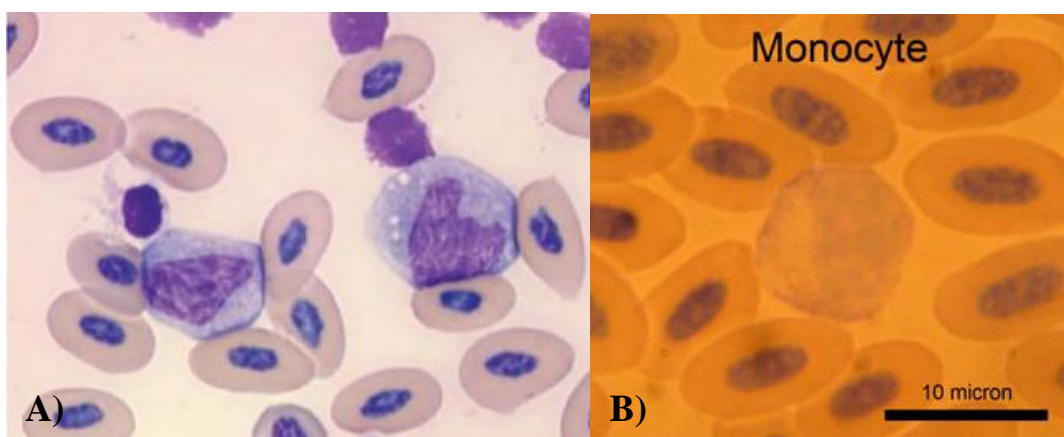


**Obr. č. 4:** **A)** Eosinofil (označen šipkou), okolo erythrocyty a velký heterofil (obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007). **B)** Eosinofil (označen šipkou), vlevo heterofil a okolo erythrocyty (Wright Giemsa barvivo, 100x zvětšení; URL 1).

## Monocyty

Monocyty jsou největšími bílými krvinkami a jsou snadno zaměnitelné s velkými lymfocyty (agranulocyty, vzhledově podobné). Mají světle modré až modro-fialové jádro (často s viditelnou „chromovanou“ strukturou) ledvinovitého tvaru či kulatého se zřetelným zaškrcením a modrošedou cytoplazmu. Hlavním rozdílným znakem monocytů od lymfocytů je velikost jádra v poměru k celkové velikosti buňky. U monocytů, jádro zabírá zhruba polovinou až tři čtvrtiny celkové velikosti buňky (Lucas et Jamroz 1961, Davis 2009, Obr. č. 5).

Monocyty se po odchodu z krevního řečiště mění v cílových tkáních v makrofágy. Mimo nezbytnou úlohu v přestavbě tkání a obraně proti různým patogenům, jsou monocyty a makrofágy zapojené i do vývoje některých patologických procesů, jako např. aterosklerózy, rakoviny či autoimunitního onemocnění (Nares et Wahl 2005).



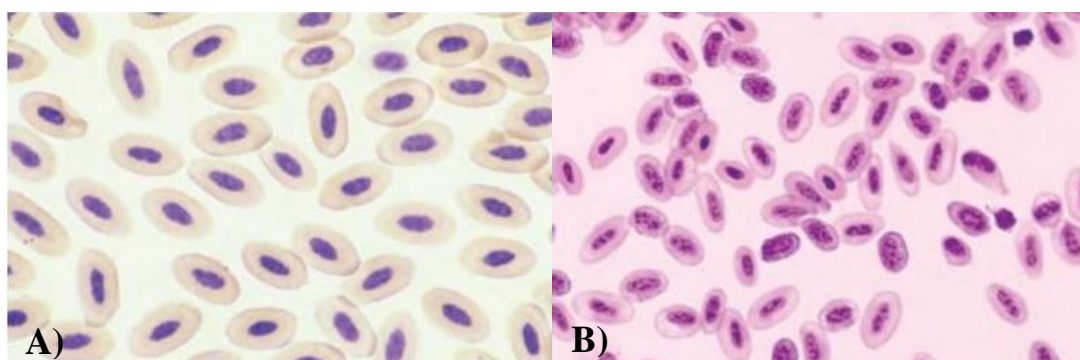
**Obr. č. 5:** **A)** Monocyty (2), okolo erytrocyty a trombocyt (obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007). **B)** Monocyt, okolo erytrocyty (Wright Giemsa barvivo; Davis 2009)

### 1.2.2.2 Diferenciální počet erytrocytů

Erytrocyty neboli červené krvinky jsou nejpočetnějšími buňkami v krvi obratlovců a mají nezaměnitelný význam z hlediska přenosu dýchacích plynů (díky hemoglobinu vázajícímu kyslík a oxid uhličitý; Glomski et Tamburlin 1989). Ptáci, stejně jako většina obratlovců (s výjimkou savců), mají jaderné erytrocyty. Jsou to středně velké oválné buňky, které (po obarvení) mají zřetelně růžovou cytoplazmu a

centrické oválné tmavě fialové jádro (Lucas et Jamroz 1961). Mladší stadia erytrocytů (nezralá neboli imaturní) jsou pak rozeznatelné zejména podle výrazně chromatizovaného jádra a celkově lehce odlišným odstínem zbarvení (Lucas et Jamroz 1961, Poplová 2011; Vinkler, I. 2014, *in verb*, Obr. č. 6).

Diferenciální počet erytrocytů slouží především ke kvantifikaci imaturních (nezralých) červených krvinek. Pochopitelně, vysoké zastoupení nezralých krevních buněk (jak erytrocytů, tak i leukocytů) se přirozeně vyskytuje u mláďat (stadium vývoje). Přesto je tento parametr důležitým ukazatelem zdraví i u dospělých zvířat. Jak je známo, vysoké počty imaturních erytrocytů v periferní krvi dospělců mohou být náznakem anemického onemocnění (Campbell et Ellis 2007), kdy dochází k hemolýze (rozpadu) červených krvinek a tak je organismus pro své přežití neustále nucen vytvářet nové k obnovení homeostázy. Může to být způsobeno jak zraněním zvířete, a následnou velkou ztrátou krve (Hauptmanová et al. 2002), nebo působením různých krevních a krev-sajících parazitů (Vinkler et al. 2010, Poplová 2011), tak také vlivem působení nějakých toxických látek (Yamato et al. 1996, Belski et al. 2005).



**Obr. č. 6:** **A)** Normální erytrocyty (dospělá stadia). **B)** Převážně imaturní erytrocyty (nedospělá stadia, obarveno Wright Giemsa barvivem, zvětšení 1000x; Campbell et Ellis 2007).

### **1.2.2.3 Absolutní počet erytrocytů a leukocytů**

Absolutní počty erytrocytů a leukocytů slouží k obecnému přehledu o složení krve vzhledem k určité objemové jednotce krve. Počty těchto buněk lze zjistit přístrojově (užíváno zejména u savců – bezjaderné erytrocyty) nebo manuálně pomocí počítacích komůrek (hematocymetry, Bürkerovy počítací komůrky), kde je možné pod světelným mikroskopem spočítat, z obarveného roztoku krve (Natt-

Harrickův roztok), počet daných buněk (erytrocytů a leukocytů) v přesně stanoveném objemu (Campbell et Ellis 2007, Poplová 2011). Absolutní počet erytrocytů bývá často doplňkovým vyšetřením při stanovování hladiny hematokritu a koncentrace hemoglobinu v krvi, kdy snížené celkové počty erytrocytů indikují anémii (způsobená krevní ztrátou, infekčním onemocněním, či vlivem toxických látek). Absolutní počet leukocytů je obecným ukazatelem zdraví obratlovců. Zvýšený počet leukocytů v periferní krvi (leukocytóza) indikuje určité onemocnění či zánět u zvířat (Ots et al. 1998). Při akutních či chronických infekcích totiž dochází k celkovému nárůstu zánětlivých leukocytů (heterofily, bazofily, eosinofily a monocyty; Erf 2008).

#### **1.2.2.4 Hematokrit**

Hematokrit jak je známo, je procentuálně vyjádřený objem červených krvinek (erytrocytů) v jednotce krve a patří mezi nejzákladnější hematologické vyšetření (krevní obraz) u obratlovců. Nízké hladiny hematokritu (jinak také zvaný PVC – packed cell volume, celkové množství krevních buněk) signalizuje anémii, která, jak bylo v předchozí kapitole již zmíněno, může vznikat různými způsoby (bakteriální infekce, přítomnost krevních či krev sajících parazitů). Samotná erythropoéza (vznik červených krvinek) je ovlivněna mnoha faktory, mimo jiné jsou to např. pohlavní hormony, věk a stres (viz Poplová 2011). Jak se ale ukazuje, použití objemu hematokritu jako indikátoru zdravotního stavu, může být i zavádějící. Jelikož objem hematokritu není závislý pouze na počtu červených krvinek, ale i na jejich velikosti. Problém vzniká ve chvíli, kdy se po ztrátě většího množství krve (následkem zranění či vlivem některých parazitů) vyplaví do oběhu značné množství imaturních erytrocytů, které zpravidla mohou být i objemnější než dospělá stadia erytrocytů (Campbell et Ellis 2007). Díky tomu se objem hematokritu po zranění či vlivem některých parazitů a jiných stresorů nemusí změnit nebo se může dokonce zvýšit (Ots et Hōrak 1998, Ewenson et al. 2001, Carleton 2008). Mimo jiné objem hematokritu je velmi variabilní i v rámci různých období, může být ovlivňován teplotou okolí či intenzitou fyzické aktivity ptáků (Dawson et Bortolotti 1997). Zdá se tedy, že hematokrit může sloužit jako základní parametr krve (index určité homeostáze), ale pro další vyšetřování zdravotního stavu je vhodné tento parametr

doplnit o další hematologické znaky, jako je diferenciální počet erytrocytů a leukocytů.

### **1.2.3 Antibakteriální aktivita komplementového systému**

Komplementový systém je hlavní složkou vrozené látkové imunity, který je důležitý nejen v obraně proti invazi patogenních mikroorganismů, ale současně posiluje i adaptivní imunitní odpověď (T a B lymfocyty; Carroll 2004). Komplementem je označována soustava zhruba 35 sérových a membránových proteinů, které jsou přítomny v celé řadě hostitelských buněk (Hořejší et Bartůňková 1998, Juul-Madsen et al. 2008). Na základě různých podnětů (rozeznání nějakého molekulárního komponentu mikroorganismu - bakterie) se tyto proteiny kaskádovitě aktivují, až dochází k úplnému zabití patogenu (perforací membrány mikroorganismu a následnou lyzí buňky, opsonizací – podpořením fagocytózy patogenu imunitními buňkami, či vyvoláním zánětu a spuštěním adaptivních složek imunity; Carroll 2004, Juul-Madsen et al. 2008). Klíčovým komponentem systému je tzv. C3, jehož fragment (C3b) se pevně váže na mikrobiální povrch, a jehož aktivace (proteolytickým štěpením) iniciuje většinu biologických funkcí celého komplementového systému (Hořejší et Bartůňková 1998, Juul-Madsen et al. 2008). Aktivace komplementu u savců může probíhat třemi způsoby (cestami) alternativní, klasickou a lektinovou. Předpokládá se, že u ptáků je tomu podobně, přestože přímé důkazy existence klasické cesty aktivace komplementu prozatím nebyly zjištěny (Vinkler, nepublikováno).

Rychlost komplementové reakce (aktivita komplementu) od začátku až po usmrcení bakterie může být zjišťována metodou tzv. luminometrického měření antibakteriální aktivity krevní plazmy (Nikoskelainen et al. 2002, Buchtíková et al. 2011). Při této metodě je využívána geneticky modifikovaná forma bioluminiscenčních bakterií (viz metodika, kapitola 4.2). Existuje několik prací zabývajících se měřením aktivity komplementu u ryb, kde bylo pozorováno, že aktivita může být ovlivněna např. teplotou vody (sezónní změny; Hernández et Tort 2003, Nikoskelainen et al. 2004) nebo steroidními hormony (Buchtíková et al. 2011). Prozatím není k dispozici příliš studií zabývajících se vlivem různých faktorů



prostředí (např. toxicity) na komplementární aktivitu u volně žijících živočichů (ani konkrétně u ptáků).

## 2 Cíle a předpoklady

Cílem této práce je především zjistit zda znečištění ovzduší  $PM_{10}$  částicemi ovlivňuje zdravotní stav a individuální kondici samců sýkory koňadry (*Parus major*). Naším předpokladem je, že v oblastech s větším emisním zatížením prachovými částicemi (Bohumín, Ostrava, Stehelčevy, Karviná) mohou být zvířata v horším kondičním a zdravotním stavu (menší zvířata, vyšší hladina stresu, vyšší pravděpodobnost anémie, atd.). Dále nás zajímá kondiční a zdravotní závislost ornamentů peří (intenzita žlutého břišního zbarvení a velikost plochy melaninového břišního pruhu). Zde předpokládáme, že samci z více znečištěných oblastí, tedy v horším kondičním a zdravotním stavu, by měli vykazovat nižší kvalitu ornamentů (méně výrazné žluté zbarvení a menší plochu melaninového pruhu).

## 3 Metodika

### 3.1 Studovaná oblast a materiály

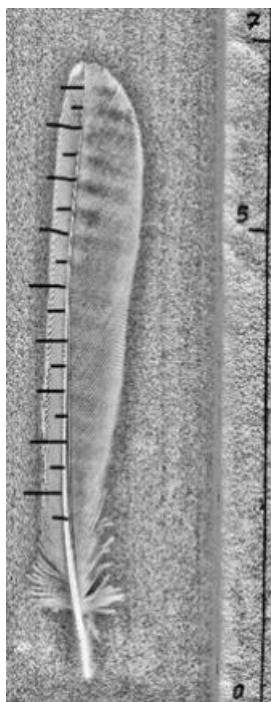
K této práci mi byla poskytnuta data získaná v rámci grantového projektu GAČR 505/10/1871 (řešitel J. Bryja, zpracovatel M. Vinkler). Terénní práce probíhala na přelomu dubna a května roku 2010 na 13 lokalitách v ČR (Obr. č. 7) s různou hladinou znečištění PM<sub>10</sub> prachovými částicemi (Příloha č. 1). Data o úrovni znečištění v daných lokalitách za dané období (průměr ročních koncentrací za období 2008, 2009 a část roku 2010) byla získána z tabelárních ročenek uveřejněných na ČHMÚ (2013). Vzhledem ke krátkému rozptylu PM<sub>10</sub> částic (Janssens et al. 2001, Geens et al. 2009) byla zvířata vždy odchyťována v blízkém okolí měřicí stanice ČHMÚ (max. do 800m), aby nedošlo ke zkreslení podaných informací. Bylo odchyceno celkem 57 dospělých (1 až 2 letých) samců sýkory koňadry (Příloha č. 1) a získány základní data o zvířatech. Byly zjištěny tělesné parametry samců, jako je délka levého tarsu (měřeno s přesností na 0.01 mm) a váha (s přesností na 0.5 g), a byla ohodnocena tučnost (v bodové škále 0-4, dle Pettersson et Hasselquist 1985). Dále byly pořízeny digitální snímky břišní strany samců a odebrány vzorky krve (50-100μL) a peří (karotenoidního i melaninového, rýdovák druhý zleva) pro další analýzy. Některá data byla již zanalyzována v minulých letech. Část odebraného vzorku krve každého zvířete byla prakticky ihned (do 24 hodin po odběru) zpracována k vyšetření absolutního počtu leukocytů a erytrocytů (provedl M. Vinkler), z části krve (kapky) byly provedeny roztěry (2 u každého zvířete) na laboratorní sklo, zbytek krve byl použit na získání krevní plazmy (poté zamražena a uchovávána v -80°C) a zjištění objemu hematokritu v krvi. Vzorky peří byly zanalyzovány již v rámci bakalářské práce, kdy byla změřena exprese karotenoidních a melaninových ornamentů (viz Bauerová 2012, BP). Tyto výsledky budou dále použity, tedy konkrétně naměřená intenzita žlutého zbarvení peří (saturace; označovaná jako *Ychroma* – Yellow chroma) a plocha černého břišního pruhu samců (v mm<sup>2</sup>). Nově byly vyšetřovány další hematologické parametry z poskytnutých krevních roztěrů k získání informací o celkovém zdravotním stavu samců. Dále byla provedena ptilochronologie vzorků rýdovacích per ke stanovení individuálního poměru přírůstu per samců jakožto dalšího kondičního znaku. U části jedinců (24 samců) byla testována také bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě (provedli P. Hyršl a L. Vojtek).



**Obr. č. 7:** Mapa odchyťových lokalit. Zeleně: méně znečištěné lokality, červeně: více znečištěné lokality PM10 částicemi (koncentrace v Příloze č. 1; mapa M. Vinkler).

### 3.2 Ptilochronologie rýdovacích per

K získání dalšího indikátoru nutriční kondice byla provedena ptilochronologie vzorků rýdovacích per samců (dle Grubb 2006). Rýdovací pero každého samce bylo naskenováno pomocí scanneru Epson Perfection V37 (Seiko Epson Corporation, Japan). Získané digitální snímky byly upraveny barevným filtrem v programu Corel Photo-Paint X3 (Corel, Ottawa, Canada) pro lepší zřetelnost růstových pruhů (funkce Local Equalization). Samotná analýza růstových proužků byla následně prováděna v grafickém programu ImageTool 3.00 (IT Development Team 2002; Obr. č. 8). Byla změřena celková délka pera (v mm). Pro standardizaci měření poměru přírůstu per u všech jedinců byla dále měřena vždy délka 10 růstových proužků se středovým bodem ve 2/3 celkové délky pera (5 pruhů směrem nahoru od 2/3, 5 směrem dolů). Následně byla vypočítána průměrná šířka jednoho růstového pruhu u každého samce (délka 10ti růst. pruhů v mm/počet pruhů; Grubb 2006).



**Obr. č. 8:** Ptilochronologie rýdovacího pera. Měření průměrné šířky jednoho růstového proužku pera z digitálních snímků (P. Bauerová).

### **3.3 Analýza zdravotního stavu**

#### **3.3.1 Hematologické vyšetření**

Individuální zdravotní stav samců byl určen klasickou metodou stanovení vybraných hematologických parametrů, a to absolutního počtu leukocytů a erytrocytů, objemu hematokritu, a diferenciálního počtu leukocytů (zastoupení jednotlivých typů leukocytů). V rámci této diplomové práce byl analyzován diferenciální počet leukocytů neboli leukocytární profil. Z poskytnutých vysušených krevních nátěrů obarvených modifikovaným Wright-Giemsa barvivem (číslo produktu WG128; Sigma-Aldrich, St.Luis, MO, USA) bylo pomocí světelného mikroskopu Olympus CX-31 (Olympus, Tokyo, Japan) vyšetřováno zastoupení jednotlivých typů leukocytů (lymfocyty, bazofily, heterofily, eosinofily a monocyty) v předem stanoveném počtu 110-140 leukocytů pod imerzním objektivem se 100x zvětšením (Vinkler et al. 2010). Přesnost manuální identifikace jednotlivých typů krevních buněk byla kontrolována podle Lucas et Jamroz (1961). Dále pak byla spočítána opakovatelnost měření (repeatabilita; Lessells et Boag 1987) diferenciálního počtu leukocytů na 20 jedincích (lymfocyty  $r=0.91$ , heterofily  $r=0.89$ ,

bazofily  $r=0.70$ , eozinofily  $r=0.82$  a monocyty  $r=0.78$ ). Ke standardizaci měření u všech jedinců byly počty jednotlivých typů leukocytů převedeny na procentuální frekvenci zastoupení ( $n$  daného typu leukocytů /  $n$  celkového počtu leukocytů  $\times 100$ ; Vinkler et al. 2010). Z leukocytárního profilu byly dále použity hlavně dva parametry, a to procentuální zastoupení bazofilů a poměrové zastoupení H/L (počet heterofilů/počet lymfocytů; Davis et al. 2008, Vinkler et al. 2010).

V budoucnu budou dále z krevních nátěrů, pomocí světelného mikroskopu a digitální kamery, zjišťovány počty imaturních (nezralých) erytrocytů z digitálních snímků 5 náhodně vybraných míst roztěru u každého jedince.

### 3.3.2 Bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě

Z poskytnutých vzorků plazmy (uchovávané při  $-80^{\circ}\text{C}$ ) byla u 24 jedinců měřena bakteriolytická aktivita komplementu (provedli P. Hyršl a L. Vojtek). Byla použita metoda luminometrického měření viability bioluminiscenční *Escherichia coli* (genetická modifikace *E. coli* K12pGFPluxBAmp; Atosuo et Lilius 2009). Koncentrovaný roztok bakterií (385 tis. bakterií/100  $\mu\text{L}$ ; uchováváno při  $-80^{\circ}\text{C}$ ) byl namíchán s krevní plazmou v poměru 25  $\mu\text{L}$  a 25  $\mu\text{L}$ . Kinetika reakce byla kontinuálně měřena po dobu necelých 3 hodin při laboratorní teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  v luminometru Plate Chameleon<sup>TM</sup> V (Hidex, Turku, Finland), kdy intenzita emitovaného světla odpovídala viabilitě bakterií v čase. Následně byla odečtena doba potřebná pro usmrcení 50% bakterií (Buchčíková et al. 2011). Kratší čas zde tedy znamenal vyšší aktivitu komplementu v plazmě (aktivita komplementu vyjádřena jako  $1/\text{čas}$   $\frac{1}{2}$  inhibice). Zbylých 33 jedinců nebylo testováno z důvodu nedostatečného objemu plazmy (méně jak 25  $\mu\text{L}$ ). Nutno poznamenat, že, i po této náhodné eliminaci několika desítek jedinců, zbylých 24 vzorků pocházelo celkem z 10ti lokalit (z 13 původních) a byly zde zastoupeny jak lokality nejméně znečištěné PM10 částicemi, tak ty nejvíce znečištěné (Příloha č. 2).

## 3.4 Statistické vyhodnocení

Veškerá statistika byla prováděna v programu R 2.15.0 (R development core team 2012). Nejprve bylo otestováno normální rozdělení dat pomocí Shapiro-Wilkova testu normality. Byly zjištěny možné korelace mezi jednotlivými kondičními a jednotlivými hematologickými znaky pomocí Pearsonova korelačního

koeficientu. Vliv znečištění prostředí na individuální kondici a zdravotní stav byl testován pomocí zobecněných lineárních mixovaných modelů (GLMM). V případě testování kondice, závislou proměnnou byly délka tarsu a standardizovaná hmotnost s normálním rozdělením. Vysvětlující proměnnou bylo znečištění. Lokalita odchyty byla zahrnuta jako náhodný efekt. U testování zdravotního stavu samců, závislou proměnnou byly vybrané hematologické parametry, tedy absolutní počet leukocytů s poissonovým rozdělením, poměrové zastoupení H/L s binomickým rozdělením a počet bazofilů s normálním rozdělením (transformace logaritmem; Vinkler et al. 2010). Vysvětlujícími proměnnými byla koncentrace znečištění a vybrané kondiční znaky samců (délka tarsu a standardizovaná hmotnost), včetně dvojných interakcí. Lokalita odchyty byla zahrnuta jako náhodný efekt. Zvláště byla u zdravotního stavu testována bakteriolytická aktivita komplementu plazmy na 23 jedincích, kde závislou proměnnou byl čas dosažení inhibice  $\frac{1}{2}$  bakterií (převeden na normální rozdělení Box-Coxovou transformací). Vysvětlující proměnné byly stejné jako u testování předchozích hematologických znaků. Kondiční závislost ornamentů byla testována opět pomocí GLMM. Závislou proměnnou zde byla intenzita žlutého zbarvení (*Ychroma*) a plocha melaninového pruhu s normálním rozdělením (plocha pruhu transformována logaritmem). Vysvětlujícími proměnnými byla délka tarsu, standardizovaná hmotnost a znečištění. Lokalita odchyty byla opět zahrnuta jako náhodný efekt. Minimální adekvátní modely (MAMs) byly získány zpětným vylučováním nesignifikantních proměnných z plného modelu analýzou rozptylu (ANOVA test). Hladina významnosti byla stanovena na  $p=0.05$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 Popisná statistika a korelace jednotlivých proměnných

Výsledky měření ptilochronologie ukázaly, že průměrná šířka růstového pruhu rýdovacích per dobře korelovala s jejich celkovou délkou ( $n=57$ ,  $r=0.32$ ,  $p=0.01$ ). Dále byla zjištěna slabě nesignifikantní korelace mezi šířkou růstového proužku a délkou tarsu ( $n=57$ ,  $r=0.24$ ,  $p=0.069$ ; Příloha č. 3). Vzhledem tomu, že tyto dva kondiční parametry udávají přibližně stejnou informaci, pro další analýzy (viz dále) byl použit pouze jeden z nich, a to délka tarsu. Co se týče dalších kondičních znaků, byla zjištěna výrazná pozitivní korelace mezi tučností samců a

jejich standardizovanou hmotností (Tab. č. 1), a proto stejně jako v předchozím případě byla dále použita pouze standardizovaná hmotnost. Výsledky diferenciálního počtu leukocytů odhalily značnou variabilitu mezi samci v zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi (Tab. č. 2). Celkově, jednotlivé parametry krve sloužící pro definici zdravotního stavu samců, tedy absolutní počet leukocytů, H/L poměr a počet bazofilů spolu nijak nekorelovaly (Tab. č. 3). Nejvyšší variabilita mezi samci byla zaznamenána v hematologických parametrech krve a v tučnosti (Tab. č. 4). Co se týče bakteriolytické aktivity komplementu v plazmě variabilita mezi samci, co do délky času kdy byla zahubena ½ bakterií v plasmě, nebyla vysoká (n=24,  $t_{max}$ =130 min.,  $t_{min}$ =47 min., CV=38.15 %). Intenzita žlutého zbarvení peří a velikost černého břišního pruhu samců spolu nijak nekorelovala (n=57, r=0.04, p=0.8).

**Tab. č. 1:** Korelační matice jednotlivých kondičních znaků, n=57, zvýrazněné korelace jsou významné na hladině  $p < 0.05$ :

Proměnná	Délka tarsu	Standard. hmotnost	Tučnost
Standardizovaná hmotnost	0.02		
Tučnost	-0.09	<b>0.34</b>	
Šířka růstového proužku	0.24	0.06	-0.08

**Tab. č. 2:** Popisná statistika - diferenciální počet leukocytů u samců sýkory koňadry, n=57:

Proměnná	průměr	min	max	SE	CV (%)
Lymfocyty (%)	57.37	29.31	87.07	1.92	25.43
Bazofily (%)	11.98	1.56	33.81	0.99	<b>62.75</b>
Heterofily (%)	22.67	3.05	58.05	1.59	<b>53.37</b>
Eosinofily (%)	3.59	0.00	16.55	0.39	<b>82.67</b>
Monocyty (%)	3.86	0.00	9.38	0.29	<b>57.72</b>

**Tab. č. 3:** Korelační matice jednotlivých hematologických parametrů, n=57:

Proměnná	Heterofily/Lymfocytům	Bazofily	Hematokrit
Bazofily	0.08		
Hematokrit	0.08	0.09	
Absolutní počet leukocytů	-0.11	-0.22	0.01



**Tab. č. 4:** Popisná statistika - variabilita všech proměnných použitých pro statistické analýzy u samců sýkory koňadry, n=57:

Proměnná	průměr	min	max	SE	CV (%)
Délka tarsu (mm)	22.80	21.19	24.18	0.075	2.47
Standardizovaná hmotnost	0.79	0.72	0.87	0.004	4.24
<b>Tučnost</b>	1.70	0.00	4.00	0.150	<b>66.59</b>
Šířka růst. proužku (mm)	3.06	2.74	3.36	0.017	4.15
<b>Abs. počet leukocytů (<math>10^9 \cdot l^{-1}</math>)</b>	5.26	1.00	12.00	0.386	<b>55.34</b>
<b>H/L</b>	0.48	0.04	1.98	0.051	<b>79.80</b>
<b>Basofily (%)</b>	11.77	1.56	33.81	0.982	<b>62.98</b>
Znečištění ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	39.34	27.22	64.83	1.523	29.23
Plocha melan.pruhu ( $\text{mm}^2$ )	612.98	425.08	900.20	10.17	12.52
Ychroma	0.56	0.42	0.66	0.007	9.06

## 4.2 Vliv znečištění na kondici a zdravotní stav samců

Vliv znečištění ovzduší  $\text{PM}_{10}$  částicemi se nijak signifikantně neprojevil ani u standardizované hmotnosti ani u délky tarsu (Tabulka č. 5, Tabulka č. 6). Výsledky testování zdravotního stavu samců ukázaly, že ve většině případů vybrané hematologické parametry souvisely se základními kondičními znaky. Zatímco souvislost znečištění prostředí se zdravotním stavem se ve většině případů signifikantně projevila pouze v interakci s kondičními parametry. Absolutní počet leukocytů byl vysvětlen jak standardizovanou hmotností samců, tak interakcí standardizované hmotnosti a znečištění ovzduší  $\text{PM}_{10}$  částicemi (Tab. č. 6). Jedinci s větší standardizovanou hmotností disponovali vyšším celkovým počtem leukocytů v krvi (Obr. č. 9). Vliv samotného znečištění zde nebyl nijak výrazně patrný (Příloha č. 5). Co se týče poměrového zastoupení H/L v krvi, byla zjištěna souvislost s poměrovou hmotností samců (Tab. č. 7). Kdy u jedinců s nižší poměrovou hmotností byly naměřeny vyšší hladiny H/L než u těch „větších“ (Obr. č. 10). Souvislost koncentrace znečištění  $\text{PM}_{10}$  částicemi s poměrem H/L v krvi nebyla prokázána (Příloha č. 6). Počet bazofilů v krvi slabě nesignifikantně souvisel s délkou tarsu samců, na hranici významnosti se zde projevila i interakce délky tarsu a znečištění  $\text{PM}_{10}$  částicemi (Tab. č. 8). Samci s delším tarsem („větší“ samci) měli vyšší procentuální zastoupení bazofilů v krvi (Obr. č. 11). Co se týče přímé

souvislosti počtu bazofilů s koncentrací znečištění ovzduší nebyl, stejně jako u H/L indexu, patrný žádný trend (Příloha č. 7). Bakteriolytická aktivita komplementu plazmy nesouvisela ani se znečištěním ovzduší ani se základními kondičními znaky (Příloha č. 8).

**Tab. č. 4:** Standardizovaná hmotnost. Zobecněný lineární model (n=57).

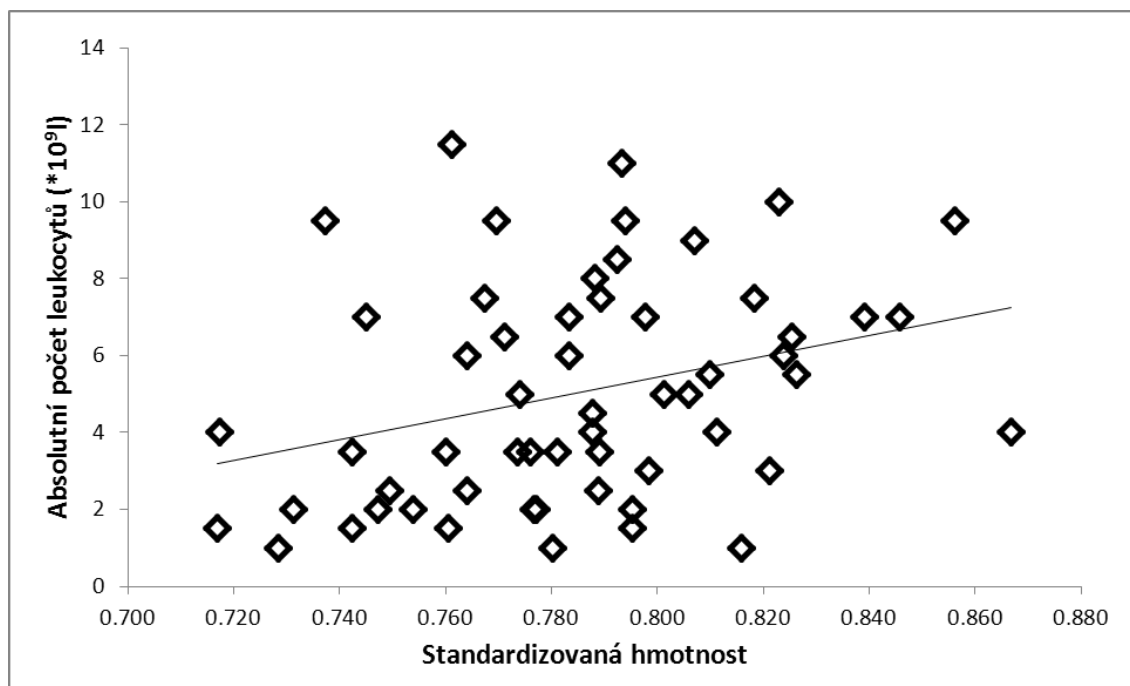
Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Standard. hmotnost</i>				
Znečištění PM10	-0.0002607 0.0005788	1	0.1263	0.85

**Tab. č. 5:** Délka tarsu. Zobecněný lineární model (n=57).

Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Délka tarsu</i>				
Znečištění PM10	0.003516 0.010320	1	0.3042	0.57

**Tab. č. 6:** Absolutní počet leukocytů (n=57): MAM Df = 3,  $X^2 = 10.43$ , p = 0.015.

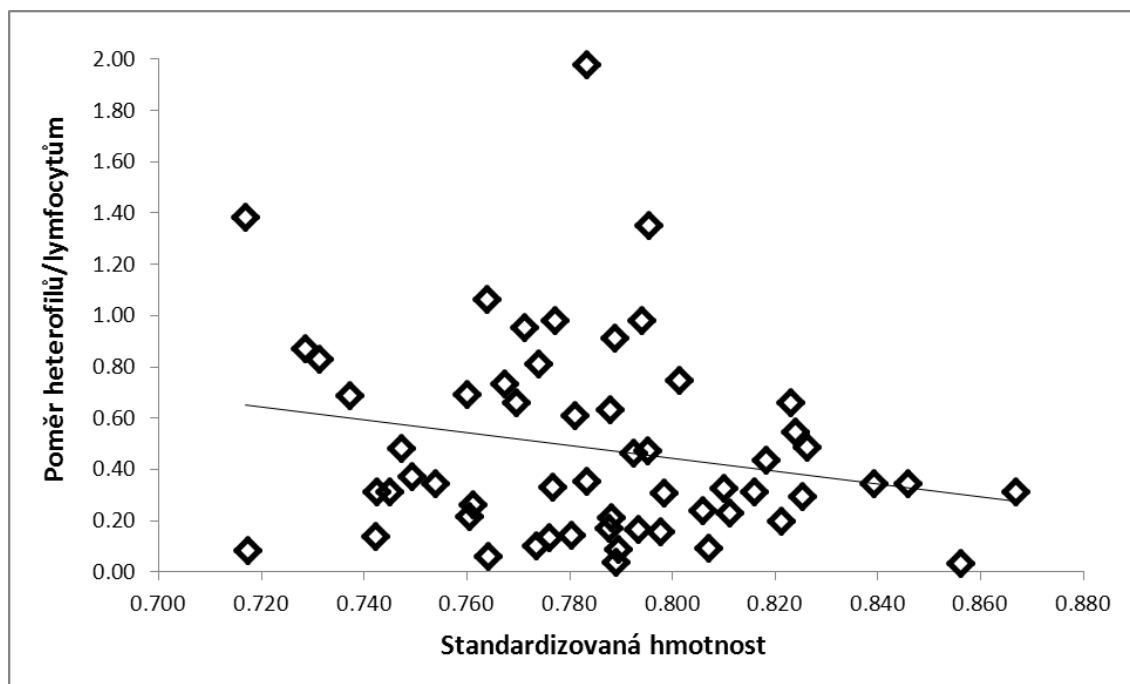
Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Abs.poč.leukocytů</i>				
Znečištění PM10	0.026950 0.332610	1	0.4565	0.29
<b>Standard.hmotnost</b>	-8.502405 7.078916	1	<b>4.7366</b>	<b>0.038 *</b>
<b>Znečištění:St.hmotnost</b>	0.349299 0.193213	1	<b>4.9221</b>	<b>0.019 *</b>



**Obr. č. 9:** Graf závislosti absolutního počtu leukocytů v krvi na standardizované hmotnosti samců, n=57.

**Tab. č. 7:** Poměrové zastoupení H/L (n=57). MAM Df = 1,  $X^2 = 31.4$ ,  $p < 0.001$ .

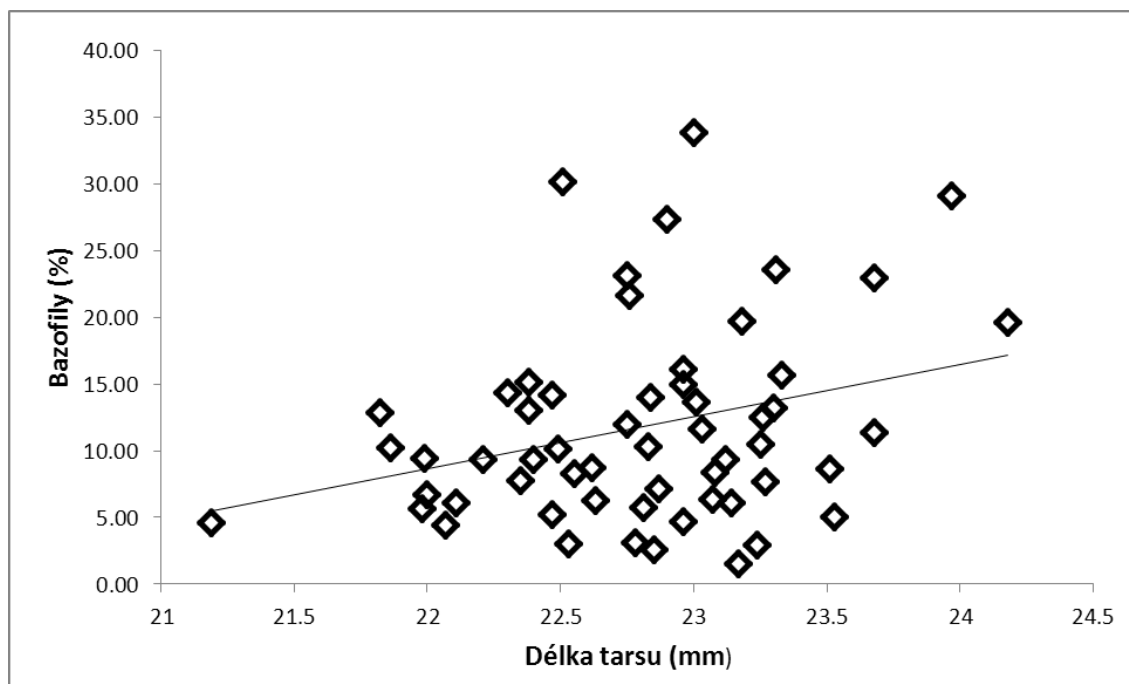
Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Heterofily/Lymfocytům</i>				
<b>Standard.hmotnost</b>	-12.080890 4.248680	1	<b>6.7518</b>	<b>&lt;0.001***</b>



**Obr. č. 10:** Graf závislosti poměrového zastoupení H/L v periferní krvi na standardizované hmotnosti samců,  $n = 57$ .

**Tab. č. 8:** Počet basofilů ( $n=57$ ): MAM Df = 3,  $X^2 = 7.52$ ,  $p = 0.057$ .

Proměnná	směrnice $\pm$ SE	DF	F	p
<i>Basofily</i>				
Znečištění PM10	-0.230324 0.203607	1	0.1622	0.59
<b>Tarsus</b>	-0.358478 0.278249	1	3.4681	<b>0.06</b>
<b>Znečištění:Tarsus</b>	0.011613 0.006547	1	<b>3.1461</b>	<b>0.049*</b>



**Obr. č. 11:** Graf závislosti poměrového zastoupení bazofilů v periferní krvi na délce tarsu samců, n=57.

### 4.3 Kondiční závislost ornamentů samců

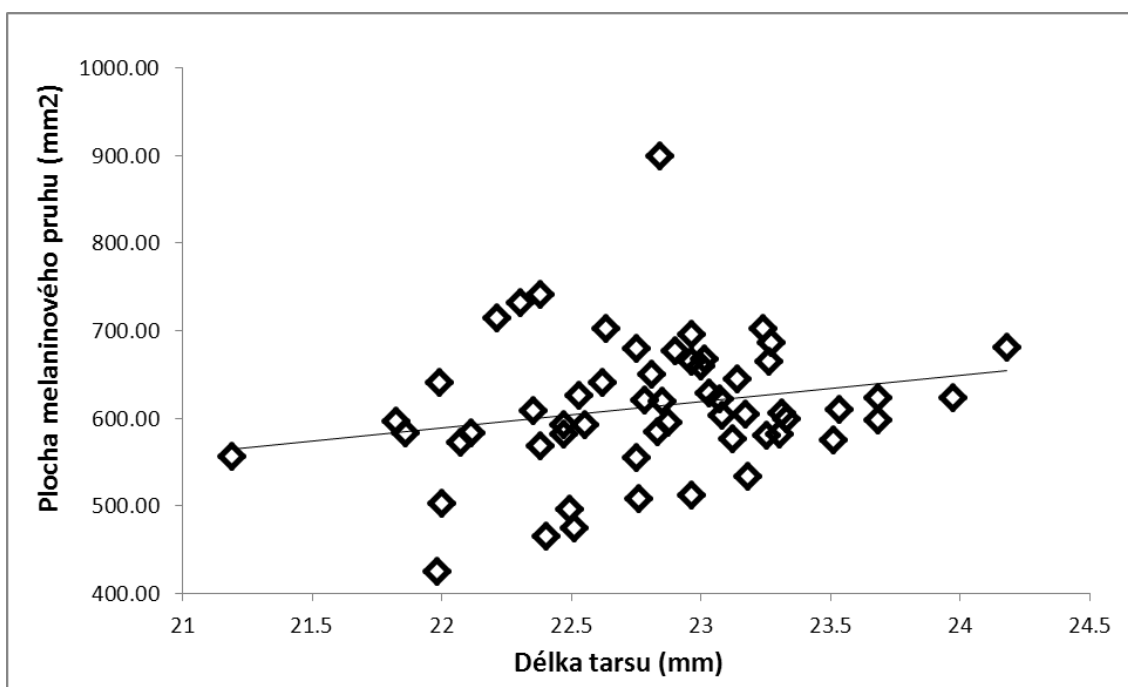
GLMM ukázaly, že intenzita žlutého (karotenoidního) břišního zbarvení peří nesouvisela se znečištěním ovzduší. Stejně tak ale nijak významně neodrážela ani kondiční znaky samců (Tab. č. 9). Naopak analýza melaninového břišního pruhu samců ukázala, že délka tarsu souvisela jak se znečištěním ovzduší (na hranici významnosti), tak s velikostí plochy melaninového ornamentu (Tab. č. 10). Tedy, že samci s delším tarsem disponovali větším břišním pruhem a vyskytovali se spíše v méně znečištěných oblastech PM10 částicemi (Obr. č. 12 a Obr. č. 13).

**Tab. č. 9:** Intenzita žlutého karotenoidního zbarvení peří (n=57).

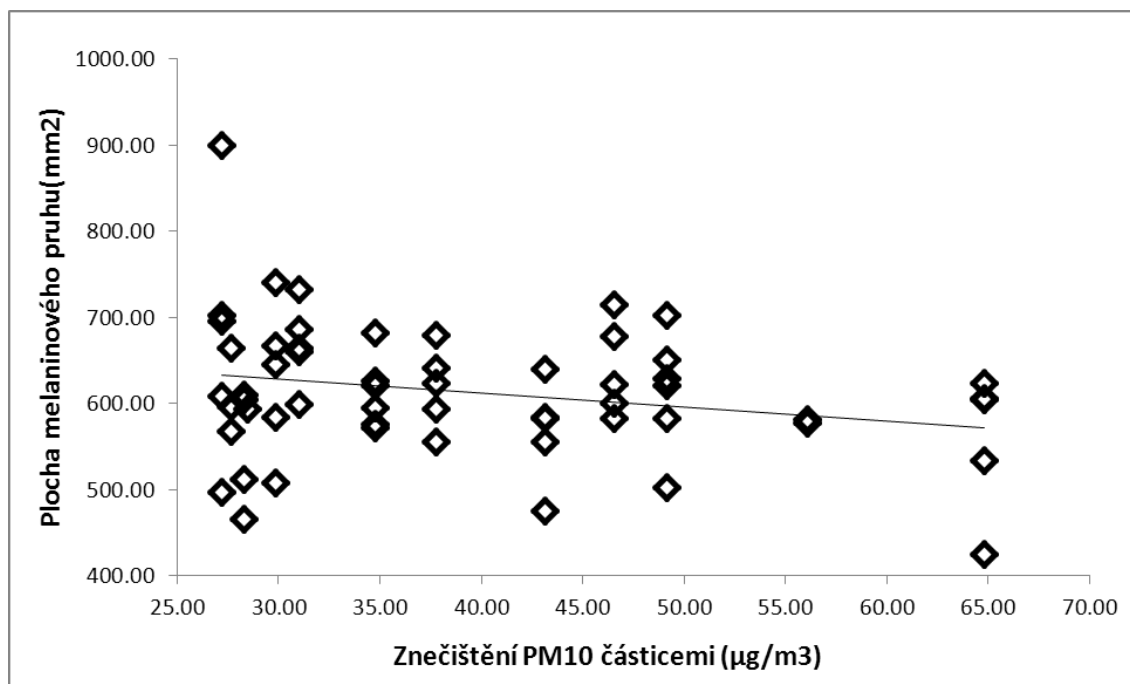
Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Ychroma</i>				
Znečištění PM10	0.0782379 ± 0.0372438	1	0.4343	0.15
Tarsus	0.0702832 ± 0.0492459	1	0.0739	0.81
Standard.hmotnost	1.8164605 ± 0.8867149	1	0.6813	0.50
Znečištění:Tarsus	-0.0018521 ± 0.0011600	1	1.1392	0.11
Znečištění:St.hmotnost	-0.0429911 ± 0.0228220	1	2.5519	0.20

**Tab. č. 10:** Plocha melaninového břišního pruhu (n=57). MAM Df = DF=2,  $X^2=7.06$ ,  $p=0.029$ .

Proměnná	směrnice ± SE	DF	F	p
<i>Plocha melaninového pruhu</i>				
<b>Znečištění PM10</b>	0.0034216 ± 0.0388399	1	<b>2.5074</b>	<b>0.057</b>
<b>Tarsus</b>	0.0152326 ± 0.0516555	1	<b>3.7628</b>	<b>0.046 *</b>



**Obr. č. 12:** Graf závislosti plochy břišního melaninového pruhu na délce tarsu samců, n = 57.



**Obr. č. 13:** Graf závislosti plochy melaninového pruhu na koncentraci znečištění ovzduší PM10 částicemi, n = 57.

## 5 Diskuze

Negativní vliv emisí prachových částic na zdraví a kondici mláďat sýkor koňader zaznamenalo několik studií (Eeva et al. 1998, Janssens et al. 2003, Geens et al. 2009). V této práci vliv znečištění na poměrovou hmotnost či délku tarsu u dospělých samců nebyl prokázán (podobně i Geens et al. 2009 u dospělých jedinců). Obecně u těchto kondičních parametrů byla zjištěna velice nízká variabilita mezi studovanými samci a v souvislosti se znečištěním nebyly viditelné ani žádné trendy či náznaky (příklad Příloha č. 4).

Vyšší absolutní počet leukocytů, konkrétně vyšší frekvence zastoupení bazofilů v krvi může značit onemocnění či infekci způsobenou krevními parazity (*Haemoproteus*, Ots et al. 1998 u sýkor, Vinkler et al. 2010 u zebřiček pestrých). Vyšší celkové počty leukocytů či bazofilů v krvi by se daly očekávat spíše u menších (slabších) jedinců (Vinkler et al. 2010). V mém případě ovšem byla zjištěna poněkud opačná závislost s kondičními znaky, tedy, že samci s vyšší poměrovou hmotností disponovali vyšším celkovým počtem leukocytů (Obr. č. 9). Podobně samci s delším tarsem vykazovali vyšší frekvence zastoupení bazofilů v krvi (Obr. č. 11). V tomto

případě ovšem nemohu vysvětlit konkrétní důvod těchto odchylek v krvi samců. Z výsledků je pouze zřejmé, že zvýšené absolutní počty leukocytů u poměrově větších samců nebyly způsobeny zvýšenou hladinou heterofilů v krvi. Poměrové zastoupení H/L totiž ukazuje, že vyššímu stresu byli vystavováni spíše poměrově menší samci (Obr. č. 10). Vyšší fyziologický stres u „malých“ samců může být způsoben např. nižší konkurenceschopností těchto jedinců (stres zvláště v období jara), či nižší potravní dostupností v jejich teritoriu (Eeva et al. 1998, Banbura et al. 2013). Stejně jako u ostatních hematologických parametrů, ani u H/L poměru nelze potvrdit, že by zde měla silný vliv koncentrace znečištění prachovými částicemi (Příloha č. 5, Příloha č. 6 a Příloha č. 7). Vliv znečištění se na zdravotním stavu odrážel pouze v interakci se zmíněnými kondičními znaky.

U ptáků jsem nezaznamenala žádné práce, které by se zabývaly aktivitou plazmového komponentu. Zjištěná variabilita v bakteriolytické aktivitě komplementu v plazmě mezi samci nijak nesouvisela koncentrací znečištění odchytové lokality PM<sub>10</sub> částicemi. Stejně tak tato variabilita nebyla vysvětlena ani základními kondičními znaky (délkou tarsu, standardizovanou hmotností). Tento výsledek může být ovlivněn malým počtem testovaných jedinců (n=24). Kondiční závislost aktivity komplementu v plasmě ovšem nebyla zjištěna např. ani ve studii Buchčíková et al. (2011) na kaprovi obecném (při n=160).

Nakonec byla testována souvislost exprese melaninových a karotenoidních ornamentů s vybranými kondičními a hematologickými znaky a se znečištěním PM<sub>10</sub> částicemi. Intenzita žlutého zbarvení peří (*Ychroma*, saturace) samců neodpovídala ani základním kondičním znakům, ani vybraným parametrům krve. Kondiční závislost karotenoidních ornamentů nebyla zjištěna např. ani u studie Maney et al. (2008) u kardinálů červených (*Cardinalis cardinalis*). Ve většině experimentálních studií byla ovšem potvrzena závislost mezi potravní dostupností karotenoidů a intenzitou žlutého zbarvení peří samců sýkory koňadry (Fitze et al. 2003, Tschirren et al. 2003, Peters et al. 2011; viz Bauerová 2012, BP). V našem případě potravní dostupnost ve studovaných lokalitách není známa, z poněkud širšího pohledu ale nebyla zjištěna ani souvislost (byť i nesignifikantní) mezi sytostí žlutého zbarvení a tučností samců (Příloha č. 9).

Expres melaninových ornamentů je často více než kondici přisuzována spíše genetické dědičnosti (McGraw et Hill 2000, Mundy 2006, Roulin et al. 2007).



Výsledky této studie ukázaly, že velikost plochy břišního melaninového ornamentu peří samců souvisela jak s délkou jejich tarsu, tak slabě nesignifikantně i s koncentrací znečištění jejich lokality prachovými částicemi. Samci s větším melaninovým pruhem měli delší tarsus (Obr. č. 12) a vyskytovali se spíše v méně znečištěných lokalitách (Obr. č. 13) jako byla např. Příbram, Benešov či Znojmo. Kondiční závislost melaninového ornamentu zjistili např. i Parker et al. (2003) u volně žijících lesňáčků žlutobrvých. Obecně variabilita mezi kvalitou karotenoidních a melaninových ornamentů peří samců byla velmi nízká.

Studium prachových částic, jakožto stresoru v přirozeném prostředí zvířat, je interpretačně komplikovaná záležitost, jelikož zde mohou působit další faktory, které mohou zkreslovat vliv tohoto typu znečištění na zdraví a další kondiční znaky zvířat. Velkou roli zde pravděpodobně bude hrát i sezónnost (Müller et al. 2011, Banbura et al. 2013), kdy např. v zimním období (s častými teplotními inverzemi) za vysokých stavů koncentrací  $PM_{10}$  v ovzduší by naměřené hematologické parametry pravděpodobně dosahovaly větších odchylek (i vzhledem k určité přirozeně oslabené imunitě ptáků v této době) než v období jara. Více informací, co se týče škodlivých vlivů různých koncentrací prachových částic „městského“ původu, by dále mohlo odhalit vyšetření počtu imaturních erytrocytů v krvi samců, jako např. u studie Belskii et al. (2005).

## 6 Závěr

Náplní této diplomové práce bylo seznámení se s metodou hematologického vyšetření u ptáků a následné použití zjištěných parametrů krve pro definici individuálního zdravotního stavu. Hlavní cílem bylo poté zjistit, zda základní kondiční a hematologické znaky samců sýkor koňader jsou nějakým způsobem ovlivňovány úrovní znečištění ovzduší  $PM_{10}$  prachovými částicemi „městského“ původu. Škodlivý vliv emisního znečištění prachovými částicemi na zdravotní stav je znám především u lidí, kdy dlouhodobá inhalace  $PM_{10}$  vede ke vzniku respiračních a kardiovaskulárních onemocnění. Co se týče výzkumu zdravotních následků vlivu tohoto typu znečištění u zvířat, bylo provedeno několik málo experimentálních studií na laboratorních myších a potkanech. V těchto případech aplikace koncentrovaných prachových částic vedla jak ke zvýšeným hladinám různých zánětlivých markerů, tak např. ke zvýšenému riziku srdečních příhod či akutních chronických zánětů střeva (Lay et al. 2004, Upadhyay et al. 2010, Kish et al. 2013). Z přirozeného prostředí existují některé studie na ptácích, které potvrzují škodlivý vliv emisního znečištění  $PM_{10}$  částicemi s vysokým obsahem těžkých kovů (v oblastech hutní výroby) na zdraví a celkovou kondici vybraných druhů (Janssens et al. 2003, Belskii et al. 2005, Geens et al. 2009). Srovnáním podmínek různých městských prostředí, z hlediska koncentrace „klasického“ prachového znečištění ovzduší, se zdravotním stavem volně žijících ptáků se ovšem doposud příliš prací nezabývalo.

Výsledky této studie neprokázaly, že by úroveň znečištění městských lokalit  $PM_{10}$  prachovými částicemi ovlivňovala vybrané kondiční znaky samců. Byla pouze nalezena souvislost mezi jednotlivými parametry zdraví a kondice. Čistý efekt znečištění  $PM_{10}$  částicemi nebyl prokázán ani u zdravotního stavu samců. Analýza barevných ornamentů peří samců prokázala kondiční závislost melaninového břišního pruhu. U tohoto ornamentu byla zjištěna i souvislost s koncentrací  $PM_{10}$  částic v ovzduší, kdy samci z více znečištěných lokalit disponovali menším pruhem než samci z méně znečištěných lokalit.

V budoucnu budou ještě manuálně vyhodnoceny počty imaturních erytrocytů z krevních roztěrů, kde bude dále testována souvislost tohoto hematologického znaku se znečištěním  $PM_{10}$  částicemi. V tomto případě předpokládáme možný výskyt hemolytické anémie u samců z více znečištěných lokalit prachovými částicemi.

## 7 Přehled literatury a použitých zdrojů

**Ardia D.R. et Schat K.A., 2008:** Ecoimmunology. In: Davison F., Kaspers B. et Schat K.A. (eds): Avian immunology. Academic/Elsevier, London: 421–441.

**Baccarelli A., Barretta F., Dou C., Zhang X., McCracken J.P., Díaz A., Bertazzi P.A., Schwartz J., Wang S., et Hou L., 2011:** Effects of particulate air pollution on blood pressure in a highly exposed population in Beijing, China: A repeated-measure study. *Environmental Health* 10: 108-118.

**Banbura J., Skwarska J., Banbura M., Gladalski M., Holysz M., Kalinski A., Markowski M., Wawrzyniak J., et Zielinski 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: 1-8.

**Beamish L.A., Osornio-Vargas A.R., et Wine E., 2011:** Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *Journal of Crohn's and Colitis Supplements* 5: 279-286.

**Belskii E.A., Lugas'kova N.V., et Karfidova A.A., 2005:** Reproductive parameters of adult birds and morphophysiological characteristics of chicks in the Pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca* Pall.) in technogenically polluted habitats. *Russian Journal of Ecology* 36: 329-335.

**Buchtíková S., Šimáková A., Rohlenová K., Flajšhans M., Lojek A., Lilius E.-M., et Hyršl P., 2011:** The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 318: 169-175.

**Campbell T.W. et Ellis C.K., 2007:** Avian and exotic animal hematology and cytology. 3rd Edition. Blackwell, Ames, 286 s.

**Carleton R.E., 2008:** Ectoparasites affect hemoglobin and percentages of immature erythrocytes but not hematocrit in nestling Eastern Bluebirds. *Wilson Journal of Ornithology* 120:565-568.

**Carroll M.C., 2004:** The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* 5: 981–986.

**Davis A.K., 2005:** Effect of handling time and repeated sampling on avian blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76: 334-338.

**Davis A.K., Maney D.L., et 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., 2008:** The importance of the avian immune system and its unique features. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: Avian Immunology. Elsevier, London: 1-12.

**Dawson R.D. et Bortolotti G.R., 1997:** Are avian hematocrits indicative of condition? American kestrels as a model. *Journal of Wildlife Management* 61:1297-1306.

**Dufva R. et Allander K., 1995:** Intraspecific variation in plumage coloration reflects immune response in Great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785-789.

**Eeva T., Lehikoinen E. et Rönkä M., 1998:** Air pollution fades the plumage of the great tit. *Functional Ecology* 12: 607-612.

**Erf G.F., 2008:** Autoimmune diseases of poultry. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: *Avian Immunology*. Elsevier, London: 339-358.

**Ewenson E.L., Zann R.A., et Flannery G.R., 2001:** Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. *Naturwissenschaften* 88:391-394.

**Falcone F.H., Pritchard D.I., et Gibbs B.F., 2001:** Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends in Parasitology* 17: 126-129.

**Fitze P.S., Tschirren B. et Richner H., 2003:** Carotenoid-based colour expression is determined early in nestling life. *Oecologia* 137:148–152.

**Friedl T.W.P et Edler R., 2005:** Stress-dependent trade-off between immunological condition and reproductive performance in the polygynous Red bishop (*Euplectes orix*). *Evolutionary Ecology* 19: 221-239.

**Geens A., Dauwe T. et Eens M., 2009:** Does anthropogenic metal pollution affect carotenoid colouration, antioxidative capacity and physiological condition of great tits (*Parus major*)? *Elsivier* 150: 155-163.

**Glomski C.A. et Tamburlin J., 1989:** The phylogenetic odyssey of the erythrocyte .1. Hemoglobin - the universal respiratory pigment. *Histology and Histopathology* 4:509-514.

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

**Hauptmanová K., Literák I., et Bártová E., 2002:** Haematology and leucocytozoonosis of Great tits (*Parus major*) during winter. *Acta Veterinaria Brno* 71: 199-204.

**Hayward L.S. et Wingfield J.C., 2004:** Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *General and Comparative Endocrinology* 135: 365-371.

**Hernández A. et Tort L., 2003:** Annual variation of complement. Lysozyme and haemagglutinin levels in serum of Gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish Shellfish Immunology* 15: 479-481.

**Heylen D.J.A. et Matthysen E., 2008:** Effect of tick parasitism on the health status of passerine bird. *Functional Ecology* 22: 1099-1107).

**Hořejší V. et Bartůňková J., 1998:** *Základy imunologie*. Triton, Praha: 215 s.

**Janssens E., Dauwe T., Pinxten R., Bervoets L., Blust R., et Eens M., 2003:** Effects of heavy metal exposure on the condition and health of nestlings of the Great tit (*Parus major*), a small songbird species. *Environmental Pollution* 126: 267-274.

**Juul-Madsen H.R., Viertlboeck B., Smith A.L., et Göbel T.W.F., 2008:** Avian innate immune responses. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: *Avian Immunology*. Elsevier, London: 144-158.

**Kaiser P., 2010:** Advances in avian immunology – Prospects for disease control: A review. *Avian Pathology* 39: 309-324.

**Karakatsani A., Analitis A., Perifanou D., Ayres J.G., Harrison R.M., Kotronarou A., Kavouras I.G., Pekkanen J., Hämeri K., Kos G.P., de Hartog J.J., Hoek G., et Katsouyanni K., 2012:** Particulate matter air pollution and respiratory symptoms in individuals having either asthma or chronic obstructive pulmonary disease: A European multicentre panel study. *Environmental Health* 11: 75-91.

**Karasuyama H., Mukai K., Tsujimura Y., et Kazushige O., 2009:** Newly discovered roles for basophils: A neglected minority gains new respect. *Nature Reviews Immunology* 9: 9-13.

**Kish L., Hotte N., Kaplan G.G., Vincent E., Tso R., Gänzle M., Rioux K.P., Thiesen A., Barkema H.W., Wine E., et Madsen K.L., 2013:** Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *Plos One* 8: 1-15.

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

**Lay Y-C., Chan C-C., Wang P-Y., Lee C-T., et Cheng T-J., 2004:** Effects of Asian dust event particles on inflammation markers in peripheral blood and bronchoalveolar lavage in pulmonary hypertensive rats. *Environmental Research* 95: 71-76.

**Lim K.G., 1995:** Chapter 5 – Eosinophils: Effector leukocytes of allergic inflammatory responses. *Immunopharmacology of Respiratory System*: 85-99.

**Lin M., Stieb D.M., et Chen Y., 2005:** Coarse particulate matter and hospitalization for respiratory infections in children younger than 15 years in Toronto: A Case-Crossover Analysis. *Pediatrics* 116: 235-240.

**Lindström K.M., Hawley D.M., Davis A.K., et Wikelski M., 2005:** Stress response and disease in three wintering House finch (*Carpodacus mexicanus*)

populations along a latitudinal gradient. *General and Comparative Endocrinology* 143: 231-239.

**Lucas A.M. et Jamroz C., 1961:** Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, Washington, 245 s.

**Lynn S.E. et Porter A.J., 2008:** Trapping initiates stress response in breeding and non-breeding house sparrows *Passer domesticus*: implications for using unmonitored traps in field studies. *Journal of Avian Biology* 39: 87-94.

**Maney D.L., Davis A.K., Goode C.T., Reid A., et Showalter C., 2008:** Carotenoid-based plumage coloration predicts leukocyte parameters during the breeding season in Northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Ethology* 114: 369-380.

**Männiste M. et Hõrak P., 2011:** Effects of immune activation and glucocorticoid administration on feather growth in Greenfinches. *Journal of Experimental Zoology* 315: 527-535.

**Maxwell M.H. et Robertson G.W., 1995:** The avian basophilic leukocyte: A review. *World's Poultry Science Journal* 51: 307-325.

**McGraw K.J. et Hill G.E., 2000:** Differential effects of endoparasitism on the expression of carotenoid- and melanin- based ornamental coloration. *Proceedings of Royal Society* 267: 1525-1531.

**Meister K., Johansson C., et Forsberg B., 2012:** Estimated short-term effects of coarse particles on daily mortality in Stockholm, Sweden. *Environmental Health Perspectives* 120: 431-436.

**Müller C., Jenni-Eiermann S., et 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.

**Mundy N.I., 2006:** Genetic basis of color variation in wild birds. In: Hill G.E. et McGraw K. J. [eds]: *Bird Coloration. Volume 1. Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Cambridge: 469-507.

**Nares S. et Wahl S.M., 2005:** Chapter 25 – Monocytes and macrophages. *Measuring immunity, Basic biology and clinical assessment* 0: 299-311.

**Nikoskelainen S., Bylund G., et Lilius E.-M., 2004:** Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 28: 581-592.

**Nikoskelainen S., Lehtinen J., et Lilius E.-M., 2002:** Bacteriolytic activity of rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Developmental and Comparative Immunology* 26: 797-804.

**Norte A.C., Ramos J.A., Sousa J.P., et Sheldon B.C., 2009:** Variation of adult Great tit *Parus major* body condition and blood parameters in relation to sex, age, year and Season. *Journal of Ornithology* 150: 651-660.

**Oláh I. et Vervelde L., 2008:** Structure of avian lymphoid system. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: *Avian Immunology*. Elsevier, London: 13-50.

**Ots I., Murumagi A., et Hõrak P., 1998:** Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12:700-707.

**Parker T.H., Stansberry B.M., Becker C.D., et Gipson P.S., 2003:** Do melanin- or carotenoid-pigmented plumage ornaments signal condition and predict pairing success in Kentucky warbler? *The Condor* 105: 663-671.

**Peters A., Magdeburg S. et Delhey K., 2011:** The carotenoid conundrum: improved nutrition boosts plasma carotenoid levels but not immune benefits of carotenoid supplementation. *Oecologia* 166: 35–43.

**Poplová J., 2011:** Hematologické metody v zoologii. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, UK Praha, nepublikováno.

**Ratcliffe M.J.H., 2008:** B cells, the bursa of Fabricius and the generation of antibody repertoires. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: *Avian Immunology*. Elsevier, London: 67-90.

**Romero L.M. et Reed J.M., 2005:** Collecting baseline corticosterone samples in field: Is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology A* 140: 73-79.

**Romero L.M., 2004:** Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 249-255.

**Romero L.M., Reed J.M., et Wingfield J.C., 2000:** Effects of weather on corticosterone responses in wild free-living passerine birds. *General and Comparative Endocrinology* 118: 113-122.

**Roulin A., Gasparini J., Bize P., Ritschard M. et Richner H., 2007:** Melanin-based colorations signal strategies to cope with poor and rich environments. *Behavioral Ecology Sociobiology* 62: 507–519.

**Roulin A., Gasparini J., Bize P., Ritschard M. et Richner H., 2007:** Melanin-based colorations signal strategies to cope with poor and rich environments. *Behavioral Ecology Sociobiology* 62: 507–519.

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

**Schijns V.E.J.C., Sharma J., et Tarpey I., 2008:** Practical aspects of poultry vaccination. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: Avian Immunology. Elsevier, London: 373-394.

**Singh S., Briles W.E., Lupiani B., et Collissonet E.W., 2010:** Avian influenza viral nucleocapsid and hemagglutinin proteins induce chicken CD8+ memory T lymphocytes. Virology 399: 231-238.

**Somers C.M., McCarry B.E., Malek F., et Quinn J.S., 2004:** Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. Science 304: 1008-1010.

**Stafoggia M., Samoli E., Alessandrini E., Cadum E., Ostro B., Berti G., Faustini A., Jacquemin E., Linares C., Pascal M., Randi G., Ranzi A., Stivanello E., Forastiere F., et the MED-PARTICLES Study Group, 2013:** Short-term associations between fine and coarse particulate matter and hospitalizations in Southern Europe: Results from the MED-PARTICLES Project. Environmental Health Perspectives 121: 1026-1033.

**Svobodová J., Gabrielová B., Synek P., Marsik P., Vaněk T., Albrecht T., et Vinkler M., 2013:** The health signaling of ornamental traits in Great partridge (*Perdix perdix*). Journal of Ornithology 154: 717-725.

**Tschirren B., Fitze P. S., et Richner H., 2003:** Proximate mechanisms of variation in the carotenoid-based plumage coloration of nestling great tits (*Parus major L.*). Journal of Evolutionary Biology 16: 91-100.

**Upadhyay S., Ganguly K., Stoeger T., Semmler-Bhenke M., Takenaka S., Kreyling W.G., Pitz M., Reitmeir P., Peters A., Eickelberg O., Wichmann H.E., et Schultz H., 2010:** Cardiovascular and inflammatory effects of intratracheally installed ambient dust from Augsburg, Germany, in spontaneously hypertensive rats (SHRs). Particle and Fibre Toxicology 7: 27-47.

**Viertlboeck B. et Göbel T.W.F., 2008:** Avian T cells: Antigen recognition and lineages. In: Davison F., Kaspers B., et Schat K.A. [eds]: Avian Immunology. Elsevier, London: 91-106.

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

**Washburn B.E., Millspaugh J.J., Morris D.L., et Schultz J.H., 2007:** Using a commercially available enzyme immunoassay to quantify testosterone in avian plasma. The Condor 109: 181-186.

**Wikelski M. et Cooke S.J., 2006:** Conservation physiology. Trends in Ecology and Evolution 21: 38-46.

**Yamato O., Goto I., et Maede Y., 1996:** Hemolytic anemia in wild Seaducks caused by marine oil pollution. Journal of Wildlife Diseases 32: 381-384.



### **Internetové zdroje:**

**ČHMÚ 2013:** Český hydrometeorologický ústav: Úsek ochrany čistoty ovzduší. Znečištění ovzduší na území ČR. Tabelární ročenky. Praha, online: <http://portal.chmi.cz>, cit. 12.11.2013.

**Davis A.K., 2009:** The Wild Life Leukocytes Webpage: The Ecologist's Source for Information about Leukocytes of Wildlife Species. The University of Georgia, Athens GA, USA, online: <http://wildlifehematology.uga.edu>, cit. 2.1.2014.

**IT Development Team 2002:** UTHSCSA ImageTool – Image Processing and Analysing Program. San Antonio, Texas, online: <http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>, cit. 5.10.2013.

**URL 1:** Avian haemathology photographs. Veterinary Diagnostic Laboratory, Leeds, UK, online: <http://ctdslab.co.uk/photos/avian-haematology-photographs/>. cit. 19.4. 2014.

**R Development Core Team 2012:** A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, online: <http://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/2.15.0/>, cit. 3.12.2013.

## 8 Přílohy

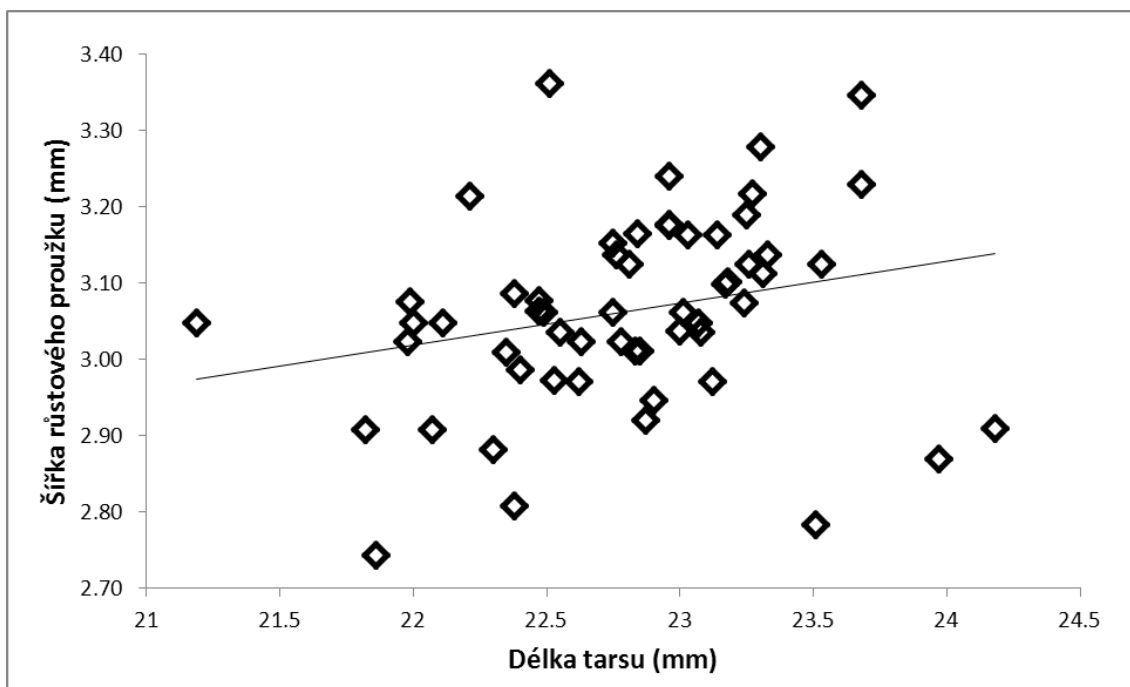
**Příloha č. 1:** Odchyťové lokality s průměrnou roční koncentrací PM10 částic v ovzduší za roky 2008, 2009, a část roku 2010 (ČHMÚ 2013), celkem 13 lokalit, 57 odchyćených samců:

Lokalita	GPS souřadnice odchyťové lokality	Koncentrace ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Počet odchyćených samců
Příbram	49°41'2.16"N, 14° 1'19.18"E	27.22	5
Benešov	49°47'10.34"N, 14°41'51.06"E	27.64	3
Znojmo	48°51'27.24"N, 16°02'42.04"E	28.30	4
Hradec Králové	50°11'42.52"N, 15°52'11.66"E	31.02	5
Plzeň	49°44'10.17"N, 13°25'1.82"E	29.86	5
Olomouc	49°36'31.55"N, 17°15'26.74"E	28.46	1
Jihlava	49°23'21.48"N, 15°36'12.03"E	34.77	6
Brno	49°11'48.09"N, 16°35'43.92"E	37.79	5
Praha	50°03'49.86"N, 14°24'09.79"E	43.12	5
Karvinná	49°52'26.86"N, 18°33'36.74"E	46.57	5
Stehelčevy	50°10'37.76"N, 14°11'58.71"E	49.17	6
Ostrava	49°48'1.88"N, 18°20'22.62"E	56.10	2
Bohumín	49°53'39.96"N, 18°22'11.17"E	64.83	5

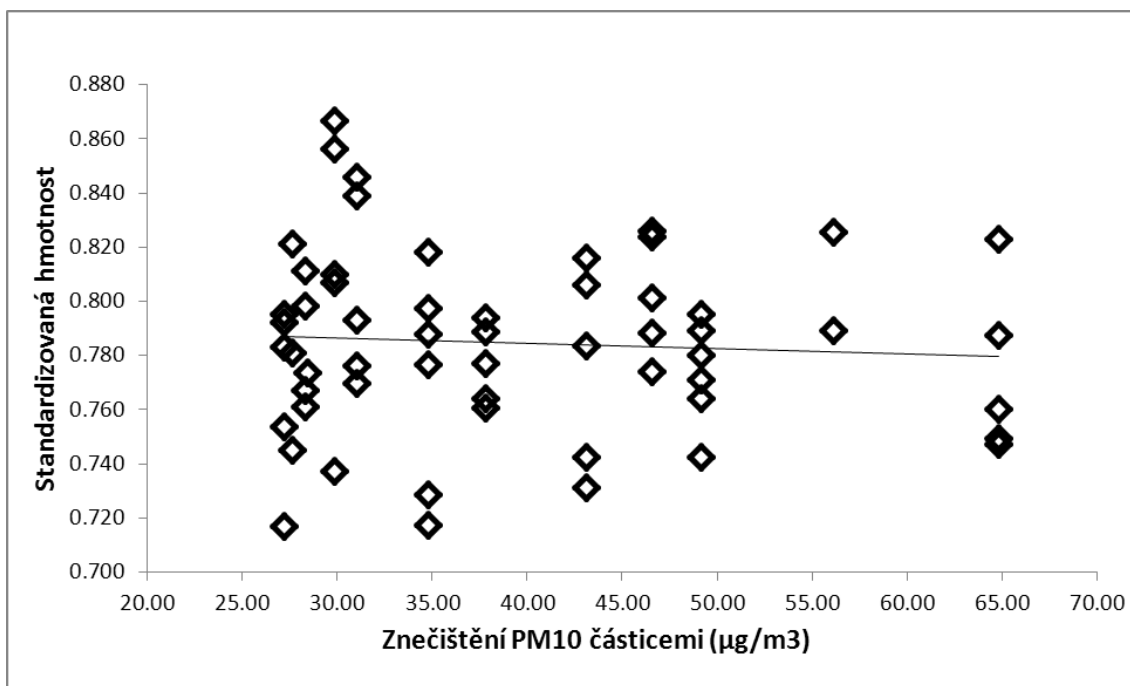
**Příloha č. 2:** Odchyťové lokality jedinců testovaných na bakteriolytickou aktivitu komplementu v plasmě, 10 lokalit, celkem 24 odchyćených samců:

Lokalita	Koncentrace ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Počet testovaných samců
Benešov	27.64	1
Znojmo	28.30	1
Plzeň	29.86	1
Jihlava	34.77	4
Brno	37.79	4
Praha	43.12	4
Karvinná	46.57	2
Stehelčevy	49.17	2
Ostrava	56.10	2
Bohumín	64.83	3

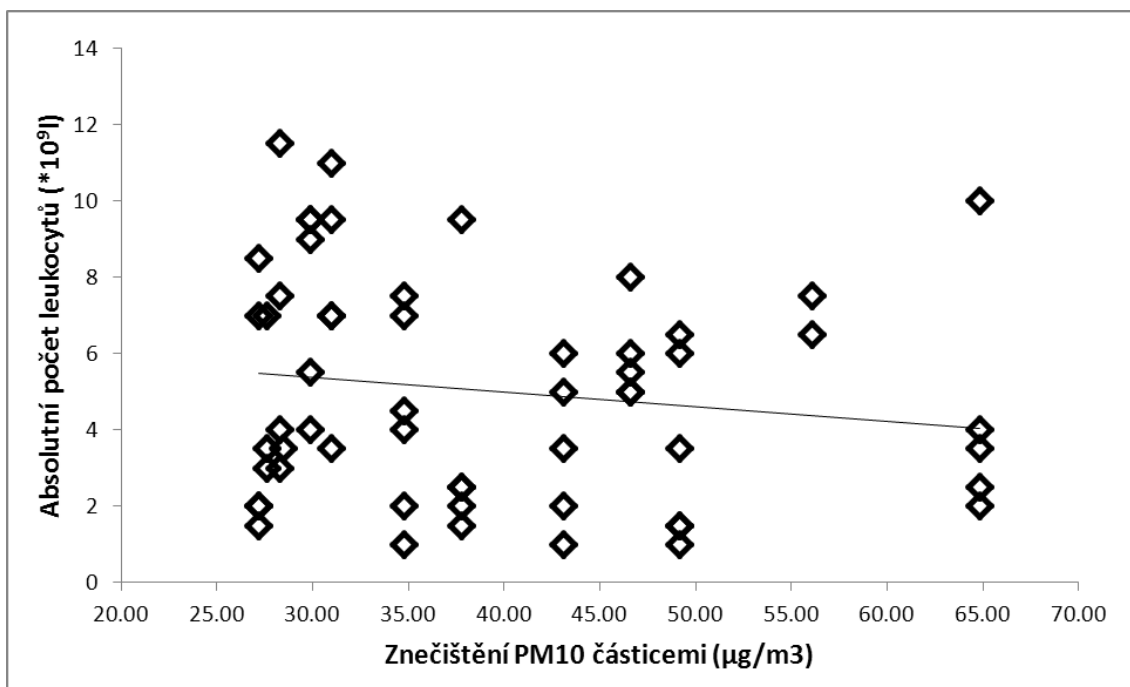
**Příloha č. 3:** Graf závislosti šířky růstového proužku rýdovacích per na délce tarsu samců,  $n=57$ ,  $p=0.069$ .



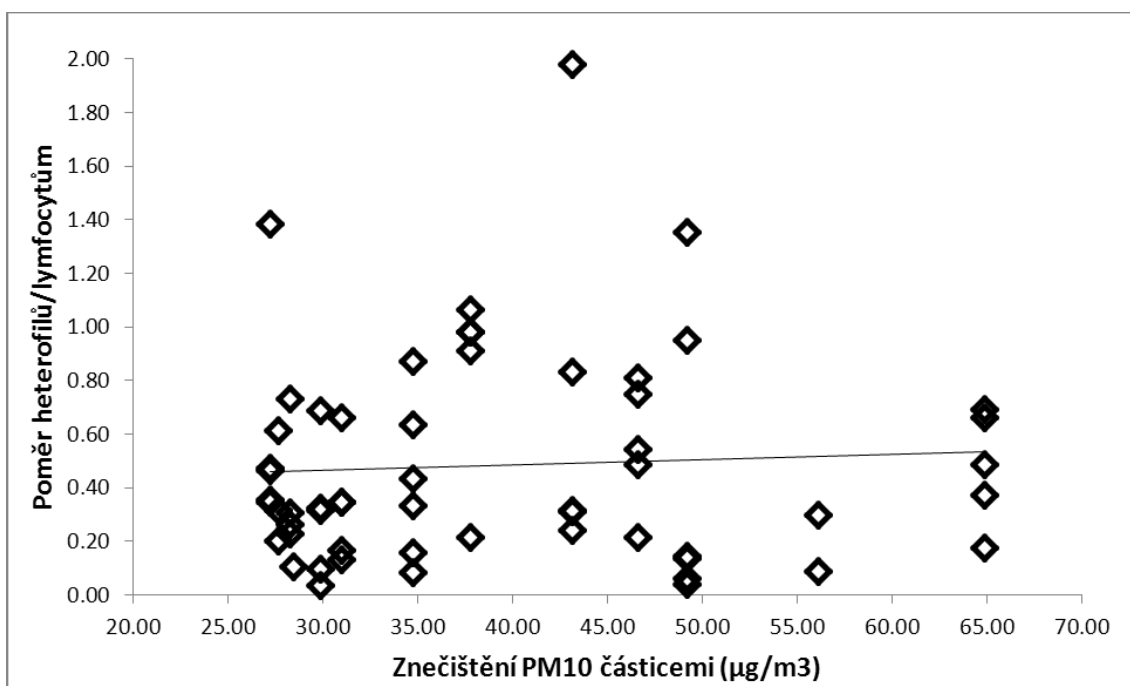
**Příloha č. 4:** Graf závislosti standardizované hmotnosti samců na koncentraci znečištění PM10 částicemi,  $n=57$ .



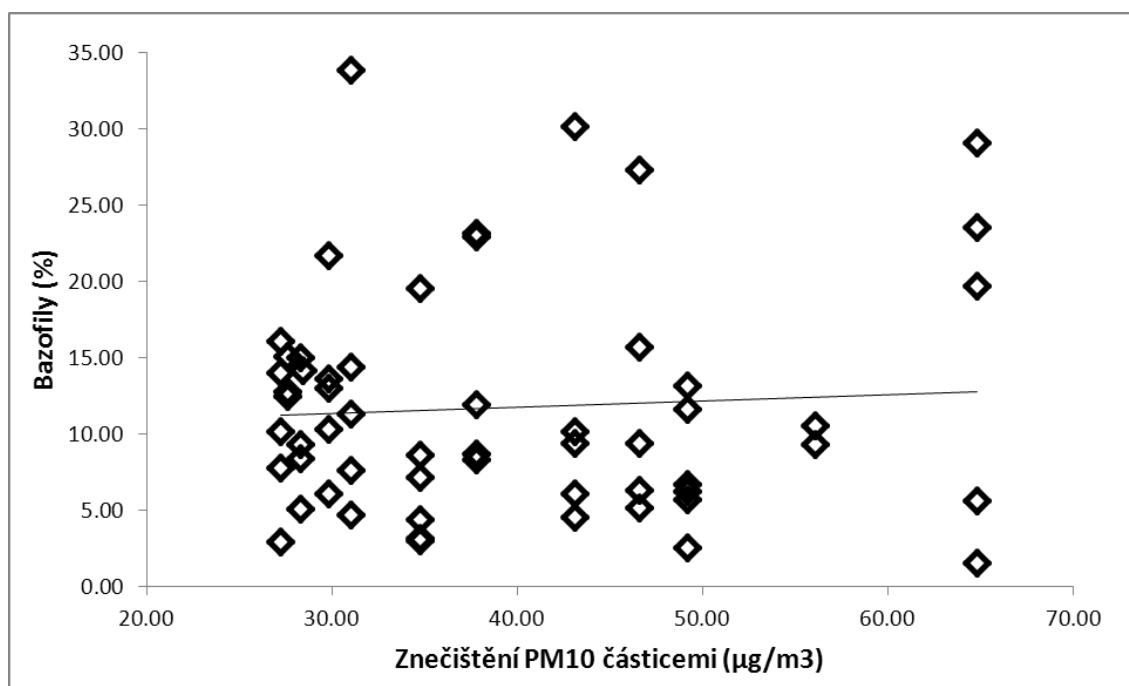
**Příloha č. 5:** Graf závislosti absolutního počtu leukocytů v krvi na koncentraci znečištění ovzduší PM10 částicemi, n=57.



**Příloha č. 6:** Graf závislosti poměru zastoupení H/L v krvi na znečištění PM10 částicemi, n = 57.



**Příloha č. 7:** Graf závislosti procentuálního zastoupení bazofilů v krvi na koncentraci znečištění lokality PM10 částicemi, n = 57.



**Příloha č. 8:** Bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě (n=24).

Proměnná	směrnice ±	SE	DF	F	p
<i>Čas inhibice ½ bakterií</i>					
Znečištění PM10	1.455e-07	2.259e-07	1	0.7129	0.35
Tarsus	4.975e-08	2.878e-07	1	0.0003	0.67
Standard.hmotnost	5.916e-06	5.495e-06	1	0.6654	0.50
Znečištění:Tarsus	-9.450e-10	7.361e-09	1	0.1590	0.53
Znečištění: St.hmotnost	-1.670e-07	1.268e-07	1	1.7354	0.13

**Příloha č. 9:** Graf vztahu intenzity žlutého zbarvení peří samců s jejich individuální tučností,  $n = 57$ .

