

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



Imunokompetenční závislost exprese samčích
sekundárních pohlavních znaků u ptáků:
stručný úvod do ekologické imunologie ptáků

Seminární práce

Michal Vinkler

Školitel: Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Praha 2005

*N*ebývá zvykem psát do seminární práce věnování. Seminární práce je totiž ze své podstaty práce školská, cvičná a jako taková by neměla nést okázalé prvky uceleného knižního díla. Ačkoliv si tuto skutečnost velmi dobře uvědomuji, utkvělá představa, že již třeba nikdy nenapíšeš nic dostatečně svobodného, abych tam mohl věnování uvést, mě přinutila udělat v této práci výjimku. V žádném případě bych si nepřál, aby těchto několik vět působilo přehnaně sebejistě či dokonce namyšleně. K jejich sepsání jsem motivován pouze snahou v rámci svých omezených možností vyjádřit dík člověku, který mi pomohl na samém začátku mých aspirací o odbornou zoologickou činnost. Věnuji proto tuto, byť jistě nedokonalou, práci ornitologovi a uznávanému parazitologovi RNDr. Jiljímu Sitkovi, CSc. z Moravské ornitologické stanice v Přerově jako poděkování za dlouhé diskuse, které byl ochoten se mnou na úkor svého drahocenného času vést.

I ABSTRAKT

Problematika pohlavního výběru představuje jednu z nejintenzivněji studovaných otázek současné evoluční ekologie. Výzkum se v tomto ohledu zaměřuje především na význam sekundárních pohlavních znaků samců ptáků, pro něž byla do současnosti navržena celá řada hypotéz. Mezi ty nejpravděpodobnější patří i skupina hypotéz o sexuální selekci zprostředkované parazity. Tyto hypotézy předpokládají, že samčí ornamenty slouží jako signály rezistence samce vůči pathogenním vlivům parazitů. Mezi odborníky však není jednotnost v tom, jaký význam má v tomto procesu imunitní systém samce ani jakými mechanismy je exprese samčího znaku regulována. Tato práce si proto klade za cíl zrevidovat do dnešní doby známé poznatky o vztahu fungování imunitního systému ptáků a tvorby samčího pohlavního znaku a prozkoumat možné faktory, které by tento proces mohly ovlivňovat. Shrnuty jsou také základní informace o ptačím imunitním systému a používané imunologické metodice, které jsou potřebné pro správnou interpretaci experimentálních a observačních dat. I přes nedostatečnost našich současných znalostí o fungování imunitního systému většiny volně žijících druhů se dnes zdá pravděpodobné, že samčí pohlavní znaky mohou signalizovat samicím zdravotní stav samce a funkčnost jeho imunitního systému, přičemž mechanismy udržování spolehlivosti takovéto signalizace mohou být pro různé ornamenty různé. Důkazy o tom jsou shrnuty v této práci. V závěru navrhuji také některá konkrétní doporučení pro možný další výzkum.

ABSTRACT

The sexual selection is one of the most intensively studied topics of current evolutionary ecology. Interesting remains especially the question of the meaning of various male secondary sexual traits in birds for which several hypothesis have been proposed. Among the most probable of them the hypotheses of parasite mediated sexual selection can be included. These hypotheses suggest that the explanation of the sense of the sexual ornaments may be the signal of the male parasite resistance to the female. There is unfortunately no agreement among the researches about the role of the immune system in this process and the mechanisms which regulate the trait expression. This work therefore aims to revise the up-to-date knowledge concerning (1) the relationship between the bird immune function and the elaboration of the male ornament and (2) the possible regulating factors of this process. I also bring together the basic information about the bird immune system and the immunological methods used in the research, which I find important for correct interpretation of the experimental and observatory data. Even we do not understand the function of the immune system in the majority of the wild bird species so far properly, it seems clear that different male ornaments may inform females about the health status and immune functions of the displaying males, which gives the females powerful criteria for the mate choice. The reliability of the signalization is probably maintained differently in various sexual traits. The evidence for this point of view is also included in this work. In the conclusion I also suggest some actual proposals for the future research.

OBSAH

I ABSTRAKT	5
II PŘEDMLUVA	11
III ÚVOD	13
IV ZÁKLADNÍ TEORIE A HYPOTÉZY SEXUÁLNÍ SELEKCE	15
IV.1 Jak pohlavní znaky vznikají?	15
IV.2 Co udržuje variabilitu v pohlavních znacích pro další výběr	17
IV.2.1 Hypotézy dobrých genů versus hypotézy komplementárních genů	17
IV.2.2 Hypotézy přímých výhod pro samici	22
IV.3 Základní typy pohlavních znaků	23
V IMUNITNÍ SYSTÉM PTÁKŮ	25
V.1 Buňky ptačího imunitního systému a jejich důležité povrchové molekuly	25
V.1.1 Myeloidní linie	26
V.1.2 Lymfoidní linie	28
V.2 MHC genové klastry a MHC glykoproteiny	35
V.3 Antigeny, mitogeny a superantigeny	37
V.4 Cytokiny	42
V.5 Komplement	46
V.6 Imunologicky významné tkáně	47
V.6.1 Primární lymfatické orgány	47
V.6.2 Sekundární lymfatické orgány	47
V.7 Vliv ontogeneze a fyziologických faktorů na fungování imunitního systému	48
V.7.1 Maternální efekt na imunitu embrya	48
V.7.2 Embryogeneze imunity	49
V.7.3 Postnatální vývin imunitního systému	50
V.7.4 Rozdíly v imunitě mezi pohlavími	52
V.7.5 Vliv hormonů na imunitní systém	54
V.8 Mezdruhové rozdíly v imunologické reaktivitě	56
V.9 Význam karotenoidů ve fungování imunitního systému	57
VI POUŽÍVANÉ IMUNOLOGICKÉ METODY	60
VI.1 Odběr vzorků ze zvířat	60
VI.1.1 Odběr krve	60
VI.1.2 Odběr tkání z orgánů	61
VI.2 Stanovení relativní velikosti lymfatických orgánů	61
VI.3 Stanovení množství jednotlivých buněčných typů a imunologicky významných molekul ve vzorku	62
VI.3.1 Relativní četnost jednotlivých leukocytárních typů v krevním nátěru	62
VI.3.2 Stimulace buněk imunitního systému pomocí SRBC in vivo	63
VI.3.3 Stanovení celkové koncentrace plasmatických proteinů	64
VI.3.4 Sedimentace	64
VI.3.5 Průtoková cytometrie	64

VI.4 Měření imunopathologické reakce opožděného typu (DTH)	66
VI.5 Cytokiny	66
VI.5.1 ELISA cytokinů	66
VI.5.2 Radioimunoanalýza cytokinů	66
VI.5.3 Bioanalýza cytokinů	67
VI.5.4 Exprese mRNA cytokinů	67
VI.6 Měření aktivity T buněk	68
VI.6.1 Měření aktivity T buněk pomocí PHA in vivo	68
VI.6.2 Měření proliferace T buněk	72
VI.6.3 Měření aktivity T buněk nepřímo přes cytokiny	73
VI.6.4 Analýza cytotoxicity T buněk	73
VI.7 Měření aktivity B buněk	74
VI.7.1 Měření proliferační aktivity B buněk	74
VI.7.2 Měření množství protilátek	74
VI.8 Měření aktivity fagocytů	76
VI.9 Použití adjuvans při podání antigenu in vivo	77
VI.10 Zjišťování MHC haplotypu	77
VII DĚDIČNÁ PODSTATA VARIABILITY V IMUNOKOMPETENCI	78
VIII KONDIČNÍ ZÁVISLOST FUNKCESCHOPNOSTI IMUNITNÍHO SYSTÉMU	82
VIII.1 Velikost a hmotnost jedince	82
VIII.2 Věk jedince	83
VIII.3 Metabolismus a pohybová aktivita	84
VIII.4 Biorytmy	84
VIII.4.1 Cirkanuální cykly	84
VIII.4.2 Cirkadiální rytmy	87
VIII.5 Počasí	87
VIII.6 Přístup k potravě	88
VIII.7 Parazitě	92
VIII.8 Stres	93
IX ZÁVISLOST EXPRESE SEKUNDÁRNÍCH POHLAVNÍCH ZNAKŮ SAMCŮ NA PARAMETRECH IMUNITNÍHO SYSTÉMU	94
IX.1 Zbarvení	94
IX.1.1 Melaniny	95
IX.1.2 Karotenoidy	98
IX.1.3 UV reflektance	106
IX.1.4 Strukturální zbarvení	107
IX.2 Morfologické struktury	107
IX.2.1 Hřebínky a laloky	107
IX.2.2 Ocasní pera	108
IX.2.3 Ostruhy	110
IX.3 Symetrie	111

X ZÁVĚREM	112
X.1 Shrnutí našich znalostí o imunologické závislosti exprese pohlavních znaků samců	112
X.2 Doporučení pro další výzkum	113
X.3 Vlastní závěr	116
XI PODĚKOVÁNÍ	117
XII SLOVNÍK ZKRATEK	118
XIII LITERATURA	119
XIV PŘÍLOHY (tab. VI.6.1/1 a tab. VI.7.2/1)	135

II PŘEDMLUVA

...

Nemohu se zde pouštět do nutných podrobností, avšak může-li člověk v krátkém čase dodat krásy a ušlechtilého chování se svým bantamským slepicím, dle svého názoru o kráse, nevidím žádné dobré příčiny, proč bych pochyboval, že samičí ptáci vybírají po tisíc generací nejlíbezněji zpívající neb nejkrásnější samečky, dle svého názoru o kráse, by nemohli dosíci patrného výsledku.

...

Darwin (1859) v překladu F. Klapálka, Praha, 1914

Ačkoliv jsem se tím snad vystavil riziku, že jsem čtenáři zavedl příčinu k mylnému počátečnímu zklamání, že namísto nejnovějších poznatků ekologické imunologie mu bude opakována vcelku široce přijímaná nauka o pohlavním výběru, rozhodl jsem se celou tuto práci započít právě tam, odkud vyrůstají kořeny našich současných výzkumných snah. Darwinova slova totiž naprosto trefně vystihují to, oč se nám bude na následujících stránkách jednat – tedy o snahu samic přetvořit samce tak, aby co nejvíce odpovídali jejich představám. Narozdíl od velikána evoluční biologie však nebudeme uvažovat estetické cítění samic, které by se nám jen velmi špatně objektivně hodnotilo, ale jejich snahu nahlédnout svým nápadníkům tak říkajíc „pod pokličku“. A o to právě jde. Samice všech vývojových linií třímající ve svých pomyslných rukou zbraň ze všech zbraní nejmocnější, tedy rozumějme „sex“, nutí hloučky kolem postávajících samců, aby dokázali, že právě oni jsou hodni dát vzniknout nové generaci potomstva. Laskavý čtenář (oponenta nevyjímaje) odpustí zjednodušení, kterého jsem se právě dopustil ve snaze hned od počátku okořenit jinak mnohdy pramálo napínavé pasáže zabývající se, dejme tomu, povrchovými molekulami leukocytů a vysvětlit tak právě jejich zajímavost.

Jako nadšený nováček ve světě imunitního systému jsem radostně akceptoval myšlenku, že celý chod evoluce je vlastně zásluhou parazitů, cizopasníků, patogenů a jiné podobné havěti. Určitou podporou tohoto tvrzení jsou nejrůznější práce zabývající se selekčním tlakem parazitů na své hostitele. Před dvěma lety byl vydán článek, který krásným příkladem dokumentuje význam tohoto jevu. Richardson & Westerdahl (2003) studovali jistý vzácný a vysoce inbrední druh endemického rákosníka na Seychelských ostrovech, přičemž je zajímalo, jak si tento druh stojí z hlediska variability jedné vcelku užitečné povrchové molekuly – MHC (*major histocompatibility complex*) glykoproteinu. Obvykle se předpokládá, že populace dlouhodobě držená v malých počtech během několika generací ztratí většinu svého původního polymorfismu. Oč větší bylo jistě překvapení těchto švédských vědců, když přišli na to, že (ačkoliv připustíme celkově chudší alelický repertoár tohoto druhu) některé exony vykazují stejnou variabilitu, jakou zjistili u populace rákosníka velkého, která je mnohonásobně větší. A příčinou této nezvyklé

skutečnosti jsou patrně právě parazité, kteří působí na své rákosníky soustavnou stabilizující selekci.

Při pročítání těchto a jiných podobných prací se člověk vůbec nediví, že to, co Sheldon & Verhulst (1996) nazývají „ekologickou imunologií“, je jedním z nejprogressivnějších se rozvíjejících odvětví ekologie a evoluční biologie. Vždyť například Christe et al. (2001) považují zjištěné míry imunologických parametrů za lepší indikátory budoucího přežití nežli vlastní tělesnou kondici jedince.

Podobně jako to vyjádřil Darwin ve své výše uvedené větě, i já jsem při psaní této práce shledal sebe sama neschopným pouštět se do větších podrobností. I přes veškerou snahu vyhnout se zbytečným detailům, přesáhnul jsem rozsah textu, který je ještě čtenář ochoten číst. I tak si ovšem uvědomuji, jak omezený pohled na tuto poutavou problematiku jsem byl schopen poskytnout. Mnohé by mohlo být doplněno, ledacos by bylo možné vysvětlit lépe. Jistou útěchou je mi myšlenka, že jsem udělal to nejlepší, čeho jsem byl schopen, k tomu, aby byl text zajímavý, logicky sestavený a pokud možno rámcově kompletní a že je tedy jistá šance, že nad touto prací nebude můj oponent zlostí lámat tužku a případní další zájemci o předkládanou látku spisek neodloží, aby si namísto něj otevřeli mnohem napínavěji psanou knihu „Jak se dělá evoluce“ pánů Zrzavého, Storcha a Mihulky (Zrzavý et al. 2004). Zároveň doufám, že mi bude rovněž odpuštěno, že v textu záměrně na většině míst nepoužívám kostrbatější české výrazivo a nahrazuji je pokud možno úmyslně slovy anglickými nebo jen lehce počestěnými.

Čtenáře patrně velmi udiví, že vlastním korelacím mezi zbarvením či délkou per samců a parametry jejich imunity se v této práci věnuji až v úplně poslední kapitole, která při tom nepředstavuje ani polovinu z celého textu. Důvody jsou pro to dva. Jednak korelací je známo relativně dost (příčemž většinu těch, o kterých vím, jsem uvedl), ale o mechanismech, jakými je jejich dosahováno, není známo skoro nic, a jednak jsem přesvědčen, že každá práce má být oproti pracem původním v něčem nová. Každý autor libovolného článku o expresi pohlavních znaků a imunitě shrnuje v úvodu svého článku, jaké jiné souvislosti byly již k tomuto tématu zjištěny. Obvykle se však již nikdo nezabývá vysvětlováním, jaký je rozdíl mezi antigenem a dejme tomu fytohemaglutininem nebo jaké metody by bylo možno použít, aby se konečně zjistilo, co je proximální imunologickou příčinou toho, že někteří ptáci vykazují intenzivnější reakci na fytohemaglutinin než jiní. Křivdili bychom těmto vědcům, kdybychom si mysleli, že nám tyto skutečnosti záměrně zatajují. Pravda je taková, že o situaci u volně žijících ptáků se toho povětšinou moc neví a je tedy potřeba obrátit se ke slepicím. Právě o to jsem se mimo jiné pokusil já.

Všem čtenářům, kteří se dostali až po tyto řádky, děkuji a přeji dostatek odvahy pro zdolání řádků dalších.

V Praze, dne 31.8.2005

Michal Vinkler

III ÚVOD

Imunitní systém představuje bezesporu jednu z bazálních soustav umožňujících přežití jedince v prostředí s existujícími vztahy parazit-hostitel. Jelikož prakticky každý ekosystém na Zemi obsahuje velké množství organismů s parazitickým způsobem života, musel se imunitní systém většiny druhů během své evoluce vyvíjet tak, aby byl schopen adaptivně reagovat na co nejširší a v důsledku koevoluce s parazity také stále se měnící spektrum potenciálně pathogenních stimulů. V evoluci se vyvinulo několik okruhů funkčních mechanismů imunitního systému (zejména T buněčná imunita, humorální imunita, antigenně nespecifická fagocytycká imunita), přičemž každý z nich je účinný proti jinému typu parazitů. Tyto složky imunity jsou provázány složitou soustavou vzájemných regulací. Není zřejmě možné, aby se hostiteli podařilo modifikovat jeho imunitní systém tak, aby dokázal zvítězit nad všemi parazity, kteří na něj mohou působit. Proto každý organismus musí řešit neustálé dilema reálné optimalizace nastavení svého imunitního systému tak, aby dokázal potlačit co největší množství případných parazitů vyskytujících se v jeho okolí. Výsledkem snahy o vyřešení tohoto dilematu je variabilita mezi jedinci, která zaručuje úspěšnější přežití některých jedinců při určitých parazitárních infekcích a jiných jedinců při střetu s jinými druhy parazitů (viz např. pokusy s humorální imunitou Parmentiera et al. 2001). Imunokompetence, označení schopnosti jedince se s parazity vypořádat, tedy nemůže být chápána jako absolutní veličina, ale spíše o ní musíme uvažovat jako o vlastnosti relativní, vztahující se k určitému parazitovi. Proto není vůbec překvapující, že u konkrétního jedince spolu jednotlivé složky imunity (např. humorální, buněčná) nemusí vůbec korelovat, což potvrzují výsledky nejrůznějších studií (např. Cheng & Lamont 1988; Møller & Petrie 2002; Ohlsson et al. 2002). Jako spolehlivější odhad imunitních schopností jedince se proto uvažují mnohočetné testy pokrývající všechny imunologicky významné mechanismy (Dietert et al. 1994). Nastavení složek imunitního systému představuje geneticky podmíněnou antiparazitární strategii jedince, jejíž úspěšnost spolupřispívá ke zvýšení fitness daného jedince. Jelikož se okolní podmínky neustále mění (především v důsledku vlastního koevolučního zápasu s parazity), mění se v čase i úspěšnost jednotlivých strategií. Z hlediska přežití potomstva je výhodné, přecházet mezi různými antiparazitárními strategiemi podle jejich momentální úspěšnosti. Jednou z nejvýznamnějších možností, jak toho docílit, je adaptovat k tomuto účelu svůj pohlavní výběr. Jedinec, který je schopen posoudit úspěšnost strategie svého potenciačního sexuálního partnera, má velkou výhodu, neboť je schopen optimalizovat své investice, a tak maximalizovat svou fitness. Situace je samozřejmě v reálu mnohem složitější – je komplikována mnoha trade-offs, které jsou důsledkem nesmírné komplexnosti fyziologických pochodů v rámci organismu i relativnosti významu různých parametrů kondice organismu v souvislosti s jeho přežitím. Vystává tak celá řada otázek zabývajících se mechanismy těchto procesů i jejich samotným významem

v evoluci pohlavního výběru. Řešení těchto otázek spadá do náplně nového progresivního oboru – *ekologické imunologie*.

Tato práce si klade za cíl shrnout naše dosavadní znalosti o souvislostech tvorby samčích pohlavních znaků u ptáků a jejich závislosti na funkci imunitního systému, přičemž se snaží prozkoumat i možné faktory, které tyto procesy ovlivňují. Jelikož není podle mého názoru možné správně interpretovat imunologická data bez znalosti stavby a funkce imunitního systému, je věnována pozornost také základním otázkám ptačí imunologie, včetně metodologie výzkumu. Existuje jistě celá řada znaků, kterými se ptáci při svém pohlavním výběru řídí. Mezi ty nejdůležitější patří především okázalé optické signály zahrnující nejrůznější barevná pera a tvarově rozmanité orgány. Právě těmito znaky se zabývá další text. Neméně významné jsou pro ptáky ovšem také akustické podněty, zejména zpěv. Stejně jako vizuální ornamenty i zpěv může zprostředkovávat informaci o nejrůznějších fyziologických parametrech určujících kvalitu jedince (viz např. Garamszegi et al. 2003, 2004; Spencer et al. 2003). I přes nesmírnou zajímavost otázek vztahu vokalizace a imunity jsem tyto kapitoly do práce nezahrnul, neboť řádné vysvětlení všech souvislostí a regulačních faktorů by vyžadovalo překročení únosného rozsahu této práce. Podobně se tato práce příliš nezabývá otázkou olfaktorických podnětů, jejichž význam je navíc u ptáků v souvislosti s pohlavním výběrem nejistý.

České názvosloví použité v této práci bylo převzato z Hudec et al. (2003).

IV ZÁKLADNÍ TEORIE A HYPOTÉZY SEXUÁLNÍ SELEKCE

Současné teorie a hypotézy týkající se principu fungování pohlavního výběru jsou většinou zoologů dobře známé, neboť jsou řazeny do náplně základních přednášek studia na vysokých školách, a mimo to je této poutavé problematice rovněž věnována nebyvalá pozornost v popularizační literatuře. Jelikož v posledních letech nic zásadním způsobem nového navrženo v tomto ohledu nebylo, neklade si tato kapitola za cíl nic jiného, než stručným a přehledným způsobem formulovat náš současný pohled na evoluci samčích pohlavních znaků tak, aby se pak již nebylo nutné k těmto základním teoretickým kamenům vracet při pozdějším pojednání o vztahu imunitního systému a ornamentace samců. Jelikož spatřuji mezi většinou do současnosti navržených hypotéz plynulé přechody, nebudu se pokoušet mezi nimi důsledně rozlišovat tam, kde to není potřeba, a spíše se pokusím podat o pohlavním výběru co možná nejucelenější představu, prostou většiny rozporů. Podrobnější přehled o jednotlivých hypotézách lze nalézt v propracovanější podobě např. v česky psané monografii Flegra (2005).

IV.1 *Jak pohlavní znaky vznikají?*

Než tuto otázku zodpovíme, připomeneme, u koho vlastně pohlavní znaky vznikají a kdo je selektuje. Jak se můžeme přesvědčit na mnoha příkladech z živočišné říše, je obvykle vybírajícím pohlavím samice, a to proto, že právě ona obvykle do rozmnožování investuje více a nemá, narozdíl od samce, možnost zvýšit svou exkluzivní fitness tím, že by se pářila s větším počtem partnerů. Jelikož se však v přírodě najdou i výjimky, obecnější pravidlo říká, že vybíravějším pohlavím je to, které zplodí poměrně méně potomků na daný počet kopulací (Andersson & Iwasa 1996). Budeme-li však uvažovat i druhy s natolik vyrovnanými reprodukčními zisky, jaké mají například monogamní pěvci, kde by se mohlo zdát, že samec i samice z jednoho hnízda mají stejnou fitness, protože odchovávají stejná mláďata, stejně zjistíme, že samec narozdíl od samice může počet svých genů předaných do další generace výrazně zvýšit, a to prostřednictvím mimopárových kopulací (avšak srovnej s nástinem samčího výběru v Hill 2002). Předpokládejme proto pro další úvahy, že vybírajícím pohlavím je samice a pohlavím, které exprimuje pohlavní znaky je samec.

Ptáci jsou skupinou, která má díky svému genetickému systému určení pohlaví (ZZ/ZW) silný předpoklad k tvorbě výrazných samčích pohlavních znaků (Reeve & Pfennig 2003). Vysvětlení, jak se může v populaci rozšířit takový pohlavní znak a zároveň preference pro něj, nám poskytuje přírodní výběr (viz např. Hill 2002). Z počátku může být znak, dejme tomu délka ocasu, výhodný z hlediska přežívání samců – samci s o něco málo delším ocasem dokáží o něco lépe manévrovat za letu, a tedy se jich více dožije reprodukčního věku. V populaci samic lze pak předpokládat následný vznik preference pro samce s delšími ocasy, která se bude šířit

proto, že samice, které se páří s dlouhoocasými samci, budou mít letuschopnější potomstvo s větší šancí se rozmnožit. Alternativně bylo ovšem navrženo, že vznik preference předchází vznik vlastního znaku, který je pak teprve dále selektován touto preferencí. Preference pro znak by v tom případě mohla být založena na predispozici samic pro určitý způsob vnímání (*hypotéza smyslového tahu, sensory bias model*; Andersson & Iwasa 1996). Z obou těchto hypotéz však vyplývá, že v této fázi nemusí mít nutně pohlavní znak samců adaptivní význam, resp. jeho význam může být jiný než později. Ve chvíli, kdy se ovšem preference pro určitý znak (ať už jakýmkoliv způsobem) rozšíří mezi samicemi natolik, že ji má většina samic, znak se dále v populaci zrychleně šíří podle *Fisherova runaway modelu* (Fisher 1930 ex Andersson & Iwasa 1996 et Hill 2002 et Flegr 2005 et Ticona & Penna 2003). Ten předpokládá, že pro samici je výhodou zvolit si samce, který nese určitý znak, jež zároveň preferuje většina okolních samic. To proto, že (je-li tento znak do určité míry dědičně podmíněn, což je společným předpokladem pro většinu hypotéz pohlavního výběru) je velká pravděpodobnost, že jej zdědí i potomci těchto samic, kteří tak budou rovněž v dalších kolech pohlavního výběru samicemi přednostně vybíráni. Zároveň s pohlavním znakem samce ovšem potomci dědí také po samici preferenci pro tento znak. Důležité je, že preferenci nelze jednoduše zvrátit, ani pokud je znak nějakým způsobem pro samce nevýhodný. Samice, která by totiž dala přednost samci s kratším ocasem, bude mít samčí potomstvo krátkoocasé, které si většina samic v dalších kolech pohlavního výběru nevybere, takže fitness takovéto samice by se výrazným způsobem snížila. Pohlavní výběr pro daný znak tedy může trvat tak dlouho, dokud jej nezabrzdí protichůdný přírodní výběr, který penalizuje samce nesoucí příliš rozvinutý znak, jenž jim brání dožít se reprodukce nebo dokud exprese znaku nenarazí na nějakou fyziologickou limitaci (Andersson & Iwasa 1996; Møller et al. 1998). Pokud přitom samotná exprese ornamentu není ničím limitována, všichni samci v populaci budou brzy exprimovat znak v maximální možné míře a variabilita mezi nimi bude takřka nulová, takže samice ztratí kritérium pro další výběr a maximálně budou dále penalizovat ty samce, kteří se například v důsledku mutace od obvyklého fenotypu odchýlí. Skutečnost, že k tomu obvykle nedochází, byla popsána jako paradox leku (viz např. Tomkins et al. 2004).

IV.2 Co udržuje variabilitu v pohlavních znacích pro další výběr

Většinou se u pohlavních znaků samců setkáváme s výraznou variabilitou. Bažanti mohou mít ostruhy různě dlouhé (von Schantz et al. 1996), hýlí zbarvení různě intenzivní (Hill 1990), kormoráni chocholky různě veliké (Daunt et al. 2003). Pokud nebudeme uvažovat mutace, které zcela zabraňují tvorbě určitého znaku (viz např. McGraw et al. 2003b), je tedy patrně míra exprese těchto znaků nějakým způsobem limitovaná. Příčina limitace se ovšem neustále mění, což zabraňuje fixaci určitého genotypu, která by způsobila ztrátu variability mezi samci. To by mohlo být řešením lekového paradoxu (Tomkins et al. 2004). Limitace také umožňuje, aby se z pohlavních znaků vzniklých výše uvedeným způsobem vyvinuly čestné indikátory kondice samců, které pak mají zásadní význam pro evoluci daného druhu. Podle příčiny omezení tvorby pohlavního znaku (tedy vlastně nákladnosti určitého znaku pro samce) pak můžeme rozlišovat další hypotézy samicího pohlavního výběru, označované jako „*modely čestné signalizace*“. Než je jednu po druhé zmíníme, připomeňme ještě, že povětšinou nejsou v ostrém kontrastu s Fisherovou runaway hypotézou. Pokud je exprese znaku limitovaná a samicím tedy čestně něco o samci sděluje, zvyšuje to selekční hodnotu preference i znaku, protože z výběru partnera podle takového kritéria má samice výhody, což ovšem neznamená, že stejné kritérium nemůže zároveň přijmout více samic najednou (naopak je to pravděpodobné), a tedy těží samice zároveň i z fisherovské výhody „*sexy synů*“. Je samozřejmé, že mezi samci bude preferována jakákoliv mutace, která bude signál falšovat a vylepšovat, stejně tak jako bude mezi samicemi preferována jakákoliv získaná schopnost tyto falešné signály odhalit. Jedná se tedy o typické „závody ve zbrojení“ mezi samci a samicemi, které vzhledem k tomu, že samice mají ve svém výběru navrch, vedly ke vzniku velmi energeticky i jinak nákladných samčích znaků (Hill 2002). Zmíňme ještě, že nově byla nashromážděna určitá data, která naznačují poněkud odlišný scénář vzniku ornamentu sloužícího čestné signalizaci. Perez-Tris et al. (2002) zjistili, že určité znaky mohou signalizovat například míru parazitace (viz dále), ještě než se z nich stanou znaky později potenciálně podchytitelné pohlavním výběrem.

IV.2.1 Hypotézy dobrých genů versus hypotézy komplementárních genů

Mnoho modelů čestné signalizace je založeno na *nepřímých výhodách*, které samice z kopulace se samcem o vysokém stupni exprese pohlavního znaku získává (srovnej s *přímými výhodami*, viz podkapitola IV.2.2). Je totiž v zájmu každé samice zplodit maximální možný počet potomků, kteří ovšem budou zároveň sami maximálně úspěšní v rozmnožování, tak, aby i oni dále plodili maximální možný počet potomků. Z tohoto důvodu nemůže samice svou reprodukci maximalizovat, ale musí ji optimalizovat. Nebudeme-li se zabývat stránkou strategií energetického rozložení výdajů na reprodukci, může samice optimalizovat reprodukční potenciál svých potomků také volbou vhodného partnera. Samec jednak u některých druhů

zajišťuje mláďatům potravu a ochranu v době, po kterou je o ně ještě rodiči pečováno (viz podkapitola IV.2.2) a jednak jim vždy předává část své genetické výbavy, která může významným způsobem ovlivnit vývin jejich fenotypových znaků. Ačkoliv je patrně vliv genotypu samce na vlastní viabilitu mláďat relativně malý, může být i tak z hlediska samičí volby důležitý (viz např. Møller & Alatalo 1999). Následující hypotézy tedy předpokládají, že to, oč samici v pohlavním výběru jde, je co nejpřesnější odhadnutí genetických vlastností různých samců. Při tom účel i prostředky tohoto posuzování se mohou lišit.

Účelem volby samice rozumějme to, zda samice posuzuje samcův genotyp proto, aby odhadla, jestli jsou v něm zastoupeny „kvalitní“ alely, které svým výběrem preferuje (*good gene model*) nebo zda posuzuje jeho celkové složení, například ve vztahu ke genotypu vlastnímu (*complementary/compatible gene model*; Trivers 1972 ex Westneat & Birkhead 1998 et Mays & Hill 2004). Jak hypotézy dobrých genů, tak i hypotézy komplementárních (kompatibilních, srovnej s Pialek & Albrecht 2005) genů předpokládají, že selektovaný samčí znak je alespoň do určité míry dědičný, a to proto, že odráží existenci určitých genů, které samy dědičné jsou. Důležitý rozdíl mezi oběma skupinami hypotéz ovšem spočívá v tom, že hypotézy dobrých genů předpokládají předání „dobré“ alely, která pak způsobí u potomka elaboraci daného znaku v podobné míře jako u otce, zatímco hypotézy komplementaristické tvrdí, že exprimovaný znak je podmíněn součinností samčích i samičích alel v organismu potomka, a tedy i exprimovaný znak je výslednicí kombinace obou rodičovských haplotypů. V druhém případě je proto samičí obvykle vybírán samec nesoucí pokud možno co nejodlišnější genotyp, aby bylo potomstvo co nejvíce heterozygotní, jelikož heterozygotnost přináší organismu mnoho různých výhod (např. v genech pro MHC vyšší rezistenci vůči parazitům; viz kapitola V.2 a část VII). Tato odlišnost způsobuje rozdílné předpoklady obou skupin hypotéz. Pokud funguje pohlavní výběr podle hypotéz dobrých genů, budou si všechny samice přednostně vybírat stejného samce. Pokud jsou ale platným modelem hypotézy komplementárních genů, pak se ve své volbě shodnou pouze geneticky si blízké samice, zatímco samice různých genotypů si budou vybírat naprosto odlišné samce.

Na tomto místě je potřeba zmínit, selekce jakých samčích genů že by mohla představovat zisk z hlediska budoucího fitness mláďat. Je zřejmé, že to musí být geny, u nichž se relativní výhodnost jedné alely vůči alele jiné neustále nepredikovatelně mění, a to proto, že v opačném případě by se v důsledku selekce samicemi brzy jedna z alel fixovala. Takovéto geny s měnícím se selekčním koeficientem pro jednotlivé alely při tom představují například geny zúčastněné v rezistenci vůči parazitárním infekcím (např. díky frekvenčně závislé selekci resp. selekci ve prospěch vzácných alel vyvolané protitahy parazita jsou neustále preferovány jiné alely MHC (Zelano & Edwards 2002; Freeman-Gallant et al. 2003). Jak zjistili např. Møller et al. (2005), může být přítom specializace parazitů důsledkem intenzity imunitní obrany

hostitele, takže se jedná o intenzivní „závody ve zbrojení“, v nichž není parazit nikterak pasivním subjektem (viz např. Møller & Rozsa 2005). Právě rozhodující úlohu takovýchto genů při expresi pohlavních znaků tedy předpokládá skupina hypotéz parazity-zprostředkované sexuální selekce (*parasite-mediated sexual selection*, původně navrženo Hamilton & Zuk 1982 ex von Schantz et al. 1996 et Westneat & Birkhead 1998). Z této hypotézy vyplývá, že na vnitrodruhové úrovni budou mít rozvinutější ornament zdravější samci, neboť pouze oni si mohou dovolit vyvinout nákladný pohlavní znak. Na mezidruhové úrovni pak Hamiltonova-Zukové hypotéza předpokládá, že výraznější ornamenty by měli mít samci více parazitovaných druhů, jelikož u těchto druhů působí intenzivnější selekční tlak na vznik spolehlivých indikátorů rezistence vůči parazitům. Pokud tedy budeme v souladu s těmito hypotézami předpokládat signalizaci rezistence vůči patogenům, pak je zřejmé, že oba zde uváděné koncepty (dobré geny a komplementární geny) se nezbytně nevylučují a mohou se oba uplatnit za poněkud odlišných situací. Selekcí ve prospěch dobrých genů můžeme očekávat tam, kde je populace sužována jediným dominantním parazitem, zatímco výběr podle komplementarity genotypů obou rodičů tam, kde je parazitů mnoho různých druhů (Mays & Hill 2004, též část VII). Právě tyto skutečnosti by snad mohly stát za rozdíly v imunokompetenci vnitro- a mimopárových mláďat zjištěnými i mezi tak ekologicky si navzájem blízkými druhy, jakými jsou slavík modráček (*Luscinia svecica*, Johnsen et al. 2000) a strnad rákosní (*Emberiza schoeniclus*, Kleven & Lifjeld 2004). Není ovšem nutno uvažovat pohlavní výběr založený na dobrých genech jako alternativu pohlavního výběru na základě komplementarity. Jak zmiňují Mays & Hill (2004) je možná i kombinace obou výběrů, kdy samice nejdříve vybírají na základě jednoho kritéria (např. nositele dobrých genů) a mezi takto vyselektovanými samci pak podle kritéria druhého (např. jedince geneticky co nejkomplementárnější).

Je zřejmé, že komplementarita genotypu samce v systému, kde existuje mnoho různých alel posuzovaných genů, je jen těžko sdělitelná. Nemáme proto přesnou představu, na základě čeho by samice mohly vybírat mezi potenciálními sexuálními partnery. Určitou možností v případě některých genů by snad mohlo být olfaktorické vnímání (u savců např. Leinders-Zufall et al. 2004, pro ptáky srovnej se Zelano & Edwards 2002) nebo postkopulační kompetice spermií, jak navrhuje např. Mays & Hill (2004). Mnoho úvah v této souvislosti proto směřuje spíše k vyhýbání se inbreedingu, neboť příbuznost lze signalizovat i vizuálně, resp. příbuzní jedinci žijí v určitých komunitách (např. Dale 2000; Foerster et al. 2003). Naproti tomu bylo pro selekci na základě dobrých genů navrženo hned několik různých možných mechanismů, kterými by mohla být kvalita samce samicemi odhadována. Zdá se, že při signalizaci „dobrých genů“ u ptáků by ústřední úlohu mohly hrát právě opticky vnímatelné pohlavní znaky. Podle mechanismu spojení exprese sexuálních znaků a selektovaných alel můžeme rozdělit následující hypotézy.

Hypotéza limitace zdrojů

Podle této hypotézy nemohou všichni jedinci exprimovat pohlavní znak ve stejné míře, neboť nejsou za daných podmínek schopni získat dostatek energetických nebo mikronutričních zdrojů, které jsou pro tvorbu znaku potřeba. Nedostatek využitelných zdrojů přitom nemusí nutně vyplývat pouze z neschopnosti jedince tyto zdroje nalézt, ale možná je také limitace jeho schopností je uhájít před jinými jedinci (zde se pak uplatňuje např. míra dominance) nebo omezenost fyziologické schopnosti přijímané látky absorbovat, transportovat, metabolizovat a deponovat do pohlavního znaku (viz Hill 2002). Všechny tyto kroky tvorby ornamentu jsou významným způsobem ovlivňovány jednak současnou kondicí jedince a jednak mírou parazitace, která s ní bezprostředně souvisí (Hamilton & Zuk 1982 ex Westneat & Birkhead 1998 et Møller et al. 1999 et Lochmiller & Deerenberg 2000 et Saks et al. 2003 et Flegr 2005). Jelikož využitelné množství mnoha zdrojů je pro organismus omezeno, byla navržena řada trade-offs, které by se při expresi pohlavních znaků samců mohly uplatňovat. Jedním z nich je i trade-off mezi alokací energetických zdrojů do reprodukce, resp. tvorby sexuálních ornamentů a udržování funkčního imunitního systému (Westneat & Birkhead 1998). Imunitní systém sám o sobě nepředstavuje proporčně významnou součást organismu, a není tedy přílišnou zátěží jeho samotná existence. Nákladnost imunity se projeví až po jeho aktivaci v průběhu parazitární infekce (Raberg et al. 1998), kdy v důsledku imunitní regulace jedinec přestává přijímat potravu, zvyšuje svůj metabolický obrat a mění mnoho fyziologických pochodů, což jsou všechno jevy, které způsobují značné ztráty nutričních zdrojů (Lochmiller & Deerenberg 2000; srovnej též s Hõrak et al. 2003). Proti tomuto pojetí smyslu prezentace samčích ornamentů je možno namítnout, že se ornamenty většinou utváří mnohem dříve, než k vlastnímu samičímu výběru dojde (příkladem může být peří; Jenni & Winkler 1994), takže samice může posoudit, jaký zdravotní stav měl samec v době přepeřování, ale nikoliv, jak je na tom v současné době. Ačkoliv je toto jistě obava oprávněná, lze předpokládat, že jedinci jsou napadáni různými parazity prakticky neustále (především v době hnízdění, ale i během zimování v teplých krajích), takže je velká pravděpodobnost, že samec, který netrpěl chorobami dříve, k nim bude méně náchylný i v době reprodukce. Mimo to bylo ukázáno, že schopnost samce imunologicky reagovat na antigenní podněty v různých částech roku spolu obvykle koreluje (viz např. Saks 2004). Mimo to, existují i znaky (např. hřebínek kura, Zuk 1996 nebo barva zobáku kosa, Faivre et al. 2003a), které skutečně spolehlivě odrážejí i samcův aktuální stav. Je také zároveň potřeba si uvědomit, že ačkoliv jedinec investuje mnoho energie do údržby imunitního systému, je otázkou jeho genetické výbavy, jak moc se bude schopen vypořádat s konkrétní parazitární infekcí a kolik energie do jejího překonání bude muset investovat. To proto, že různé genotypy jsou různě citlivé vůči různým parazitům a neexistuje univerzální genotyp, který by byl rezistentní vůči všem parazitům (Westneat & Birkhead 1998; viz také

poznámky o koevoluci parazita a hostitele výše). Přitom jedinec, který je odolnější vůči hlavním parazitům v populaci, neztrácí tolik na příjmu energetických zdrojů a může tedy investovat více energie jak do tvorby ornamentu tak i do dalších imunitních reakcí (Saks 2004). V podstatě totéž, co bylo právě zmíněno pro energetické zdroje, by pak mělo platit i pro minoritní avšak fyziologicky významné složky potravy, jakými jsou například karotenoidy. Pomocí trade-off mezi jejich upotřebením v imunitním systému a depozicí v ornamentálních perech je často vysvětlována variabilita zbarvení samců mnoha druhů (Olson & Owens 1998, avšak srovnej s Hill 2002). Z výše uvedeného tedy vyplývá, že měření imunitní reakce je patrně spolehlivější znak kvality samce než vyšetření přítomnosti některého konkrétního parazita, a to především proto, že parazitů působí na hostitelský organismus veliké množství současně a je jen velmi těžké dopředu rozhodnout, kteří z nich mají na fitness svého hostitele natolik významný vliv, že má cenu je v souvislosti s pohlavní signalizací uvažovat (Møller et al. 1999).

Hypotéza handicapu

Zahavi (1975; ex Ticona 2003 et Hill 2002 et Flegr 2005) navrhnul, že by sekundární samčí pohlavní znak mohl hrát roli handicapu, který by byl nefalšovatelným indikátorem kvality samců. Podle této hypotézy by byla vyšší pravděpodobnost, že by samec doživil se reprodukčního věku s ocasem dlouhým tak, že by mu ztěžoval let, byl kvalitnější, než samec s ocasem kratším. To v podstatě znamená, že samec musí vybalancovat míru exprese svého pohlavního znaku tak, aby s ní byl ještě schopen úspěšně přežít, a nebylo to pro něj příliš vyčerpávající ve smyslu jeho reprodukčního potenciálu v následujících sezónách. Ve vztahu k fungování imunitního systému byla navržena hypotéza imunokompetenčního handicapu (*Immunocompetence handicap hypothesis*; viz např. Sheldon & Verhulst 1996), která předpokládá, že androgeny (zejm. testosteron) zvyšují expresi pohlavních znaků a zároveň působí imunosupresivně. Proto samec, který nese nejrozvinutější sekundární pohlavní znak, má v krvi nejvíce testosteronu, který ovšem omezuje výkonnost jeho imunitního systému, což si může dovolit pouze tehdy, když je jeho organismus (nebo nějaká jeho fyziologická či přímo imunologická složka) v tak dobrém stavu, že úspěšně přežije i s touto zátěží. Na nedostatky tohoto pojetí hypotézy handicapu upozornil například (Hill 2002), který namítnul, že by samci brzy vynalezli způsob, jak znak exprimovat i bez imunosupresivního testosteronu. Zdá se tedy, že příčina handicapu není vlastní imunosupresivnost testosteronu, ale trade-off mezi náklady na imunitu a reprodukci, přičemž testosteron je pouze signální látka, kterou organismus využívá k optimálnímu nastavení rozložení zdrojů (viz též (Saino et al. 1995) nebo asociace s kortikosteronem v (Buchanan et al. 2003) a (Owen-Ashley et al. 2004). Tomu by také mohly odpovídat mnohdy rozporuplné výsledky výzkumu vlivu testosteronu na imunitní systém (kapitola V.7.5). Imunitní systém by také jako součást fyziologie jedince mohl být s expresí pohlavního znaku propojen přes tělesnou kondici (viz např. Møller 1995, ale srovnej

s Owens & Short 1995). Rozdíl oproti předchozí hypotéze je tedy především v tom, že znak neodráží pasivně současný stav, ale je produktem plánování organismu. Je zřejmé, že v reálu se důsledky plynoucí z těchto dvou hypotéz budou patrně prolínat.

IV.2.2 Hypotézy přímých výhod pro samici

Tato skupina hypotéz předpokládá, že si samice volí své partnery podle určitého znaku proto, že tento znak indikuje samici některé bezprostřední výhody jejich nositele (Andersson & Iwasa 1996). Těmito bezprostředními výhodami může být samcův dobrý zdravotní stav, který zajišťuje, že na samici ani mláďata nepřenesou žádné parazitární choroby (viz např. Hillgarth 1996; Møller et al. 1999), jeho schopnost vyprodukovat dostatek kvalitních spermií (Blount et al. 2001) nebo schopnost přispět co nejvíce při výchově mláďat (model „dobrého rodiče“, *good parent model*; Hoelzer 1989). Příkladem poslední uvedené možnosti může být červené zbarvení hrudi kardinála červeného (*Cardinalis cardinalis*), indikující schopnost samce zajistit mláďatům dostatek potravy (Linville et al. 1998). Existují při tom dva alternativní pohledy, jaký signál by měl podle těchto předpokladů samec vydávat. První hypotéza říká, že samec v lepší kondici je zároveň schopnějším rodičem a při tom dokáže elaborovat energeticky či fyziologicky nákladný znak (viz např. Hill 1991). Druhá hypotéza naopak tvrdí, že samec, který je v dobré kondici a dokáže vytvořit nákladný znak, nese zároveň „dobré geny“, pro něž si jej samice vybírají, zatímco samec, který není tak kvalitní a nedokáže tedy exprimovat tak náročný pohlavní ornament, musí (aby měl vůbec šanci se rozmnožit) být zároveň pečlivým rodičem, pro kteroužto vlastnost si jej alespoň některé samice zvolí. Tuto hypotézu, zdá se, potvrzují výsledky studií na americkém hýlu mexickém (*Carpodacus mexicanus*; shrnuto v Hill 2002). Z toho je zřejmé, že je pro samici výhodou s takovými samci uzavírat páry, ale nejlepší je, jelikož zároveň nenesou ty nejlepší možné genetické vlastnosti, je v zápětí podvést a nechat je vychovávat alespoň část kvalitních mláďat zplozených s někým jiným. Zde lze tedy ku příkladu hledat příčinu existence mimopárových kopulací (srovnej se Zelano & Edwards 2002).

Tato skupina hypotéz, jak patrně, naznačuje spojení mezi pohlavními znaky a fungováním imunitního systému, které je do určité míry obdobné jako u hypotéz „dobrých genů“. Možný je tedy nepřímý vztah přes kondici a rezistenci vůči parazitům. Důležitý je ovšem rozdíl mezi oběma výše uvedenými hypotézami ve významu informace o stavu samcova imunitního systému. Zatímco ve světle první hypotézy těží samice nejen z kondice svého partnera, ale také ze skutečnosti, že zdravý samec ji nebo její mláďata nemůže nakazit parazity, pokud si volí samice méně zbarveného samce podle hypotézy druhé, žádnou takovouto výhodu předpokládat nemůže.

IV.3 Základní typy pohlavních znaků

Na tomto místě pouze ve stručnosti nastiňme existenci nesmírné diverzity utvářených samčích pohlavních znaků v rámci ptáků a rozdělme si tyto znaky do několika logických skupin. To proto, aby bylo zřejmé, jakými strukturami se budeme dále zabývat. V detailu bude jednotlivým ornamentům věnována pozornost později v části IX.

Způsob života předurčil většině druhů ptáků maximální vnímavost na optické podněty. Prakticky všechny do současnosti studované prostředky pohlavní selekce u ptáků byly proto vizuální povahy. Samčí sekundární pohlavní struktury můžeme rozdělit na znaky morfologické, u nichž hraje rozhodující vlastností tvar struktury, její délka nebo výška a na znaky pigmentosní, u kterých je rozhodující vlastností jejich barva nebo jiná charakteristika ornamentálního opeření (např. velikost plochy peří určité barvy). Samozřejmě ne vždy je možno tyto dvě hlavní skupiny znaků striktně odlišit, protože i u typicky morfologického znaku, jakým je dlouhý ocas, může mít signální význam zároveň jeho zbarvení.

U mnoha skupin ptáků je určujícím signálním znakem právě samčí zbarvení. Jak se zdá, nejedná se při tom ovšem vždy pouze o znak jeden, ale někdy lze ve zbarvení rozlišit celou řadu dílčích znaků (viz např. Badyaev & Young 2004). Můžeme například definovat jas barvy, tón barvy a intenzitu (saturaci) barvy nebo podle kritérií vlnových délek odráženého světla komponenty PC1, PC2 a PC3. Dále rozlišujeme velikost plochy zbarvení, délku či šířku skvrn a proužků nebo symetrii zbarvení. Například u samců hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) lze rozpoznat význam prakticky všech těchto komponent barevného ornamentu nacházejícího se především na hlavě a hrudi (Hill 1991; Hill 2002). Podobně bylo zjištěno, že pohlavním znakem je intenzita žlutého zbarvení břišní strany těla samců zvonka zeleného (*Carduelis chloris*; Saks et al. 2003), velikost žlutého proužku v křídle čížka obecného (*Carduelis spinus*; Senar et al. 2005) nebo třeba tón žlutého zbarvení zobáků kosů (*Turdus merula*; Faivre et al. 2003a; Faivre et al. 2003b) a kachen (*Anas platyrhynchos*; Peters et al. 2004a; Peters et al. 2004b). Všechny tyto jmenované znaky jsou karotenoidní povahy. Podobně však slouží i melaninové náprsenky vrabců (*Passer domesticus*; Gonzalez et al. 1999; Poiani et al. 2000; McGraw et al. 2003a), černobílé ocasy ťuhýků (*Lanius collurio*; Votýpka et al. 2003) či modravé zbarvení modropláštníků nádherných (*Malurus cyaneus*; Peters et al. 2000) nebo strukturní zbarvení vlhoveců hnědohlavých (*Molothrus ater*; McGraw et al. 2002). Jak bude ukázáno v kapitole IX.I. signalizují tyto odlišné chromatofory o svých nositelích různé informace.

Morfologické samčí pohlavní znaky zahrnují především ornamentální pera, která nacházíme například v ocase páva (*Pavo cristatus*; Møller & Petrie 2002) nebo v chocholce kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*; Daunt et al. 2003).

Pohlavní znaky ovšem nepředstavují pouze pera, ale také lysé části pokožky, zejména laloky, jako např. u krocana divokého (*Meleagris gallopavo*; Buchholz et al. 2004) a bažanta obecného (*Phasianus colchicus*; Ohlsson et al. 2002), nebo temenní hřebínky (u kura *Gallus gallus*; Zuk et al. 1995) či nadočnicové hřebínky (např. u bělokurů, *Logopus lagopus* Mougeot et al. 2004). Právě plochy holé kůže často vysílají zároveň barevné signály. Zcela jiným příkladem morfologického typu znaku mohou být ostruhy bažanta (von Schantz et al. 1996). Také pro tyto znaky se předpokládá kondiční či genotypová závislost, o které se však blíže zmíníme v kapitole IX.2.

V IMUNITNÍ SYSTÉM PTÁKŮ

Tato obecněji pojatá kapitola o ptačím imunitním systému se patrně poněkud vymyká rozsahu zaměření této práce. Jelikož obecná ani speciální imunologie nebývá obvykle předmětem zájmu většiny zoologů, rozhodl jsem se ji do textu zahrnout pro snazší srozumitelnost problematiky rozebírané v kapitolách dalších. Uvádím zde základní funkční součásti imunitního systému ptáků a mechanismy jejich působení, aniž by bylo zabíháno do přílišných (v rámci celku nepodstatných) detailů. Text je zde strukturován spíše encyklopedicky, v souladu se současným stavem základního poznání v imunologii. Proto je možné tuto část práce libovolně přeskočit a vracet se k ní vždy jen v těch odstavcích pozdějších kapitol, ve kterých se objeví blíže necharakterizovaný imunologický jev.

Ptačí imunitní systém je ve svém fungování v podstatě jedním z nejdokonalejších prototypů obratlovčí imunity. Nese všechny její obecné základní znaky, avšak oproti obdobně rozvinutému savčímu imunitnímu systému má i svá specifika. Některá z nich jsou zmíněna v následujících odstavcích, mnohá však lze nalézt až na úrovni molekulární. Ty jsou ale pro potřeby ekologické imunologie (snad prozatím) spíše nevýznamné. Využití v současnosti známých imunologických dat a metodických postupů v ekologických a evolučně-biologických studiích poněkud komplikuje skutečnost, že prozatím byly studovány pouze (nebo převážně) hospodářsky významná zvířata – zejména hřabaví (kur, křepelka, krocan) nebo vrubozobí (kachna), přičemž skutečným modelovým druhem je pouze kur domácí (*Gallus domesticus*). Nedostatečnost našich informací o jiných druzích by mohla představovat problém při aplikaci dosud známých poznatků na mnohé volně žijící druhy ptáků patřící do jiných řádů.

V.1 Buňky ptačího imunitního systému a jejich důležité povrchové molekuly

Obecně lze rozdělit buňky imunitního systému do dvou hlavních skupin podle směru procesu jejich diferenciaci z kmenových buněk kostní dřeně – na buňky myeloidní a lymfoidní linie. Mimo to jsou imunitně významné ještě buňky, které svůj původ v krvetvorných buňkách nemají – např. folikulární dendritické buňky (*Follicular dendritic cells*, FDC) a jako buňky prezentující potenciálně nebezpečné antigeny vlastně všechny buňky exprimující MHC gp I – tedy v podstatě veškeré buňky organismu, ačkoliv ty se za buňky imunitního systému samozřejmě nepovažují.

Pro identifikaci jednotlivých leukocytárních typů se v imunologii obvykle používá jejich povrchových markerů, tedy antigenních struktur rozpoznatelných pro monoklonální protilátky. Pro ptáky bylo zavedeno vzhledem k odlišnostem zvláštní CD (*cluster*

of differentiation) kódování, odlišné od CD názvosloví pro savce (Jeurissen et al. 1998). Vzhledem k doposud omezeným provázanostem výzkumu ptačích povrchových markerů nesou CD označení pouze prokázaná homologa savčích CD molekul. U ostatních je použito počáteční písmeno druhu, u něž byl marker objeven (písmeno ch pro kura, *chicken*, q pro křepelku, *quail* a t pro krocana, *turkey*), následuje písmeno označující buňku, na níž se daný marker převážně nachází (T pro T lymfocyt, B pro B lymfocyt a L pro antigeny přítomné na více než jednom leukocytárním typu) a dále číslo označující daný antigen. Patrně na všech ptačích leukocytech se nachází antigeny ChL2, ChL3 a CDw45 (stejně jako CD45 u savců), dále ChL9 a ChL10 a na většině leukocytárních typů též ChL7 (Jeurissen et al. 1998). V následujícím textu jsou uváděny pouze ty povrchové markery, které se vyskytují na leukocytárních stádiích v krevním řečišti a periferních lymfatických tkáních (tedy ne ty, které nacházíme na nezralých stádiích, jakými jsou thymocyty a bursocyty).

V.1.1 Myeloidní linie

Z prekursorových buněk myeloidní linie se diferencují jednak erythroblasty (1) směřující dále k erythrocytům (u ptáků normálně jaderným), jednak megakaryocyty (2), které se později dále vyvíjejí v trombocyty (i ty jsou u ptáků jaderné), a dále pak granulocyty (3) (nezávisle heterofilní, bazofilní a eosinofilní) a monocyty (4), které v příslušných tkáních dávají vzniknout dendritickým buňkám a makrofágům (Lucas & Jamroz 1961). Heterofilní granulocyty, eosinofilní granulocyty a monocyty/makrofágy patří do skupiny buněk, které označujeme jako fagocyty, neboť fagocytují částice ze svého okolí nesoucí na svém povrchu definované, evolučně konzervativní struktury (tzv. PAMP – *pathogen associated molecular patterns*, např. bakteriální LPS). Tyto struktury fagocyty rozpoznávají pomocí nejrůznějších receptorů, mezi které patří i TLR (*Toll-like receptors*). U kura byl definován chTLR2 typu 1 a 2, které patrně vznikly genovou duplikací a jsou nejvíce homologní savčímu TLR2. ChTLR2 typu 2 váže jak lipoproteiny tak lipopolysacharidy a funkčně tak odpovídá savčímu TLR2 i TLR4 (Fuku et al. 2001). Definován byl také ChTLR4 (viz např. Dil & Qureshi 2002; Leveque et al. 2003). Iqbal et al. (2005a) uvádějí existenci chTLR3. Nově byl u kura identifikován také TLR7 hrající roli v antivirové vrozené imunitě (Philbin et al. 2005). V návaznosti na zveřejnění osekvenovaného kuřího genomu byly na základě sekvenčních analýz rozpoznány také ptačí orthology savčích TLR1 (typu 1 a 2), TLR3, TLR5 a TLR7, přičemž nebyly nalezeny žádné sekvence odpovídající savčímu TLR9 ani TLR10 a ani TLR8 (Yilmaz et al. 2005). Naproti tomu Philbin et al. (2005) objevili sekvenci homologní s TLR8 lokusem savců, avšak tato je patrně nefunkční, neboť je do ní zasazen gen pro TLR7. Iqbal et al. (2005a) pak identifikovali chTLR1/6/10 sekvenčně podobného savčím TLR1, 6 a 10, přičemž se zdá, že tyto savčí TLR vznikly duplikacemi až po odštěpení savčí evoluční linie od ptačí. Ani oni

však neidentifikovali u kuřete žádné homology savčích TLR9 či TLR11. Byla také naznačena existence obdobných signálních drah jako u savců (Lynn et al. 2003). V současné době se začínají objevovat první práce prokazující funkční význam některých nově objevených kuřecích TLR (Kogut et al. 2005a; Iqbal et al. 2005b). Fagocyty dále pohlcují i částice opsonizované protilátkami a složkami komplementu.

Společným markerem všech buněk myeloidní linie a T buněk je ChL13, který je ligandem CD6, tedy adhesivní molekulou aktivovaných leukocytů (Jeurissen et al. 1998).

Heterofilní granulocyty

Jejich funkce je velmi obdobná funkci neutrofilních granulocytů savců – spolu s makrofágy fagocytují antigenní částice (viz např. Kogut et al. 2002; Kogut et al. 2003). Mimo to produkují i cytokiny a chemotaktické molekuly, které do místa infekce navádějí lymfocyty a stimulují prozánětlivou reakci (Lam 2002; Kogut et al. 2003).

Histologicky se heterofilní granulocyty vyznačují především vřetenovitým tvarem svých granul, která se May-Grünwaldovým nebo Wrightovým barvivem zbarvují červeně (Lucas & Jamroz 1961). Tato granula lze rovněž barvit fluorescenčně fluorescein isothiokyanátem, FITC, což by bylo možno použít při stanovení relativního množství heterofilů v krvi nebo pro sledování průběhu degranulace po stimulaci buněk aktivačními agens, např. LPS (Rath et al. 1998). V krevním nátěru představují spolu s lymfocyty dominantní složku, často kolem 50%: kur podle plemene 13,3-35,1%, kachna 31-57%, berneška 24-57%, bažant 34-75%, holub 29-66% (Lucas & Jamroz 1961).

Bazofilní granulocyty a mastocyty

Bazofilní granulocyty jsou funkčně velmi podobné mastocytům, s nimiž bývají často spojovány. Jedná se v obou případech o buňky hrající významnou roli v imunitních reakcích směřujících proti mnohobuněčným parazitům, které atakují degranulací svých granul, která obsahují hydrolitické enzymy a biogenní aminy. V krevním nátěru bývají bazofily spíše minoritní složkou, obvykle kolem 3%: kur podle plemene 2,1-3,1%, kachna 2-11%, berneška 0-5%, bažant 3-19%, holub 1-6% (Lucas & Jamroz 1961).

Eosinofilní granulocyty

Tyto buňky jsou fagocyty, které mají patrně svůj význam v prozánětlivé obraně proti mnohobuněčným parazitům. V krevním nátěru představují rovněž spíše menšinovou složku, často kolem 1%: kur podle plemene 1,2-2,5%, kachna 3-11%, berneška 2-15%, bažant 0-4%, holub 0-4% (Lucas & Jamroz 1961).

Monocyty / makrofágy

Makrofágy jsou klíčové regulační a výkonné buňky účastníci se jak vrozených (antigenně nespecifických) tak i adaptivních (antigenně specifických) imunitních mechanismů (Klasing 1998a). V důsledku stimulace T_H1 buňkou se makrofág mění na aktivovaný makrofág, který pomocí baktericidních mechanismů, jakými je např. produkce oxidu dusnatého (NO), účinně likviduje intracelulární parazity (Guillermo & DaMatta 2004). Okamura et al. (2004) prokázali u kura zvýšenou koncentraci NO v séru 4-14 dní po vakcinaci flagely *Salmonella enteritidis*. Někteří parazité (např. *Toxoplasma gondii*) jsou ovšem schopni potlačovat produkci NO v makrofázích, a to i přes skutečnost, že i na ně má uvolňovaný NO cytostatický účinek (Guillermo & DaMatta 2004). NO ovšem zároveň také potlačuje aktivitu lymfocytů (Dietert et al. 1994). Mimo to produkují makrofágy například chemotaktickou molekulu *MIP-1 β* , která atrahuje do místa infekce heterofily a lymfocyty (Lam 2002). Některé makrofágy exprimují ChL4 a CD45R1 (Jeurissen et al. 1998). Pro identifikaci monocytů/makrofágů byly vyvinuty monoklonální protilátky, které jsou schopny je specificky označit (Jeurissen et al. 1992; Kaspers et al. 1993). V krevním nátěru bývají zastoupeny kolem 5%: kur podle plemene 1,1-6,4%, kachna 3-15%, berneška 2-11%, bažant 2-23%, holub 4-25% (Lucas & Jamroz 1961).

V.1.2 Lymfoidní linie

V rámci lymfoidní linie diferencují stejně tak jako u savců T a B lymfocyty a NK buňky. Zásadní odlišnost obou skupin obratlovců spočívá ovšem v tom, že narozdíl od savců, u kterých k diferenciaci B buněk dochází v kostní dřeni, je vývoj B lymfocytů u ptáků vázán na prostředí ve Fabriciově burse (Arstila & Toivanen 1998). T i B lymfocyty představují klíčové buňky antigenně specifických imunitních mechanismů, NK buňky slouží především jako nástroj kontroly exprimace MHC gp molekul na povrchu buněk organismu, což umožňuje eliminovat případné intracelulární parazity, kteří se naučili tímto způsobem potlačovat MHC gp prezentaci svých antigenních molekul. Mimo to hrají NK aktivní buňky významnou úlohu v protinádorové imunitě (viz např. Fleischer 1980; Chai & Lillehoj 1988). Pro T a B buněčnou imunitu je charakteristická imunologická paměť – po prodělané primární infekci v organismu zůstávají tzv. *paměťové buňky*, které jsou zodpovědné za rychlou a efektivní odpověď organismu na opětovnou, sekundární infekci (u ptáků viz např. Rose et al. 1979; Nordling et al. 1998; Saino et al. 2003c; Beal et al. 2004).

Povrchovými markery exprimovanými na všech lymfocytech jsou CD5, ChL4, na většině CD57 a na některých T i B buňkách ChLw5, ChL6, ChL12 (Jeurissen et al. 1998). Prozatím nebyly u kura identifikovány žádné specifické markery NK buněk, ačkoliv existují přesvědčivé důkazy o existenci funkčních homologů těchto buněk u ptáků (Wakenell 1998). Gobel

et al. (2001) definovali NK buňky kura jako $CD8^+CD3^-$ bez TCR či BCR, načež vyvinuli protilátku rozpoznávající intestinální NK buňky $CD3^-$ od T buněk ($CD3^+$). Podle těchto kritérií identifikovali 30% $CD8^+$ buněk v intestinálním epitelu, ale méně než 1% buněk v krvi a ve slezině jako NK buňky.

Jednotlivé populace lymfocytů (B a T) není v krevním nátěru možno rozlišit. Proto se udává pouze celkový zjištěný počet lymfocytů. Ten představuje obvykle majoritní složku celkového množství leukocytů ve vzorku periferní krve, často přes 50%: kur podle plemene 64-76,1%, kachna 24-49%, berneška 30-66%, bažant 10-63%, holub 8-51% (Lucas & Jamroz 1961).

B lymfocyty

Antigenně specifická imunita založená na protilátkách je zprostředkována především vzájemným kontaktem a stimulací B lymfocytů, T_H lymfocytů a antigen prezentujících buněk (APC) v lymfatické tkáni.

Mnoho antigenů vyvolává protilátkovou odpověď B lymfocytů pouze za podpory T_H buněk. Tyto antigeny označujeme jako T-dependentní antigeny. Jiné, T-independentní antigeny, jsou schopny stimulovat diferenciaci B buněk a sekreci protilátek i bez účasti T_H lymfocytů (především polysacharidy). V tomto případě se jako superantigeny na BCR nespecificky váží například bakteriální lipopolysacharidy (LPS) přítomné ve vyšších koncentracích. BCR je tím nespecificky stimulován a dochází k produkci nízkoafinitních protilátek isotypu IgM. LPS tak funguje jako mitogen B buněk. Podobně účinkují i polymerní proteiny. T-dependentní a T-independentní antigeny se liší i ve své cytokinové a hormonální regulaci a vlivu na redistribuci lymfocytů z periferní krve do sekundárních lymfatických orgánů (Gehad et al. 2002a; Gehad et al. 2002b). Pokud je antigen stimulující BCR T-dependentní, má následující proces dvě fáze. Během první, primární, dochází mimo vlastní stimulace B buňky antigenem současně k pohlcení tohoto antigenu APC, jeho následné prezentaci na jejím MHC gp II a rozpoznání tohoto komplexu prekurzorovou T buňkou, která se pak následně mění ve zralou T_H2 buňku poskytující B lymfocytu cytokinové signály potřebné k jejímu pomnožení, diferenciaci a sekreci protilátek. T_H2 buňka rozpoznává správnou B buňku, již je potřeba poskytnout pomoc, vzájemným navázáním svého T receptoru (TCR) s jejím MHC gp II-antigenním komplexem. To se děje v sekundárních lymfatických orgánech a produkované jsou pak nízkoafinitní IgM protilátky, které blokují další šíření pathogenní infekce. Protilátky obalují antigenní struktury a tvoří s nimi imunokomplexy pohlcované v sekundárních lymfatických orgánech FDC (o jejich původu u ptáků viz např. Olah & Glick 1995). Ty tyto komplexy na svém povrchu koncentrují a vystavují pro B lymfocyty. Pokud jsou B buňkami rozpoznány a tyto dostanou druhý kostimulační signál od T_H buněk (kontakt $CD40$ B buňky

a CD40L T buňky) vstupují B lymfocyty do sekundární fáze protilátkové imunitní odpovědi, při níž dochází k jejich afinitní maturaci (tedy k mutacím V domén vazebných míst BCR a elekcii podmíněné množstvím rozpoznávaného antigenu a následně i množstvím poskytnutých stimulačních cytokinů). Zároveň dochází také k izotopovému přesmyku, v jehož důsledku buňka mění v závislosti na cytokinovém prostředí produkci původních IgM v jiné protilátkové isotypy. Výsledkem je tak vznik vysokoafinitních protilátek, které pak fungují při vlastní imunitní reakci. Po zdolání infekce zůstávají v organismu podobně jako v případě T lymfocytů paměťové buňky, které nastartují při opětovném kontaktu s patogenem rychlou imunitní odpověď spojenou s dalšími koly zkvalitňování produkovaných protilátek.

Protilátky účinkují proti patogenům jednak tím, že je a jejich toxiny obalí a tím blokuje jejich toxické působení a kontakt s buňkami organismu, jednak tím, že patogen opsonizují a usnadní tak jeho pohlcení fagocyty a v neposlední řadě také tím, že aktivují komplement. U ptáků (resp. přesněji řečeno u kura) byly identifikovány celkem tři isotypy imunoglobulinů – IgM, IgG (také označován jako IgY) a IgA (Jeurissen et al. 1998; Demaries & Ratcliffe 1998). Ptačí IgM jsou patrně obdobné savčím IgM, se kterými jsou asi ze 30% homologické. Tento isotyp Ig nacházíme na většině B lymfocytů a je prvním typem protilátek, který se objevuje po primární imunizaci zvířete. IgG kura je funkčně homologní se savčím IgG, avšak evolučně je stejně blízké savčímu IgG jako IgE, což vedlo k názoru, že je tato molekula evolučním předkem IgG i IgE savců (Demaries & Ratcliffe 1998). U kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) byla zjištěna přítomnost 2 strukturně odlišných isoform IgG – jedné normálně dlouhé a jedné zkrácené. Zdá se při tom, že poměrné zastoupení těchto dvou isoform v imunokomplexech může určovat míru fagocytosy těchto komplexů monocyty a centrum odpovědi na tyto imunokomplexy (Humphrey et al. 2004). Stejně jako předchozí Ig i IgA isotyp plní obdobnou funkci jako u savců – hraje významnou roli ve slizniční imunitě. (Cihák et al. 1991) přitom zjistili, že schopnost produkce IgA je spojena s přítomností TCR2⁺ (V_β1 – viz níže) T buněk, ačkoliv exprese IgM a IgG s výhradně těmito buňkami nesouvisí. (Chen et al. 1982) podávají určitou evidenci pro existenci IgD isotypu protilátek u kura, avšak v současné době se nezdá být existence tohoto typu imunoglobulinu u ptáků pravděpodobná.

Jak už bylo zmíněno, uplatňuje se při vzniku repertoáru B buněčného receptoru (BCR, *B-cell receptor*) (1) přeskupování genových segmentů pro BCR, (2) genová konverze variabilních V segmentů a (3) izotopový přesmyk. Přeskupení imunoglobulinových (Ig) genů BCR, které se odehrává ještě než prekurzory B buněk osídlí Fabriciovu bursu (ve žlutkovém vaku, slezině), probíhá u kura víceméně shodně jako u savců, ačkoliv zde nacházíme na úrovni kombinovaných genových segmentů velkou sekvenční chudost, která neumožňuje vznik větší rekombinační diverzity. To je důsledkem existence pouze jediného funkčního V a J genu v lokusech pro lehký i těžký řetězec, takže výsledkem je prakticky jediný typ imunoglobulinu

(to však může být situace specifická pro linii vedoucí ke kurovi, a u jiných ptáků to nemusí platit; Vainio & Imhof 1995; Demaries & Ratcliffe 1998; Arstila & Toivanen 1998). Do takto vzniklého substrátu jsou pak při genové konverzi vnášeny intrachromosomálním přenosem sekvence z asi 25 pseudogenů ΨV_L a 80 ΨV_D_H . To je patrně hlavní mechanismus vzniku Ig genové diverzity u kura. Tyto děje probíhají ve Fabriciově bursě. Zdá se, že prostředí bursy není nezbytné při počátečním procesu přeskupování genů, zatímco další fáze diverzifikace protilátek (genová konverze) a proliferace B buněk jinde probíhat nemohou (Arstila & Toivanen 1998). Procesy ve Fabriciově bursě jsou stejně jako procesy v thymu provázeny masivní proliferací prekurzorových buněk a také silnou negativní selekcí proti buňkám produkujícím jednak nefunkční a jednak autoreaktivní Ig (Arstila & Toivanen 1998). Apoptosu tak prodělává asi 95% všech vznikajících bursálních buněk (Lassila 1989). Pouze buňky, které v pořádku exprimují na svém povrchu funkční IgM Fabriciovu bursu opouštějí a tvoří pool B buněk v krvi a periferních lymfatických orgánech. Velkou odlišností oproti situaci u většiny savců je skutečnost, že přeskupování imunoglobulinových genů je omezeno pouze na krátký časový úsek embryonálního života. Fabriciova bursa přestává být funkční během juvenilního období a poté dochází k sebeobnovování B buněk v periferních tkáních (Demaries & Ratcliffe 1998). Jak jsme se už zmínili, probíhá izotopový přesmyk až při afinitní maturaci po kontaktu B buňky s antigenem a stimulaci T_H2 buňkou, a to obdobným způsobem jako u savců.

Na všech B buňkách je exprimován ChL4, ChB1 a ChB3-6 a na některých také ChB7-12 a IgM, IgG a IgA. V malém množství nacházíme na většině B lymfocytů také CD5 (Jeurissen et al. 1998).

T lymfocyty

T lymfocyty představují nezbytnou součást antigenně specifických mechanismů. Svými T receptory (TCR) rozpoznávají antigenní peptidy prezentované na MHC gp APC. Některé T buňky slouží jako pomocné buňky stimulující prozánětlivou (především T_H1 buňky) nebo protilátkovou (především T_H2 buňky) odpověď ostatních imunitních komponent, jiné představují výkonné cytotoxické buňky (T_C), které selektivně zabíjejí pro organismus potenciálně nebezpečné buňky. V neposlední řadě fungují určité T buněčné populace jako regulační buňky (T_{REG}), které modulují intenzitu imunitní odpovědi na příslušný antigen. Do místa probíhající infekce se dostávají stejně jako B lymfocyty migrací stimulovanou působením gradientu chemotaktických signálů, např. LPS či IL-8 (Lam 1999). T buňky představují asi 80% lymfocytů periferní krve a kostní dřeně (Fletcher & Barnes 1998).

T-cell receptor (TCR) patří mezi základní receptorové molekuly antigenně specifické imunitní odpovědi. Je zodpovědný za kontakt s MHC gp molekulou na APC a za případné rozpoznání prezentovaného antigenu potenciálně pathogenního původu. Narozdíl od jiných

receptorů (včetně ptačích imunoglobulinových receptorů) je u TCR dosahováno nesmírné variability vazebných míst somatickým přeskupováním genů kódujících variabilní části TCR v průběhu ontogeneze dané buňky v thymu. Náhodný DNA sestřih a následné spojování předem definovaných a navzájem si funkčně synonymních úseků několika typů na čtyřech TCR lokusech (α - δ) vede k seskládání TCR unikátního pro daný T buněčný klon. Tento poměrně složitý proces a jeho molekulárně-genetická podstata má oproti situaci u savců své mnohé odlišnosti (McCormack 1998) jejichž vysvětlení ovšem přesahuje možnosti tohoto textu. Zmiňme pouze, že narozdíl například od myši, která má 25 variabilních segmentů $V\alpha$ a 20 $V\beta$, jsou u kura známy od každého pouze dva, takže geny pro kuřecí TCR jsou relativně jednoduché (Vainio & Imhof 1995). Aby byly TCR funkční a zároveň nerozeznávaly antigeny těla vlastní, prochází T buňky nesoucí TCR různých specifit v thymu pozitivní a negativní selekcí, v jejímž průběhu jsou eliminovány jednak buňky, které s MHC gp vůbec neasociují a jednak ty buňky, které váží příliš silně autoantigenní peptidy. Do periferní krve tak odchází až vyselektované T buňky (Vainio & Imhof 1995).

Thymus tedy opouští zralé T buňky, které na svém povrchu exprimují CD8 (na T_C buňkách, koreceptor MHC gp I) nebo CD4 (na T_H buňkách, koreceptor MHC gp II). Zajímavé je, že mimo tyto dva jasně odlišné T buněčné typy existují ještě i mimo thymus $CD4^+CD8^+$ (*double positive*) T lymfocyty, které se ve větším množství našly zatím pouze u opic, prasete a také právě u kura, avšak u člověka či myši se téměř vůbec nevyskytují. Proto snad je jim většinou imunologů věnována jen malá pozornost a jejich význam zůstává nejasný (Zuckermann 1999).

Aby byly aktivovány, musí prekurzorové T_C buňky rozpoznat MHCgp I s antigenním peptidem na APC, která nese patřičné adhezivní a kostimulační molekuly (u kura homolog $CD80/CD86$, O'Regan et al. 1999, $CD28L$ a snad i nějaký ptačí homolog $CD86$ vážící se na $CD28$ T buňky, Parsons et al. 1996). Touto APC je dendritická buňka či makrofág, který pohltil daný antigen nebo byl pathogenem infikován. Pokud T_C buňka rozpozná určitý peptid na jiné buňce, nedostane potřebný druhý kostimulační signál a je utlumena (shrnuto např. v Parsons et al. 1996). Naopak pokud od APC kostimulační signál T buňka dostane, začne proliferovat a diferencovat a stává se z ní klon zralých efektorových buněk, které pak kontrolují všechny buňky těla, se kterými se dostanou do kontaktu, zda neexprimují daný cizorodý (např. virový) antigen. Buňky, jejichž MHC gp takovýto antigenní peptid obsahují, pak cytotoxicky zabijí. Tento proces je regulován IL-2 produkovaným T_H1 buňkami.

Hlavní funkcí T_H1 buněk je spolupráce s makrofágy a stimulace jejich přeměny na aktivované makrofágy. K pomnožení T_H1 buněk je nezbytný kontakt s infikovanou APC (např. právě s makrofágem, takže stimulace obou typů leukocytů může být vzájemná). Při kontaktu

T_H1 buňky a APC se vzájemně spojují TCR a CD4 na povrchu T buňky s MHC gp II nesoucím patogenní antigen na APC, adhezivní molekuly obou buněk a ligand kostimulačního receptoru na APC a kostimulační receptor CD28 T buňky (u kura tato molekula identifikována viz např. Young et al. 1994). T_H1 buňky jsou také stimulovány IL-12 produkovaným APC. Výsledkem interakce je aktivace makrofágu a přeměna prekurzorové T_H buňky na efektorovou T_H1 buňku, která proliferuje a stimuluje aktivaci dalších makrofágů produkcí IFN- γ . Aktivované makrofágy pak produkují řadu faktorů vedoucích k další stimulaci T buněk a vzniku lokálního zánětu. Vzájemné působení T_H0 (prekurzorových T_H) a makrofágů je také příčinou imunopathologické reakce opožděného typu (*delayed type hypersensitivity*, DTH).

Existuje mnoho náznaků, že ptáci, stejně jako savci produkují T_H2 buňky, které spolupracují s B lymfocyty stimulovanými rozpoznáním antigenu, ačkoliv přímé důkazy pro to zatím neexistují (Staehele et al. 2001). Jelikož je však, v souladu s rostoucím počtem nepřímých dokladů, výskyt těchto buněk u ptáků velmi pravděpodobný a je ve shodě s naším současným chápáním fungování obratlovčího imunitního systému, budeme v této práci existenci ptačích T_H2 buněk předpokládat.

Z prekurzorové T_H buňky vzniká zralá T_H2 buňka na základě kontaktu s MHCgp II s antigenním peptidem na APC v přítomnosti IL-4, kdy T buňka dostává signály přes své TCR, CD28, IL-4R a IL-2R receptory. Následuje proliferace a diferenciaci a takto vzniklé zralé efektorové T_H2 buňky pak mohou stimulovat B buňky pomocí kontaktu CD40L T buňky a CD40 B buňky. Lze předpokládat, že ptačí T_H2 buňky pak produkují podobně jako u savců hlavně IL-4, IL-6 a IL-10 (ne však IL-5, snad KK34, Avery et al. 2004), které pak zároveň podporují zpětnou vazbou další diferenciaci prekurzorů T_H v T_H2 buňky a mimo to aktivují B lymfocyty (vzhledem k nedostatečné probádanosti situace u ptáků se jedná spíše o hypotézu více či méně podporovanou náznaky výsledků současného výzkumu - viz poznámky k jednotlivým cytokinům níže).

U savců (a u ptáků patrně v obdobné podobě také) je poměr T_H1 a T_H2 buněk (a tedy i typ odpovědi – zánětlivá vs. protilátková) regulován produkcí různých cytokinů. Pro diferenciaci T_H1 nebo T_H2 buňky z prekurzorové $CD4^+$ buňky je rozhodující poměr koncentrací IL-12 (produkovan makrofágy a dendritickými buňkami, stimuluje T_H1) a IL-4 (produkovan basofily a mastocyty, stimuluje T_H2). Cytokiny dále produkované T_H1 buňkami (IFN- γ) podporují diferenciaci T_H1 buněk a inhibují T_H2 buňky a naopak IL-4 a IL-10 produkované T_H2 buňkami podporují diferenciaci T_H2 buněk a inhibují T_H1 buňky. Toto je patrně jeden z nejvýznamnějších regulačních mechanismů každé imunitní odpovědi.

TCR sestává z antigen vázajícího receptoru (TCR $\alpha\beta$ nebo TCR $\gamma\delta$), který je v asociaci se dvěma signálními molekulami CD3 (Jeurissen et al. 1998). U kura byly definovány 3

hlavní linie TCR (a tedy i T buněk) – TCR1, TCR2 a TCR3 (Lahti et al. 1991; McCormack 1998). Proti všem těmto typům TCR byly posléze vyvinuty specifické monoklonální protilátky (Sowder et al. 1988; Cihak et al. 1991). $\gamma\delta$ T buňky představují TCR1⁺ linii a $\alpha\beta$ T buňky TCR2⁺ a TCR3⁺ linie (lišící se navzájem svými variabilními doménami – V _{β} 1 resp. V _{β} 2, ontogenezí, orgánovou distribucí i funkcí). Kur má narozdíl od savců (myš, člověk) relativně vysoký podíl $\gamma\delta$ T buněk (až 20% T lymfocytů v periferní krvi a 30% ve slezině; (Sowder et al. 1988). Zajímavá je i skutečnost, že během dospívání u něj dochází specificky u samců ke zvýšení hladiny $\gamma\delta$ T buněk v krvi a ve slezině (v krvi u samců kolem 40%, u samic kolem 21%, ve slezině u samců 31%, u samic 15%), nikoliv však v intestinálním epithelu (Arstila & Lassila 1993). Samci při tom ovšem nemají celkově větší počet leukocytů v krvi než samice. Toto relativní zvýšení je podmíněno působením androgenů (k obdobnému zvýšení dojde i u samic, kterým je podán testosteron). Následkem je tedy relativně vyšší podíl $\gamma\delta$ subpopulací T buněk u samců oproti jejich podílu u samic, jehož biologický význam je však prozatím nejasný (Arstila & Lassila 1993). $\gamma\delta$ T buňky v periferní krvi jsou charakterizovány $\gamma\delta$ TCR (monoklonální protilátka TCR1) a většinou jsou stejně jako u savců CD4⁻ CD8⁻ (narozdíl od $\gamma\delta$ T lymfocytů nacházejících se ve slezině a ve střevním epithelu, kde exprimují ze 75% CD8 (Bucy et al. 1988; Arstila & Lassila 1993; Kasahara et al. 1993). Při jejich stimulaci během pathogenní infekce hraje patrně důležitou úlohu IL-2, přičemž jej patrně samy spolu s IFN- γ produkují (Kasahara et al. 1993; Choi & Lillehoj 2000). Dunon et al. (1993) zjistil, že většina $\gamma\delta$ T lymfocytů ve střevním epithelu kura, ve kterém představují tyto buňky početně zastoupený typ, pochází původně z thymu. $\gamma\delta$ T lymfocyty snad ovšem neprodělávají selekci v thymu jako $\alpha\beta$ T buněčné linie, z thymu rychle odcházejí do periferních lymfoidních orgánů, aniž by absolvovaly klonální expanzi a ihned exprimují na svém povrchu velké množství TCR. Zatímco $\alpha\beta$ T lymfocyty in vitro odpovídají na stimulaci mitogeny samostatně, $\gamma\delta$ T buňky (subpopulace CD8⁺, jiné na stimul neodpovídají) reagují pouze v přítomnosti CD4⁺ T buněk (V _{β} 1 nebo V _{β} 2) nebo z nich odvozených rozpustných faktorů (Arstila et al. 1993; Kasahara et al. 1993), což naznačuje vzájemnou regulaci mezi $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T buňkami při imunitní odpovědi.

Bylo zjištěno, že TCR β lokus sestává u ptáků pouze ze dvou variabilních genových rodin (Lahti et al. 1991). Podle toho jsou $\alpha\beta$ T buňky děleny na dvě linie, které exprimují V _{β} 1, resp. V _{β} 2 variabilní doménu a jsou rozpoznávány monoklonálními protilátkami TCR2 resp. TCR3 (Cihak et al. 1991; Lahti et al. 1991). $\alpha\beta$ T buňky prodělávají v thymu, jak bylo nastíněno výše, negativní a pozitivní selekci, během níž jsou odstraněny nefunkční a autoreaktivní klony a pak z thymu odcházejí obdobně jako $\gamma\delta$ T buňky do periferních orgánů (Arstila & Toivanen 1998). Stejně jako u savců jsou buďto CD4⁺ nebo CD8⁺.

Na všech T buňkách nacházíme v periferní krvi pouze TCR v komplexu s CD3.

Subpopulace $\alpha\beta$ T lymfocytů nese mimo to také CD4 nebo CD8 (CD8 $\alpha\alpha$ či $\alpha\beta$), které posilují vazbu TCR a jeho ligandu. Podle toho dělíme T lymfocyty na CD4⁺ T_H buňky a CD8⁺ T_C a T_S buňky. CD8 α se nalézá mimoto i na subpopulaci $\gamma\delta$ T buněk a na NK-T lymfocytech (Jeurissen et al. 1998). Na všech periferních $\alpha\beta$ T lymfocytech, avšak nikoliv na $\gamma\delta$ subpopulaci T buněk, je přítomna CD28 CD3-TCR-kostimulační molekula (Arstila et al. 1994; Young et al. 1994). Dále exprimují některé T buňky CD2 a CD5 (Knabel et al. 1993). Na splenických $\gamma\delta$ T buňkách a většině $\alpha\beta$ T buněk se vyskytuje CDw6. Některé T lymfocyty exprimují také ChT1, ChL4, ChLw5, ChL12, CD45R1 a aktivované T lymfocyty též ChT6, ChT7 a ChL13 (Jeurissen et al. 1998). Proti většině těchto povrchových molekul byly zároveň vyvinuty monoklonální protilátky, které je identifikují (Knabel et al. 1993; Jeurissen et al. 1998)

V.2 MHC genové klastry a MHC glykoproteiny

MHC glykoproteiny kódované MHC jsou nezbytnými antigen prezentujícími molekulami v mechanismu antigenně specifické imunity ptáků stejně jako savců (Zelano & Edwards 2002). MHC kura se ve své organizaci výrazně liší od savčího MHC. Nachází se na chromosomu 16 a sestává ze dvou nezávislých genových klastrů: B komplexu a Rfp-Y, přičemž oba jsou oproti MHC savců výrazně jednodušší a menší (snad nesou jen minimální počet genů potřebných pro správnou funkci MHC, Vainio & Imhof 1995; Kaufman et al. 1999b). Zajímavé ovšem je, že nejenže mnoho genů v B komplexu ptáků oproti savcům chybí, ale některé mají u ptáků jiné umístění (Kaufman et al. 1999a).

B komplex sestává z nejméně tři polymorfních oblastí (Miller et al. 2004): *F lokusu* (I. třída, exprimuje B-F molekulu, nově byly zjištěny dva blíže příbuzné B-F lokusy: BF1 (BFI) a BF2 (BFIV) (Livant et al. 2004)), *L lokusu* (II. třída, exprimuje B-L molekulu) a *G lokusu* (IV. třída, B-G geny). Mezi F, L a G lokusem dochází jen zřídka k rekombinaci, proto B haplotypy zahrnují alely všech těchto lokusů. Pro bližší popis jednotlivých genů v rámci MHC kura, kterému se zde nelze věnovat, doporučuji práci Miller et al. (2004). Zatímco tkáňová distribuce, struktura a funkce B-F resp. B-L molekul kódovaných B komplexem je obdobná savčímu MHC gp I resp. MHC gp II, B-G molekuly patrně nemají u savců obdobu a představují unikátní diferenciační antigen erythroidní linie (Guillemot et al. 1986; Hála et al. 1998). *B-F molekula* (MHC I gp) se vyskytuje na velké škále buněk organismu a slouží k prezentaci peptidových fragmentů produkovaných těmito buňkami T_C buňkám. Naproti tomu *B-L molekula* (MHC II gp) je exprimována pouze na APC (např. B buňkách, monocyttech/makrofázích), kde vystavuje T_H buňkám vázané peptidové fragmenty pocházející z proteinových molekul a částic pohlcených těmito buňkami. Mimoto se B-L molekuly vyskytují na aktivovaných T buňkách. *B-G glykoproteiny* nacházíme ve větším množství na erythrocytech a trombocytech,

v malém také na leukocytech a epitheliálních buňkách střeva. Funkce B-G molekul je však stále neznáma (Hála et al. 1998).

Nedávno byl popsán i ptačí homolog savčího *CD1* ležící rovněž uvnitř B klastru na 16 chromosomu kura (Miller et al. 2005). Předpokládá se, že molekula vznikající expresí tohoto genu, váže a prezentuje stejně jako u savců T buňkám lipidové antigeny.

B-F a B-L geny jsou vysoce polymorfní, přičemž má tento polymorfismus stejnou funkci jako u jejich savčích homologů: B-F a B-L molekuly, které z nich vznikají, vážou rozmanité antigenní peptidy a prezentují je T buňkám o různých TCR specifitách (Vainio et al. 1988; Fulton et al. 1995), přičemž i mechanismus prezentace antigenu je patrně obdobný. Bylo potvrzeno, že u kura má pro rezistenci vůči různým patogenům velký význam právě alelická příslušnost MHC daného jedince (Liu et al. 2002).

Jak již bylo zmíněno, existuje u ptáků kromě výše zmíněného MHC (B) komplexu ještě druhý MHC genový klaster (**Rfp-Y**, *Restriction fragment pattern-Y*), který rovněž obsahuje geny I. (YF) a II. třídy (YB). Rfp-Y segreguje nezávisle na MHC, ačkoliv může být lokalizován na téže mikrochromosomu. Mezi těmito dvěma komplexy snad dochází k intenzivním rekombinacím. Rfp-Y tak představuje nový typ genové MHC organizace kombinující jak geny I. tak i II. třídy v nezávislém klasteru (Hála et al. 1998; Miller et al. 2004). (Afanassieff et al. 2001) přitom zjistili, že ze dvou YF genů je jeden nefunkční, zatímco druhý je široce transkribován, přičemž má patrně nějakou specializovanou funkci, odlišnou od klasických MHC I gp.

Studium MHC křepelky odhalilo, že u předka tohoto druhu došlo po odštěpení od linie vedoucí ke kurovi k MHC genové duplikaci, takže počty mnoha MHC genů křepelky jsou vyšší než u kura (Shiina et al. 2004). Jak se zdá, je duplikace MHC mezi ptáky obecnějším jevem (viz též Miller & Lambert 2004).

V posledních letech byla věnována zvláštní pozornost mnoha ekologicky zaměřených výzkumných týmů definování MHC u různých volně žijících druhů. Studovány tak byly MHC vrabce domácího (*Passer domesticus*, (Bonneaud et al. 2004; Piertney 2003), rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*, Wittzell et al. 1998; Westerdahl et al. 2000; Richardson & Westerdahl 2003; Westerdahl et al. 2004), rákosníka sechelského (*Acrocephalus sechellensis*, Richardson & Westerdahl 2003), špačka obecného (*Sturnus vulgaris*, Wittzell et al. 1998), budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*, Westerdahl et al. 2000), strnadce skvrnitého (*Paserculus sandwichensis*, Freeman-Gallant et al. 2002), hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*, Hess et al. 2000), lejsčika dlouhonohého (*Petroica australis*) a lejsčika chathamského (*Petroica traversi*, Miller & Lambert 2004), podčeled'

šatovníků (Drepanidinae, Jarvi et al. 2004), vlhovce červenokřídleho (*Agelaius phoeniceus*, Gasper et al. 2001), bažanta obecného (*Phasianus colchicus*, von Schantz et al. 1996; von Schantz et al. 1997; Wittzell et al. 1998), bělokura rousného (*Lagopus lagopus*, kachny divoké (*Anas platyrhynchos*, např. Mesa et al. 2004), bekasiny větší (*Gallinafo media*, Ekblom et al. 2003), jeřába amerického (*Grus americana*, Jarvi et al. 1999), jeřába kanadského (*Grus canadensis*, Jarvi et al. 1999) a tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*, Kikkawa et al. 2005). Tyto studie prokázaly, že se alelická variabilita mezi různými ptačími druhy výrazně liší, ale celková stavba MHC lokusu mnoha z těchto druhů je, zdá se, obdobná situaci u kura (včetně Rfp-Y systému), přičemž je ovšem u různých druhů přítomný patrně odlišný počet MHC genů. Z toho vyplývá, že chudost popisovaná Kaufmanem et al. (1999b) u kura, není patrně mezi ptáky obecným pravidlem (viz též Zelano & Edwards 2002).

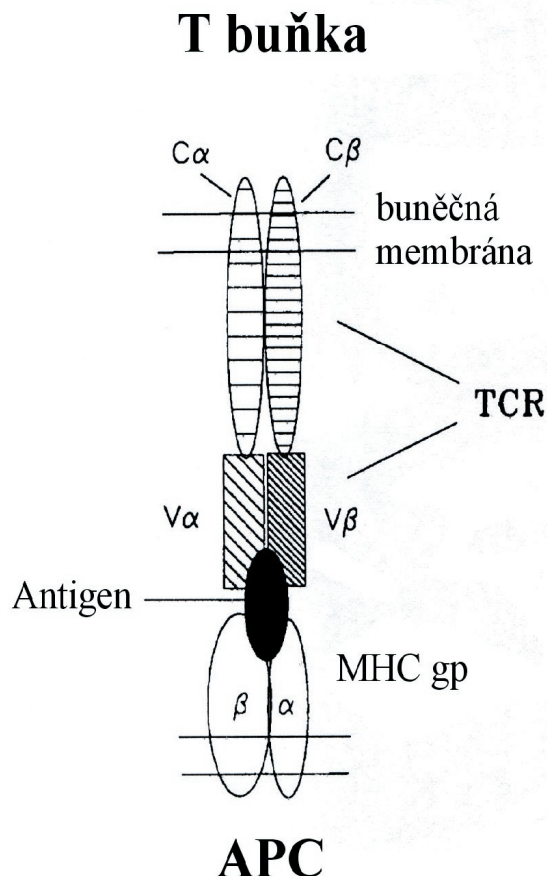
Jelikož tedy víme, že MHC gp vzniklé expresí různých alel váží různé antigenní peptidové fragmenty, zdá se být existence geneticky determinované rezistence o různém stupni vůči různým patogenům zřejmá. To potvrdili např. Liu et al. (2002). Zhou & Lamont (2003) zase prokázali spojitost mezi typem MHC I i II a schopností produkovat protilátky proti různým aloantigenům. Vezmeme-li navíc v úvahu, že různé MHC gp molekuly také váží různě silnou vazbou různé T buňky podle struktury obou vazebných míst, logicky nám vyplývá, že daný typ MHC může ovlivňovat typ další imunitní reakce (T_H1 nebo T_H2). Tuto skutečnost také dokládají výsledky některých pokusů (např. Cheng & Lamont 1988). von Schantz et al. (1997) navíc u volně žijících bažantů zjistili, že MHC genotyp může predikovat pravděpodobnost dalšího přežití jedince v daném roce.

V.3 *Antigeny, mitogeny a superantigeny*

Tuto krátkou kapitolu, která zdánlivě pojednává o molekulárně-imunologických detailech vazebných interakcí antigenu s. lat. a imunoreceptorů, považuji za klíčovou pro správné pochopení souvislostí v dalších kapitolách. Podává totiž přehled o rozdílech mezi klasickými *antigeny s. str.*, *mitogeny* a *superantigeny*, tedy molekulami, které, pomineme-li jejich normální biologickou úlohu, slouží jako mocný nástroj pro výzkum imunitního systému. Zejména v ekologických studiích bohužel často dochází k zaměňování pojmu „antigen“ a „mitogen“, aniž si tento rozdíl autoři do důsledku uvědomují. Je proto dobré se o těchto rozdílech zmínit.

Antigenem s. lat. je jakákoliv látka, která po vhodném vpravení do organismu vyvolává imunitní odpověď. Naproti tomu se pod pojmem *antigen s. str.* (tedy tak, jak budeme antigen chápat v tomto textu) rozumí jakákoliv povrchová molekula nebo její součást, na kterou se specificky váží receptory imunitního systému – např. TCR nebo protilátky. Ne všechny antigeny ovšem nutně spouštějí produkci protilátek. Ty, které tak činí, označujeme termínem *imunogeny*.

Tělu vlastní molekuly, na něž imunitní systém obvykle nereaguje, nazýváme *autoantigeny*, cizorodé antigeny (např. molekuly virových kapsid nebo součásti bakteriálních buněk) pak *exoantigeny*. O antigenech a jejich vztahu k různým imunoreceptorům je pojednáno na různých místech předchozích kapitol. Zde jen ve zkratce zmíníme, že aby mohly být aktivovány specifické lymfocyty schopné daný antigen rozpoznat, musí být tento antigen nejdříve pohlcen APC a navázaný na MHC gp vystaven na jejím povrchu (Majumdar et al. 1990). Lymfocyty totiž nejsou schopny rozpoznávat antigeny rozpuštěné ve svém okolí. Způsob propojení TCR a MHCgp nesoucí antigenní peptid ukazuje obr. V.3/1.

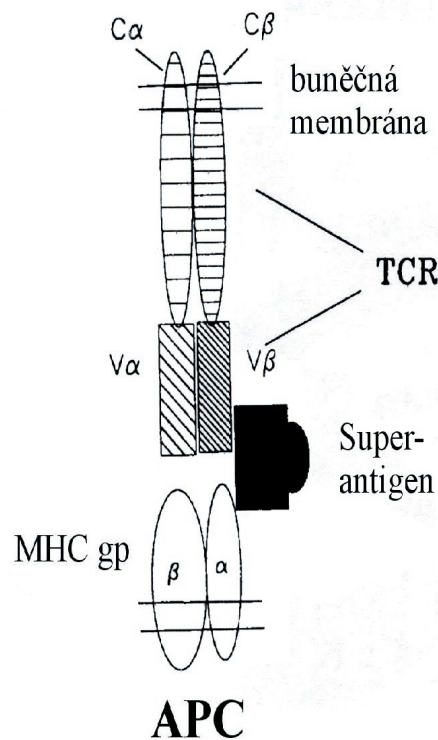


Obr.V.3/1: Schématické znázornění propojení TCR T lymfocytu a MHC gp II na povrchu APC při prezentaci antigenního peptidu (označený jako „antigen“). $V\alpha$ a $V\beta$ označují variabilní podjednotky vazebného místa, $C\alpha$ a $C\beta$ jsou konstantní transmembránové podjednotky a α a β značí imunoglobulinové podjednotky MHC gp II. Převzato z Licastro et al. (1993).

Oproti klasickým antigenům je superantigen antigen s. lat., který vyvolává nespecifickou stimulaci velkého množství lymfocytů, bez ohledu na specifitu jejich vlastních povrchových receptorů. Existují dvě skupiny těchto superantigenů: 1) exogenní a 2) endogenní (Licastro et al. 1993). Z hlediska ekoimunologického výzkumu je důležitější skupina první, do které patří různé bakteriální produkty uvolňované během infekce, např. lipopolysacharidy (LPS), které jsou komponentami vnější membrány gramnegativních bakterií. Tyto exogenní superantigeny způsobují v organismu často neproduktivní až destruktivní imunitní odpověď.

Mechanismus působení superantigenů je takový, že se váží MHC gp II na APC a zcela antigenně nespecificky (mimo vlastní vazebné místo) jej spojují s V β doménou TCR, čímž T buňky aktivují (Majumdar et al. 1990; Licastro et al. 1993; viz obr. V.3/2). Tímto způsobem mohou stimulovat 5-25% T lymfocytů v krevním oběhu (Licastro et al. 1993). Zajímavé je, že ne všechny MHC II molekuly váží superantigeny se stejnou afinitou. Z toho vyplývá, že pro aktivaci buněk superantigeny je potřeba dostatek vhodných APC, které ovšem superantigen nepohlcují jako běžný antigen. Přitom je biologická aktivita některých superantigenů, stejně jako mitogenů, regulována ionty kovů. Různé superantigeny vyžadují také různé cytokinové prostředí – např. IL-1 a IL-6 v případě pep M5 superantigenu. Superantigeny stimulované buňky produkují za vhodných podmínek proliferační faktory (např. IL-2, Majumdar et al. 1990).

T buňka



Obr.V.3/2: Schéma vazebně nespecifického propojení TCR T buňky a MHC gp APC pomocí superantigenu. Použité zkratky jsou stejné jako u obr. V.3/1. Převzato z Licastro et al. (1993).

Výše popsané se týkalo antigenně nespecifické aktivace T buněk. Superantigeny, např. LPS, mohou být ovšem zároveň také polyklonálními aktivátory B lymfocytů, které stimulují proliferaci a sekreci IgM u více než 30% těchto buněk (Bucala 1992). Bucala (1992) zjistili, že při těchto procesech je stejně jako při aktivaci T buněk potřebná přítomnost některých cytokinů, např. IL-1 a TNF- α , které jsou produkty aktivovaných makrofágů. Přitom je známo (Guha & Mackman 2001), že makrofágy rovněž rozpoznávají bakteriální LPS, a to prostřednictvím svých povrchových molekul včetně TLR a reagují na něj produkcí prozánětlivých cytokinů.

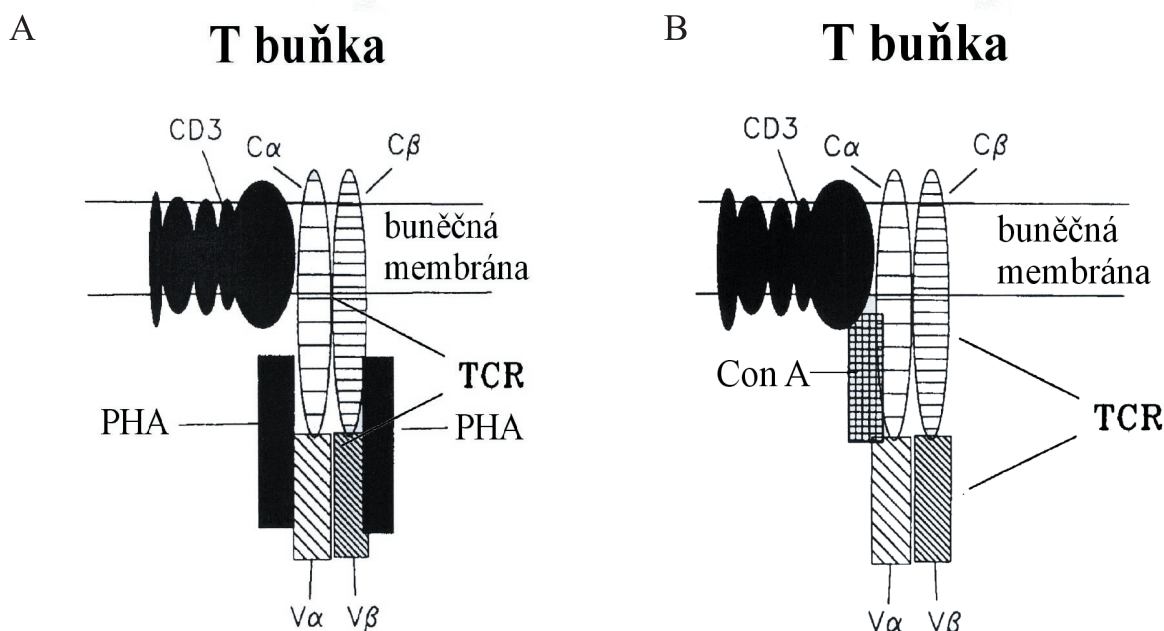
Aktivace buněk imunitního systému pomocí LPS je tedy velmi komplexní.

Aplikace superantigenů *in vivo* má oproti aplikacím antigenů odlišné fyziologické důsledky. Na mladých samcích kura bylo například zjištěno, že zatímco hladina ChIL-1 a TNF α po injekci LPS stoupá, injekce T-dependentního antigenu hovězího serumalbuminu (BSA) nemá na hladinu těchto dvou cytokinů vliv (Gehad et al. 2002a). Podobně se chovala i hladina hormonu kortikosteronu, zatímco koncentrace trijodtironinu po injekci LPS poklesla. Ještě zajímavější je zároveň zjištěný fakt, že po injekci LPS následuje signifikantní pokles ChIL-2, zatímco BSA koncentraci ChIL-2 zvyšuje. Nepřekvapí proto, že obě látky mají různý vliv na redistribuci T a B buněčné populace (Gehad et al. 2002b). Nejvýznamnější je v tomto ohledu patrně pokles početnosti T buněk, které se přesouvají do sekundárních lymfatických orgánů a nárůst početnosti monocytů v krvi po injekci LPS. Důsledkem aplikace LPS je i zvýšená exprese receptoru IL-1 na lymfocytech.

Skupinu leukocyty-aktivujících látek odlišnou od superantigenů tvoří *lektiny, mitogeny*. Tabulka V.3/1 shrnuje odlišné aktivační mechanismy lektinů a superantigenů. Lektiny jsou specifické sacharidy vázící molekuly velmi rozmanitého původu (Licastro et al. 1993). Byly izolovány prakticky ze všech typů organismů na Zemi včetně obratlovců, přičemž jejich nejběžnější biologickou funkcí je aglutinace erythrocytů (např. bakteriální lektiny). Některé lektiny ovšem ovlivňují proliferaci, metabolickou aktivitu a diferenciaci leukocytů. Bylo objeveno hned několik takovýchto molekul, které stimulují proliferační aktivitu lymfocytů. To platí pro mnoho lektinů normálně fungujících v imunitním systému obratlovců – např. lektiny vázící manosu, které stimulují fagocytosu neopsonizovaných bakterií. Dále ovšem existují i exogenní lektiny s imunostimulačním účinkem. Mezi ně patří např. fytohemagglutinin (PHA) izolovaný z fazolu (*Phaseolus vulgaris*), mitogen PWM z *Wistaria floribunda* a konkanavalin A (Con A) z *Canavalia ensiformis*. Tyto látky aktivují pouze T lymfocyty, a to bez ohledu na jejich TCR specifitu, protože se označují jako polyklonální mitogeny. Mechanismy aktivace T buněk jsou různé podle druhu lektinu (Licastro et al. 1993). PHA váže nespecificky α/β heterodimer nebo γ -řetězec TCR (viz obr. V.3/3A), zatímco Con A propojuje CD3 kostimulační molekulu s TCR (viz obr. V.3./3B); a ještě jiné lektiny iniciují proliferaci navázáním na CD2 molekulu. MHC II gp se tedy této vazby přímo neúčastní (Majumdar et al. 1990). Bylo ale zjištěno, že ke zdárné aktivaci proliferace bývají přece jen nějakým způsobem potřeba APC, které na svém povrchu exprimují MHC II gp. Majumdar et al. (1990) na lidských T buňkách zjistili, že jejich vliv spočívá patrně v produkci stimulačních cytokinů – zejména IL-2. PHA stimulované T buňky produkují v přítomnosti dalších nezbytných faktorů (např. PMA) proliferační IL-2 i receptor pro něj. Pro úplnost je ještě dobré zmínit, že některé lektiny, včetně těch imunoregulačních, mohou mít zároveň pro organismus toxické účinky. To je např. případ bolesatinu (Licastro et al. 1993).

Tab.V.3./1: Mechanismy aktivace T buněk lektiny a superantigeny. Převzato z Licastro et al. (1993)

	lektiny	superantigeny
Vazba cukrů	Ano	Ne
Aglutinace buněk	Ano	Ne
Vazba MHC II gp	Ne	Ano
Vazba TCR elementů	α/β	V β či V γ
Vazba na CD2	Některé ano	Ne
Vazba na CD3	Některé ano	Ne
Vazba podmíněná přítomností iontů kovů	Ano	Ano
Polyklonální aktivace	Ano	Ano
Indukce syntézy cytokinů	Ano	Ano
In vivo toxicita	Ano	Ano



Obr.V.3/3: Schéma vazebně nespecifické aktivace TCR T buňky pomocí PHA (A) a Con A (B). Použité zkratky jsou stejné jako u obr. V.3/1. Převzato z Licastro et al. (1993).

V současné době je dobře známá i reakce organismu na podání mitogenu in vivo. Goto et al. (1978) popisují průběh kožní reakce na injekci PHA následovně: 3 hodiny po injekci infiltrovaly do podkoží heterofilní granulocyty, v menší míře doprovázené bazofily a makrofágy; mezi 6. a 12. hodinou se začaly objevovat ve větší míře malé lymfocyty v okolí cév, avšak nebyla pozorována žádná mitóza; 12 hodin po aplikaci PHA ubylo heterofilních granulocytů a přibylo makrofágů; po 24 hodinách byly makrofágy nejpočetnější infiltrovanou složkou a bazofily se soustředily kolem cév, což bylo doprovázeno hemoragií; po 48 hodinách infiltrace buňkami ztlačila a lymfocyty se ze tkáně prakticky vytratily. Nic podobného u PHA neinjektovaných nebo thymektizovaných ptáků pozorováno nebylo. Podobný popis reakce na subkutánní aplikaci PHA popisují i McCorkle et al. (1980), kteří ovšem pozorovali

celý průběh poněkud protáhlejší v čase, což mohlo podle mého mínění být způsobeno použitím odlišného množství injektovaného PHA. Tyto výsledky naznačují, že mitogenní vliv PHA se projevuje spíše než vlastní proliferací lymfocytů produkcí prozánětlivých cytokinů, které pak do podkožní oblasti chemotakticky přilákají fagocyty. Připočteme-li, že celý proces pozorovaný ve výše zmíněných studiích iniciovala zřejmě aktivita fagocytyckých heterofilů, dokládají tyto výsledky jasně, že se jedná o velice komplexní imunitní proces, a nikoliv tedy o pouhou proliferační odpověď T buněk.

Shrneme-li naše poznatky o mitogenech a superantigenech do jedné věty, jedná se narozdíl od běžných antigenů v obou případech o silné polyklonální aktivátory lymfocytů (1 buňka z 10 u lektinů a 1 z 20 u některých superantigenů – viz Licastro et al. 1993), které ovšem působí mechanismy odlišnými, vyžadujícími odlišné kombinace okolních faktorů.

I.1 Cytokiny

Cytokiny jsou rozpustné proteiny hrající úlohu signálních molekul imunitního systému („hormony imunitního systému“) s obvykle parakrinním účinkem. Ačkoliv bylo u ptáků identifikováno mnoho ekvivalentů savčích cytokinů, zatím jen několik se jich podařilo purifikovat a charakterizovat. Obecně lze říci, že savčí a ptačí cytokiny vykazují jen malou mezidruhovou biologickou aktivitu mezi těmito třídami obratlovců (Rautenschlein & Sharma 1998), což je patrně z velké části dáno jejich nízkou vzájemnou sekvenční identitou (Staheli et al. 2001). Následující přehled ptačích cytokinů byl ve zkrácené a upravené formě převzat z přehledů Klasing (1994) a Rautenschlein & Sharma (1998) a byl doplněn o mnohé nové poznatky z let 1998-2005.

ATH (*avian thymic hormone*) je homologem savčího α -parvalbuminu. Je produkován v thymu a svalovině a působí na buňky kostní dřeně, které stimuluje ke zrání.

Bursin (*bursaprotein*) je produkován B buňkami a působí na hypothalamus, hypofysu a produkci adrenokortikoidů, přičemž obnovuje imunitní funkce.

G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) produkován makrofágy působí na myeloblasty a buňky kostní dřeně.

MGF (*myelomonocytic growth factor*) indukující proliferaci myeloblastů je strukturně podobný savčímu G-CSF a IL-6 (Staheli et al. 2001).

IL-1 (*interleukin-1*) produkují stimulované makrofágy (Weining et al. 1998; Staheli et al. 2001). Působí jako komitogenní faktor T buněk (Staheli et al. 2001), aktivátor produkce CXC chemokinů fibroblasty a mimo to také reguluje hladinu kortikosteronu (Weining et al. 1998) a účastní se procesu indukce horečky (Staheli et al. 2001). Struktura

genu, který kóduje ChIL-1 β byla zmapována, ačkoliv promotor se osekvenovat nepodařilo (Weining et al. 1998; Kaiser et al. 2004).

IL-2 (také znám jako *T-cell growth factor*) kura vykazuje značnou podobnost s kuřecím ChIL-15 a savčím IL-2 a IL-15 (Sundick & GillDixon 1997). Produkují jej T lymfocyty v periferní krvi a slezině, přičemž působí jako mitogen na T lymfocyty a NK buňky (Kasahara et al. 1993; Sundick & GillDixon 1997; Kaiser & Mariani 1999; Choi & Lillehoj 2000; Lillehoj et al. 2001). Gobel et al. (2003) uvádějí, že jeho stimulační vliv se týká převážně CD8⁺ T buněk, zatímco CD4⁺ buňky stimuluje k proliferaci IL-18, který CD8⁺-buňky utlumuje. Skutečnost, že IL-2 reflektuje parazitární infekci in vivo podporují i výsledky Miyamoto et al. (2002) na kuřatech experimentálně nakažených *Eimeria tenella*. Proti tomuto interleukinu u tohoto druhu bylo vytvořeno relativně velké množství monoklonálních protilátek (Rothwell et al. 2001; Miyamoto et al. 2001). Nově je obdobně jako u kura zkoumán i IL-2 kachny, krocana a husy (Staheli et al. 2001; Zhou et al. 2005a; Zhou et al. 2005b). U kachny a kura byla i přes nízkou sdílenou aminokyselinovou sekvenci identita v IL-2 zjištěna zkřížená stimulační aktivita. Ford et al. (2002) sledovali vliv aplikace ChIL-2 do vejce na tělesnou hmotnost, relativní hmotnost lymfopoetických orgánů a přecitlivělost opožděného typu (DTH, *delayed type hypersensitivity*) v reakci na lidský γ -globulin. Zjistili, že podaný IL-2 zvyšuje tělesnou hmotnost a relativní hmotnost jater, Fabriciovy bursy a thymu v raných fázích života, avšak na DTH coby míru buněčné imunity neměl žádný vliv. Kogut et al. (2002) zjistili věkově závislý vliv ChIL-2 na aktivaci heterofilů u kuřat starších 7 dní. Prokázán byl také vliv ChIL-2 na produkci IL-8 a IL-18 fagocyty (Kogut et al. 2003).

V roce 2004 byly u kura na základě své strukturní podobnosti se savčími interleukiny objeveny geny pro **IL-3**, **IL-4**, **IL-13** a **GM-CSF** ležící v genomu v rámci T2 cytokinového klastru (Avery et al. 2004). O produktu těchto genů a jejich biologické aktivitě není ovšem doposud nic známo.

IL-5 je cytokinem, jehož existence je u jiných obratlovců než savců nejistá. Avery et al. (2004) předpokládají, že se v případě kuřecí sekvence homologické ke genu pro IL-5 u savců jedná o pseudogen. Koskela et al. (2004) objevili v kuřecích $\gamma\delta$ T lymfocytech gen (**KK34**), který vykazuje 19,5% aminokyselinovou identitu s lidským proteinem IL-5. Zajímavá je ovšem skutečnost, že tento gen, nacházející se stejně jako ChIL-5 pseudogen v T2 cytokinovém klastru (Avery et al. 2004) – patrně tedy gen pro cytokin, je exprimován pouze v $\gamma\delta$ T lymfocytech a nikoliv v $\alpha\beta$ T buňkách.

IL-6 je cytokinem známým u ptáků již delší dobu (Rath et al. 1995). Jedná se o prozánětlivý cytokin produkovaný například heterofilními granulocyty například po stimulaci LPS (Rath et al. 1998). Jedná se patrně o významnou molekulu indukce efektivní

imunitní odpovědi na přítomnost parazita (viz např. Lynagh et al. 2000), neboť jeho množství po invazi parazita nápadně vzrůstá. Zdá se, že ovlivňuje mnoho různých buněk (mezi nimi i diferenciaci B buněk a monocytů) a že reguluje T_H1/T_H2 imunitní odpověď. (Ferro et al. 2005) ovšem prokázali, že ChIL-6 samotný nemá žádný vliv při in vitro pokusech na funkční aktivitu heterofilních granulocytů, ačkoliv je známo, že infiltrace do místa infekce heterofily časově a prostorově odpovídá právě zvýšení koncentrace IL-6. Proti ChIL-6 již byly vyvinuty protilátky (Nishimichi et al. 2005) a také vlastní strukturu ChIL-6, která vykazuje 35% homologii s lidským IL-6, se už podařilo definovat (Schneider et al. 2001). Mimo to byla v nedávné době prozkoumána i struktura genu, který ChIL-6 kóduje, včetně jeho promotoru a regulačních míst (Kaiser et al. 2004).

IL-8 je chemokin z 51% homologní savčímu IL-8. Je produkován lymfocyty (Rautenschlein & Sharma 1998) a fagocyty (Kogut et al. 2003) a chemotakticky působí na jiné lymfocyty (Lam 1999), heterofilní granulocyty (Kogut 2002) a monocyty.

Nově objevený **IL-10** kura vykazuje 45%, resp 42% sekvenční podobnost s lidským, resp. myším IL-10 (Rothwell et al. 2004). Zdá se, že by se mohlo jednat o významný imunoregulační cytokin exprimovaný různými leukocytárními typy (např. aktivovanými thymocyty, makrofágy), který spoluurčuje typ T_H odpovědi. To by podporovala i zjištěná skutečnost, že ChIL-10 inhibuje stejně jako u savců syntézu IFN- γ (podporuje tedy T_H2 diferenciaci prekurzorových T_H buněk, a tedy protizánětlivou protilátkovou imunitní odpověď).

IL-15 kura je z 31% homologický s kravským IL-15 (Choi et al. 1999). IL-15 exprimuje velké množství buněk, hlavně makrofágy. Ačkoliv funkce IL-15 není zatím zcela jasná, zdá se, že by mohl mít souvislost s mechanismy rychlé odpovědi v rámci přirozené imunity, se stimulací aktivity NK buněk a je také růstovým faktorem T buněk (Lillehoj et al. 2001). Receptory pro něj byly nalezeny v malém množství na makrofázích a ve velkém množství se nacházejí na lymfoblastech, tedy aktivovaných lymfocytech před proliferací (Li et al. 2001). Proti IL-15 již byly také vyvinuty monoklonální protilátky (Min et al. 2002).

Izolována cDNA kuřecího **IL-17** vykazuje 37-46% aminokyselinovou sekvenční identitu se savčím IL-17, přičemž pokusy naznačují, že tato molekula má u ptáků vztah k produkci IL-6 (Min & Lillehoj 2002). Podobně byla identifikována cDNA kuřecího prozánětlivého, T buňky chemoatrahujícího **IL-16** vykazující 86% sekvenční podobnost ke kachnímu IL-16 a 49-52% podobnost k savčím homologům (Min & Lillehoj 2004) a cDNA kuřecího a krocáního **IL-12**, které jsou sobě homologní na 95% a k savčím IL-12 ze 21-40% (Balu & Kaiser 2003; Degen et al. 2004). mRNA ChIL-12 byla zjištěna v mnoha různých tkáních a B a T buňkách a makrofázích, což by mohlo odpovídat funkci obdobné u savců, kde tato molekula stimuluje T_H1 a NK buňky. (Degen et al. 2004) prokázali, že IL-12 indukuje syntézu IFN- γ a proliferační

aktivitu v kuřecích splenocytech, což jeho funkční homologii se savčím IL-12 podporuje.

IL-18 je patrně narozdíl od situace u savců nejvýznamnějším růstovým faktorem ptačích CD4⁺ (tedy T_H) buněk (Gobel et al. 2003). Mimo to bylo zároveň zjištěno, že má velký vliv na produkci IFN- γ . cDNA IL-18 je známa u kura (Schneider et al. 2000) a kachny (Staheli et al. 2001).

IFN 1. typu (*interferon typu I*) jsou interferony kódované skupinou genů, které odrážejí poměrně nízkou podobnost se savčím IFN- α a IFN- β (Staheli et al. 2001). Zatímco je IFN- α rodinou několika genů, IFN- β kóduje gen jediný (Sick et al. 1996). Homologa IFN- α byla objevena u různých ptačích druhů (krocana, kachny), ale IFN- β pouze u kura (Staheli et al. 2001). IFN- α a IFN- β jsou interferony účastníci se antivirové obrany buněk. Bylo zjištěno, že vzájemný poměr v produkci těchto dvou interferonů napadenými buňkami může u kuřecího embrya odrážet typ virové infekce (Schwarz et al. 2004).

IFN- γ (*interferon- γ , IFN typu II, macrophage activating factor, MAF*) ptáků je cytokin s pleiotropním působením, který produkují převážně T buněčné populace (podle výsledků Kaspers et al. 1994, spíše CD4⁺ T buňky). Jednou z jeho funkcí je působení na makrofágy, v nichž indukuje produkci oxidu dusnatého a reguluje expresi MHC II gp (Kaspers et al. 1994; Rautenschlein & Sharma 1998). Kogut et al. (2005b) zjistili, že IFN- γ také moduluje imunitní odpověď heterofilních granulocytů, které po aktivaci patogenem v jeho přítomnosti zvyšují expresi prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8) a T_H1 cytokinů (IL-18 a IFN- γ ; IFN- γ tedy sám zvyšuje svou vlastní produkci ve smyslu pozitivní zpětné vazby). Důležité ovšem je, že IFN- γ sám o sobě expresi těchto cytokinů nevyvolává, pouze ji po aktivaci fagocytu patogenem zvyšuje. Bylo navrženo, že narozdíl od situace u savců má kuřecí IFN- γ též antivirovou aktivitu, ačkoliv se později ukázalo, že by se pravděpodobně z určité části mohlo jednat spíše o antivirovou aktivitu IFN- α , atypicky produkovaného buňkami sleziny (Staheli et al. 2001). cDNA strukturu tohoto interferonu popsali Digby & Lowenthal (1995), přičemž zjistili, že je pouze z 15 % homologní kuřecímu IFN typu I, a samčímu IFN- γ je identický z více než 30%. Do dnešní doby byl mimo kura charakterizován IFN- γ krocana, bažanta, křepelky a kachny (Staheli et al. 2001). Proti IFN- γ bylo vyvinuto několik monoklonálních protilátek, které umožňují jeho poměrně citlivou detekci (Lambrecht et al. 2000).

MIF (*migration inhibitory factor*) je produkován lymfocyty a působí na lymfocyty v periferní krvi. Také způsobuje pokles migrace makrofágů. Jeho cDNA struktura již byla charakterizována.

TGF- β (*transforming growth factor- β*) kura je vysoce homologický s lidským TGF- β . Patrně stejně jako u člověka (Kehrl et al. 1986) reguluje proliferaci a diferenciaci mnoha

buněčných typů a působí jako mitogen. Struktura genu pro tento cytokin je u ptáků známa (Klasing 1994; Rautenschlein & Sharma 1998). Tento cytokin se u ptáků vyskytuje ve 4 isoformách (Staeheli et al. 2001).

TNF- α (*tumor necrosis factor*) produkují převážně makrofágy a neurony, přičemž se patrně jedná o prozánětlivý cytokin s pleiotropním účinkem, který zahrnuje produkci NO a expresi MHC II gp makrofágy (Staeheli et al. 2001).

Thymulin (*thymopoetin*) je produkován epitheliálními buňkami thymu a indukuje maturaci T buněk (Wakenell 1998).

Chemokiny CXC, CC a C podrodin jsou chemotaktické molekuly produkované například makrofágy po stimulaci LPS, jejichž nejvýznamnější úlohou je patrně atrahovat do místa infekce různé leukocyty. Bylo zjištěno, že ptačí CXC jsou produkovány fibroblasty po stimulaci IL-1 makrofágy (Weining et al. 1998). U kura je znám z této podrodiny chemokin cCAF kódovaný genem 9E3/CEF4 sekvenčně dosti homologním k lidskému IL-8 a MGSA/Gro- α , který atrahuje heterofily, monocyty a lymfocyty. Z CC chemokinů byl u kura popsán sekvenční homolog lidského MIP-1 β . (Sick et al. 2000) popsali na základě cDNA dva nové kuřecí chemokiny, z nichž jeden (K60) patří do podrodiny CXC a druhý (K203) do podrodiny CC. Oba chemokiny jsou exprimovány v makrofázích a fibroblastech po stimulaci interferony a IL-1 β . U kura byl objeven také sekvenční homolog lymfotaktinu patřícího mezi chemokiny C podrodiny, u kterého byl zjištěn vliv na migraci B lymfocytů.

V.5 Komplement

Komplement je souborem sérových a membránových proteinů, které se účastní antigeně nespecifických mechanismů imunitní odpovědi svými chemotaktickými účinky, opsonizací antigeních částic (což usnadňuje pohlcení těchto částic fagocyty) i perforací membrán pathogena (způsobující osmotickou lýzi jeho buněk). Ptačí sérum obsahuje makromolekuly, které strukturně i funkčně odpovídají savčím komplementovým komponentám, což může být dáno do značné míry evolučním paralelismem vynuceným koevolucí s obdobnými patogeny (Koppenheffer 1998). U ptáků byla zatím zjištěna (nebo se předpokládá) existence komponent C3, C4, C6, faktoru B, D, I a H. Patrně nejdůležitější komplementovou molekulou, jak u savců tak i u ptáků, je molekula **C3** (Kai et al. 1983). Ta se samovolně v malém množství štěpí na fragmenty C3a a C3b, přičemž fragment C3b se svou reaktivní thioesterovou skupinou váže na povrch buňky pathogena (i na vlastní buňky, na kterých je ovšem inhibován rozštěpením katalyzovaným faktory I a H), kde se spojuje s Bb fragmentem faktoru B štěpeném faktorem D a vytváří tak *alternativní C3 konvertázu*, která v blízkosti membrány pathogena katalyzuje další štěpení molekul C3, čímž je mnohonásobně zvýšena rychlost tohoto procesu. C3b fragment

se tak váže na membránu pathogena ve velkém množství, čímž ji opsonizuje. C3a fragment pak funguje jako molekula chemotaktická pro fagocyty. Zatím se nepodařilo u ptáků prokázat existenci *klasické cesty aktivace komplementu*, ačkoliv pro ni existují určité nepřímé důkazy. Prokázáno však bylo, což je zajímavé, že alternativní komplementová cesta může být u ptáků aktivována protilátkami, ačkoliv se to nemusí uplatňovat za fyziologických podmínek in vivo (Koppenheffer 1998). Koppenheffer & Russell (1986) tento jev popsali na séru z holuba (*Columba livia*), přičemž zjistili, že IgM protilátky aktivují kalcium-independentní alternativní dráhu, zatímco aktivace pomocí IgG je kalcium-dependentní (což odpovídá klasické cestě aktivace) a má jen velmi nízkou lytickou efektivitu.

V.6 *Imunologicky významné tkáně*

Lymfatické tkáně lze dělit na primární (centrální), v nichž imunitní buňky vznikají a vyvíjejí se, a sekundární (periferní), v nichž dochází ke kontaktům s antigeny a rozvoji antigenně specifických imunitních reakcí.

V.6.1 *Primární lymfatické orgány*

Mezi primární lymfatické orgány patří mimo thymu a kostní dřeně u ptáků také Fabriciova bursa. V kostní dřeni se u ptáků vyvíjejí fagocyty a NK buňky (Arstila & Toivanen 1998).

Thymus představuje sedm váčků na každé straně krku v těsné blízkosti jugulárních žil a vagického nervu. Narozdíl od situace u některých savců (např. myši) jsou prakticky všechny T buňky kura thymus-dependentní. Teprve z thymu pak T buňky odcházejí do periferních poolů (Arstila & Toivanen 1998). Zároveň je thymus také sekundárním lymfatickým orgánem.

Fabriciova bursa se nachází dorsálně od kloaky v kaudální části dutiny tělní. Je místem diferenciaci a proliferace B buněk, které jsou zodpovědné za protilátkovou imunitní odpověď. Také Fabriciova bursa funguje zároveň jako sekundární lymfatický orgán (součást střevní lymfatické tkáně, GALT). Z buněk z Fabriciovy bursy jsou odvozeny buňky germinálních center a plasmatické buňky (bursa-dependent tissue); ostatní soubory lymfocytů sekundárních lymfatických tkání jsou odvozeny od thymu (*thymus-dependent*; Fletcher & Barnes 1998).

V.6.2 *Sekundární lymfatické orgány*

Sekundární (periferní) lymfatické tkáně ptáků mají spíše difúzní charakter, přičemž narozdíl od savců mízní uzliny většinou chybí. Ptáci však mají vyvinuté lymfatické noduly (germinální centra). Mezi sekundární lymfatické orgány patří slezina (největší sekundární lymfatický orgán), Harderiánské (paraokulární) a paranasální žlázy (součásti HALT, *head-associated lymphoid tissue*), kostní dřeň a lymfatické tkáně v oblasti spojivky

(*conjunctival-associated lymphoid tissue*, CALT), průdušek (*bronchial-associated lymphoid tissue*, BALT) a střeva (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT), kde jsou nejvýznamnějšími součástmi cekální tonsily a Peyerovy plaky střeva (Fletcher & Barnes 1998).

V.7 Vliv ontogeneze a fyziologických faktorů na fungování imunitního systému

V.7.1 Maternální efekt na imunitu embrya

Jak bude patrné z dalších odstavců této kapitoly, je imunitní systém nově narozeného nebo vylíhlého mláděte jen velmi nedokonalý a některé jeho složky přední důležitosti se tak dovyvíjejí až během prvních dní či týdnů života. Mateřský organismus je tak jako jediný schopen ochránit nového jedince před ničivými vlivy v okolí přítomných patogenů. Narozdíl od savců, u nichž předávají matky potřebné protilátky svým mláďatům prostřednictvím mateřského mléka, ukládají ptáci, neschopni kojení, svým potomkům protilátky do vejce. Jejich umístění však není jednotné. U kura bylo zjištěno, že jsou maternální IgM a IgA protilátky lokalizovány v amniotické tekutině (Wakenell 1998), zatímco IgG se nacházejí převážně ve žloutkovém vaku a do krevního oběhu embrya jsou absorbovány ve zvýšené míře až v pozdních fázích embryogeneze a krátce po vylíhnutí (Kowalczyk et al. 1985). Tímto je zajištěna maximální pasivní imunizace čerstvě vylíhlého mláděte. Životnost IgG protilátek v kuřeti je také zhruba dvojnásobná oproti životnosti v dospělém kurovi, aby byl kompenzován čas potřebný k úplnému strávení žloutku (Wakenell 1998). To je, zdá se, velmi významné, neboť čerstvě vylíhlé kuře není schopno produkovat své vlastní IgG protilátky až do stáří šesti dnů po vylíhnutí. Sérové IgA se objevují zhruba ve stáří 10 dní a IgM už ve stáří 4 dní. U různých druhů bylo zjištěno, že množství protilátek předávaných matkou do mláděti závisí na věku matky, době snášení a na koncentraci protilátek v séru matky (Wakenell 1998; Saino et al. 2002b). Vyšší koncentrace protilátek v séru slepice však neznamená nezbytně vyšší koncentraci protilátek v embryu. Podle Kowalczyk et al. (1985) tyto alokační procesy pro samici ovšem znamenají značný pokles její vlastní Ig hladiny, takže i v tomto lze spatřovat příčinu nákladnosti reprodukce. Proto je pro samici výhodné investice Ig do mláďat optimalizovat. Např. bylo prokázáno, že samice vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*) investují více protilátek proti momentálně nebezpečným patogenům do vajíček oplozených atraktivnějšími samci (Saino et al. 2002b) a také více do vajíček dcer než do vajíček synů (Saino et al. 2003d). Protilátky však nejsou to jediné, čím může matka determinovat vývoj imunitního systému svého potomka. Samička do vejce ukládá také mnoho nutričních zdrojů (Young & Badyaev 2004), mezi nimiž jsou i imunologicky významné karotenoidy (Blount et al. 2000). Saino et al. (2003b) prokázali, že experimentálně zvýšená hladina karotenoidů deponovaných do vejce pozitivně koreluje s T-buněčnou odpovědí

mláďat (funkce karotenoidů v imunitním systému je diskutována v kapitole V.9). Některé studie přitom naznačují, že matka může alokovat tyto zdroje v množství závislém na kvalitě svého partnera tak, aby případně zmírnila jeho předpokládaný negativní vliv (Saino et al. 2002a, tedy opak oproti Saino et al. 2002b). Mimo to rozhoduje samička o hormonálních poměrech ve vejci (viz např. Gil et al. 1999; Rubolini et al. 2005), které také mohou určovat vývoj imunitního systému mláďete (viz kapitola V.7.5).

V.7.2 Embryogeneze imunity

Většina našich poznatků o ontogenezi imunitního systému ptáků vychází opět ze studia kura. O volně žijících ptácích přitom, co se embryogeneze imunity týče, nevíme vůbec nic. V dalších odstavcích tedy stručně popíšeme vývinové procesy u kura.

Raná krvetvorba začíná ve žloutkovém vaku kuřecího embrya již 1.-2. embryonální den (Vainio & Imhof 1995). V této fázi však patrně ještě nevznikají prekurzory lymfocytů. Ty vznikají až se začátkem intraembryonální krvetvorby čtvrtého embryonálního dne v oblasti aorty. Po vylíhnutí mláďete se krvetvorba přesouvá do kostní dřeni, jejíž význam v lymfopoesi je však méně jasný než u savců (Arstila & Toivanen 1998).

Fagocytycké buňky (monocyty/makrofágy a heterofilní granulocyty) jsou produkovány právě v kostní dřeni, odkud přecházejí kontinuálně do krevního oběhu (Arstila & Toivanen 1998). U kura se při tom buňky linie monocyty/makrofágy začínají utvářet už někdy kolem 3. dne embryogeneze a schopné funkční odpovědi k některým bakteriálním patogenům jsou již kolem druhého týdne inkubace (Wakenell 1998). Limitujícím faktorem jejich odpovídavosti v těchto raných fázích embryogeneze je ovšem prozatímni nefunkčnost specifických protilátek a komplementu. Právě vzestup dostupnosti komplementu podmiňuje intenzivní imunologickou reakci na určité patogeny krátce po vylíhnutí.

Fabriciova bursa, orgán diferenciaci B buněk, se zakládá jako výchlípek kloakálního epithelu a je osídlena, u kura devátého embryonálního dne, buňkami z paraaortální oblasti, které během své cesty prošly slezinou (7. den), v níž daly základ lymfoidním folikulům. Kolem desátého se tyto prekurzory B buněk objevují i v kostní dřeni, kde se však dále nevyvíjejí, neboť jim chybí stimuly přítomné pouze ve Fabriciově bursě (Vainio & Imhof 1995). Bursa je tedy primárním lymfoidním orgánem nezbytným pro uskutečnění genové konverze v procesu diverzifikace imunoglobulinových genů. Tento děj probíhá u kuřete od 15. embryonálního dne zhruba do stáří 6 týdnů, přičemž od doby pohlavního dospívání bursa postupně zaniká. Buňky, které přežijí negativní selekci (viz vznik BCR v kap. V.1.2), Fabriciovu bursu opouštějí v období kolem líhnutí mláďete (Arstila & Toivanen 1998; Wakenell 1998).

Prekurzory T buněk osidlují u kura thymus ve třech vlnách 6., 12. a 18. den embryonálního vývoje, přičemž všechny dávají vzniknout všem T buněčným subtypům (Vainio & Imhof 1995). První se objevují $\gamma\delta$ T buňky (12. embryonální den), následuje V β 1 typ $\alpha\beta$ T- buněk (15. embryonální den) a konečně 18. den lze identifikovat i V β 2 typ $\alpha\beta$ T buněk. První periferní $\gamma\delta$ T buňky nacházíme ve slezině kolem 15. embryonálního dne a první $\alpha\beta$ T buňky se objevují o 3 dny později (Arstila & Toivanen 1998). Tyto informace jsou velmi zajímavé, protože legitimují otázku, jaké jsou rozdíly v rozvoji antigenně specifické imunity už u čerstvě vylíhlých mláďat. Je velkou škodou, že srovnatelné informace pro většinu skupin volně žijících ptáků nejsou k dispozici.

O značné funkceschopnosti imunitního systému již ve stádiu pokročilého vývinu embrya svědčí i skutečnost, že u kura lze bez větších problémů praktikovat tzv. embryonální vakcinaci, tj. injektovat vakcínu již do vejce s osmnáctidenním embryem. Tato procedura byla úspěšně experimentálně použita pro vakcinaci hned proti několika chorobám a komerčně se široce užívá pro vakcinaci proti viru Markovy nemoci (Wakenell 1998). Není těžké si představit využití tohoto postupu tam, kde máme zájem měřit sekundární imunitní reakci mláďat již během prvních dní života.

V.7.3 Postnatální vývin imunitního systému

Některé skutečnosti týkající se vývinu ptačí imunity během prvních dní mláďete byly už v návaznosti na embryogenezi diskutovány v předchozích podkapitolách. Ve stručnosti jen zmiňme, že krátce po vylíhnutí je mláďe ještě chráněno protilátkami od matky a postupně se mu dovývají jednotlivé imunitní složky, které se stávají funkceschopnými už během několika málo dní. B lymfocyty prolifерují a podstupují genovou konverzi během juvenilní fáze ptačí ontogeneze ve Fabriciově bursě, která však zaniká v období dospívání. Pro vznik repertoáru BCR je kritická přítomnost bursy asi do 3 týdnů věku kuřete, pak svůj význam postupně ztrácí (Wakenell 1998). Tou dobou je již připravena velká diverzita B buněčných populací v periferních orgánech, kde se pak už jen prolifерací udržuje a žádné nové BCR nevznikají.

Thymus, jako primární orgán T buněčné imunity, vyprodukuje velké množství zralých T buněk ještě před vylíhnutím mláďete, takže už tou dobou je T buněčná imunita v podstatě funkceschopná a T buňky osidlují vznikající periferní lymfatické tkáně (Wakenell 1998). Už v období před vylíhnutím se při tom u kura začínají uvnitř zárodku tvořit základy významného sekundárního lymfatického orgánu – cékálních tonsil (Del Moral et al. 1998). Ty rychle rostou a již ve stáří 4 dní dosahují dospělé velikosti. Nejdříve (do stáří 4 dní) obsahují především $\alpha\beta$ (CD4⁺) T buňky, které zaujmou pozici v difúzní lymfatické tkáni. V dospělosti však v tonsilách dominují B buňky produkující IgM a IgA, které jsou soustředěny s subepiteliální vrstvě a germinálních centrech. V té době také tonsily osídí CD8⁺ lymfocyty. Slezina je v době líhnutí osazena heterofilními granulocyty, které ji však již během prvních tří hodin opouštějí a na jejich místo přicházejí makrofágy, eosinofilní a bazofilní granulocyty, jež ve stáří jednoho

dne nahrazují lymfocyty, které se postupně stanou prakticky jedinou leukocytární populací v tomto lymfatickém orgánu (Lucas & Jamroz 1961). Ve slezině pak závisí vznik germinálních center na věku, přičemž maximálního počtu dosahuje u kura ve věku 4 až 5 týdnů (Wakenell 1998). Lucas & Jamroz (1961) popisují změny v relativní početnosti různých leukocytárních typů v kostní dřeni po vylíhnutí, z nichž je patrně nejzajímavější infiltrace monocytů během prvních dní života mláděte. V této době se stává kostní dřeň zároveň nejdůležitějším orgánem produkce erythrocytů, thrombocytů a granulocytů. Peyerovy plaky na povrchu trávicí soustavy v době líhnutí zcela chybí a největšího rozsahu dosahují až ve stáří 16 týdnů, přičemž do 52. týdne se takřka úplně ztratí. Ani distribuce různých subpopulací T buněk v jiných částech GALT nedosahuje dospělých hodnot až do 4 až 5 týdnů. V současnosti není příliš jasné, jaký má toto odlišné zastoupení T buněčných populací krátce po vylíhnutí vliv na efektivitu fungování T buněčné složky imunity (Wakenell 1998).

Proměny v relativních leukocytárních počtech v krvi, které zmiňuje práce Lucas & Jamroz (1961) naznačují významné přesuny buněk imunitního systému v období několika hodin až dní po vylíhnutí mláděte. U mlád'at ve stáří 1-24 hodin se celkové počty leukocytů nacházely hluboko pod normálem, přičemž dominantní subpopulací byly heterofilní granulocyty. Postupně se však relativní počty leukocytů zvyšovaly, až ve stáří 4-6 dní dosáhly normálních počtů, přičemž heterofily byly zastoupeny méně než lymfocyty, které tvořily výrazně nejdominantnější leukocytární populaci v dalších fázích života. Bohužel je tento popis patrně poněkud zatížen nízkým počtem vyšetřovaných jedinců.

Dramatický postnatální vývin přitom prodělává i antigenně nespecifická složka humorální imunity. U kura a křepelky bylo například zjištěno, že komplementová aktivita stoupá rapidně během prvního týdne po vylíhnutí, načež následuje po určitou dobu plató a pak dále stoupá, až dosáhne hodnot odpovídajících dospělosti. Detekovatelná složka C3 je však přítomna již v 7-denním embryu (Koppenheffer 1998).

Zdá se, že postupný vývin prodělává také receptorové vybavení buněk imunitního systému. Kogut et al. (2002) například popisují, že IL-2 kura, který se účastní mnoha imunologických mechanismů, je ve svém působení na heterofilní granulocyty věkově dependentní. Fagocytózu a respirační vzplanutí heterofilů odebraných z periferní krve podporoval tento cytokin až po 7. dni věku kuřete, nikoliv však ihned po vylíhnutí. To poněkud kontrastuje se skutečností, že mladší mlád'ata mívají silnější imunitní reakce než mlád'ata starší. Okamura et al. (2004) zjistili, že mladší kuřata (ve stáří 4 týdnů) mnohem intenzivněji odpovídala na vakcinaci bakteriálním flagelinem než zvířata starší (8 měsíců). Tyto příklady tak dokládají, že imunitní systém se v raných fázích po vylíhnutí mláděte rychle vyvíjí, přičemž intenzivněji přijímá antigenní podněty ze svého okolí. Po dosažení určitého věku jsou pak jeho reakce postupně tlumeny.

Vývoj imunitních mechanismů v průběhu počátečních fází ontogeneze byl již nalezen i v ekologickém kontextu. Nebyla sice doposud studována mlád'ata různého stáří, avšak

i výsledky získané na mladých a dospělých ptácích ukazují určité vývinové změny v imunitním systému. Figuerola et al. (1999) při svém výzkumu vztahu imunity a zbarvení na strnadu cvrčivém (*Emberiza circlus*) shledali, že mladí jedinci mají v krvi relativně nižší podíl heterofilních granulocytů, avšak vyšší podíl eosinofilů než ptáci dospělí, ačkoliv mezi nimi nebyl zjištěn žádný rozdíl v poměru lymfocytů a monocytů vůči ostatním leukocytům. Jelikož však srovnání mladých ptáků a dospělců nebylo původním záměrem této práce, nelze z těchto výsledků bohužel odvodit příčinu tohoto rozdílu.

V.7.4 Rozdíly v imunitě mezi pohlavími

Mezi samci a samicemi existují mnohé fyziologické odlišnosti, které vyplývají z rozdílné produkce hormonů pohlavními orgány. Jelikož hormony působí na imunitní systém (viz následující podkapitola V.7.5), není překvapující, že nacházíme mezi oběma pohlavími imunologicky významné rozdíly. Soubor našich poznatků o těchto rozdílech u ptáků je ovšem notně omezený a u volně žijících druhů, u nichž lze předpokládat v souvislosti s výraznými fyziologickými změnami během roku nejzajímavější zjištění (Møller et al. 2003), sestává pouze z izolovaných informací, získaných povětšinou velmi málo zevrubnými metodami. O významu těchto rozdílů ovšem vypovídá skutečnost, že je možné intersexuální odlišnosti v různých imunologických parametrech nalézt už během prvních dní života mláďat. Tschirren et al. (2003) ve své studii na mláďatech sýkory koňadry (*Parus major*) zjistili pohlavně-specifický vliv experimentálně nastavené míry parazitace. Narozdíl od samic, u kterých se míra parazitace v žádné růstové charakteristice mláďat neprojevila, byli pokusně více parazitovaní mladí samci menší a vážili méně než samci z méně parazitovaných hnízd. Mimo to prokázali Tschirren et al. (2003) také nižší PHA-kožní reaktivitu u samců v porovnání se samicemi. Podobné rozdíly patrně přetrvávají i do dospělosti, neboť jak uvádějí Ots et al. (1998), existují u dospělých sýkor mezipohlavní rozdíly v poměru heterofily: lymfocyty (H/L) v krvi, které jsou patrně dány vyšší početností heterofilních granulocytů v krvi samic, přičemž početnost lymfocytů je pro obě pohlaví stejná. Mimo to mají samice také vyšší hematokrit. Ots et al. (1998) tyto rozdíly vysvětlují přítomností různých koncentrací pohlavních hormonů v tělech jedinců obou pohlaví a Tschirren et al. (2003) je považují za pohlavně-specifické strategie alokace omezených zdrojů. V případě hnízdících dospělých sýkor je ovšem možné ještě jiné vysvětlení, spočívající ve větší reprodukční zátěži samic v době měření imunologických parametrů (srovnej s kapitolou VIII.4.1). To potvrzují obdobné rozdíly v H/L poměrech a rozdíly v koncentracích globulinů, měnící se ovšem i v závislosti na roční době, zjištěné u stejného druhu ve studii Hōraka et al. (1998). Zajímavé přitom je, že na kurech bankivských (*Gallus gallus*) bylo v naprostém rozporu s výše uvedeným zjištěno, že samci (nikoliv samice) měli vyšší hematokrit a nižší počty lymfocytů v krvi, přičemž autoři

tohoto zjištění připisují rozdíly rovněž vlivu pohlavních hormonů (Zuk 1996). Podobně Jovani et al. (2004) zjistili u mladých čápů (*Ciconia ciconia*), že samice měly obdobnou či slabší reakci na PHA než samci. Na vlaštovkách (*Hirundo rustica*) přitom bylo prokázáno, že se obě pohlaví mohou lišit ve své věkové závislosti primární humorální odpovědi, zatímco v případě vlivu věku na sekundární odpověď žádný významný rozdíl mezi pohlavími zjištěn nebyl (Saino et al. 2003c). Hasselquist et al. (1999) zjistili u vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*), že samice měly nezávisle na fázi ročního cyklu vyšší sekundární humorální odpovědi než samci. Krom toho je potřeba uvažovat, že humorální a buněčné složky antigenně specifické imunity mohou být u obou pohlaví vyvinuty různě. Například McGraw & Ardía (2005) v mimohnízdním období zjistili, že samice měly lépe vyvinutou T buněčnou odpověď na PHA, zatímco samci humorální odpověď na SRBC. Tento rozdíl mohl mít souvislost s odlišnou koncentrací karotenoidů a testosteronu v krvi obou pohlaví.

Důkazy pro existenci mezipohlavních rozdílů nacházíme ale také u domácího kura, který změnami v reprodukční zátěži vzhledem k řízenosti chovu neprochází. Cheng & Lamont (1988) například detekovali pro obě pohlaví odlišnosti ve fagocytycké aktivitě a T buněčné odpovědi. I na tomto druhu byly ovšem zjištěny rozdíly v leukocytárních počtech mezi samci a samicemi, obdobné těm, o kterých referovali Ots et al. (1998) a Hōrak et al. (1998). Lucas & Jamroz (1961) podávají u kura přehled o významných rozdílech v relativním zastoupení lymfocytů (více u samic) a heterofilů (více u samců). V souladu s představou Otse et al. (1998) pak popisují Arstila & Lassila (1993) rozdíl v hladině $\gamma\delta$ T lymfocytů u samců a samic vznikající pod vlivem testosteronu. Zajímavé je, že estrogeny a gestageny neměly žádný detekovatelný účinek na složení T buněčných populací v periferní krvi. Výsledky Arstila & Lassila (1993) ovšem nepodporují hypotézu o zásadním významu thymu v androgenně-dependentní expanzi subpopulace $\gamma\delta$ T buněk, jelikož podání testosteronu in vivo nemělo na relativní frekvence jednotlivých T lymfocytárních subtypů v thymu žádný vliv, zatímco frekvence $\gamma\delta$ T buněk v periferní krvi vzrostla.

Na druhou stranu je třeba na tomto místě zmínit, že existuje relativně velký počet prací, které žádné rozdíly v určité sledované aktivitě imunitního systému v závislosti na pohlaví nezjistily (např. Lifjeld et al. 2002; Ewenson et al. 2003; Raberg et al. 2003; Saino et al. 2003c; Møller et al. 2004). To je ovšem v souladu s naším očekáváním, že se mezipohlavní rozdíly projevují pouze tam, kde jsou nevyrovnané reprodukční náklady obou pohlaví nebo tam, kde si odlišný tlak sexuální selekce a koevoluce s parazity vyžádaly tyto rozdíly. Nelze proto imunologicky významné odlišnosti očekávat u všech druhů a ve všech ročních obdobích.

V.7.5 Vliv hormonů na imunitní systém

Vzájemná souvislost hormonální signalizace a imunitního systému je zřejmá. Bylo zjištěno, že mnohé hormony mají imunoregulační účinky a že imunitní procesy zpětně ovlivňují koncentrace různých hormonů v těle (El Lethey et al. 2003). V následujících několika odstavcích se stručně zmíníme o imunologickém významu dvou nejvýznamnějších imunoregulačních hormonů u ptáků.

Kortikosteron

Zdá se, že kortikosteron je „stresovým“ hormonem organismu. Bylo prokázáno, že jeho podání vyvolává u ptáků stres, který je patrný mimo jiné i ve zvýšení poměru heterofilů ku lymfocytům v krvi a snížením protilátkové i prozánětlivé odpovědi (El Lethey et al. 2003). Podobně bylo zároveň zjištěno, že stres zvyšuje hladinu kortikosteronu, který se pak projevuje obdobnými změnami imunologických parametrů. Rubolini et al. (2005) prokázali, že mláďata vylíhlá z vajec, do kterých byl pokusně aplikován kortikosteron měla sníženou T buněčnou imunitní odpověď, ale humorální složka imunity a viabilita byly u mláďat nedotčeny.

V rozporu s výše nastíněným imunosupresivním působením kortikosteronu jsou ovšem výsledky Saino et al. (2002c). Ti u vlaštovek (*Hirundo rustica*) nezjistili žádnou souvislost mezi naměřenou hladinou tohoto hormonu a zvýšením intenzity kožní imunoreakce na PHA u samců vystavených sníženým reprodukčním nákladům, které měly snížit hladinu působení reprodukčního stresu. Naproti tomu však pak u mláďat vystavených suboptimálním potravním podmínkám zaznamenali jak zvýšenou koncentraci kortikosteronu tak i imunosupresi (Saino et al. 2003e). Z toho by mohlo vyplývat vysvětlení, že kortikosteron působí jako imunoregulátor pouze tam, kde to má pro organismus nějaký adaptivní význam, přičemž sám nemusí být proximální příčinou imunosuprese.

Testosteron

Testosteron je hormonem, jenž má neobyčejný význam jak pro expresi pohlavních znaků tak i pro imunitní systém. Na tomto místě zmíníme pouze jeho vliv na imunitu, zatímco jeho role při expresi různých ornamentů uplatňujících se v sexuální selekci bude diskutována v části IX.

U kura bylo zjištěno, že testosteron ovlivňuje složení subpopulací imunologicky významných buněk v krvi (Arstila & Lassila 1993). Vztah koncentrace testosteronu v tělech volně žijících ptáků a jejich imunitního systému je v současné době velmi intenzivně studován, a není prozatím zcela jisté, zda má testosteron přímé nebo nepřímé účinky na imunitu ani to, je-li opravdu jeho vliv vždy pouze imunosupresivní. Některé studie, např. Peters

(2000) na modropláštníku nádherném (*Malurus cyaneus*), Casto et al. (2001) na strnadi zimním (*Junco hyemalis*), Buchanan et al. (2003) na vrabci domácím (*Passer domesticus*) či Owen-Ashley et al. (2004) na strnadi zpěvném (*Melospiza melodia*) prokázaly jeho spojitost s poklesem T buněčné či humorální imunity, zatímco výsledky jiných studií jsou spíše negativní (např. Saino et al. 1995 na vlaštovkách obecných či Hasselquist et al. 1999 a Westneat et al. 2003 na vlhovci červenokřídlém, *Agelaius phoeniceus*). Jak navrhli např. Mougeot et al. (2004), může být účinek testosteronu na imunitní systém částečně nepřímý, zprostředkovaný poklesem kondice jedince. Vychází při tom z pozorování učiněných na samcích bělokura rousného (*Lagopus lagopus*), kteří se v době páření oddávají pod vlivem testosteronu energeticky náročným soubojům snižujícím jejich celkovou kondici. Takovýto vztah testosteronu a imunitního systému by potvrzovali i výsledky Duckworth et al. (2001), kteří prokázali, že samci hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) v lepší kondici mají více testosteronu a méně kortikosteronu. Navíc samci, kterým byl pokusně podán testosteron měli intenzivnější průběh kokcidiální infekce než samci, kterým podán nebyl resp. samci, kterým byla hladina testosteronu uměle snížena odstraněním gonád. Hasselquist et al. (1999) potvrdili, že pokusně podaný testosteron snižuje tělesnou hmotnost a tukové zásoby ptáků. Tyto skutečnosti by ovšem mohly potvrzovat nejen tuto hypotézu (vyšší aktivita způsobuje vyšší energetické výdaje), ale i alternativní hypotézu, která předpokládá nepřímý účinek testosteronu zprostředkovaný stresovým hormonem kortikosteronem (Møller 1995; Buchanan et al. 2003). Pro význam asociace vlivu testosteronu a kortikosteronu vypovídají i výsledky Evans et al. (2000). Ti prováděli imunokompetenční pokusy na kastrovaných samcích vrabce domácího. Vrabci byli rozděleni do čtyř skupin, přičemž první byla v době pelichání nekastrovaná kontrola a zbývajícím třem kastrovaným bylo implantováno placebo, nízké množství testosteronu a vysoké množství testosteronu. Zjistili, že normální samci měli vyšší sekundární humorální odpověď na SRBC než samci kastrovaní a v rámci kastrovaných samců měli vyšší hladinu protilátek v krvi ti, kterým bylo podáno málo testosteronu a nejnižší odpověd vykazovali samci, jimž bylo podáno placebo nebo vysoká dávka testosteronu. Jelikož přitom zjistili rozdíly mezi skupinami v hladině kortikosteronu, zohlednili v následující analýze možný vliv hladiny tohoto hormonu. V tom případě zjistili, že největší schopnost reakce vykazovali opět normální jedinci, avšak zvířata, kterým byla implantována vysoká dávka testosteronu měla vyšší odpověd než ta, kterým bylo podáno jen málo testosteronu. Z výsledku tohoto pokusu autoři vyvozují, že imunoregulačním prvkem by mohl být spíše kortikosteron, jehož produkce by mohla být důsledkem hladiny testosteronu, přičemž testosteron by mohl na imunitní systém působit i pozitivně přes dominanci zvířete.

Imunitní systém, jako všechny ostatní fyziologické systémy, je z hlediska regulačních mechanismů velmi složitý. Je proto s podivem, že prozatím nebyla v ekologické imunologii

věnována pozornost možnosti současného spolupůsobení více hormonů na imunitní systém, přičemž důležitá by nebyla hladina jednotlivých hormonů, ale také jejich poměrné zastoupení. O složitosti tohoto systému vypovídá také skutečnost, že vztah hormonů a imunity je obousměrný. V mnoha pokusech se experimentálně vyvolané změny některé součásti imunitního systému následně projevily změnami koncentrace hormonů. Pokud je například do kuřete intravenosně injektován ChIL-1, brzy způsobí krátkodobý vzestup hladiny kortikosteronů v krevním séru (Weining et al. 1998). Stejný účinek má i obdobně aplikovaný ChIL-6 (Schneider et al. 2001), takže se zdá, že se jedná o obecnější závislost. Studovat vlivy jednotlivých hormonů bez hledání souvislostí v celku, má proto podle mého názoru jen malou naději na úspěch.

V.8 Mezidruhové rozdíly v imunologické reaktivitě

I přes velkou podobnost imunitních mechanismů v rámci obratlovců nacházíme mezi jednotlivými druhy určité rozdíly v jejich predispozici vypořádat se s různými typy parazitů. Vezmeme-li v úvahu rozdílnou evoluční historii jednotlivých druhů, která byla utvářena nezávislými koevolucemi s různými parazity (např. Møller et al. 2005), pak zřejmě očekáváme, že nalezneme významné mezidruhové rozdíly v citlivosti imunitního systému k různým antigenům nebo různé vyladění T_H1 a T_H2 odpovědi. V této kapitole ovšem nebudeme věnovat pozornost jemným mezidruhovým odlišnostem na molekulární úrovni, ale spíše rozdílům, které lze považovat právě za důsledek dlouhotrvajících koevolučních procesů mezi hostiteli a jejich parazity. Bohužel je o těchto rozdílech v rámci ptáků prozatím známo jen velice málo. Může to být do značné míry dáno tím, že imunologický výzkum pracuje více méně pouze s modelovými druhy (především domácí kur). Je tak známo mnoho imunologicky významných odlišností mezi inbredními kuřecími kmeny (viz např. (Lamont & Smyth 1984; Cheng & Lamont 1988; Parmentier et al. 1993a, 1994; Dil & Qureshi 2002; Leveque et al. 2003), které jsou důsledkem umělé selekce. Pověštinou nám ale chybí detailnější informace o rozdílech mezi volně žijícími druhy. Určitou výjimku představuje práce Blount et al. (2003a), která studuje rozdíly mezi mrchožravými a nemrchožravými ptačími predátory. Autoři přitom zjistili, že mrchožraví ptáci, kteří jsou patrně vystaveni většímu tlaku různých parazitů, měli relativně větší sekundární lymfatické orgány, větší koncentrace leukocytů v krvi a v reakci na aplikaci SRBC i vyšší koncentrace protilátek v krevní plasmě v porovnání s nemrchožravými druhy, avšak měli relativně menší zastoupení lymfocytů mezi celkovým množstvím leukocytů v krvi a nevykazovali vyšší odpověď na PHA, z čehož Blount et al. (2003a) vyvozují, že mrchožraví ptáci investují více do mechanismů vrozené imunity, která tak tvoří silný štít chránící je před vývojem pathogenní infekce. Jejich výsledky navíc potvrzují dobře známý fakt, že spolu různé mechanismy imunitní odpovědi (antigenně nespecifická,

T buněčná a protilátková) nemusí korelovat. Podobně pro dutinově hnízdící ptáky dokázali Møller et al. (2003) vyšší rozdíly v imunitní odpovědi mezi hnízdní a nehnízdící sezónou oproti volně hnízdícím druhům, které vysvětlují intenzivnějším parazitárním tlakem na druhy hnízdící v dutinách.

Možnou příčinou rozdílné vnímavosti různých druhů vůči různým druhům parazitů (ačkoliv výše popsané rozdíly v odpovědi na PHA test s tímto očividně souviset nemohou) by mohla být rozdílná alelická variabilita MHC komplexu u různých druhů (srovnej např. Piertney 2003; Richardson & Westerdahl 2003; Bonneaud et al. 2004 nebo Kaufman et al. 1999b; Westerdahl et al. 2000; Ekblom et al. 2003). Byla navržena hypotéza, že druhy migrující na větší vzdálenosti by měly mít větší variabilitu MHC alel a větší počet MHC genů než druhy stálé. Do jaké míry s tímto ale opravdu souvisí výsledky Freeman-Gallant et al. (2002) na strnadcí skvrnitěm (*Passerculus sandwichensis*) a do jaké míry je jimi zjištěný polymorfismus v MHC klastru u tohoto druhu dán obecněji příslušností k monofyly pěvců, není v současnosti zřejmé.

V.9 Význam karotenoidů ve fungování imunitního systému

Jsem si plně vědom skutečnosti, že různých sloučenin, které tím či oním způsobem moduluji fungování imunitního systému, je mnoho a vzhledem k omezenému rozsahu této práce nemohou být v žádném případě zmíněny všechny, ba dokonce ani jejich většina. Následující text věnovaný karotenoidům byl ale do kapitoly o fungování ptačího imunitního systému přece jen vložen, a to především proto, že karotenoidy představují, pomineme-li na chvíli jejich fyziologickou aktivitu, zároveň pigmenty, které jsou u ptáků v hojné míře využívány při expresi samčích pohlavních znaků. Nastínění jejich významu v imunitních mechanismech nám proto umožní snáze a bez dalšího pozdějšího ozřejmování pochopit různé trade-offs v jejich použití, kterým se budeme věnovat v následujících kapitolách při revizi závislosti exprese samčích pohlavních znaků na imunokompetenci jejich nositele.

Karotenoidy patří mezi esenciální sloučeniny, které si živočichové nejsou schopni sami vyrobit a získávají je pouze z rostlinné (resp. v dalším trofickém stupni pak z živočišné) potravy (Olson & Owens 1998; Møller et al. 2000), přičemž jejich zastoupení je v různých rostlinných pletivech různé; obvykle ale nejsou příliš hojné. Z toho vyplývá jejich relativní vzácnost a potřeba s nimi v živočišném organismu pokud možno šetrně hospodařit (u karnivorů neúměrně více než u herbivorů). Karotenoidy ovšem živočichové dále transportují a metabolizují, takže dostatek určitého karotenoidu je závislý i na genetických dispozicích organismu (Chew 1993; Møller et al. 2000; Hill 2002).

Mimo skutečnost, že jsou karotenoidy obvykle červenými až žlutými pigmenty, mají také svůj fyziologický význam (shrnutí v Olson & Owens 1998; Vershinin 1999). Bylo navrženo, že se účastní absorpce volných radikálů, hojení ran, regulace produkce steroidních hormonů, a jsou také, prekurzory vitamínu A, který má mimo jiné svou funkci i v imunitním systému (Geissmann et al. 2003), a retinalu, který je důležitý jako zrakový pigment. Mimo to jsou karotenoidy nezbytné pro správné fungování nervového systému a transportu látek v organismu. Velký význam mají karotenoidy patrně také v regulaci imunitního systému. Jak bylo zjištěno u člověka, může mít nedostatečný příjem karotenoidů vliv i na výskyt některých infekčních nemocí (Chew 1993) a rakoviny (Bendich 1989; Bendich 1991; Hughes 2001).

V ekologické-imunologii je nejčastěji diskutovanou funkcí karotenoidů v organismu jejich antioxidantní působení. Bylo totiž zjištěno, že se karotenoidní sloučeniny (např. β -karoten nebo kanthaxantin, nejvíce však lykopen) mohou podílet na redukci volných kyslíkových radikálů, které vznikají mimo jiné při oxidativním vzplanutí, jež je důležitou součástí baktericidních mechanismů imunitního systému (Burton 1989; Bendich 1989; Bendich 1991; Chew 1993). Z těchto procesů také vyplývá zvýšená citlivost imunitních buněk k oxidativnímu poškození (Hughes 2001). Je zřejmé, že karotenoidy nejsou jedinými antioxidanty v organismu. Významné jsou v tomto ohledu např. vitamíny E a C nebo antioxidantní enzymy, které se vyskytují v citlivých tkáních ve vysokých koncentracích (Hartley & Kennedy 2004). Burton (1989) navrhl možnost komplementárních účinků těchto různých antioxidantních sloučenin. Naproti tomu Hartley & Kennedy (2004) se domnívají, že role karotenoidů jako antioxidantů v organismu není významná, jelikož z nich mohou po ataku volnými radikály vzniknout pro organismus toxické aldehydy. Ty vznikají ve zvýšené míře především tehdy, když jsou tkáně vystaveny silnému působení radikálů a zároveň je vyčerpán vitamin C. To by potvrdilo domněnku (Olson & Owens 1998), že karotenoidy mohou být pro svého nositele toxické. Tato skutečnost by pak mohla mít zásadní význam pro naše chápání významu některých sexuálních znaků samců (viz kapitola IX.1.2).

Zdá se, že různé karotenoidy působí na imunitní systém různě (Chew 1993; Chew et al. 1999; Hughes 2001; avšak srovnaj s McGraw & Ardia 2004). Přitom mají patrně význam jako samostatné nutriční komponenty, nikoliv jako pouhé prekurzory jiných látek (např. β karoten jako prekurzor vitamínu A, (Bendich 1989); jen méně než 10% karotenoidů jsou ovšem savci schopni podobným způsobem metabolizovat, (Chew 1993)). Jak bylo zjištěno na β -karotenu, v tomto ohledu nejstudovanějším karotenoidu, mohou některé karotenoidy protektivně působit na imunitní systém organismu vystaveného UV záření (Hughes 2001) a jiným mutagenům (Bendich 1991). Některé práce detekovaly dokonce přímý vliv určitých karotenoidů na množství $CD4^+$ T buněk v organismu (Bendich 1989), ačkoliv jiné studie tento vliv nepotvrdily (Moriguchi et al. 1996). Několik pokusů také ukázalo, že zvýšení přijímané

denní dávky β -karotenu se projevilo zvýšením počtu lymfocytů v krvi a zvýšenou intenzitou odvržení alogenního transplantátu (Bendich 1989). Bendich (1991) zmiňuje u zdravých, dobře živých zvířat vliv β -karotenu a kanthaxantinu v potravě na proliferační aktivitu T i B buněk po stimulaci mitogeny (podobně i Bendich 1989; Chew 1993; Moriguchi et al. 1996, přičemž Chew 1993 předkládá i údaje o podobném efektu karotenoidů přidaných do buněčné kultury během inkubace). McGraw & Ardia (2003) popisují, že u zebřičky (*Taenopygia guttata*) zvýšení obsahu luteinu a zeaxantinu v potravě mělo pozitivní vliv na humorální i buněčnou imunitu. (McGraw & Ardia 2004) však mezi těmito dvěma karotenoidy nezjistili rozdíl v účinku na buněčnou složku imunity. Navržen byl také význam β -karotenu v mechanismech NK buněčné imunity (Bendich 1989; Bendich 1991), v aktivitě neutrofilních granulocytů (Chew 1993) a v signalizaci APC buněk (monocytů) prostřednictvím zvýšené exprese MHC II gp a adhesivních molekul (shrnuto v Hughes 2001). Vliv některých karotenoidů na produkci TNF zmiňuje např. Bendich (1989). Zdá se přitom, že - alespoň u člověka - nemá zvyšující se zastoupení karotenoidů v potravě žádný vliv na efektivitu imunitních mechanismů, pokud je organismus zdravý a v dobré kondici (Hughes 2001).

Je jisté, že různé druhy zvířat o různém stáří nebo reprodukčním statutu budou mít odlišné nároky na příjem karotenoidů (Olson & Owens 1998), což může souviset s odlišnou účinností využití karotenoidů (Hughes 2001). Tyto rozdíly se tedy nezbytně projeví i na korelaci příjmu karotenoidů a indikátorech fungování imunitního systému či exprese pohlavního znaku.

VI POUŽÍVANÉ IMUNOLOGICKÉ METODY

Následujících několik stran věnujeme metodám, pomocí nichž lze imunitní systém zkoumat. Bohužel lze v současné době pozorovat v imunologické ekologii jen velmi pomalý vývoj používaných metod, který je v silném rozporu se současnou metodologií používanou ve veterinární imunologii. Je jasné, že na začátku každého komplexního výzkumu musí nutně stát jednoduchý pilotní experiment, který naznačí, jakým směrem se dále ubírat. Nemělo by však zůstat pouze u něj a tam, kde byl nalezen nějaký vztah, je vhodné metodiku upravit tak, aby bylo možné získat o fungování zkoumaného systému co nejdetailnější informace. Tato kapitola si tedy klade za cíl nastínit několik možností používaných metod, které je možné k tomuto účelu použít. Zmíněny jsou samozřejmě i bazální metody používané v ekoimunologii do současné doby, jejich výhody, nevýhody a aplikovatelnost.

VI.1 Odběr vzorků ze zvířat

Obecně lze rozdělit metody výzkumu imunity do dvou kategorií podle toho, zda vyžadují nebo nevyžadují usmrcení vyšetřovaných zvířat. Naneštěstí pro terénní zoology, kteří často potřebují svá pokusná či sledovaná zvířata udržet na živu, používá imunologie běžně postupů souvisejících s izolací vnitřních lymfatických tkání (např. sleziny či částí sliznic), jež nelze bez použití chirurgických praktik ze živého zvířete odebrat. Větší pozornost tedy v následujícím textu věnujeme oné menší skupině postupů, které lze provádět přímo *in vivo* nebo *in vitro* na vzorcích získaných na živém zvířeti, ačkoliv tam, kde je to z nějakého důvodu zajímavé, popíšeme i některé jiné metody *ex vivo*.

VI.1.1 Odběr krve

Krev se u ptáků odebírá obvykle venepunkcí jugulární (*v. jugularis externa*) nebo pažní (*v. basilica* a *v. ulnaris*) žíly (Fleischer 1980; Hůrak et al. 1998) anebo žíly metatarsální (*v. metatarsalis plantaris superficialis medialis*; viz např. Hůrak et al. 1998; Ots et al. 1998; Buchanan et al. 2003). Z drobného pěvce o velikosti sýkory nebo vlaštovky lze odebrat bez většího negativního vlivu na vyšetřovaného jedince 150-200 μ l krve (Hůrak et al. 1998; Saino et al. 2003c). Podle účelu se pak z krve připraví buďto krevní nátěr sloužící po obarvení k počítání poměru jednotlivých leukocytárních typů nebo se vzorek centrifuguje a supernatant a sediment se konzervují zvlášť. Před centrifugací je možné vzorek ředit různými roztoky podle účelu izolace (viz např. Fleischer 1980)). Inkubací na plastové podložce lze z krve vyizolovat adherentní makrofágy a trombocyty (např. Fleischer 1980; Kaspers et al. 1993, 1994). Po propláchnutí zůstanou na podložce přichyceny pouze tyto silně adherentní buňky, zatímco méně adherentní B lymfocyty a neadherentní T lymfocyty se

shromažďují v proplachovém roztoku. T a B buňky lze oddělit jejich inkubací s nylonovou vlnou, přičemž B lymfocyty se přichycují na vlákna vlny, zatímco T lymfocyty se proplachem dostávají do sběrného roztoku. Fagocyty lze izolovat v silném magnetickém poli za použití prášku karbonylželeza, který je buňkami z média fagocytován (např. Fleischer 1980). Takto vyizolované buňky pak lze dále kultivovat pro potřeby in vitro analýz (viz např. Kogut et al. 2002). Výhodou všech těchto izolačních procedur je jejich nenáročnost a rychlost, např. ve srovnání s průtokovou cytometrií. Nelze ovšem získat leukocytární populaci o takové čistotě, jaké dosahuje právě průtoková cytometrie (viz podkapitola VI.3.5).

Pokud není možné další analýzy provést ihned po odběru krve, lze vyizolované leukocyty z krve po delší dobu uchovávat v kryoprezervačním roztoku při nízkých teplotách (-70°C). Nevýhodou ovšem je, že buňky tímto procesem ztrácejí na viabilitě (z 99% na přibližně 72-89%). Proto je potřeba také relativně velké množství krve, aby i přes značné ztráty v procesu izolace buněk a jejich uchovávání zůstalo dostatek životaschopných buněk pro pozdější analýzy (Finkelstein et al. 2003; Lavoie & Grasman 2005).

VI.1.2 Odběr tkání z orgánů

Metody využívající orgánové vzorky nelze samozřejmě provádět bez usmrcení sledovaných zvířat. Nejčastějším odebíraným orgánem je slezina, neboť patří mezi nejdůležitější sekundární lymfatické tkáně, a obsahuje tak většinu buněk potřebných pro zjištění aktivity různých složek imunitního systému. Ze sleziny připravená buněčná suspenze je centrifugována, čímž jsou odstraněny erythrocyty a pro další analýzy se používá pouze supernatant obsahující leukocyty resp. protilátky (viz např. Beal et al. 2004). Obdobně lze odebrat samozřejmě i další imunologicky významné tkáně jako např. střevní sliznice, cékální tonsily (Beal et al. 2004),

VI.2 Stanovení relativní velikosti lymfatických orgánů

Je zřejmé, že se nejedná o metodu stanovení predispozice k intenzivní imunitní odpovědi, která by byla proveditelná na živých zvířatech. Usmrcení vyšetřovaného jedince je ovšem pro mnoho ekoimunologických studií podmínka nepřijatelná. Z tohoto důvodu zde tuto metodu jen pro úplnost zmíníme, aniž bychom zacházeli do podrobností. Jako korelát funkceschopnosti imunitního systému může sloužit velikost sleziny, měřená jako její objem (Møller et al. 2003; Blount et al. 2003a). Při tom se považuje slezina o větších rozměrech jako indikátor jednak lepší imunitní kondice a jednak také probíhající nemoci.

VI.3 Stanovení množství jednotlivých buněčných typů a imunologicky významných molekul ve vzorku

VI.3.1 Relativní četnost jednotlivých leukocytárních typů v krevním nátěru

Stanovení relativní četnosti různých leukocytárních typů v krevním nátěru je záležitost po technické stránce poměrně jednoduchá, finančně nenákladná a v terénu prakticky proveditelná. Proto je hojně využívána v různých ekoimunologických studiích. Krevní nátěr zhotovený ihned po odběru krve je fixován v absolutním methanolu nebo ethanolu a poté obarven některým hematologickým barvením – např. azur-eosinem (Hůrak et al. 1998; Ots et al. 1998; Ots & Hůrak 1998; Hůrak et al. 2000; Saks et al. 2003), Giemsovým barvivem (Rose et al. 1979; Dufva & Allander 1995; Moreno et al. 1998; Zuk & Johnsen 1998; Figuerola et al. 1999; Merino et al. 1999; Morales et al. 2004), barvením Diff-Quik (El-Lethey et al. 2003), Wrightovým barvivem (Lucas & Jamroz 1961; Fudge 1989) nebo May-Grünwald-Giemsa barvicí metodou (Saino et al. 1995, 1999; Christe et al. 2000; Christe et al. 2001; Ewenson et al. 2001; Møller & Petrie 2002; Buchanan et al. 2003). Takto připravené preparáty se pak prohlížejí pod mikroskopem při silném zvětšení (1000x) a jsou zaznamenávány počty jednotlivých typů lymfocytů zjištěné do celkového počtu 100 leukocytů. Vyjádřením zastoupení jednotlivých typů leukocytů jsou tedy procenta (Fudge 1989). Ots et al. (1998) považují poměr heterofilních granulocytů ku lymfocytům (H/L) spolu s celkovým množstvím plasmatických proteinů (viz dále) za neadekvátnější ukazatele imunitního stavu při ekologickém výzkumu. Poměr H/L je přitom indexem stresu – zvyšuje se v závislosti na infekčních chorobách, hladovění a dráždění i zranění (Hůrak et al. 1998; El-Lethey et al. 2003). V případě parazitace jsou však změny H/L poměru patrně velmi závislé na druhu parazita (Fudge 1989). Např. Rose et al. (1979) zjistili u kuřat infikovaných kokcidiemi (*Eimeria*) nárůst jak hladiny lymfocytů tak i heterofilů a makrofágů. Reakce na stejný patogen může být patrně také druhově specifická (Hůrak et al. 2003).

Z krevního nátěru je také podle některých autorů možné více méně přesně stanovit relativní počet všech leukocytů vůči stanovenému počtu erythrocytů, což je veličina užitečná pro diagnózu leukocytózy a leukopenie, které provázejí mnoho chorob (Fudge 1989). Ots et al. (1998) i Hůrak et al. (2000) uvádějí přepočtení přibližně na 10 000 erythrocytů. Bohužel však vůbec nezmiňují způsob odhadu 10 000 červených krvinek. Je však pravděpodobné, že k tomuto účelu použili obdobný postup jako Hůrak et al. (1998), kteří počítali celkový počet leukocytů ve 100 mikroskopických polích při tisícinásobném zvětšení, přičemž uvažovali počet erythrocytů v jednom poli konstantně za 100 buněk. Podobně Figuerola et al. (1999) spočítali počty leukocytů ve 30 mikroskopických polích rovněž při tisícinásobném zvětšení a tuto hodnotu přepočítali pomocí jednoduchého vzorce na celkový počet leukocytů v 1 mm³

krve. Aby jejich výsledky odpovídaly skutečnosti, museli je ovšem korigovat přes hematokrit (podobně Christie et al. 2001 a Møller & Petrie 2002). Co ovšem Figuerola et al. (1999) ani Hůrak et al. (1998) ve své práci neuvádějí, je proces, pomocí kterého zajistili rovnoměrné rozprostření krevních buněk na roztěrovém skle ve všech odebíraných vzorcích tak, aby bylo v 5 mikroskopických polích vždy 1000 erythrocytů resp. v jednom poli 100 erythrocytů (zde je překvapující, že ačkoliv se krevní nátěry připravují vždy obdobně, počty erythrocytů na jedno mikroskopické pole se v obou těchto pracích liší). Takovýto výpočet celového množství leukocytů v krvi je patrně zatížen velkou chybou. Množství erythrocytů v určitém objemu krve lze stanovit pomocí hemocytometru (Buchanan et al. 2003). Pro účel stanovení celkového množství leukocytů v krvi zmiňují (Ots et al. 1998) ještě používání metody měření mocnosti leukocytární vrstvy v heparinizované kapiláře s odebranou krví ihned po centrifugaci (*buffy coat layer*). Tento způsob stanovení množství leukocytů v krvi použili jako pomocná charakteristika např. Moreno et al. (1998) či Cadee (2000). Ots et al. (1998) však tuto metodu pro její nízkou výpovědní hodnotu nedoporučují.

Samostatnou pomocnou charakteristikou momentální kondice je též stanovení *hematokritu*, tedy relativního množství erythrocytů v krvi (Hůrak et al. 1998; Ots et al. 1998). Pomocí měření hematokritu může být detekována anemie, která často provází nemoci (Fudge 1989). Tato metoda se provádí tak, že se krev odebírá do heparinizované kapiláry, která se pak centrifuguje a měří se proporce erythrocytárního sedimentu vůči celkovému sloupci krve v kapiláře.

VI.3.2 Stimulace buněk imunitního systému pomocí SRBC *in vivo*

SRBC je zkratka pro ovčí červené krvinky (*sheep red blood cells*), přičemž pro níže popsanou metodu se vžil termín SRBC-injekční test (*SRBC-injection assay*). Jedná se v podstatě o stimulaci imunitní odpovědi aplikací multiantigenních částic, v tomto případě ovčích erythrocytů (Hůrak et al. 2003). Tento postup simuluje napadení jedince novým parazitem, neboť imunitní systém reaguje na nepathogenní erythrocyty normálním rozvinutím T i B buněčné odpovědi. Podobně lze použít i jiné antigeny neparazitárního původu - kupříkladu KLH (*keyhole limpet hemocyanin*, viz např. Hasselquist et al. 1999; Sijben et al. 2000; Hangalapura et al. 2003) nebo BSA (*bovine serum albumine*; Parmentier et al. 1993b; Parmentier et al. 1997). Určitou nevýhodou tohoto testu je skutečnost, že například produkcí detekovatelného množství protilátek na SRBC reaguje jen 75% vyšetřovaných jedinců (Hůrak et al. 2003). To by mohlo být způsobeno skutečností, že SRBC nenesou žádné PAMP, které by mohly aktivovat APC.

K vlastnímu vyšetření funkce imunitního systému po této proceduře se pak používají jiné metody uvedené v této kapitole (např. stanovení H/L poměru nebo koncentrace protilátek v krevním séru, přičemž o nejběžnější z nich - vyšetření množství protilátek při primární a sekundární imunitní reakci pojednává podkapitola VI.7.2).

VI.3.3 Stanovení celkové koncentrace plasmatických proteinů

Stanovení koncentrace všech proteinů v krevní plasmě se používá jako pomocné kritérium při diagnostice nemoci, neboť ta je velmi často provázena poklesem hladiny plasmatických proteinů (Ots et al. 1998; Tella et al. 2000). Jelikož ovšem množství protilátek v séru během infekce narůstá, stanovuje se tento ukazatel spíše jako pokles poměru albuminu (nejpočetnějšího proteinu normální krevní plasmy, jehož hladina za patologických stavů klesá) ku globulinům, tedy proteinům akutní fáze a protilátkám (Hõrak et al. 1998; Ots et al. 1998). Vlastní stanovení množství těchto proteinů se pak provádí za použití standardní gelové elektroforézy (Hõrak et al. 1998; Ots et al. 1998; Hõrak et al. 2000).

VI.3.4 Sedimentace

Tato metoda odrážející množství plasmatických proteinů (včetně protilátek) a hematokrit se používá v ekoimunologických studiích jen zřídka. Jednou z výjimek je například práce Garamszegi et al. (2005) prováděná na vlaštovkách (*Hirundo rustica*). Postup je takový, že krev je odebrána do kapilár, které se poté jednostranně zataví a ponechají po určitou dobu za konstantní teploty ve vertikální poloze, načež je odečten poměr volné plasmy bez buněk ku celkovému objemu krve v kapiláře. Rychlost sedimentace přitom vypovídá o množství proteinů v krvi, a tedy vysoké hodnoty indikují zhoršený zdravotní stav jedince. Jelikož ovšem nelze na základě této metody odlišit výše popsané dva jevy (množství proteinů v krvi a hematokrit) ani identifikovat příčinu zvýšené hladiny proteinů, využívá se obvykle jiných, přesnějších metod.

VI.3.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie náleží v dnešní době mezi metody s velice širokým využitím. Jedná se o techniku, která umožňuje nejen buňky nebo jejich komponenty (popř. celé shluky buněk) počítat, ale také definovat několik jejich vlastností najednou a na základě těchto vlastností je pak i separovat (Ormerod 2000). Separované buněčné typy lze pak dodatečně barvit a identifikovat podle jejich morfologie nebo dále živé kultivovat a charakterizovat jejich aktivitu in vitro. V imunologii tak tato metoda představuje mocný nástroj pro další výzkum jednotlivých leukocytárních linií. Základním principem je rychlý průtok buněk v roztoku měřicí komorou,

v níž buňky procházejí přes laserový paprsek. Tím dojde k emitaci fluorescenčního záření, které se pak využívá ke spektrometrické detekci povrchových molekul značených fluorescenčními značkami (např. fluoresceinem). Ke specifickému fluorescenčnímu označení povrchových molekul (např. CD) sledovaných buněk se používá především vazba monoklonálních protilátek (ačkoliv je možné pro některé struktury použít třeba některé lektiny) nesoucích fluorescenční značku. Tyto protilátky jsou v dnešní době již dobře komerčně dostupné pro velký počet antigenů. Různými fluorescenčními značkami můžeme označit větší počet různých povrchových molekul najednou, takže lze ve výsledku rozlišit relativně velký počet různých typů buněk, na kterých navíc můžeme stanovit i některé metrické parametry a určit množství přítomných označených povrchových molekul. Pomocí průtokové cytometrie je možno obdobným způsobem také detekovat intracelulární cytokiny nebo expresi určité mRNA (a stanovit jejich množství), odhalit proliferační buňky anebo buňky podléhající apoptóze. Pro různé ekologické studie by mohla být také důležitá informace o viabilitě nejrůznějších buněk, kterou lze rovněž za pomoci této metody měřit.

Mnohdy je potřeba ve výstupu sledované buňky oddělit pro další analýzy. Nejčastější metoda separace buněk je založena na rozdělení protékajícího roztoku do kapek obsahujících po jediné buňce nebo její součásti, přičemž každé kapce je v elektrickém poli udělen určitý náboj, který kapku vychýlí směrem do sběrné nádoby. Při cytometrii leukocytů z periferní krve je třeba nejdříve odstranit erythrocyty, které jsou v krvi ve velké převaze. To lze provést lyzí buněk chloridem amonným a následným proplachem. Pokud vyšetřujeme některou kompaktnější lymfatickou tkáň, je třeba před vlastní cytometrií buňky z této tkáně mechanicky nebo enzymaticky vyizolovat.

Velkou nevýhodou průtokové cytometrie je její náročnost na čas. V důsledku toho je po ukončení izolace mnoho buněk mrtvých, a nelze je tedy použít pro další analýzy. Tato metoda je také velmi náročná z finančního hlediska a její používání vyžaduje mnoho zkušeností. Výhodou je naopak fakt, že vyizolované leukocyty jsou velmi čisté ve srovnání s jinými izolačními postupy (V. Holáň *in verb.*).

Příklady použití průtokové cytometrie v ptačí imunologii mohou být práce týkající se výzkumu $\gamma\delta$ T lymfocytů (Choi & Lillehoj 2000), specifity monoklonálních protilátek (Kaspers et al. 1993), exprese MHC II gp na makrofázích (Kaspers et al. 1994).

VI.4 Měření imunopathologické reakce opožděného typu (DTH)

Imunopathologická reakce opožděného typu (*delayed type hypersensitivity*, DTH) je lokální zánětlivá reakce vyvolaná imunizací a opakovanou aplikací určitého antigenu po několika týdnech. Jejím základem je vzájemné působení antigenně specifických T_H1 buněk a makrofágů, které do místa opakovaného podání antigenu (u ptáků to bývá patagium křídla) musí nejdříve imigrovat a vzájemně se stimulovat. V důsledku toho vzniká na tomto místě tvrdý otok, který je metricky měřitelným parametrem. Jako antigenní částici lze použít *Mycobacterium sp.*, přičemž je výhodná vakcinace ve Freundově kompletním adjuvans (Sijben et al. 2000; El Lethey et al. 2003). Jiným užitým antigenem může být BSA (Parmentier et al. 1993a) nebo KLH (Sijben et al. 2000).

VI.5 Cytokiny

VI.5.1 ELISA cytokinů

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) patří v dnešní době mezi nejpoužívanější metody užívané ke stanovení koncentrace cytokinů. Jedná se o metodu, pomocí níž lze detekovat množství cytokinů v séru či tkáňové tekutině nebo v kultivačním médiu v případě *in vitro* kultivace vyšetřovaných buněk. Postup této analýzy je takový, že na stěny jamek kultivační destičky je nanášena protilátka vázající daný cytokin, jejíž přebytečné množství je pak odmyto; následně je přidán roztok obsahující stanovované cytokiny, které se navážou na protilátky na stěnách destičky; poté jsou přidány další protilátky proti jinému epitopu daného cytokinu, které se opět naváží na molekuly cytokinu; po odmytí těch, které se na cytokin nenavázaly, je možno aplikovat obdobným způsobem ještě několik vrstev protilátek pro zesílení detekčního účinku; tyto protilátky na sobě nesou navázaný enzym, který po přidání substrátu do roztoku vytváří na destičce barevný produkt, jehož densita je pak spektrofotometricky měřena. Tímto způsobem lze tak stanovit například produkci cytokinů po stimulaci buněk patogenem (např. IL-6 u myši viz Lynagh et al. 2000, IFN- γ u kura Lambrecht et al. 2000; Dalloul et al. 2002; Lambrecht et al. 2004).

VI.5.2 Radioimunoanalýza cytokinů

Jedná se o metodu založenou na navázání radioaktivně značených protilátek na stanovované cytokiny, přičemž je detekováno množství komplexů takto nachytaných na nosiči (viz např. Bucala 1992).

VI.5.3 Bioanalýza cytokinů

Pomocí bioanalýzy lze stanovovat pouze takové cytokiny, které představují růstové faktory (tedy ne např. IL-1, IL-8 či IL-10). Metoda je totiž založena na kultivaci buněčných linií, které jsou závislé na přítomnosti stanovovaného cytokinu v prostředí. To znamená, že pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje dostatek daného cytokinu, linie roste, zatímco pokud je cytokinu nedostatek, linie hyne. Např. stanovení IL-6 v krevním séru je možné pomocí 7TD1-bioanalýzy, kterou popsali u kura (Lynagh et al. 2000). V jejich pokusech bylo sérum ptáků infikovaných *Eimeria tenella* přidáno ke kultuře 7TD1 buněk, přičemž množství přítomného IL-6 bylo indikováno proliferací těchto buněk stanovenou prostřednictvím inkorporace radioaktivního ³H tymidinu. Pomocí této metody lze stanovit i nízké koncentrace IL-6 (přibližně do 0,1 pg/ml) ležící pod prahovou koncentrací pro ELISA (2pg/ml). Obě metody přitom podávají srovnatelné výsledky (Lynagh et al. 2000).

Podobně lze např. IFN stanovit tak, že ke kultuře buněk je přidán jednak stanovovaný vzorek a jednak virus, který buňky zabíjí. Je-li ve vzorku dostatečné množství IFN, dokáže ochránit buňky před virem a ty neodumírají. Pro stanovení produkce IFN ptačími buňkami byla ovšem navržena i jiná metoda, která je založena na bioanalýze prováděné za použití křepelčích buněk nesoucích gen pro luciferázu. Tento gen je zde kontrolovaný kuřecím IFN-responsivním Mx promotorem. Tato metoda je citlivá na ChIFN- α , - β , - γ nikoliv však na ChIL-1 β (Schwarz et al. 2004). Tímto způsobem by bylo například možné provést stanovení IFN- γ odpovědi T buněk na aktivaci v prostředí IL-2 nebo měření produkce IFN- α resp. - β viry stimulovanými buňkami.

VI.5.4 Exprese mRNA cytokinů

Sledování exprese mRNA cytokinů v buňkách je metoda založená na amplifikaci mRNA sledovaného cytokinu z buněk v odebraném vzorku. Při tom se využívá kvantitativní RT-PCR a následná fluorescenční detekce kvantity takto standardně zmnožené mRNA (Kogut et al. 2003; Beal et al. 2004; Kogut et al. 2005b). Touto metodou by však neměla být stanovována produkční aktivita buněk pro cytokiny, které jsou regulovány až na posttranskripční úrovni – např. IL-1, IL-15 a IL-18 (Staheli et al. 2001).

VI.6 Měření aktivity T buněk

VI.6.1 Měření aktivity T buněk pomocí PHA in vivo

Metodě PHA-kožního testu je věnována samostatná podkapitola především proto, že se v současné ekologické imunologii jedná o nejčastější metodu využívanou při studiu T buněčné imunity (viz tab. VI.6.1/1 v příloze, shrnující vybrané práce používající PHA-kožní test). Její princip je následující: do patagia sledovaného jedince je injektován phytohemagglutinin (PHA), tedy mitogen (viz kapitola V.3), který v tomto místě způsobí polyklonální aktivaci T lymfocytů. V důsledku této aktivace začnou T buňky proliferovat a produkovat prozánětlivé cytokiny, které způsobí infiltraci ostatních buněk imunitního systému a vznik zánětu (Goto et al. 1978). Proto se postupně na tomto místě objeví otok, který pak lze měřit pomocí tlakově citlivého mikrometru nebo za použití posuvného měřítka na základě vizuální kontroly. Jak ukázali na mlád'atech jiříček (*Delichon urbica*) Merino et al. (1999), nevyvolává tato metoda u ptáků žádnou větší zátěž, a je tedy považována za maximálně šetrnou. Hůrak et al. (2000) ovšem zjistili u mlád'at sýkory koňadry (*Parus major*), jimž byl aplikován PHA, zvýšený poměr heterofilů (a tím i jejich poměr ku lymfocytům) v krvi týden po tomto ošetření (k podobným výsledkům později dospěli u adultních samců vrabce domácího (*Passer domesticus*) Buchanan et al. (2003). To indikuje určitý stres (viz např. Hůrak et al. 1998). Ani oni však nezjistili žádný vliv na počet lymfocytů v krvi, celkovou koncentraci proteinů v krvi nebo na růstové parametry mlád'at. Je pravděpodobné, že Hůrakem et al. (1998) zjištěný imunologický stres byl úměrný intenzitě a délce stresu při manipulaci s mlád'aty, což by odpovídalo výsledkům studia manipulačního stresu prováděného Ewenson et al. (2003) na zebříčkách (*Taeniopygia guttata*). Právě tato studie jasně dokládá citlivost této metody na manipulační stres. V případě, že se mu při odchytu zvířat nelze vyhnout, je lépe nechat vyšetřovaného jedince po určité době (navrhováno 2h) uklidnit (Ewenson et al. 2003).

Časovou dynamiku PHA kožní reakce studovali in vivo Navarro et al. (2003), kteří u vrabce domácího zjistili počáteční rychlý nárůst měřeného otoku, a pak více méně stabilní stav po dobu 3 dnů. Tento průběh odpovídá předchozím histologickým (Goto et al. 1978; McCorkle et al. 1980) a morfometrickým závěrům (Parmentier et al. 1993a) zjišťovaným na kurovi, ačkoliv je, co se délky trvání odpovědi týče, významně přesahuje. Tento výsledek má zřejmý metodologický význam v tom, že umožňuje větší časový interval při měření otoku, než je standardně používaná 24 ± 1 hodina. Považuji za vhodné do budoucna tyto závěry (vzhledem k jiné délce průběhu zjištěné u kura a vzhledem k poznámce o nepublikovaných pozorováních u bělokura rousného (*Lagopus lagopus*) viz Mougeot & Redpath 2004) ověřit ještě na několika dalších druzích a v případě obecné platnosti déle trvající neměnnosti otoku vzniklého po aplikaci PHA této skutečnosti využít při zpětných odchycích tam, kde není možné

z určitého důvodu vyšetřované jedince měřit po standardních 24 hodinách. Významným parametrem by v tomto ohledu mohla být i podávaná dávka PHA. Objevily se už první práce (např. Møller et al. 2003), které těchto poznatků využily v tom smyslu, že měření otoku provedli experimentátoři už 6 hodin po aplikaci PHA. Navarro et al. (2003) ovšem mimo výše uvedené rovněž prozkoumali cirkadiální rytmicitu otokové reakce. Přitom dospěli k výsledku, že v nočních hodinách jsou otoky týchž jedinců signifikantně větší než během dne. To by mohlo vypovídat pro intenzivnější imunologické pochody během noci, které je možno podle těchto autorů vysvětlit jednak neadaptivně větším množstvím využitelných zdrojů během noci a jednak také adaptivně jako odpověď hostitele na větší míru ataků ektoparazitů, kteří mají převážně noční aktivitu, a endoparazitů, kteří lépe prospívají během noční snížené teploty těla. Pravděpodobně proto se autoři v tomto ohledu prozatím ojedinelé studie, Marzal et al. (2005), rozhodli aplikovat PHA výhradně v odpoledních hodinách, aby tak byla zajištěna homogenita naměřených výsledků.

Jiným aspektem, který je potřeba si při používání PHA-kožního testu uvědomit, je skutečnost, že pozitivní výsledek testu nelze bez výhrad spojovat s lepší funkcí T buněčné imunity. PHA jako mitogen stimuluje pouze hypersenzitivní reakci v míře, která koreluje s množstvím dostupných T buněk a na nic jiného tedy ani nelze z výsledku testu usuzovat. Jak ukazují výsledky některých studií (např. Saks 2004), mohla by zvýšená odpověď na PHA stejně tak jako na lepší připravenost organismu na invazi pathogena naznačovat probíhající infekci, která stimulovala zvýšení počtu přítomných T buněk. Proto je vhodné při posuzování výsledků PHA-kožního testu brát tuto možnost v potaz.

V praxi se v současné době používají dvě odlišné varianty této metody (viz tab. VI.6.1/1 v příloze práce). Původnější je metodika, podle níž injektujeme do jednoho křídla roztok PHA rozpuštěného v PBS (izotonický pufr phosphate buffer saline), zatímco do druhého křídla čistý roztok PBS (tzv. „kontrola“). Jako korelát aktivace T buněk pak slouží rozdíl mezi otokem v místě vpichu PHA a tloušťkou membrány v místě vpichu čistého PBS, obojí měřeno 24 hodin po aplikaci. Tato metodika vychází ještě z původních prací na drůbeži (Goto et al. 1978; Lamont & Smyth 1984; Cheng & Lamont 1988), při kterých se ověřoval vliv PHA na aktivaci buněčné imunity a použitelnost této metody pro měření T buněčné imunity u kuřat. Injekce PBS tak slouží jako kontrola, že PBS nezpůsobuje aktivaci T buněk (Goto et al. 1978; viz též Smits et al. 2001). Tato skutečnost se zdá být již dobře dokázána a není proto potřeba ji dále ověřovat (Smits et al. 1999; Smits et al. 2001). Goto et al. (1978) dokonce sami píšou, že PBS se vstřebá do 6 hodin po injekci. Proto Smits et al. (1999) navrhli zjednodušení PHA metody následujícím způsobem: změřeno je patagium před injekcí PHA a pak znovu 24 hodin po injekci (tedy v době, kdy se již vytvořil měřitelný otok), přičemž míra odpovědi je vyjádřena v rozdílu těchto dvou hodnot. Obě metody při tom nutně podávají srovnatelné výsledky (Smits

et al. 1999; Owen-Ashley et al. 2004). Smitsova metoda je znatelně technicky jednodušší, rychlejší, zajišťuje menší riziko chyby v důsledku nepřesného měření, umožňuje využití druhého křídla pro výzkum jiné imunitní reakce a z hlediska stresu pokusných zvířat je zřetelně i mnohem šetrnější. Právě otázka vyvolaného stresu se pak může zpětně odrazit i na velikosti naměřené reakce, neboť schopnost vyvolat imunitní odpověď se stresem nepřímo úměrně koreluje (Ewenson et al. 2003). Abychom tedy neměřili citlivost jednotlivých zvířat vůči stresovým faktorům, ale skutečnou schopnost mobilizovat imunitní systém, je vhodné vzniklý stres všemožně minimalizovat, k čemuž přispívá i použití zjednodušené PHA metody. Bohužel jak je vidět z tabulky VI.6.1/1, stále mnoho autorů používá poněkud kontraproduktivně metodu původní, což ovšem může být dáno skutečností, že stejní autoři používají pro zachování metodiky stále stejnou metodu, kterou přijali ještě před vydáním doporučení Smitse et al. (1999). Pro úplnost je ovšem třeba poznamenat, že zjednodušení navržené Smitsem et al. (1999) bylo o 2 roky později napadeno Siva-Jothy & Ryder (2001) s poukazem na vhodnost PBS „kontroly“ pro ověření praktických schopností pokus provádějícího pracovníka a stanovení repetability měření. Tento podnět byl však následně podle mého názoru smysluplným způsobem uveden na pravou míru vysvětlením pojmu „kontrola“ ve výzkumné práci a vyvrácením představy o potřebě injekce čistého PBS pro stanovení repetability (Smits et al. 2001).

Někteří autoři se rozhodli pro aplikaci „senzitivizační“ injekce PHA několik dní před podáním vlastní „měřicí“ injekce. Tento postup byl použit především ve studiích na mláďatech (Johnsen et al. 2000; Kleven & Lifjeld 2004; Westneat et al. 2004). Narozdíl od Westneat et al. (2004) se mi nepodařilo v Parmentierově et al. (1993) práci nalézt zmínku o použití takovéto senzitivizační injekce v případě aplikace PHA mitogenu a v práci Parmentier et al. (1994) dokonce jakoukoliv zmínku o použití PHA. Domnívám se proto, že tito autoři zaměnili BSA za PHA, přičemž nevzali v potaz rozdílnou povahu působení obou látek. Vezmeme-li tedy v úvahu to, co je známo o molekulárním mechanismu působení mitogenů (Licastro et al. 1993), vychází nám senzitivizační injekce aplikovaná na jiné místo, než je později měřený bod injekce PHA „měřicí“ dávky, jako zbytečný stresový faktor, který nemůže zvýšit odpověď organismu na PHA. Mitogen způsobuje aktivaci velkého množství různých antigenně specifických klonů T buněk, takže vlastně aktivuje jakékoliv T buňky, které jsou v danou chvíli v blízkosti místa injekce nebo které tam infiltrovaly. Senzitivizační injekce by měla význam pouze v případě měření odpovědi na klasický antigen, kdy by bylo třeba předem „nachystat“ dostatečně velký počet paměťových buněk specifických k danému antigenu (jako právě v případě BSA použitého Parmentierem et al. 1993). I kdyby nebyl PHA pouze mitogenem a účinkoval i jako klasický antigen, vůči němuž vznikají i paměťové buňky (těch však bude vždy relativně zanedbatelný počet vzhledem k buňkám, které PHA aktivuje nespecificky), pak podání senzitivizační injekce pouhé dva dny před aplikací měřicí

injekce PHA, tak jak to provedli Johnsen et al. (2000) a Kleven & Lifjeld (2004), nemůže být v žádném případě dobrou dostatečně dlouhou pro vznik paměťových buněk. Proto pokud Johnsen et al. (2000) a Kleven & Lifjeld (2004) podali senzitivizační injekci, byla to spíše snaha zvýšit celkové množství lymfocytů cirkulujících v krvi, která se ovšem dle mého názoru minula účinkem, neboť atrahovala buňky cirkulující v krevním oběhu do nevhodného místa – tedy metakarpu (místa senzitivizace) místo do patagia, kam pak byla podána měřicí injekce (srovnej s Navarro et al. (2003)). Poněkud úspěšnější v tomto směru mohli být Zuk & Johnsen (1998), kteří podali senzitivizační injekci týden před injekcí měřicí. V žádném případě však nelze, vzhledem k výše uvedenému, v souvislosti s PHA hovořit o měření DTH, tak jak to pojali Westneat et al. (2004) či Lozano & Ydenberg (2002). Parmentierovo et al. (1993) použití výrazu DTH ve vztahu k PHA injekci je spíše terminologickou nepřesností (podobně patrně i Ohlsson et al. 2002).

Poněkud smutným důsledkem praktické jednoduchosti této metody je skutečnost, že byla přijata za svou i výzkumnými pracovníky, kteří nepovažovali za nezbytné zabývat se při interpretaci svých výsledků hlouběji otázkami fungování ptačí imunity a výsledky této metody pojali absolutním způsobem. Příkladem takovéto práce se zdá být článek Granbom et al. (2005). Autoři (sledující opakovatelnost měření PHA indukovaných otoků v určitém čase a po určité době) v této práci navrhuji PHA injekce do obou křídel, aby bylo možno stanovit momentální repetabilitu měření. Při tom zcela opomíjejí procesy na úrovni pohybu buněk, které tvoří základ PHA metody. Granbom et al. (2005) se podivují nad skutečností, že repeatabilita v čase (tj. mezi dvěma injekcemi oddělenými 46-ti dny) je velmi nízká, přičemž nediskutují možný vliv biorytmů (viz kapitola VIII.4). Měření otoku s přesností na 0,001 mm po uplynutí doby 24 hodin \pm 10 minut, je přesnost obdivuhodná, ačkoliv z praktického hlediska není s ohledem na zjištění Navarra et al. (2003), Gota et al. (1978) i McCorkleho et al. (1980) vůbec nezbytná. Navíc měřeným objektem je relativně měkká tkáň, která postrádá rigiditu, takže i při nejpřesnějším možném měření nelze očekávat 100% shodu. Skutečnost, že při aplikaci dvou injekcí PHA stráví experimentátoři na zvířeti dvojnásobný čas, který způsobí větší stres, jenž může intenzivněji a zcela nekontrolovaně suprimovat imunitu, ovšem ve svých závěrech Granbom et al. (2005) nepřipouštějí. Tento příklad pouze podtrhuje skutečnost, že PHA-kožní test je metoda jednoduchá, ale výzkumní pracovníci by si měli být maximálně vědomi jejích omezení. Není možné od ní očekávat absolutní přesnost, neboť měřená veličina odráží mnoho simultánních procesů (viz Goto et al. 1978) a proces měření je i při nejlepší vůli principiálně příliš hrubý (např. nelze brát v úvahu změny v tloušťce kožní membrány, které mohou mít momentální charakter, ale s imunitním systémem vůbec nemusí nesouviset). Pokud je potřeba získat o T buněčné imunitě přesná data, je potřeba použít některou lépe definovanou metodu *in vitro*.

Z výše uvedeného tak jasné vyplývá, že výpovědní možnosti této metody měření aktivity T buněk jsou ve skutečnosti jen omezené. Pomocí PHA-kožního testu nelze konstatovat nic jiného, než že za daných podmínek někteří jedinci vykazují vyšší T buněčnou odpovídavost na in vivo aplikovaný mitogen než jiní. Vzhledem k povaze interakcí vysvětlené v kapitole V.3. nelze přitom v žádném případě konstatovat, že PHA je novým antigenem (jako to učinil např. Møller et al. 2003 a Westneat et al. 2004) nebo že simuluje antigeny podobné antigenům parazitů (viz např. Buchholz et al. 2004). Reakce na PHA je ve své podstatě velmi komplexní a zahrnuje nejen proliferační aktivitu T buněk, ale také mezi jinými infiltrační aktivitu fagocytů nebo produkci prozánětlivých cytokinů, a tak zpětně aktivaci dalších buněk (Goto et al. 1978). Míra otoku tak může záviset na míře schopnosti buněk uskutečnit kterýkoliv z těchto kroků. Ke všemu navíc z předchozí kapitoly o ptačí imunitě vyplývá, že nadměrná aktivita některé složky imunitního systému (tedy její hypersenzitivita) není z hlediska boje proti parazitům vůbec prospěšná, pokud není úměrná intenzitě podnětu (viz např. pasáže věnované $T_H1 \times T_H2$ regulaci). Proto nemusí být nutně jedinec, u něhož se projeví největší otok, zároveň jedincem, který je schopen se s parazity nejlépe vyrovnat (tedy jedincem nejimunokompetentnějším). Naproti tomu existují důkazy o tom, že alespoň v některých případech tomu tak opravdu je (viz např. Gonzalez et al. 1999), což podporuje relevantnost použití této metody. Výsledky poskytnuté touto metodou nám tak mohou naznačit správný směr, jakým by se měl ubírat náš další (podrobnější) výzkum v případě zjištění signifikantního vztahu mezi PHA-reakcí a nějakým jiným sledovaným parametrem. PHA-kožní test je tak pro svou jednoduchost neobyčejně vhodným nástrojem pro první fáze každého výzkumu zaměřeného na sledování T buněčné imunity in vivo in natura.

VI.6.2 Měření proliferace T buněk

Měření proliferační aktivity in vitro je díky konstantnímu nastavení podmínek a izolaci sledovaných buněk oproti výše nastíněnému postupu in vivo mnohem přesnější, avšak zároveň také mnohem technicky a metodologicky náročnější. Je tedy možné je použít pouze v těch studiích, kde lze čerstvě odebrané vzorky obsahující T lymfocyty ihned zpracovat a izolované buňky kultivovat. Vlastní měření se pak provádí tak, že je buněčná kultura obsahující sledované T lymfocyty inkubována na živném médiu obsahujícím radioaktivní ^3H -thymidin za konstantní zvýšené teploty (37°C nebo 41°C) a CO_2 (5%) v přítomnosti aktivátoru proliferace (superantigen, PHA, Con A apod). Po určité době jsou takto nakultivované vzorky odebrány a analyzovány na množství inkorporovaného ^3H -thymidinu (Majumdar et al. 1990; Parmentier et al. 1994; Sijben et al. 2000; Parmentier et al. 2001; Hangalapura et al. 2003; Hangalapura et al. 2004; Beal et al. 2004). Podobně lze použít i 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetr

azoliumbromid (Dalloul et al. 2002) či pyrimidinový analog 5-bromo-2'-deoxyuridin, jehož inkorporaci do DNA je možno měřit spektrofotometricky (Finkelstein et al. 2003) popř. přímo za využití průtokové cytometrie (Motobu et al. 2002). Je ovšem potřeba brát v úvahu určitá specifika jednotlivých T buněčných populací. Například bylo zjištěno, že $\gamma\delta$ T lymfocyty reagují na in vitro stimulace mitogeny poněkud hůře než jiné populace (Arstila & Lassila 1993).

VI.6.3 Měření aktivity T buněk nepřímo přes cytokiny

Lambrecht et al. (2004) navrhli odhad buněčné imunitní odpovědi na vakcinaci proti viru Newcastleké choroby prováděný přes stanovení ChIFN- γ , který T buňky uvolňují in vitro po stimulaci antigenní částicí. ChIFN- γ je v tomto případě detekován pomocí cytokinové ELISA. V podstatě se tedy jedná o metodu obdobnou jiným metodám popsaným v kapitole VI.5, které lze rovněž využít.

VI.6.4 Analýza cytotoxicity T buněk

K tomuto účelu lze použít mikrocytotoxický test založený na uvolňování radioaktivního chromu ze značených buněk (⁵¹chromium-release microtoxicity assay; Fleischer 1980). Ta je, zjednodušeně řečeno, založena na γ -spektrometrickém stanovení radioaktivního chromanu sodného. Touto sloučeninou jsou označeny cílové buňky (ovčí erythrocyty či nádorové buňky), které jsou pak inkubovány společně se sledovanými efektorovými buňkami (T_C či NK buňky, ale i aktivované fagocyty). Efektorové buňky v průběhu inkubace postupně v médiu cytotoxicky likvidují cílové buňky, čímž se do okolí uvolňuje radioaktivní značka, jejíž koncentrace je následně stanovována. Míra cytotoxického působení efektorových buněk se pak stanovuje procentuálně vzhledem ke stavu, kdy jsou detergentem zničeny všechny cílové buňky (100% uvolnění značky). Při hodnocení se odečítá spontánní uvolňování značky, které se stanovuje inkubací média bez efektorových buněk.

VI.7 Měření aktivity B buněk

VI.7.1 Měření proliferační aktivity B buněk

K tomuto účelu je možno použít stimulaci izolovaných B buněk superantigenem (LPS) ve vhodném cytokinovém prostředí o standardním obsahu radioaktivního ^3H -thymidinu (Bucala 1992). Po určité době kultivace (24 hodin) se pak buňky lyzují a spektrometricky se stanovuje obsah inkorporované označené báze.

VI.7.2 Měření množství protilátek

Obecně je možné sledovat buďto aktuální množství všech protilátek v krevní plasmě (v tom případě jejich vyšší množství indikuje větší parazitaci, např. Martinez et al. 2003) nebo produkci protilátek vyvolanou experimentálně aplikovaným antigenním stimulem (vyšší přítomnost protilátek značí větší schopnost humorální imunitní odpovědi). V druhém případě lze sledovat odpověď primární (na první kontakt organismu s daným antigenem) nebo sekundární (vyvolanou opakovaným podáním antigenu). Primární odpověď nastává obvykle přibližně 9. den po aplikaci antigenu, zatímco sekundární odpověď již po 6 dnech. Ačkoliv spolu obě odpovědi pro jednotlivá zvířata obvykle korelují, je průběh sekundární reakce výrazně intenzivnější (viz např. Hasselquist et al. 1999; Owen-Ashley et al. 2004). Jako antigen je možné podat mnoho různých látek, u nichž však v případě měření primární imunitní reakce musíme mít jistotu, že se s nimi vyšetřovaný jedinec neměl možnost během svého života nikdy předtím setkat. Použít tedy lze nejrůznější bakteriální a virové vakcíny (např. vakcína z *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*, tedy „diphtheria-tetanus“ (Raberg et al. 2003), SRBC (např. Deerenberg et al. 1997), KLH (Jeurissen et al. 1992; Hasselquist et al. 1999), BSA (Parmentier et al. 1993b) ap (viz tab. VI.7.2/1 v příloze této práce). Určitý problém při využívání nepřírodných antigenů (např. právě tři posledně jmenované, včetně SRBC, které se dnes velmi často používají) by mohla v ekoimunologických studiích představovat skutečnost, že se jedná o antigenní částice, které nesimulují přirozeného parazita. Tyto látky nenesou například žádné společné pathogenní markery (PAMP), které jsou normálně zodpovědné za iniciaci antigenně nespecifických imunitních mechanismů, které pak ovlivňují i antigenně specifické složky imunity. Proto je otázkou, zda negativní výsledek některých studií (např. Faivre et al. 2003b) je skutečně důsledkem horší odpovědivosti humorální složky imunity nebo je ovlivněn povahou použitého antigenu.

ELISA

Za tímto účelem se běžně používá ELISA využívající rozředěného krevního séra nebo kultivačního média. Ta využívá specifické vazby protilátek na antigeny přichycené na povrchu ELISA destiček. Na takto vázané protilátky se pak váží (i v několika vrstvách pro zesílení detekovaného signálu) protilátky proti těmto sledovaným protilátkám nesoucí určitou vizualizační složku – enzym pro detekční reakci. Množství produktu této reakce je pak spektrofotometricky odečteno (viz např. Kowalczyk et al. 1985; Hasselquist et al. 1999; El Lethey et al. 2003; Bonneaud et al. 2003; Raberg et al. 2003; Beal et al. 2004; Owen-Ashley et al. 2004). Podobně lze použít i kompetitivní radioimunologickou analýzu (Kowalczyk et al. 1985), která využívá kompetice protilátek ve stanovovaném vzorku se standardním množstvím radioaktivně značených imunoglobulinů o dostupné vázané anti-specifické (např. anti-kuřecí) protilátky. Pro analýzu ELISA lze použít komerčně dostupné anti-kuřecí protilátky, ačkoliv jejich schopnost vázat protilátky studovaného druhu je nutno ověřit (Martinez et al. 2003).

Elektroforetické stanovení množství protilátek v krvi

Tato skupina separačních metod je založena na prostupu proteinů (v našem případě imunoglobulinů) polyakrylamidovým gelem, ve kterém jsou molekuly děleny podle své velikosti na základě rychlosti pohybu mezi elektrodami. Takto běžně prováděná je N-PAGE (nativní elektroforéza). SDS-PAGE (elektroforéza na sodiumdodecylsulfát polyakrylamidovém gelu) využívá skutečnosti, že do gelu je přidán SDS, tedy detergent, který rozvolní hydrofobní interakce a umožní tak rychlejší vstup izolovaných podjednotek. Obě zmíněné elektroforetické metody lze při stanovování protilátek v krevním séru použít (Martinez et al. 2003). K izolaci elektroforetický separovaných protilátek pak lze použít Western blotting a inkubaci s anti-kuřecími-IgG protilátkami spojenými s peroxidázou, pomocí které jsou pak proužky vizualizovány. Pro určení molekulové hmotnosti stanovovaných protilátek se tato procedura provádí se standardy (Martinez et al. 2003). Martinez et al (2003) navíc navrhli použití Western blottingu jako nejlepší metody pro ověření vazby anti-kuřecích-Ig protilátek na protilátky jiných druhů při použití analýzy ELISA. Gonzalez et al. (1999) a Christe et al. (2001) po elektroforetické separaci imunoglobulinů densitometricky stanovili relativní podíl imunoglobulinů, který vyjádřili jako poměr mezi plochou gelu zahrnující densitometrický profil imunoglobulinů a celkovou plochou densitometrického profilu. Podobný postup použili i (Saino et al. 1995).

Aglutinace

Nejčastěji používanou aglutinační metodou je hemaglutinace (např. Zhou et al. 2001). Tato technika je založena na stanovení nejvyššího rozředění původního séra či média, v němž se nacházejí stanovované protilátky (obvykle proti SRBC), které je ještě schopno vyvolat sražení erythrocytů (tedy hemaglutinaci). Jelikož může pre-inokulovaná plasma vykazovat aglutinaci danou zkříženou reaktivitou protilátek, lze využít k popisu hodnoty po odečtení preinokulačního nejvyššího zředění, které hemaglutinaci vyvolalo (Blount et al. 2003a). Tato metoda je pro svou relativní nenáročnost často používána v ekoimunologických studiích (Peters 2000; Saks et al. 2003; Faivre et al. 2003a; Faivre et al. 2003b; Peters et al. 2004b; McGraw & Ardia 2005). Jinou aglutinační metodu použili např. El Lethy et al. (2003). Jejich postup je více méně obdobný, pouze místo SRBC je na destičce přítomný nadbytek anti-kuřích IgG, který způsobí aglutinaci.

VI.8 Měření aktivity fagocytů

K tomuto účelu lze *in vivo* použít metodu Carbon Clearance Assay (viz např. Cheng & Lamont 1988). Ta je založena na injekci určité látky obsahující uhlík (např. india ink) do brachiální vény a odběru krve ze stejné žíly ve druhé polovině těla před a 3 a 15 minut po aplikaci. Po centrifugaci se pak spektrofotometricky stanovuje relativní množství uhlíku, který zůstal v supernatantu a index fagocytózy se vypočítá jako záporná směrnice přímky popisující závislost logaritmu absorbance na čase.

In vitro lze pro měření fagocytycké aktivity leukocytů (např. makrofágů) použít opsonizované kvasinkové buňky konjugované s fluoresceinisokyanátem (Finkelstein et al. 2003). Takto značené fagocytycké částice jsou inkubovány s makrofágy po určitou dobu, po jejímž uplynutí je kultura promyta a další fagocytóza je zastavena nízkými teplotami. Z kultury je připraven preparát vyšetřovaný pomocí fluorescenčního mikroskopu. Fagocytóza je pak kvantifikována jako počet kvasinkových buněk fagocytovaných přibližně 100 makrofágy, z čehož se pak zprůměrováním vypočítá fagocytycký index.

Fagocytyckou aktivitu buněk lze také měřit prostřednictvím zymosanem indukované produkce reaktivních kyslíkových částic, která je spektrofotometricky detekována na základě barevné změny vzorku po přidání dimethylsulfoxidu (Hangalapura et al. 2003; Hangalapura et al. 2004)

VI.9 Použití adjuvans při podání antigenu in vivo

Na tomto místě považuji za užitečné ještě nastínit možnost využití adjuvancií pro potřeby ekoimunologického výzkumu. Adjuvancia jsou látky, které zvyšují schopnost APC pohltit daný antigen nebo jinak podporují aktivaci imunitních mechanismů v počátečních fázích imunitní reakce. Toho se často využívá zejména v klinické praxi při aplikaci očkovacích látek.

V ptačí imunologii se používá experimentálně kompletní Freundovo adjuvans (např. Aitken & Parry 1974; El-Lethey et al. 2003) nebo nekompletní Freundovo adjuvans (Hasselquist et al. 1999), obojí založené na bázi minerálních olejů emulgujících aplikovaný antigen (v případě kompletního adjuvans doplněných o usmrcené bakterie), které usnadňují pohlcení antigenu APC.

Zejména v posledních letech se stále více diskutuje možnost využití některých cytokinů, jmenovitě IL-2, jako adjuvans při vakcinaci kuřat (Choi & Lillehoj 2000; Kolodsick et al. 2001; Zhou et al. 2005a; Zhou et al. 2005b). IL-2 je vhodný jak pro zvýšení produkce protilátek, tak pro T buněčnou proliferaci. (Staeheli et al. 2001) mimo to uvádí jako použitelná adjuvancia indukující zvýšení hladiny protilátek IFN- γ , IFN- α/β a IL-1 β . Narozdíl od klasických adjuvans založených na bázi oleje nemají cytokinová adjuvancia negativní vedlejší účinky. Podle tohoto autora však v některých případech neúčinkují. Jako adjuvancia byly experimentálně použity i rekombinantní plasmidy nesoucí kromě sekvence vakcinačního antigenu i sekvenci pro IFN- γ nebo IL-2 (Staeheli et al. 2001).

Dlužno ovšem zmínit, že, pokud je mi známo, nebyla adjuvans zatím v žádné ekologicky či evolučně zaměřené práci využívající podání antigenu s. lat. in vivo použita a jejich účinek na jiné druhy ptáků nežli imunologicky používané (kur, bažant, křepelka apod.) není znám. Lze ale předpokládat, že reakce většiny druhů ptáků si budou navzájem podobné a využití adjuvans by tak mohlo být vhodným nástrojem pro zvýšení měřené reakce tam, kde byla po podání antigenu, superantigenu či mitogenu zjištěna příliš nízká odpovědávost, způsobující neměřitelnost rozdílů mezi vyšetřovanými jedinci. Jiným možným využitím by mohlo být studium DTH (viz např. El-Lethey et al. 2003)

VI.10 Zjišťování MHC haplotypu

Příslušnost MHC k určitému haplotypu se obvykle stanovuje molekulárně-genetickými metodami. Těm se zde pro neúměrnou rozsáhlost, kterou by jejich byť stručný popis vyžadoval, věnovat nebudeme. Pro úplnost však musíme zmínit, že MHC alelickou příslušnost jedince lze určit, pokud byly tyto alely předem definovány, také imunologickými metodami, jakými je použití monoklonálních protilátek, resp. aloantisér vážících se specificky na daný typ MHC gp. Tato metoda byla využita např. pro rozlišení inbredních linií kura (Parmentier et al. 1994).

VII DĚDIČNÁ PODSTATA VARIABILITY V IMUNOKOMPETENCI

Většina genů významných z hlediska funkce imunitního systému má za sebou relativně dlouhou evoluční minulost, během níž byly vytrženy méně výkonné alely a zachovaly se tak pouze alely pro druh či populaci v daných podmínkách optimální. To se týká patrně genů pro různé cytokiny a většinu povrchových molekul leukocytů, jejichž funkce je v rámci vyšších obratlovců poměrně stálá, a tedy i jejich struktura je více či méně konzervativní (např. CD1, Miller et al. 2005). Evoluce imunitního systému je však nutně nekonečným zápasem s měnícím se protihráčem – patogenem, a tak musí existovat i molekuly, jejichž geny vykazují vysoký stupeň polymorfismu a jsou fylogeneticky velice variabilní. Těmito molekulami jsou především antigen-rozpoznávající molekuly a výše popsané se týká pouze jejich receptorových domén (zatímco intracelulární strukturní a signální domény jsou opět více-méně konzervativní). Mezi antigen-rozpoznávající molekuly můžeme zahrnout jednak MHC gp molekuly, které jsou zodpovědné za prezentaci antigenu na povrchu buněk (včetně profesionálních APC), a jednak BCR a TCR, které pak slouží k rozpoznávání těchto antigenů (viz obecná část o fungování imunitního systému V). Relativně konzervativními, avšak v rozpoznávání patogenů neméně významnými, jsou i receptory účastníci se vrozených imunitních mechanismů (např. TLR). U všech těchto molekul, resp. jejich variabilních receptorických úseků bude jejich polymorfismus na úrovni jedince i populace a druhu odrážet schopnost vyrovnat se s různými patogeny (avšak srovnej s Nowak et al. 1992) viz dále v této kapitole). Nevyhnutelně tedy některá alela určitého genu umožní svému nositeli rozpoznat určitého konkrétního parazita lépe než jiná a ještě jiná mu to třeba neumožní vůbec.

Tato práce není svým tématem zaměřena na dědičnou podstatu rezistence vůči parazitům. Bylo by však neúplné, kdybychom se o této zajímavé oblasti alespoň krátce nezmínili, neboť právě genetické faktory, byť námi třeba opomenuty, mohou z velké části rozhodnout o výsledku našich kondičních pokusů. Proto je třeba stále uvažovat možnost působení těchto vlivů. Moderní imunologie z tohoto důvodu používá prakticky výhradně inbrední linie modelových druhů (viz např. Liu et al. 2002), které zaručují, že veškerá pozorovaná variabilita je odrazem pouze experimentálně determinovaných rozdílů. Použití podobného pokusného designu při studiu volně žijících zvířat ovšem nepřipadá samozřejmě v úvahu.

Jak jsme se již zmínili, patří MHC mezi imunologicky nepostradatelné genové komplexy a řadí se tak mezi horké kandidáty na geneticky podmíněnou pohlavní selekci. Cheng & Lamont (1988) dokázali vliv MHC haplotypu na humorální, T buněčnou i fagocytickou složku imunitní odpovědi. Při tom jasně prokázali, že schopnost jedince vyvinout intenzivní odpověď v jednom směru je nezávislá na jeho schopnosti intenzivně reagovat jiným typem imunitní odpovědi (viz též Lamont & Smyth 1984, podobně zmíněno i v úvodu, část III).

Z výše uvedeného je patrné, že pro jedince je velmi výhodné z hlediska návratnosti jeho reprodukčních investic, když je schopen odhadnout genetickou kvalitu svého potencionálního partnera. Při tom může posuzovat buďto vnější projevy této kvality (tomuto je věnována část IX) nebo může nějakým způsobem hodnotit přímo partnerův genotyp. Skutečnost, že alespoň některé druhy jsou schopny přímo odhadnout genetické charakteristiky jiných jedinců, dokládají různé práce především na savcích (zejména lidech a myších). Ty ukazují, že alespoň v této obratlovčí skupině se najdou zvířata schopná olfaktoricky vnímat MHC genotyp jiných jedinců, srovnávat jej s genotypem vlastním a patrně se podle toho řídit i ve své volbě sexuálního partnera (Jordan & Bruford 1998; Wedekind & Penn 2000; Milinski & Wedekind 2001). Bernatchez & Landry (2003) podávají určitý přehled o MHC závislosti pohlavní preference, reprodukčního úspěchu a schopnosti přežít u různých druhů obratlovců. Jak již bylo uvedeno výše, je MHC genový komplex vysoce polymorfní. Existuje hned několik hypotéz, které se snaží popsat mechanismus, jakým se tento polymorfismus udržuje. Jedna skupina hypotéz předpokládá přímý vliv parazita na přežívání jedinců (hypotézy o výhodě heterozygotů nebo o výhodě nositelů vzácné alely), zatímco jiná skupina hypotéz uvažuje spíše roli sexuální selekce v interakci parazit-alely MHC předávané do další generace. Navrhnuta byla také hypotéza, že variabilita MHC je důsledkem vyhýbání se inbreedingu. Ve všech těchto případech je ovšem nutné si uvědomit, že role MHC bude vždy závislá na selekčním tlaku, kterému jsou jedinci vystaveni ze strany parazita. Pokud například připustíme, že na diferenční předávání alel MHC do další generace má vliv sexuální selekce, je na místě se ptát, jakými parazity je v dané době populace sužována. Pokud existuje jeden dominantní parazit, kterým je parazitováno velké procento jedinců v populaci, pak bude pohlavní výběr patrně upřednostňovat ty jedince, kteří nesou jednu nebo několik málo alel MHC, které jsou schopny daného parazita rozpoznat (srovnej s výsledky parazitačních pokusů na inbredních liniích kura, Liu et al. 2002). Sexuální selekce tedy bude pracovat jasně podle modelu „dobrých genů“ (viz kapitola IV.2.1.). Naopak pokud je populace vystavena současně tlaku velkého množství méně početných parazitů, pak je výhodnější preferovat jedince, kteří nesou co nejodlišnější alely tak, aby i vzniklé potomstvo bylo v tomto ohledu co nejrozmanitější (tedy model „komplementárních genů“). Ovšem tato situace se postupně může měnit a přecházet od jednoho modelu ke druhému. Lze si například představit, že tlak jednoho dominantního parazita způsobí selekci ve prospěch několika málo podobných alel, které se v populaci během několika generací rozšíří natolik, že umožní jiným, na daný druh méně adaptovaným parazitům, populaci napadnout a pak bude selekce naopak upřednostňovat heterogenitu co nejširšího spektra alel. Mohlo by se zdát, že vhodnou odpovědí by byla duplikace MHC lokusu a exprese většího množství různých antigen-vážečích molekul. To ovšem není pro jedince výhodné z toho důvodu, že v tom případě značně rozšiřuje spektrum prezentovaných antigenů, čímž je větší pravděpodobnost, že tyto antigeny budou odpovídat tělu vlastním antigenům. V důsledku toho by bylo negativně odselektováno větší množství

T buněk a celková variabilita jimi rozpoznávaných exoantigenů by nakonec klesla. Je tedy pravděpodobné, že bylo v průběhu evoluce optimalizováno množství MHC lokusů v genomu jedince a je pouze vhodné, co nejvíce zvyšovat polymorfismus v rámci genofondu populace (Nowak et al. 1992).

Ačkoliv, jak již bylo zmíněno, existuje relativně dostatek důkazů o tom, že se v sexuální selekci myši a patrně i člověka uplatňuje MHC výběr, význam tohoto fenoménu u ptáků je nejasný. Klasickou je v tomto ohledu práce von Schantze et al. (1996), kteří prokázali, že délka ostruh mladých samců bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) souvisí s jejich MHC genotypem. Při tom bylo zároveň zjištěno, že MHC genotyp (ne však heterozygotnost v MHC alelách, srovnej s hypotézami dobrých genů) má vliv na přežívání jedince. Jelikož je délka ostruh u tohoto druhu pohlavně selektovaným znakem (von Schantz et al. 1997), jedná se patrně o přímý důkaz parazity zprostředkovaného pohlavního výběru tak, jak jej navrhli Hamilton & Zuk (1982). Zajímavé ovšem je, že, jak se zdá, samice si podle délky ostruh volí teprve mezi samci staršími dvou let, u kterých je tento znak zároveň kondičně dependentní, ale v rámci jednoletých samců tento znak při svém výběru nezohledňují (von Schantz et al. 1997). Tento závěr podporuje představu, že samice vybírají samce bez ohledu na jejich MHC genotyp proto, že v podmínkách měnících se tlaků různých parazitů není jisté, který MHC genotyp bude úspěšný, což se ovšem ověří časem podle celkové kondice zvířete. To by potvrzovala také skutečnost, že délka ostruh téhož jedince je v čase velmi proměnlivá (von Schantz et al. 1997). Naproti tomu Freeman-Gallant et al. (2003) odhalili u jednorokých samic strnadce skvrnitého (*Passerculus sandwichensis*) sklon párovat se se samci s odlišným typem MHC a u starších samic souvislost mezi jejich MHC podobností vůči svým partnerům a jejich tendencí vyhledávat mimopárové kopulace. Tento výsledek je však prozatím zcela ojedinělý. Westerdahl (2004) neobjevila při svých výzkumech na rákosníku velkém (*Acrocephalus arundinaceus*) nic, co by nasvědčovalo samiččí volbě s ohledem na MHC a podobně ani Ekblom et al. (2004) nenašli ve své práci na bekasíně větší (*Gallinago media*) žádné důkazy pro MHC-závislé párování. Zároveň ale zjistili, že samci, kteří byli samicemi preferováni, nesli zároveň určité typy MHC alel. Tuto skutečnost spojují autoři s odolností těchto samců vůči nemocem a s jejich kondicí (tito samci byli zároveň větší, takže je toto pozorování v souladu s výsledky von Schantze et al. 1996 a hypotézou „dobrých genů“). Náznaky pro podobnou genetickou závislost imunokompetence naznačují i výsledky Raberga et al. (2003) humorální odpovědi na vakcínu tetanu u sýkor modřinek (*Parus caeruleus*). Zajímavé je zjištění vztahu mezi určitými MHC a PHA-senzitivitou u krocana (*Meleagris gallopavo*, Buchholz et al. 2004). U něj totiž nebyla zjištěna žádná souvislost s tělesnou kondicí. Jak bylo uvedeno v kapitole V.3, není mitogenní působení závislé na přítomnosti APC nesoucí MHC gp. Pro tento vztah tedy prozatím není žádné spolehlivé vysvětlení. Jelikož

PHA-metoda bohužel neumožňuje odhalit podstatu tohoto jevu, bylo by potřeba nashromáždit k tomuto vztahu více imunologických dat a při tom snad hledat příčinu v korelaci mezi určitým MHC haplotypem a přítomností zvýšeného množství určitého leukocytárního buněčného typu v krvi či zvýšenou produkcí určitého cytokinu.

Zmiňme ještě pro úplnost, že ani u myší není existence přímé MHC-samičí volba zcela jistá. Např. Ehman & Scott (2001), nezjistili žádnou podobnou preferenci, zato však zjistili preferenci pro pachové podněty vycházející od neparazitovaných jedinců. Tento výsledek později tito autoři potvrdili také jinými pokusy (Ehman & Scott 2002). To by naznačovalo určitou konsistenci těchto výsledků s výsledky získanými dopsud na ptácích.

Významnou roli v rezistenci vůči chorobám by mohla hrát také heterozygotnost organismů. V tomto případě nemáme na mysli ani tak heterozygotnost v některém konkrétním genovém lokusu, ale spíše celkový podíl heterozygotních lokusů v genomu jedince. Předpokládá se totiž, že homozygotnost (daná například inbreedingem) snižuje viabilitu potomstva, pravděpodobně vlivem exprese recesivních škodlivých alel a že heterozygotní jedinci tedy přežívají lépe než jedinci homozygotní (viz např. Foerster et al. 2003). Význam heterozygotnosti by mohly podporovat například výsledky Blomqvista et al. (2002) a Foerster et al. (2003), které naznačují, že by dospělí jedinci mohli vyhledávat pro mimopárové kopulace přednostně jedince s co nejodlišnějším genotypem, čímž by zvyšovali životaschopnost alespoň části svých mláďat. Zcela nově se objevují také práce, které naznačují přímou souvislost heterozygotnosti a imunity. Například Hawley et al. (2005) zjistili, že u hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) ovlivňuje heterozygotnost vnímavost jedince k nebezpečné chorobě způsobené bakteriemi *Mycoplasma gallisepticum* a jeho schopnost vyprodukovat silnou buněčnou imunitní odpověď. Dlužno ovšem poznamenat, že usuzovat na význam vztahu heterozygotnosti a viability z výsledků mnoha do současnosti publikovaných studií by mohlo být poněkud předčasné. Většina z těchto studií totiž použila omezené množství mikrosatelitů, které umožňují srovnání pouze několika málo genových lokusů (maximálně několik málo desítek). Pemberton (2004) shrnuje nadostatečnost takového přístupu na příkladu studií, které ukázaly, že ani při použití sta a více lokusů není možné správně odhadnout míru inbreedingu a tedy heterozygotnosti jedinců. Zdá se tedy možné, že studie, které potvrzují význam heterozygotnosti ve vztahu k viabilitě či přímo ke schopnosti adekvátní imunitní reakce, použily náhodně mikrosatelity, které váží lokusy ležící v okolí některých imunologicky či jinak významných genů (např. MHC) a spíše než celkovou heterozygotnost proto vyjadřují heterozygotnost v některém klíčovém lokusu. Bohužel se ovšem obvykle přesně neví, v blízkosti jakých genů se mikrosatelity vážou, a tak není možné na základě výsledků těchto studií konstatovat nic bližšího k příčinám zjištěných rozdílů ve sledovaných parametrech mezi jedinci.

VIII KONDIČNÍ ZÁVISLOST FUNKCESCHOPNOSTI IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Stejně jako na většině jiných fyziologických funkcích organismu se i na schopnosti vyvolat adekvátní imunitní odpověď odráží momentální kondiční stav jedince. Ten je dán jednak příčinami vnitřními (stáří jedince, fáze ročního reprodukčního cyklu aj. – podkapitoly VIII.1-4) a jednak také vnějšími (např. počasí, stresové faktory – podkapitoly VIII.4-8). Dlužno ovšem přiznat, že jsou tyto dvě kategorie spíše umělými konstrukty, které nám pouze umožňují rychlý zběžný přehled o imunologicky významných vlivech. Např. přístup k potravě je jednak dán aktuální nabídkou potravy v prostředí (tak je chápána převážně v tomto textu), jednak také vyhledávacími schopnostmi jedince, jeho momentálními potřebami převáděnými do nervové soustavy prostřednictvím hormonů, trade-off s rizikem predace na zvláště výhodných místech a konečně také současným tlakem ze strany parazitů. V praxi lze ovšem význam těchto jednotlivých činitelů samostatně jen velmi obtížně zkoumat. Existující práce se proto obvykle zabývají vztahem nabídky potravy nebo jiného výše zmíněného faktoru a funkce imunitního systému, přičemž výsledky jsou pak dávány do kontextu na spíše teoretické bázi. Přehled v kapitolách VIII.1-8 si klade za cíl utřídit poznatky z této oblasti, které byly do dnešní doby získány při výzkumu ptáků obecně. Lze totiž předpokládat, že souvislosti zjištěné na ptácích obecně se budou v podobné míře uplatňovat i u rozmnožujících se samců konkrétně.

VIII.1 Velikost a hmotnost jedince

Mnoho prací zabývajících se kondiční závislostí akceschopnosti imunitního systému (povětšinou měřeného PHA-kožním testem nebo jako množství protilátek v krvi) zjistilo pozitivní korelaci mezi velikostí a hmotností jedince na jedné straně a komponentami imunitních reakcí na straně druhé (Gonzalez et al. 1999; Johnsen et al. 2000; Tella et al. 2000; Tella et al. 2001; Møller & Petrie 2002; Kleven & Lifjeld 2004; Westneat et al. 2004; Hõrak et al. 2000). Tuto skutečnost lze vysvětlit buďto proporčně, jako větší hodnotu měřené veličiny u jedinců celkově větších, nebo kondičně, jako lepší funkčnost imunitního systému těch jedinců, kteří jsou v celkově lepší kondici, v důsledku které zároveň více vyrostli a dokázali si udržet vyšší tělesnou hmotnost. Zatímco první vysvětlení si další podrobnější ozřejmění patrně nevyžaduje, vysvětlení druhé v sobě obsahuje řadu podotázek týkajících se příčiny určité kondice daného jedince. Například Hõrak et al. (2000) navrhuje, že nákladnost aktivace imunitního systému (a tím i rezistence vůči parazitům) spočívá v tom, že vyvolává hyperaktivitu imunitního systému, a tím i poškození vlastního organismu hostitele, a tak si pouze jedinci v lepší kondici mohou dovolit silnější imunitní reakci, neboť jsou lépe schopni reparovat vzniklá somatická poškození. Existují samozřejmě i jiná dílčí vysvětlení, a právě jim jsou tedy věnovány následující kapitoly této sekce.

Připomeňme však ještě, že Navarro et al. (2003) zjistili spíše než vztah míry imunitní reakce a vlastní hmotnosti jedince souvislost imunity s fluktuacemi hmotnosti během dne. Vrabci domácí (*Passer domesticus*), kterým byl aplikován PHA, byli schopnější tím silnější imunitní reakce, čím menší vykazovali fluktuace hmotnosti během dne. Toto a podobná dále diskutovaná pozorování tak hovoří spíše pro druhé z výše zmíněných vysvětlení.

VIII.2 Věk jedince

Věk je, jak se zdá, z hlediska imunity i reprodukce jedince velmi důležitý parametr. Různé studie, které tento fenomén studovaly, přitom obvykle zjistily časný nárůst a po té postupný pokles imunitních schopností jedince s přibývajícím věkem (viz např. Tella et al. 2002; Møller et al. 2003). Jako možná příčina tohoto jevu bylo před nedávnem navrženo postupné zvyšování poškození organismu v důsledku ničivého účinku uvolňujících se kyslíkových radikálů (Alonso-Alvarez et al. 2004b). Ačkoliv se obvykle předpokládá, že proces stárnutí přispívá k celkové mortalitě volně žijících zvířat jen velmi málo, neboť většina jedinců zemře dříve, než se může senescence projevit, Saino et al. (2003c) u vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*) zjistili, že humorální odpověď na primární i sekundární antigenní podnět klesá s rostoucím stářím jedince. Vrchol imunitní reaktivity v mládí by ale mohl mít i svůj adaptivní význam. Alokace větší části zdrojů do imunitního systému v počátečních fázích života, kdy je větší pravděpodobnost setkání s novými antigeny, by totiž byla velkou výhodou oproti vyrovnaným investicím po celý život jedince, neboť by umožňovala mladým zvířatům překonat omezení plynoucí z menší efektivity primární imunitní odpovědi (Møller et al. 2003). To by také mohlo vysvětlovat pozorování, že mladí jedinci trpí více ektoparazitárními infekcemi než ptáci staří (např. Garamszegi et al. 2005). Jedním z možných mechanismů rozdílné aktivity imunitního systému mezi různými věkovými kategoriemi by také mohl být postupný vývoj receptorů na povrchu jednotlivých buněk imunitního systému. Tuto hypotézu by podporovaly např. výsledky získané na studiu aktivace heterofilních granulocytů kura (Kogut et al. 2002). Zmiňme však pro úplnost, že mnoho prací žádnou věkovou závislost imunitních parametrů nezjistilo (např. Dufva & Allander 1995; Jovani et al. 2004).

VIII.3 Metabolismus a pohybová aktivita

Metabolismus ovlivňuje imunitní systém přes své stavební a imunoregulační produkty, přičemž metabolismus samotný je pod vlivem genetických faktorů (schopnost různé látky různým způsobem metabolizovat) a faktorů prostředí (možnost tyto látky vůbec z prostředí získat). Jelikož je metabolismus složitou sítí látkových přeměn s velice komplexním regulačním systémem, může se ve svém důsledku na funkci imunitního systému projevit i změna příjmu či metabolizace imunitě velmi vzdálených sloučenin. Schopnost látky metabolizovat může ovšem být ovlivněna např. střevní parazitární infekcí (Ruff et al. 1974), takže se vlastně může jednat o propojený kruh s mnoha vstupy a výstupy, který vede od schopnosti metabolismu ovlivnit imunitní systém přes parazity až po vliv imunitního systému na schopnost metabolizovat určité látky.

Pohybová činnost byla do této kapitoly vložena zejména proto, že s metabolismem přímo souvisí. Narozdíl od předchozího odstavce zde nebudeme rozebírat vliv pohybu na imunitní systém, ale naopak vliv aktivity imunitního systému na aktivitu pohybovou. Hůrak et al. (2003) zjistili, že jedinci, u kterých byl imunitní systém stimulován aplikací nepathogenních SRBC částic, vykazovali po rozvinutí imunitní odpovědi sníženou pohybovou aktivitu. Toto zjištění je pro naše úvahy důležité proto, že naznačuje určitý trade-off o energetické nebo mikronutriční zdroje mezi těmito dvěma procesy. Ačkoliv z výsledků Hůraka et al. (2003) nelze přímo nic takového vyvozovat, je možné spekulovat, že by těmito omezujícími látkami mohly být např. antioxidanty, které se uplatňují jak v imunitním systému, tak i při redukci volných radikálů, které vznikají při pohybu. V konkrétním případě karotenoidů by s nimi mohli ptáci také šetřit pro potřeby exprese pohlavního znaku.

VIII.4 Biorytmy

VIII.4.1 Cirkanuální cykly

Život mnoha ptačích druhů, především těch žijících v mírném a studeném zemském pásu, je silně ovlivněn střídáním ročních období. Tyto změny navozují typickou periodizaci, v níž se obvykle střídá reprodukční sezóna, migrace a zimování. Četné vlivy působící během těchto jednotlivých fází v odlišné míře se pak nevyhnutelně promítají i do fyziologických procesů (například kolísání hladiny hormonů v krvi, viz např. Buchanan et al. 2003), imunitní aktivitu z toho nevyjímaje. Jak ukázali např. Masello & Quillfeldt (2004) souvisí kondice vyjádřená různými složkami krevní plasmy ptáků s reprodukčním úsilím. Podobně zjistili např. Alonso-Alvarez et al. (2004b) pokles tělesné hmotnosti samců i samic během hnízdění. Lze proto s velkou pravděpodobností očekávat, že zpětně kondice jedince ovlivní jeho fyziologii,

a tím i imunitní systém jako její nedílnou, integrální součást. Přesně to zjistili u sýkory koňadry (*Parus major*) Hůrak et al. (1998), kteří zaznamenali změny v počtech různých leukocytárních typů i v celkových počtech leukocytů a snížení hematokritu v průběhu reprodukční sezóny. Tyto změny časově odpovídaly změnám v koncentracích metabolicky významných proteinů v krevní plasmě, které mohou sloužit jako indikátor změny kondice. Zajímavé je, že tyto proměny v imunitním systému byly různé u samců a u samic; u samců byl na začátku poměr H/L vyšší než u samic, zatímco na konci hnízdění byla situace opačná, přičemž změna tohoto parametru vyšla signifikantní pouze pro samice (to odpovídá i zjištěním Moralese et al. 2004 u samic lejska černohlavého, *Ficedula hypoleuca*, ačkoliv ti navíc zjistili, že se koncentrace IgY v krvi samic po naklazení vajec dále nemění a pozitivně koreluje s PHA T buněčnou odpovědí). Podobné změny byly Hůrakem et al. (1998) zjištěny i u poměru albuminu ku globulinům v krevní plasmě. Toto dohromady se zjištěným stavem některých kondičních parametrů (VLDL částice v krvi) plně odpovídá různým nákladům obou pohlaví v různých fázích reprodukce. Je tedy pravděpodobné, že jsou samci více vystaveni riziku parazitace před naklazením vajec, zatímco samice trpí větším stresem až během vlastního hnízdění. Podobné mezipohlavní rozdíly vztahující se ke skupinám vystaveným různému reprodukčnímu úsilí, týkající se však tělesné hmotnosti a míře citlivosti k oxidativnímu stresu, uvádějí i Alonso-Alvarez et al. (2004b) pro zebřičku (*Taeniopygia guttata*). Právě velký význam míry reprodukčních investic v těchto procesech dokládají mnohé manipulační studie. Deerenberg et al. (1997) například právě u zebřiček prokázali, že experimentální manipulace reprodukční zátěže rodičů snižuje jejich schopnost produkovat protilátky proti SRBC. Ačkoliv reprodukční zátěž a imunitní procesy také způsobily pokles ptáků na váze, zvýšení kvality potravy na proteiny nemělo očekávaný vliv na změny imunitní odpovědi ani na změny hmotnosti pokusných zvířat. To by mohlo znamenat, že výše popsané procesy jsou součástí adaptivní realokace zdrojů z oblasti sebeúdržby organismu do oblasti reprodukce, což je strategie zajišťující maximalizaci celoživotní fitness jedince. Prakticky identické výsledky podává manipulační studie Nordlinga et al. (1998) sledující protilátkovou antivirovou reakci hnízdících samiček lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*). Také v souvislosti s T buněčnou imunitou uvádí Lifjeld et al. (2002) pro vlaštovku stromovou (*Tachycineta bicolor*), že intenzita PHA reakce u rodičů klesá s velikostí snůšky. Podobně i výsledky manipulačních pokusů Saina et al. (2002c) prováděných na vlaštovkách (*Hirundo rustica*) potvrzují závislost míry změn kondice a funkceschopnosti imunitního systému na míře reprodukčních investic v dané sezóně. Nordling et al. (1998) ovšem také v souladu s obecnými předpoklady (Sheldon & Verhulst 1996) prokázali, že existuje pozitivní vztah mezi reprodukčním úsilím samice a intenzitou parazitace (v tomto případě krevními parazity rodu *Haemoproteus*, kteří mohou u ptáků představovat významnou příčinu mortality). Zajímavá je v tomto ohledu skutečnost, že Saino et al. (2002c) nezjistili mezi samci vlaštovek, jimž počet mláďat v hníždě byl experimentálně

navýšen, a těmi, u nichž byl počet mlád'at snížen, žádné rozdíly v hladině kortikosteronů. Jak již bylo uvedeno v kapitole V.7.5, je kortikosteron hormonem, jehož zvýšená hladina signalizuje stres, a právě u samců, do jejichž hnízd byla mlád'ata pokusně přidána, by tedy bylo možno zvýšení hladiny kortikosteronu v důsledku stresu předpokládat. Zdá se proto, že může aktuální reprodukční úsilí ovlivňovat kondici a imunitní systém jinými prostředky nežli pouze tvorbou stresových hormonů. Zde se nabízí otázka adaptivnosti optimalizace využití nutričních nebo antioxidantních zdrojů během reprodukčního období (Alonso-Alvarez et al. 2004b). Pro toto vysvětlení by také vypovídaly výsledky Ilmonena et al. (2000), kteří zjistili u lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), že aktivace imunitního systému pomocí vakcíny diptheria-tetanus vede k redukci alokace energie do reprodukčního úsilí (např. nižší frekvence krmení), což se projeví jako snížená kvalita mlád'at a jejich snížený počet. Naproti tomu však Williams et al. (1999) nezjistili žádný vliv nepathogenní aktivace imunitního systému na charakteristiky reprodukčních investic samic u špačka obecného (*Sturnus vulgaris*), z čehož by vyplývalo, že samotná produkce protilátek není pro organismus příliš energeticky náročná. Zajímavým rozdílem, který nebyl prozatím nikdy diskutován a jehož význam není možné na základě dnes známých informací odhadnout (ačkoliv by mohl být velmi velmi významný), je skutečnost, že narozdíl od Williams et al. (1999), kteří použili SRBC, které je nepathogenního původu, Ilmonen et al. (2000) aplikovali vakcínu bakteriální podstaty. Je proto docela dobře možné, že imunitní systém, který je schopen reagovat na pathogenní částice efektivněji než na částice nepathogenní, vysílá v případě podání těchto dvou různých antigenních struktur různé signály, které vedou k odlišným změnám ve fyziologii jedince (srovnej též s kapitolou VI.3.2 pojednávající o stimulaci imunitního systému pomocí SRBC).

Oproti výše zmíněným studiím hledají Møller et al. (2003) možnou příčinu sezonality fungování imunitního systému jinde. Ti si totiž všimli, že většina parazitů načasovává svou vlastní reprodukci do období rozmnožování svého hostitele, aby tak zajistila svůj přenos na hostitele nové. Předpokládají proto naopak silnou mobilizaci imunitního systému právě v hnízdní sezóně ve srovnání se sezónou nehnízdění. Podle Møller et al. (2003) může právě s těmito antagonistickými vztahy souviset pokles relativní velikosti sleziny (velká slezina indikuje kondici i parazitózu) a T buněčné odpovědi po hnízdním období, a také skutečnost, že jedinci v dobré kondici vykazují větší imunitní odpověď právě v hnízdním období. Podobné výsledky poskytuje i studie Hasselquist et al. (1999), kteří zjistili výrazný vzestup v intenzitě sekundární humorální imunitní odpovědi v prehnízdění sezóně u vlvovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*).

Významným prvkem ovlivňujícím fyziologické mechanismy v průběhu roku je u mnoha druhů také migrace. Jedná se o náročný proces, který výrazně působí na reprodukční úspěch jedinců v závislosti na jejich kondici. Jak zjistili Møller et al. (2004), vykazují samci (ne však

samice) vlaštovek, kteří přilétají na hnízdiště dříve, intenzivnější PHA-kožní imunitní reakci. To patrně souvisí s jejich celkově lepší kondicí. Podobně i Moreno et al. (1998) u tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) dokládají, že ptáci s lepším stavem imunitního systému začínají hnízdit dříve v sezóně.

VIII.4.2 Cirkadiální rytmy

Mimo výše zmíněné střídání relativně dlouhotrvajících fází anuitních cyklů však existují i biorytmy s kratší periodou. Z těchto byla ve vztahu k imunitnímu systému volně žijících zvířat věnována pozornost pouze cirkadiálním proměnám. Maxwell (1981) zjistil, že během dne kolísají u kura počty lymfocytů, heterofilů a monocytů v krvi, přičemž relativní zastoupení heterofilů a monocytů přes den významně (až dvojnásobně) stoupá, maxima dosahuje v podvečer a přes noc opět klesá, zatímco úměrně těmto změnám poměr lymfocytů v krvi přes den klesá a přes noc pak vystoupí na původní hladinu. Podobné výsledky uvádějí i Ots et al. (1998) pro sýkory koňadry (*Parus major*). Kondo et al. (1992) uvádějí, že množství monocytů v krvi kura a aktivita jeho peritoneálních makrofágů kolísá během dne, přičemž se jedná o cyklus se dvěma vrcholy.

VIII.5 Počasí

Je zřejmé, že na imunitní systém budou kromě predikovatelných sezónních a cirkadiálních změn podmínek působit také výkyvy nepredikovatelné, dané proměnami počasí. Klimatické výkyvy nejen v hnízdní sezóně, ale i během zimování ptáků se odrážejí do různých reprodukčních parametrů, včetně exprese pohlavních znaků (Saino et al. 2004). Jelikož jsou z evolučního hlediska nevýznamné, neboť se jejich vliv v dlouhodobém průměru stává zanedbatelným, byla jim věnována jen malá pozornost. Potvrzení naší představy, že aktuální parametry imunity a kondice obecně jsou přímo závislé na momentálním stavu vnějšího prostředí (počasí, teplota), nacházíme např. v práci Lifjelda et al. (2002) na vlaštovce stromové (*Tachycineta bicolor*) nebo v práci Christeho et al. (2001), zabývající se reprodukčním úspěchem jiříček obecných (*Delichon urbica*). V této souvislosti připomeňme především význam vlivu chladu na imunitní systém. V ekologických studiích je již delší dobu známo, že chlad způsobuje stres, který se projevuje imunosupresí (viz např. pokles humorální odpovědi u sýkor modřinek, *Parus caeruleus*, Svensson et al. 1998). Možné imunologické mechanismy poklesu aktivity imunitního systému v chladu naznačují nedávné výzkumy Hanganalapura et al. (2003, 2004), kteří zjistili, že teplotní stress mobilizuje především vrozené mechanismy imunity a že buněčné složky imunity jsou na déle trvající chladový stres citlivější než složky humorální. Zároveň zjistili, že teplotní stress má vliv i na tělesnou hmotnost zvířat. Z těchto výsledků vyplývá, že chladné počasí by mohlo mít veliký determinační vliv na imunitní funkce

organismu a mohlo by představovat skrytý zdroj variability o neznámém rozsahu uplatňující se v ekoimunologických studiích. Bohužel nemáme doposud žádné bližší informace o vztazích mezi chladem a imunitním systémem u volně žijících druhů, takže získání jakýchkoliv nových poznatků v tomto směru by mohlo významným způsobem upřesnit interpretaci našich dosavadních i budoucích výsledků.

VIII.6 Přístup k potravě

Potrava je zřetelně jedním z nejdůležitějších vnějších faktorů, které ovlivňují fyziologické funkce organismu. Její složení přímo souvisí s růstem a vývinem organismu, produkcí biologicky aktivních molekul, jakými jsou hormony nebo enzymy a má vliv i na nervovou činnost. Je obecně rozšířeným jevem, že špatná výživa vede ke vzniku chorob (Sheldon & Verhulst 1996), což jasně dokládá, že se pak všechny výše uvedené souvislosti odrážejí i na funkci imunitního systému. Klasing (1998b) rozděluje mechanismy nutričního působení na imunitní systém do šesti hlavních okruhů (1-6).

1) Složení a množství potravy může determinovat ontogenezi imunitního systému. Při tom mají velkou úlohu především zdroje předávané mláděti matkou prostřednictvím vejce (srovnej s kapitolou V.7.1) a potrava, kterou mládě přijímá během prvních dní života. Nedostatek mikronutričních zdrojů (vitaminů, minerálů, karotenoidů apod.) může mít významný dopad na ontogenetické procesy v imunitním systému, což může ovlivnit i budoucí imunokompetenci jedince. Například experimentálně vyvolaný nedostatek v příjmu vitamínu E a selenu vyvolává narušený vývin Fabriciovy bursy (viz např. Wakenell 1998). Ačkoliv se o podobných fenomenech u volně žijících druhů mnoho neví, bylo u pěvců například zjištěno, že složení potravy má vliv na rychlost růstu, imunologickou reaktivitu (viz pokusy na zebříčce, *Taenopygia guttata*; Birkhead et al. 1999) i karotenoidní zbarvení peří během juvenilní fáze života (viz pokusy na sýkoře koňadře, *Parus major*, které naznačují možnost determinačního vlivu této mikronutriční složky na ontogenezi organismu, včetně imunitního systému; Fitze et al. 2003). V ontogenezi imunitního systému přitom patrně mohou fungovat i látky s celkově imunostimulačním efektem. Příklad pro toto tvrzení můžeme najít v kinetice ontogeneze kura. El-Abasy et al. (2002) zjistili, že kuřata krmená několik dní stravou obohacenou o extrakt z cukrové třtiny vykazovala rychlejší růst ještě několik týdnů po této aplikaci. Zároveň měla tato zvířata i vyšší imunitní odpověď na SRBC a antigeny *Brucella abortus*. In vitro pak bylo zjištěno, že extrakt z cukrové třtiny zvyšuje fagocytyckou aktivitu heterofilů.

2) Nutriční zdroje tvoří substrát, který je nezbytný pro proliferační, biosyntetické a ekreterické procesy během imunitní reakce i pro vlastní udržování imunitního systému. Zdá se přitom, že akutní fáze imunitní odpovědi představuje větší spotřebu zdrojů než je jejich množství,

ze kterého se imunitní systém skládá (Klasing 1998b; avšak srovnej s výsledky Erauda et al. 2005). Velké množství studií na kurovi (*Gallus domesticus*) ukázalo, že zastoupení různých složek (například mastných kyselin či aminokyselin) v přijímané potravě může ovlivňovat průběh reakcí imunitního systému na různé stimulační podněty (viz např. Fritsche et al. 1991; Dietert et al. 1994; Parmentier et al. 1997; Sijben et al. 2000). Jelikož byl mnohdy prokázán také rychlejší růst pokusných jedinců, mohl by tento výsledek souviset s celkově lepší kondicí zvířat držených na nutričně bohatší dietě. Například Hoi-Leitner et al. (2001) zjistili, že dostupnost potravy koreluje u mláďat zvonohlíka zahradního (*Serinus serinus*) se schopností vyvolat jak buněčnou tak i protilátkovou odpověď a negativně koreluje s H/L poměry v krvi. Podobně i dnes již klasická práce v tomto směru, studie Lochmillera et al. (1993), prokázala, že mláďata křepela virginského (*Colinus virginianus*) krmená potravou na proteiny chudou měla v porovnání s jedinci drženými na dietě o normálním obsahu proteinů nejen omezený růst, ale i vývoj primárních i sekundárních lymfatických orgánů a slabší PHA-kožní reakci. Lochmiller et al. (1993) však nezjistili, že by nižší zastoupení proteinů v potravě vedlo k nižší proliferativní aktivitě lymfocytů in vitro, změnám v početnosti leukocytů nebo k horší humorální odpovědi in vivo. Také vrabci domácí (*Passer domesticus*) krmení na proteiny bohatší dietou měli vyšší T buněčnou imunitu (měřenou pomocí PHA) v porovnání s jedinci živěnými na proteiny chudou dietou (Gonzalez et al. 1999). V případě humorální imunity měřené jako relativní koncentrace imunoglobulinů v séru po aplikaci SRBC však byla experimentátory zjištěna přesně opačná, negativní korelace mezi proteinovou bohatostí diety a densitometricky stanoveným množstvím elektroforeticky izolovaných Ig v séru. Tuto skutečnost autoři vysvětlují tím, že jedinci v celkově lepší kondici čelili v daném čase méně parazitárním infekcím, a tedy nevytvářeli tolik protilátek. Tuto možnost by potvrzovalo také zjištění, že kvalita potravy měla vliv na výskyt krevních parazitů (Gonzalez et al. 1999). Naproti tomu Ohlsson et al. (2002) nezjistili žádný vliv sníženého příjmu proteinů na rozvoj imunitního systému mladých bažantů obecných (*Phasianus colchicus*). Příčinou v tomto případě mohlo být, že snížení obsahu proteinů v potravě nebylo dostatečné k tomu, aby významně imunitní systém ovlivnilo nebo to, že parametry imunitního systému byly měřeny až s určitým zpožděním, přičemž imunitní systém se v mezidobě s důsledky potravního stresu vyrovnal. Možné je také vysvětlení, které navrhuji obecněji Norris & Evans (2000), že jednoduše byla vyšetřována špatná složka imunity – tedy ta, která je pro organismus natolik důležitá, že do ní alokuje velkou část dostupných zdrojů tak, aby její funkčnost zůstala zachována.

3) Zdá se být docela dobře podloženo, že vlastní imunitní reakce není energeticky přespříliš nákladná (viz např. Klasing 1998b; Hůrak et al. 2000), což je patrně dáno tím, že nutriční náklady na růst a metabolismus jsou ve srovnání s náklady na proliferaci buněk imunitního systému relativně malé. To však neznamená, že imunitní odpověď není nákladná

vůbec. Naopak se zdá (Hůrak et al. 2000), že jedinci ve špatných podmínkách nejsou schopni vyvolat tak dobrou imunitní odpověď jako jedinci v dobrých podmínkách. Za to by mohly být zodpovědné právě minoritní složky potravy, jejichž nízká koncentrace v těle z nich činí omezené zdroje, které jsou obzvláště limitované během imunitních reakcí. Takovými vzácnými látkami by mohly být například látky esenciální pro detoxifikaci organismu (např. karotenoidy) nebo látky limitující proliferaci buněk (např. železo).

4) Některé mikronutriční složky mají přímý regulační účinek na imunitní systém (např. vitaminy A, D a E). Bylo zjištěno, že nedostatek vitamínu A v potravě snižuje účinnost imunitních reakcí (Dalloul et al. 2002). Podobně bylo zjištěno na starších kuřatech (Leshchinsky & Klasing 2003), že množství vitamínu E v potravě ovlivňuje v organismu poměry jednotlivých lymfocytárních populací a také snižuje expresi cytokinu MGF po stimulaci LPS. Vezme-li v úvahu, že je imunitní systém silně citlivý na oxidační stres způsobený kyslíkovými radikály vznikajícími během respiračního vzplanutí, pomocí kterého jsou během zánětu zabíjeny patogenní mikroorganismy (např. Hughes 2001) a že vitamin E působí v organismu jako účinný antioxidant (Hartley & Kennedy 2004), nacházíme určitou možnost, v níž by mohl spočívat imunomodulační efekt vitamínu E na zánětlivou reakci. Podobný antioxidační účinek jako vitamin E je přisuzován i karotenoidům, dalším minoritním látkám přítomným v potravě. Význam karotenoidů z hlediska fungování imunitního systému byl diskutován v samostatné kapitole (V.9), a proto na tomto místě pouze zmíníme bez ohledu na molekulární mechanismy to, co bylo o zastoupení karotenoidů v potravě zjištěno na ptačích druzích. (Blount et al. 2003b) na příkladu zebřičky (*Taenopygia guttata*) zjistili, že množství karotenoidů podávaných v potravě mění schopnost organismu vyvolat imunitní odpověď.

5) Příjem potravy má také nepřímý regulační efekt zprostředkovaný endokrinním systémem, například způsobený déle trvajícím omezením přísunu potravy. Jak bylo vysvětleno v kapitole V.9 je především kortikosteron hormonem uvolňovaným za stresových situací. Byly navrženy dvě alternativní hypotézy vysvětlující souvislost změn hladiny kortikosteronu a různých imunitních reakcí za působení potravního nedostatku. První, nutriční hypotéza, předpokládá omezení imunitního systému kortikosteronem, aby bylo možno limitované zdroje využít pro potřeby zachování jiných, životně důležitých funkcí (Raberg et al. 1998). Toto vysvětlení se však ve světle výsledků Svenssona et al. (1998) a Erauda et al. (2005) nezdá, alespoň pro energetické zdroje, příliš pravděpodobné (avšak srovnej s Ots et al. 2001). Druhá hypotéza naproti tomu předpokládá, že omezení imunitního systému je adaptivní obranou proti autoimunopathologickému efektu imunitního systému za špatných nutričních podmínek (Saino et al. 2003e).

6) Fyzické a chemické složení potravy může ovlivňovat populace mikroorganismů v gastrointestinálním traktu, a tak spoluurčovat možnost vzniku patologických stavů. Rozhodujícími komponentami potravy by v tomto ohledu mohlo být například množství vlákniny, viskozita, obsah tuku apod. (Klasing 1998b).

Skutečnost, že jemné odlišnosti v přijímané potravě mohou specifickým způsobem ovlivnit jednotlivé součásti imunitních mechanismů nezávisle na ostatních, dokazuje například výsledek pokusu, který byl proveden na kuřatech krmených potravou s různým obsahem β -glukanu (Cheng et al. 2004). Bylo totiž zjištěno, že různé koncentrace β -glukanu se nikterak neprojeví ani na růstu zvířat ani na koncentraci protilátek v jejich krvi ani na blastogenezi lymfocytů, avšak projeví se na chemotaktické aktivitě makrofágů. Proti těmto výsledkům lze namítnout, že nebyl sledován dostatečně velký soubor imunologických parametrů a že je tedy možné, že se zvýšená krmná dávka β -glukanu projeví i na některé jiné složce imunitního systému. I tak však zůstává platnou skutečnost, že právě určitá složka zastoupená v potravě různých jedinců v různém poměru může mít zásadní vliv na fungování některého imunitního mechanismu. Tento rozdíl se pak může projevit pouze tehdy, když je populace napadena parazitem, proti němuž je tento imunitní mechanismus funkčně účinný. Jedná se tedy v podstatě o negenetický faktor, který může významně ovlivnit rezistenci jedinců vůči parazitům, a tedy i míru exprese pohlavního znaku. Domnívám se také, že je možné předpokládat, že by se taková případná potravní specifita mohla předávat formou učení z generace na generaci, s čímž by byla spojena i dočasně (po dobu trvání selekčního tlaku ze strany parazita) zvýšená exprese pohlavního znaku u potomků. Pokud by byl selekční tlak ze strany parazita významný a dlouhotrvající, mohlo by dojít i k fixaci využívání určitého potravního zdroje prostřednictvím pohlavního výběru, s čímž by byla (v případě přísně vertikálního učení) spojena i fixace určitých genotypů. Nicméně to není nezbytné. Mnohem pravděpodobnější je spíše představa, že selekční tlaky různých parazitů na populaci v čase různě fluktuují, což může představovat měnící se proměnnou, která určuje významnost jednotlivých imunitních mechanismů a skrze ně i zastoupení jednotlivých složek potravy.

VIII.7 Parazité

Parazitární infekce představují pro ptáky veliké riziko z hlediska přežití (viz např. Hõrak et al. 2001; vliv kokciidií na hostitele shrnutý v Saks 2004 nebo epidemie mykoplasmy popisovaná Hillem 2002) i reprodukčního úspěchu (Marzal et al. 2005), přičemž skutečnost, že parazité zároveň ovlivňují aktivitu imunitního systému, je samozřejmá. Celá řada parazitů například utlumuje samotný vývin imunitního systému během ontogeneze (viz např. Dietert et al. 1994 či Wakenell 1998). Pomineme-li energetické výdaje, které parazit přímo způsobuje svému hostiteli (destrukce tkání, konzumace hostitelovy potravy), může být nákladná i vlastní aktivita imunitního systému směřující k vypuzení parazita (Sheldon & Verhulst 1996). To by potvrdzovaly například výsledky Otse et al. (2001), kteří zjistili, že pokusná aktivace imunitního systému významně ovlivňuje rychlost metabolismu jedince. Podobně Hõrak et al. (2003) prokázali, že organismus s aktivovaným imunitním systémem snižuje spontánní lokomoční aktivitu, patrně jako energeticky úsporné opatření (avšak srovnej s výsledky Svenssona et al. 1998 a Erauda et al. 2005). Výsledky mnohých studií dokládají, že parazity aktivovaný imunitní systém odpovídá na infekci zvýšeným množstvím imunitních buněk v postižené tkáni i v krvi (viz např. Rose et al. 1979; Saino et al. 1995; Ots & Hõrak 1998; Figuerola et al. 1999; Williams et al. 1999; Christe et al. 2000; Ilmonen et al. 2000), zvýšením produkce cytokinů (viz např. Klasing 1994 či Miyamoto et al. 2002), zvýšenou sekrecí protilátek (viz např. Saino et al. 1995; Nordling et al. 1998; Ots & Hõrak 1998; Christe et al. 2000; Morales et al. 2004) a mnoha dalšími víceméně jasně detekovatelnými projevy. Na různé parazity přitom reaguje imunitní systém pomocí různých imunologických mechanismů, takže ne všechny imunologické parametry musí být infekcí ovlivněny stejnou měrou (Ots & Hõrak 1998). Ots & Hõrak (1998) také na sýkoře koňadře (*Parus major*) zjistili, že mohou existovat i mezipohlavní a věkové rozdíly v průběhu reakcí na probíhající parazitární infekci (více k tomuto viz kapitola V.7.4).

Jak ukázala simulace parazitární infekce, kterou pomocí nepathogenního bakteriálního LPS provedli Bonneaud et al. (2003), způsobuje pouhá stimulace imunitního systému pokles hmotnosti a pohybové aktivity postiženého jedince a má tak vliv na jeho reprodukční úspěšnost v daném hnízdění. Podobné výsledky zjistili i Garamszegi et al. (2004) v souvislosti s tělesnou hmotností a zpěvovou aktivitou sameců. Parazitární infekce ovšem samozřejmě není nákladná pouze z hlediska náročnosti aktivace imunitního systému (která sama je často diskutována (Svensson et al. 1998; Eraud et al. 2005)). Parazitární infekce mohou způsobit pokles některých fyziologicky významných látek v krvi, patrně v důsledku jejich omezeného příjmu či zvýšené spotřeby (např. Ruff et al. 1974). To může zpětně ovlivňovat imunitní systém. Mnoho ekologických studií tak prokázalo, že ptáci napadení parazitární infekcí jsou schopni rozvinout

pouze slabší imunitní reakci na experimentální stimulus ve srovnání s jedinci neparazitovanými (Christe et al. 2000; Navarro et al. 2003; Westneat et al. 2004). V případě některých parazitů může být ale parazitární imunosuprese důsledkem přímé aktivity parazita v organismu. Bylo například zjištěno, že *Toxoplasma gondii* účinně potlačuje produkci NO v makrofázích (Guillermo & DaMatta 2004). O kondiční zátěži parazita pro jeho hostitele vypovídají také výsledky výzkumu reprodukční fenologie. Votýpka et al. (2003) na ťuhýkovi obecném (*Lanius collurio*) zjistili, že samice infikované určitými krevními parazity začínaly hnízdit později v hnízdní sezóně. Podobně (Møller et al. 2004) zjistili u vlaštovek (*Hirundo rustica*), že parazitace může ovlivňovat datum příletu ze zimovišť.

VIII.8 Stres

Tuto velice krátkou kapitolku do tohoto místa vkládám pro úplnost předkládané problematiky. Jak již název napovídá, shrnuje několik různých vlivů, které lze rozlišit, ale často se shrnují pod pojem jeden. Do obecnějšího pojetí stresu je možno zahrnout samozřejmě i nedostatek potravy, migrační a reprodukční úsilí nebo nemoci, kterýmžto vlivům jsme se věnovali v samostatných předchozích kapitolách.

Jak již bylo porůznu zmíněno v jiných částech této práce, má stres významný vliv na fungování imunitního systému (viz též Dietert et al. 1994). To konečně dokládají i některé studie na ptácích (Ewenson et al. 2001; Ewenson et al. 2003) i na lidech (Bachen et al. 1992). Stres může u jedince působit jednak vyšší fyzickou aktivitu, a s tím související vyšší uvolňování volných radikálů (viz Alonso-Alvarez et al. 2004b), pokles energetických rezerv nebo tkáňová poškození a jednak také změny v signalizaci nervové a hormonální soustavy (např. produkce kortikosteronů). U mláďat může stres vyplývající v imunosupresi souviset s jejich větším počtem v jednom hnízdě, což ovšem může být důsledek nedostatečného přísunu potravy (Saino et al. 2003e). Podobné účinky stresu byly zjištěny i pro zvětšující se hnízdní kolonie tučňáků magellanských (*Spheniscus magellanicus*; (Tella et al. 2001). O působení některých dílčích složek stresu na imunitní systém bylo pojednáno v této sekci i sekci věnované fungování imunitního systému obecně. Na závěr ještě zmiňme, že existují dvě alternativní hypotézy o příčině imunosuprese v důsledku stresu (Raberg et al. 1998). První z nich předpokládá, že imunosuprese je neadaptivním řešením trade-off při alokaci zdrojů mezi imunitní systém a jiné fyziologické funkce zajišťující přežití organismu. Druhé vysvětlení je adaptivní a předpokládá, že pokles reaktivity imunitního systému předchází imunopathologickým stavům vyvolaným hypersenzitivní autoreaktivní aktivací imunitních mechanismů za suboptimálních podmínek.

IX ZÁVISLOST EXPRESE SEKUNDÁRNÍCH POHLAVNÍCH ZNAKŮ SAMCŮ NA PARAMETRECH IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Tato část práce se zabývá rozbořem signálního významu jednotlivých typů samčích pohlavních znaků a vlivem imunitního systému na expresi těchto znaků. Tam, kde je to možné, se snažím podat pokud možno co nejucelenější obraz o mechanismech tvorby znaku a faktorech, které tento proces ovlivňují. Jelikož se u různých druhů setkáváme s větším počtem pohlavních znaků, přičemž všechny mohou být současně stejně relevantní, jsou v textu vztahy mezi jednotlivými znaky zmíněny. Samčí pohlavní znaky byly rozděleny do více méně ucelených skupin (viz také kapitola IV.3) především proto, že se v současné době zdá, že není pravděpodobné, že by existoval jediný mechanismus, který by stál za expresí všech typů pohlavních znaků. Nelze proto ani předpokládat, že by všechny pohlavní znaky podávaly samicím stejný typ informace. Jak nastínili například Gonzalez et al. (1999), nelze považovat sekundárními pohlavními znaky za jednotné signály kondice či kvality, neboť každý znak je asociován s jiným typem nákladů. Morfologické, behaviorální a ornamentální znaky jsou exprimovány různými fyziologickými drahami, a mají tedy pravděpodobně jiné náklady na využívané zdroje.

Dále je potřeba si uvědomit, že ačkoliv se snažíme o syntézu různých dat získaných na různých druzích, resp. jejich různých populacích, musíme si být stále vědomi, že na úrovni konkrétních lokálních populací mohou existovat odlišnosti ve významu jednotlivých znaků nebo v samičí preferenci pro ně. Důvodem je rozdílná evoluční historie těchto populací, kterou modulovaly odlišné faktory, včetně různých skupin parazitů, kteří se vyznačovali různou pathogenitou, prevalencí i virulencí. Příkladem může být vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), která nese několik pohlavních znaků: délku vnějších ocasních per, bílé skvrny na nich a zbarvení ventrální strany těla (viz např. Møller et al. 1998). Bylo ovšem zjištěno (Safran & McGraw 2004), že samičky evropské subspecie (*H. r. rustica*) vybírají své samečky podle délky ocasních per a bílých skvrn na nich, zatímco americké vlaštovky (*H. r. erythrogaster*) posuzují ve svém výběru červené zbarvení břišní strany těla.

IX.1 Zbarvení

Zbarvení představuje jeden z nejnápadnějších atributů sexuální ornamentace mnoha ptačích druhů. Určitý problém při výzkumu role zbarvení v sexuální selekci představovalo v minulosti antropocentrické vnímání barev, neboť to je druhově specifické (Olson & Owens 1998). To se týkalo především vnímání UV spektra, kterého jsou mnohé ptačí druhy schopny (viz např. Johnsen et al. 1998), dále také kapitola IX.1.3). Důležité je také si uvědomit, že většina znaků založených na zbarvení nepředstavuje znak jeden, ale znaků několik:

například intenzitu pigmentace, velikost plochy barevného ornamentu, symetrii znaku, přičemž tyto dílčí znaky spolu mohou, ale nemusejí korelovat (např. Badyaev et al. 2001). Badyaev & Young (2004) přitom ukazují, že signální význam různých pigmentů může být dán už samotnou povahou fyziologického procesu tvorby pohlavního znaku z těchto pigmentů. Zatímco v případě karotenoidů je pro správnou tvorbu znaku potřeba získat v potravě dostatečné množství několika různých prekurzorů a tyto látky dále transportovat a metabolizovat, v případě melaninů k ničemu takovému nedochází, neboť melaniny jsou syntetizovány během aminokyselinového metabolismu z prekurzorů, které si organismus povětšinou sám vyrábí. Proto je na cestě ke karotenoidnímu ornamentu větší riziko nedokonalosti procesu v důsledku různých kondičních faktorů, a tedy jsou karotenoidní pohlavní znaky méně integrované než znaky melaninové. Důsledkem je tedy spíše kondiční závislost exprese karotenoidních ornamentů (přičemž pohlavní výběr může působit na nejrůznější dílčí složky procesu tvorby takového znaku) a naopak tendence melaninových znaků k signalizaci organismální integrity nebo geneticky podmíněné individuální identity. Badyaev & Duckworth (2003) také zjistili, že se zbarvení může během života měnit v závislosti na kontextu předchozích událostí, přičemž může v každé fázi života signalizovat něco jiného.

Potřeba je ještě v úvodu zmínit, že ne každý červený či žlutý pigment zbarvující peří ptáků musí být nutně karotenoidního původu. Jak zjistili McGraw et al. (2004), je například červenavé zbarvení na hrdle vlaštovek (*Hirundo rustica*) nebo na hrudi salašníka modrého (*Sialia sialis*) složeno převážně z eumelaninu a feomelaninu. Podobně ani ne každý karotenoidní ornament musí nutně korelovat s kondicí či imunitou jedince (Dale 2000). Jak je tedy patrné, při interpretaci výsledků imunokompetenčních testů z hlediska role deponovaných pigmentů v imunitě je dobré mít chemickou povahu a biologickou roli těchto pigmentů doloženu výsledky předchozího výzkumu v tomto směru.

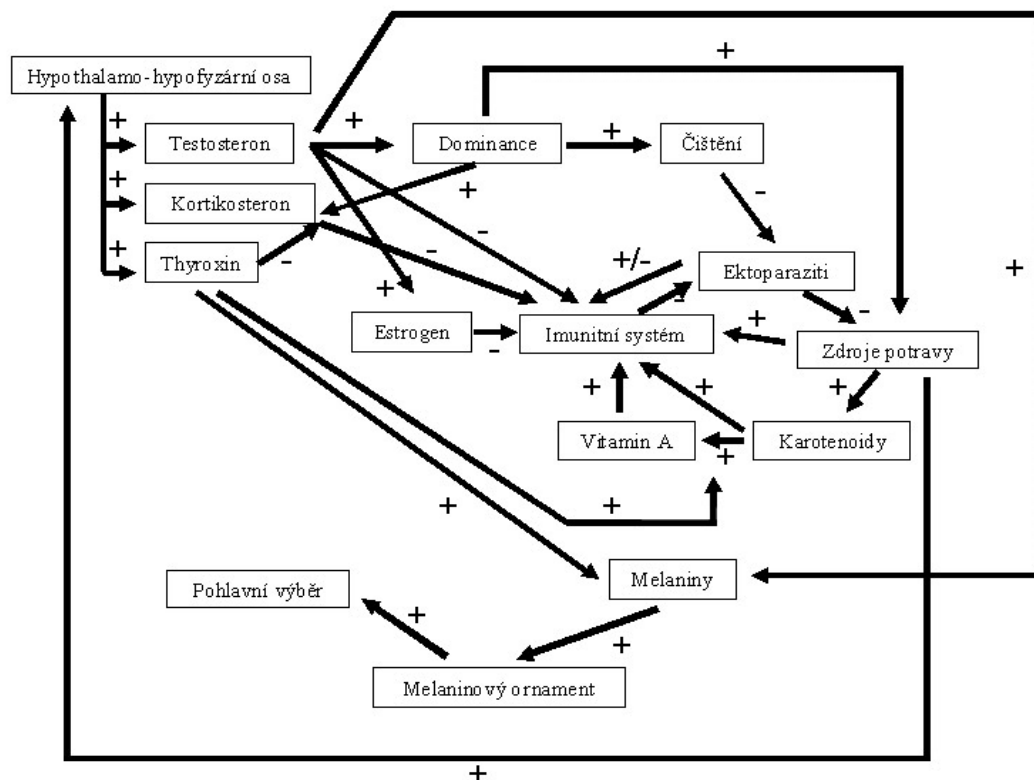
IX.1.1 Melaniny

Melaniny představují skupinu pigmentů velmi běžně zastoupenou v samčích ornamentech. Bylo zjištěno, že exprese většiny těchto znaků je zároveň testosteron-dependentní (např. Peters et al. 2000; Buchanan et al. 2003). Zdá se proto, že by melaninové zbarvení mnoha druhů mohlo spolehlivě indikovat sociální statut jedince projevující se mírou jeho dominance. Například Poiani et al. (2000), Evans et al. (2000) i McGraw et al. (2003a) zjistili, že velikost černé skvrny pod hrdlem samce vrabce domácího (*Passer domesticus*) pozitivně koreluje s agresivním chováním jedinců. V současné době ovšem není zcela jasné, zda může zároveň exprese melanoidního znaku signalizovat i nutriční stav nebo rezistenci vůči parazitům. Relativně velké množství studií nezjistilo u mnoha různých druhů žádný vztah mezi kondicí jedince, jeho

parazitací či přístupem k potravě a velikostí či intenzitou jeho melanoidního ornamentu (např. Hill & Brawner 1998; Gonzalez et al. 1999; McGraw & Hill 2000; McGraw et al. 2002, 2003a; Senar et al. 2003). Naproti tomu u některých jiných druhů byl význam malaninového znaku v signalizaci stupně parazitace prokázán. U ťuhýka obecného (*Lanius collurio*) bylo zjištěno, že velikost černé plochy na rýdovacích perech pozitivně koreluje s mírou parazitace (Votýpka et al. 2003). Právě tento znak patrně samice ťuhýka hodnotí, když jí samec během námluv vystavuje ocasní pera. Proč právě méně uloženého melaninu v perech signalizuje méně krevních parazitů, lze vysvětlit pomocí handicapu. Melanin je potřebný ke zpevnění per, takže jeho nedostatek může ovlivňovat letové vlastnosti ocasu při manévrování (např. při lovu kořisti či úniku před nepřáteli). Proto pouze kvalitní samci mohou riskovat zhoršení letových schopností. Naproti tomu skutečnost, že rozsah či intenzita melaninového zbarvení může také korelovat přímo s parametry imunitního systému, dokládají výsledky studie na samcích strnada cvrčivého (*Emberiza cirlus*), u kterých Figuerola et al. (1999) prokázali pozitivní korelaci mezi intenzitou tmavého zbarvení hrdla a množstvím lymfocytů v krvi. To by mohlo nasvědčovat pro vyšší parazitaci samců s intenzivněji zbarveným peřím na hrdle.

Patrně nejdůkladněji studovaným druhem exprimujícím melaninový ornament je ovšem vrabec domácí. Narozdíl od výše uvedeného příkladu ťuhýka je samicemi vrabce preferována větší plocha samčího, melaniny zbarveného peří. Proto se předpokládalo, že se jedná o důkaz existence imunokompetenčního handicapu, tak jak jsme jej popsali v kapitole V.2.1 (tedy že testosteron potřebný k expresi pohlavního znaku zároveň snižuje odolnost jedince vůči parazitárním nákazám). Tuto hypotézu by částečně potvrzovaly i výsledky Buchanana et al. (2003), kteří zjistili, že testosteron v krvi, který pozitivně koreluje s tvorbou černé skvrny na hrdle vrabce, je skutečně imunosupresivní pro některé složky imunity (zejm. humorální imunitu), a to především v hnízdním období. Obecná platnost tohoto tvrzení je ovšem otázkou. Například při studiu modropláštěníka nádherného (*Malurus cyaneus*) bylo zjištěno, že čím vyšší hladina testosteronu v krvi, tím větší pravděpodobnost primární humorální odpovědi na SRBC (Peters 2000; více také viz kapitola V.7.5). Ani v případě samotného vrabce není ale vliv testosteronu na imunitní systém jednoznačně imunosupresivní. Evans et al. (2000) zjistili, že z hlediska imunity je patrně významná určitá rovnováha v koncentraci testosteronu a kortikosteronu, přičemž testosteron pozitivně působí na expresi samčích pohlavních znaků a zároveň pravděpodobně koreluje s produkcí kortikosteronu, který pak může sám působit imunosupresivně. Vlastní účinek testosteronu na imunitní systém by navzdory obecné představě mohl být alespoň částečně pozitivní. To proto, že testosteron posilující dominanci jedince, by mohl podmiňovat lepší přístup k potravním zdrojům, a tedy i lepší tělesnou kondici. Existenci takového vztahu podporují i výsledky Gonzaleze et al. (1999), kteří zjistili, že kvalita potravy ovlivňuje funkceschopnost imunitního systému,

ačkoliv nemá přímý vliv na expresi melaninového ornamentu. Poiani et al. (2000) ve své studii na témže druhu, při které manipulovali množství testosteronu v tělech pokusných zvířat, navíc zjistili, že vyšší hladina testosteronu je spojena s vyšší mírou ektoparazitace, přičemž u kastrováných jedinců, kteří tvoří testosteron v minimálním množství, prevalence ektoparazitů po zákroku poklesla. Je zajímavé, že Poiani et al. (2000) narozdíl od předpokladů Evans et al. (2000) nezjistili přímou souvislost mezi změnami hladin testosteronu a kortikosteronu v krvi, ačkoliv prokázali, že jedinci s vyšší hladinou testosteronu mívají zároveň i vyšší hladinu kortikosteronu. Poiani et al. (2000) dále uvádějí, že s intenzitou parazitace souvisí i proporce času, který nakažení ptáci stráví čištěním. Ačkoliv tato aktivita vede k poklesu početnosti parazitů, není pravděpodobně zcela schopna kompenzovat imunosupresivní vliv kortikosteronu a testosteronu. V důsledku těchto zjištění, která nejsou plně v souladu s původní hypotézou imunokompetenčního handicapu, Poiani et al. (2000) navrhli nový *integrováný imunokompetenční model pohlavního výběru (Integrated immunocompetence model)*, který narozdíl od čistě handicapového modelu předpokládá, že (1) stejný hormon může být zároveň nebo postupně zapojen do mechanismů, které zvyšují šanci jedince na přežití, i do těch, které tuto šanci snižují (např. snižuje zastoupení určitého typu leukocytů, ale zároveň zvyšuje aktivitu jiných typů, přičemž jeho účinek může záviset na jeho koncentraci); (2) různé hormony ovlivňující expresi stejného znaku mohou mít různé účinky na imunitní systém; (3) bez ohledu na účinek hormonu na efekt přežívání by měl mít daný hormon pozitivní účinek na expresi samčího pohlavního znaku. Schéma na obr. IX.1.1/1 ukazuje souvislosti navrhované Poianim et al. (2000) modelem na příkladu vrabce domácího. Autoři tohoto modelu shrnuli velké množství dat podporujících správnost tohoto modelu. Zdá se přitom, že by se mohlo jednat o model platný i pro různé jiné (nejen melaninové) znaky. Jeho nespornou výhodou oproti modelům uvažujícím pouze jednotlivé hormony je skutečnost, že bere v úvahu současný regulační význam více různých hormonů. Právě interference vlivů různých hormonů, uplatňující se navíc v odlišných kondičních podmínkách, nám umožňuje vysvětlit Evansovo et al. (2000) pozorování, že testosteronu může mít na imunitní systém jak pozitivní tak i negativní vliv. Podobně se tak již nezdá být rozporuplný výsledek Saino et al. (1999), kteří na vlaštovkách zjistili, že hladina karotenoidů v krvi pozitivně koreluje s intenzitou červeného zbarvení hrdla u tohoto druhu, ačkoliv toto zbarvení není karotenoidního, ale melaninového původu (McGraw et al. 2004). Z hlediska exprese pohlavního znaku samců by proto mohl být významný trade-off mezi vybalancováním hladiny jednotlivých hormonů podle potřeb aktuální investice do reprodukce a potřeb udržování fyziologických funkcí organismu. Je ovšem potřeba zmínit, že toto vysvětlení není jediné, a zrovna tak by se mohla (spolu-)uplatňovat energetická nákladnost agresivních interakcí závislých na množství testosteronu, které by bránily slabým jedincům nastavit hladiny hormonů do pozice maximalizující aktuální reprodukci.



Obr. IX.1.1/1: Schéma regulace exprese pohlavního znaku podle (Poiani et al. 2000) na příkladu vrabce domácího. Doplněna byla šipka značící vliv ektoparazitů na imunitní systém, která má jak znaménko + (ektoparazité stimulují aktivitu imunitního systému, čímž mohou bránit či naopak podporovat invazi jiných parazitů) tak i - (ubírají energetické zdroje, popř. ničí komponenty imunitních mechanismů). Převzato s úpravami z Poiani et al. (2000).

IX.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou díky svým dvojným vazbám schopny absorbovat světelné záření (Vershinin 1999) a jeví se tak jako barevné pigmenty. Jelikož jsou tyto pigmenty u velké většiny karotenoidních ornamentů ukládány do per, budeme převážně uvažovat v dalším textu právě tyto znaky. V podstatě totéž platí ovšem i pro karotenoidy uložené v ramfotéce zobáku a jiných epidermálních derivátech (tam jsou jen změny v množství deponovaných molekul mnohem rychlejší). Jak již bylo zmíněno v kapitole V.9, je tato skupina látek přijímána ptáky výhradně v potravě. Zdá se, že ptáci přednostně akumulují xantofyly (např. lutein, zeaxanthin a kanthaxantin), zatímco vlastní karoten (jako třeba β -karoten) jsou shromažďovány pouze omezeně (Møller et al. 2000). Přijímané karotenoidy musí ptáci pro potřeby depozice do sexuálního ornamentu často dále metabolizovat (viz např. McGraw et al. 2003b), což může být pro ptáky energeticky náročné (Hill 2000). Různé druhy se přitom liší rychlostí absorpce karotenoidů i schopností je dále konvertovat v karotenoidy jiné (viz např. Møller

et al. 2000; Tella et al. 2004). Koncentrace karotenoidů v krevní plasmě jedince obvykle pozitivně koreluje s množstvím karotenoidů v elaborovaném znaku (Hill et al. 1994). Zdá se, že pro tvorbu znaku jsou podstatné pouze karotenoidy přijímané v době růstu nových per (Hill 1992) a že míra intenzity zbarvení samců je alespoň z části dědičná (Hill 1991).

Jak shrnuje Olson & Owens (1998) v „principu tří R“ mohou být karotenoidy pro nositele karotenoidního ornamentu jednak málo dostupné (*Rare*), jednak riskantní (*Risky* – z hlediska predace snad i toxicity – viz kapitola V.9), a přitom zároveň také metabolicky nezbytné (*Required*). Mimo to jsou také podle některých názorů (Hill 2002) drahé ve smyslu energetických nákladů potřebných pro udržení metabolického aparátu, který je schopen přeměňovat karotenoidy obsažené v potravě v karotenoidy, které lze deponovat do peří (pouze samozřejmě u druhů, které do peří ukládají jiné karotenoidy než ty přijímané v potravě). To z nich dělá skvělý nástroj pro čestnou signalizaci v pohlavním výběru. Skutečnost, že k tomu účelu skutečně slouží, naznačuje mimo jiné i Møllerova et al. (2000) revize většího počtu studií. Z ní vyplývá obecnost pravidla, že výrazněji zbarvení samci mají větší párovací úspěch než samci méně výrazní (viz též Hill 1990, 1991, avšak srovnej s Duckworth et al. 2003). Møller et al. (2000) zmiňují tři okruhy informací, které by mohly karotenoidy uložené v samčích pohlavních znacích samicím sdělovat (1-3).

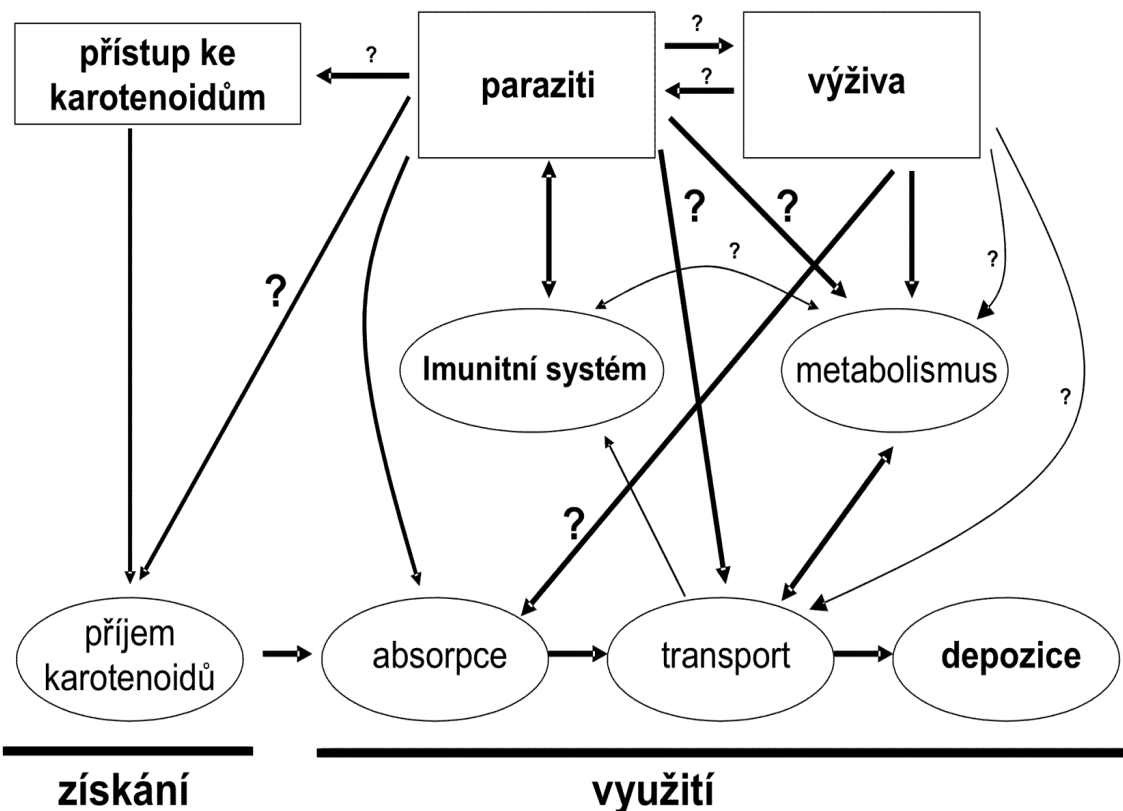
1) Karotenoidní znak samce by mohl vypovídat o jeho schopnosti získat dostatek potravy. Samec, který by získal více potravy než jiní samci, by spolu s touto potravou získal i proporcčně větší množství karotenoidů. Tato hypotéza by byla schopna vysvětlit, proč by samci s lépe vyvinutým ornamentem mohli být zároveň lepšími rodiči (viz např. Hill 1991; srovnej však s Duckworth et al. 2003). Jelikož je však známo, že různé zdroje potravy obsahují různé koncentrace různých karotenoidů, nezdá se být toto vysvětlení příliš pravděpodobné (Møller et al. 2000). Pokud bychom však přesto podobný vztah považovali za relevantní, měla by korelovat schopnost jedince vyvolat adekvátní imunitní reakci s jeho zbarvením, a to kvůli celkové kondiční závislosti funkčnosti imunitního systému (viz kapitola VIII.6). V takovém případě by si samice při své volbě ovšem nevybírala samce pro nastavení jeho imunitního systému, ale spíše pro jeho předpoklady zajistit mláďatům dostatek potravy v souladu s hypotézou „dobrého rodiče“ nebo pro jeho genetické předpoklady předávané mláďatům, které určují schopnost získat dostatek potravy („dobré geny“). Ani tato hypotéza, v poněkud modifikované podobě, se ovšem kupodivu přímo nevyklučuje s hypotézami týkajícími se výběru podle imunologických vlastností jedince, a to proto, že rezistence vůči parazitům spoluurčuje schopnost jedince získat dostatek potravy (parazitování ptáci přijímají potravu jen omezeně, viz kapitola VIII.7). Imunologické mechanismy by se tak mohly doplňkově podílet na procesech elaborace pohlavního znaku samců a mohly by proto hrát úlohu v pohlavním výběru. Například Senar et al. (2005) usuzují, že žlutý proužek v křídle samce čížka obecného (*Carduelis*

spinus) by mohl být spojen se schopností jedince získat potravu, což může nasvědčovat pro model „dobrého rodiče“.

2) Další možností je, že karotenoidy uložené do pohlavního znaku jsou limitovány dostatkem karotenoidů v potravě (nezávisle na jejím celkovém množství) a signalizují tak schopnost samce získat dostatek karotenoidy-bohaté potravy a/nebo tyto látky z potravy absorbovat. Např. Hill (1990, 1992) či (Hill et al. 2002) prokázali u volně žijících hýlů mexických (*Carpodacus mexicanus*), že obsah karotenoidů v potravě přijímané jedincem pozitivně koreluje se zbarvením jeho červeného ornamentálního peří. Podobně Blount et al. (2003b) u samců zebřičky zjistili, že množství karotenoidů v potravě ovlivňuje červenost zbarvení zobáku. Otázkou však je, proč je natolik výhodné signalizovat při pohlavním výběru právě tuto schopnost přijímat karotenoidy. Pokud pomíneme vysvětlení pomocí Fisherova runaway efektu (viz kapitola IV.1) a zaměříme se na biologickou úlohu karotenoidů v organismu (viz kapitola V.9), pak může samec tímto způsobem poskytovat samici informaci, že (i) je schopen mláďatům zajistit dostatek těchto látek potřebných v jejich rané ontogenezi; (ii) nese geny, které mu umožňují lépe získat a metabolizovat karotenoidy, což je výhodou pro obě pohlaví potomků z hlediska jejich vlastní reprodukce (srovnej s Blount et al. 2000); (iii) díky schopnosti získat dostatek karotenoidů v potravě jsou organismus samce a také organismy jeho potomků schopny lepší funkce imunitního systému (srovnej s bodem 3). Další zajímavou možností navrhuje Blount et al. (2001), kteří předpokládají, že by karotenoidní signál mohl informovat samici o schopnosti samce předat jí nepoškozené spermie v dostatečném množství, což je informace nesmírně důležitá z hlediska naplnění investic samice v dané sezóně. Při tom by se mohl uplatňovat stejný trade-off vzhledem k depozici karotenoidů jako v případě jejich směřování do imunitního systému.

3) Mnoho prací publikovaných do dnešní doby však ukazuje, že hlavní funkcí karotenoidních ornamentů by mohla být signalizace zdravotního stavu jedince (viz např. přehled v Møller et al. 2000). Schéma na obrázku IX.1.2/1 zobrazuje proces elaborace karotenoidního znaku a základní činitele, kteří tento proces mohou ovlivňovat. Jak je patrné, ústřední úloha je v tomto schématu připisována působení parazitů. Existuje velké množství prací, které prokázaly korelaci mezi parazitací a mírou exprese samčího pohlavního znaku. Například Figuerola et al. (2003) zjistili pomocí pokusných manipulací intenzity parazitace u zvonohlíka zahradního (*Serinus serinus*), že abundance ektoparazitů má vliv na jas a sytost nově rostoucího žlutého peří. Podobně i Saks (2004) uvádí pro zvonka zeleného (*Carduelis chloris*), že jedinci parazitovaní kokcidiemi jsou schopni deponovat méně karotenoidů do ornamentálního peří. Hõrak et al. (2001) zjistili u sýkor koňader (*Parus major*), že mladí jedinci, pokud nejsou parazitováni, mají vyšší hodnoty odstínu karotenoidního zbarvení než jedinci parazitovaní, zatímco u starších ptáků je situace opačná. Hõrak et al. (2001) vysvětlují

tuto skutečnost jako důkaz, že starší infikovaní ptáci o nižším odstínu zbarvení jsou ti, kteří prokázali svou rezistenci vůči parazitům, a jsou to tedy jedinci kvalitnější. Pokud přijmeme toto vysvětlení, musíme se ovšem ptát, proč poklesl odstín u těch ptáků, kteří jako starší parazitováni nejsou a proč by měli být tito ptáci méně kvalitní a méně přežívat než ptáci parazitovaní, což jsou skutečnosti, kterými se již Hůrak et al. (2001) nezabývají. Existenci negativní korelace mezi množstvím parazitů a zbarvením potvrdily také studie na hýlovi mexickém (Thompson et al. 1997; Brawner et al. 2000). Jelikož hematologické poměry jsou také ukazatelem probíhající parazitární infekce, můžeme podobně interpretovat i výsledky Figuerola et al. (1999), kteří zjistili u strnada cvrčivého (*Emberiza cirlus*) pozitivní korelaci mezi intenzitou karotenoidního zbarvení a H/L poměrem, pozitivní korelaci mezi velikostí žlutě zbarveného ornamentu a relativní proporcí heterofilních granulocytů a naopak negativní korelaci mezi velikostí ornamentu a absolutním počtem leukocytů.



Obr. IX.1.2/1: Schéma procesu tvorby karotenoidního znaku samců. Přístup k potravě spolu s genetickou složkou (na schématu neuvedena) určuje schopnost jedince přijímat v potravě dostatek karotenoidů. Genetická složka ovlivňuje také nastavení imunitního systému a metabolismus jedince. Na všechny tyto složky působí negativně parazitární infekce (oslabují příjem potravy a metabolismus jedince, vyčerpávají aktivovaný imunitní systém, odebírají látky transportované tkáněmi). Aktivovaný imunitní systém odčerpává karotenoidy, které tak nemohou být deponovány do pohlavního znaku. Imunitní systém je ovšem schopen parazity potlačovat, a tak mírnit jejich negativní vliv. Proto úspěšnost jeho aktivity pozitivně koreluje s množstvím pigmentů uložených do ornamentu. Karotenoidní zbarvení je tedy čestným signálem rezistence jedince vůči chorobám a jeho zdravotního stavu. S úpravami převzato z Hill (2002).

Na schématu na obrázku IX.1.2/1 jsou naznačeny některé předpokládané cesty zprostředkovávající negativní korelaci mezi parazitací a ukládáním karotenoidů do pohlavního znaku. Zdá se při tom, že aktivita imunitního systému by v těchto procesech mohla mít klíčový význam. V prvé řadě je třeba si uvědomit, že parazitovaný jedinec ztrácí významným způsobem na kondici, což ovlivňuje jak jeho přístup k potravě, tak i metabolismus a imunitní systém. Právě kondice jedince je proto často považována za klíčový činitel v expresi pohlavních znaků (viz např. Hill 2002). Badyaev & Duckworth (2003) například uvádějí, že u mladších ptáků hýla mexického je zbarvení kondičně závislé. Zajímavé ovšem je, že u starších ptáků podle těchto autorů kondiční závislost zcela neplatí a zbarvení může být ve své intenzitě ovlivněno tím, zda samec hnízdil či nehnízdil v předchozím roce. V případě, že se mu totiž v předchozím roce nepodařilo zahnízdit, investuje do ornamentace více než ostatní pravidelně hnízdící samci. I přes tento poněkud komplikující prvek, který dokazuje, že tvorba ornamentu je součástí velice komplexní reprodukční strategie, je zřejmé, že kondice a přímé působení parazita určují omezenou schopnost parazitovaného jedince karotenoidy získat nebo je metabolizovat (viz kapitola VIII.7). Takto lze vysvětlit již dlouhou dobu známý fakt, že střevní parazitární infekce mohou snižovat koncentraci karotenoidů v krvi (viz např. Ruff et al. 1974) a snad také množství nepřímých důkazů negativního vlivu parazitů na koncentraci karotenoidů v krvi, které jsou založeny na výzkumu imunologických parametrů signalizujících probíhající parazitózu (např. Saino et al. 1999). Současně by ovšem mohl mít infikovaný jedinec nedostatek karotenoidů také proto, že jejich momentálně omezené množství musí ze značné části alokovat do imunitních procesů (viz kapitola V.9). Proto si nemůže dovolit investovat tento životně důležitý a přitom omezený zdroj do sexuální ornamentace. Tímto způsobem lze vysvětlit důkazy o tom, že barvu samčího ornamentu ovlivňují i parazité, kteří nemohou mít žádný přímý vliv na absorpci, metabolizaci či depozici karotenoidů (viz např. výsledky Hilla et al. 2004). I kdyby ovšem přese vše výše uvedené slabý jedinec přece jen expimoval rozvinutý pohlavní znak, který by neodpovídal jeho současné kondici, je pravděpodobné, že by jej to vyčerpalo natolik, že by se stal snáze obětí predátorů (v případě karotenoidů je obvykle pestřeji zbarvený jedinec nápadnější, tedy v souladu se Zahaviho teorií handicapu, viz Møller et al. 2000; Møller & Erritzoe 2000) nebo parazitů. Proto může pohlavní znak sloužit také jako čestný indikátor rezistence jedince vůči parazitárním chorobám. Získána byla v této souvislosti mnohá data dokládající vztah funkceschopnosti určitých složek imunitního systému a zbarvení. Například Saks et al. (2003) zjistili, že intenzita žlutého zbarvení samců zvonka zeleného (*Carduelis chloris*) koreluje pozitivně s reaktivitou jeho humorální imunity a odráží i celkový zdravotní stav zvířete (negativně koreluje s H/L poměrem v krvi). Podobné výsledky byly získány také na zebřičce (*Taenopygia guttata*, McGraw & Ardia 2003; Alonso-Alvarez et al. 2004a) a kosu černém (*Turdus merula*, Faivre et al. 2003a, 2003b). Dufva & Allander (1995) zjistili, že intenzita žlutého zbarvení samců sýkory koňadry (*Parus*

major) v hnízdní sezóně pozitivně koreluje s H/L poměrem a s absolutními počty heterofilů v krvi. Tuto skutečnost, která je přesně opačná než výsledky získané Saksem et al. (2003), vysvětlují mimo jiné jako zvýšenou schopnost kvalitnějších samců vyvolat imunitní odpověď, což je ovšem vysvětlení spíše neodůvodněné. Zároveň nezjistili žádnou korelaci mezi parazitací a zbarvením. To není nikterak překvapivé, neboť patrně nevyšetřovali druh parazita, který významně ovlivňuje kondici jedince.

Existence výše nastíněného trade-off v alokaci karotenoidů však byla zpochybněna. Například Hill (1999, 2002) předkládá silnou argumentaci proti relevanci limitace exprese pohlavních znaků karotenoidy spotřebovanými v probíhajících imunitních procesech. Při tom se opírá o tři údajné rozpory. (i) Narozdíl od savců cirkuluje v krvi mnohých ptáků relativně mnohem více karotenoidů. S tím také souvisí skutečnost, že zatímco u savců mají velmi vysoké dávky karotenoidů podávané v potravě pro organismus závažný škodlivý efekt, u ptáků nic podobného známo není. Podle Hilla proto není nepravděpodobné, že by na tak vysokou hladinu karotenoidů mohla mít jejich spotřeba během imunitní reakce natolik významný vliv, aby byla ovlivněna exprese pohlavního znaku. (ii) Samice mají relativně nižší hladinu krevních karotenoidů než samci. Pokud by byly karotenoidy limitujícím faktorem funkce imunity, snažila by se obě pohlaví stejně jejich obsah v organismu maximalizovat, což samice nedělají. (iii) Některé druhy, které ukládají karotenoidy do peří mají relativně vyšší hladinu karotenoidů v krvi než blízkce příbuzné druhy, které karotenoidní zbarvení nevytvářejí. Stejně jako v předchozím bodě by při tom bylo možné předpokládat, že se všechny druhy budou snažit přijímat co nejvíce karotenoidů z okolí. Jinými slovy Hill říká, že karotenoidy nejsou pro ptáky omezeným zdrojem, což by znamenalo, že neexistuje přímý vztah mezi stavem imunitního systému a expresí pohlavního znaku. Veškeré interakce by se tedy odehrávaly nepřímo přes kondici jedince modulovanou složením přijímané potravy a parazitární zátěží. Tyto argumenty nelze, jak patrně, bez vysvětlení opomenout.

V první řadě je ovšem třeba si uvědomit, že pro obsah karotenoidů v organismu, stejně jako pro většinu mikronutričních zdrojů, existuje patrně určité optimum (viz kapitola V.9 nebo též Alonso-Alvarez et al. 2004a, kteří zjistili u zebřičky horní plató v příjmu karotenoidů). Organismus se proto nesnaží udržovat jejich hladinu co nejvyšší, ale spíše stabilní na určité potřebné hodnotě. Příjem karotenoidů proto maximalizují pouze jedinci, kteří jich mají aktuálně velkou spotřebu (tedy například samci v době přepeřování, avšak nikoliv samice). Otázkou tedy není, proč mají některé druhy či určití jedinci v krvi více karotenoidů než jiní, ale to, jak moc mohou okolní faktory tuto rovnováhu narušit. Značný rozpor s předpokladem Hillovy polemiky, že imunologické děje nemohou hladinu karotenoidů v krvi přímo ovlivnit, představují výsledky pokusů na zebřičkách, kterým bylo podáno dodatečné množství karotenoidů ve vodě. Tato procedura měla za výsledek zvýšení nejen exprese pohlavního znaku, ale také schopnosti

vyvolat imunitní odpověď (McGraw & Ardia 2003; Blount et al. 2003b), a to i u samic (McGraw & Ardia 2005). Z toho tedy vyplývá, že i přesto, že organismus pokusných ptáků obsahoval vysoké množství karotenoidů, existoval po aktivaci imunitního systému vzhledem k akutní imunitní odpovědi jejich nedostatek. McGraw & Ardia (2003) ve svém pokusu zjistili, že u samců zebříček, kterým byla přidána směs luteinu a zeaxantinu do vody, došlo ke zvýšení hladiny krevních karotenoidů, zjasnění barvy zobáku a zvýšení buněčné i humorální imunitní reakce. Zároveň prokázali, že T buněčná reaktivita koreluje se změnami koncentrace karotenoidů v krvi i se zbarvením zobáku. Pro humorální imunitu takováto korelace zjištěna nebyla. Z toho tedy vyplývá, že karotenoidní signál může indikovat zcela určité parametry imunity. Výsledky McGraw & Ardia (2003) také dokládají, že experimentální stimulace imunitního systému vedla k poklesu hladiny karotenoidů v krvi, a to i přes pokusně zvýšený příjem karotenoidů, což opět potvrzuje mylnost Hillova předpokladu. Prakticky totéž zjistili také Alonso-Alvarez et al. (2004a), kteří prokázali, že aplikace LPS vyvolávající imunitní odpověď snižuje zbarvení zobáku a že zároveň ptáci s nejvyšší hladinou krevních karotenoidů jsou nejrezistentnější vůči oxidativnímu stresu. Další důkaz, že imunitní reakce bez vedlejších účinků nemoci (reakce na SRBC) způsobuje sama o sobě významný pokles koncentrace karotenoidů v krvi, předkládá u kachny Peters et al. (2004a). Faivre et al. (2003a) zjistili, že aktivace imunitního systému pomocí nepatogenního SRBC má za následek rychlý pokles karotenoidního zbarvení zobáku u kosa černého a že zároveň pravděpodobnost, že se barva zobáku změní v méně intenzivní, významně koreluje s intenzitou produkce anti-SRBC protilátek. Faivre et al. (2003b) pak uvádějí, že samci s intenzivněji zbarvenými zobáky vykazovali nižší humorální odpověď na SRBC, zatímco jejich T buněčná imunita měřená pomocí PHA-kožního testu byla vyšší než u samců s méně vybarveným zobákem. Autoři tento rozdíl vysvětlují rozdílnou alokací zdrojů v důsledku trade-off mezi reprodukčními náklady a náklady na tyto dvě různé složky imunity. Poněkud problematický je ovšem velmi nízký počet vyšetřovaných jedinců ($n=15$) a také samotné použití SRBC (viz kapitola VI.3.2). Všechny tyto výsledky tak dokazují, že pravděpodobně skutečně existuje trade-off mezi alokací karotenoidů z krve do exprese pohlavního znaku a do imunitního systému. Tak by opravdu mohlo karotenoidní zbarvení indikovat rezistenci jedince vůči chorobám a mohlo by mít zásadní význam v sexuální selekci.

K bodu (ii) Hillových námitek ještě uvedme, že samci a samice mohou mít skutečně v krvi rozdílnou hladinu karotenoidů (viz např. McGraw & Ardia 2005; avšak srovnej s Alonso-Alvarez et al. 2004a). Nejedná se ovšem o nic překvapivého. McGraw & Ardia (2005) navrhují, že by imunostimulační účinek karotenoidů mohl u samců kompenzovat vliv působení imunosupresivního testosteronu. Jako dodatečné vysvětlení můžeme považovat také existenci různých strategií využití karotenoidů u samců a u samic, které vyplývají z odlišné míry

a načasování nákladů obou pohlaví (Møller et al. 2000). Zatímco samci ukládají karotenoidy především v době přepečování do výrazných ornamentů, samice je investují v době reprodukce do vajec (Blount et al. 2000). Lze proto předpokládat, že k poklesům či naopak zvýšením hladiny karotenoidů v krvi bude u samců a samic docházet v různou dobu.

Vzhledem k výše uvedenému se tedy jeví, že není vhodné (alespoň do hlubšího prozkoumání některých otázek) zamítat hypotézu o existenci imunologické limitaci depozice karotenoidů. Spolu s hypotézou o nepřímém vztahu příjmu karotenoidů a imunity přes kondici a hypotézou o přímých vlivech parazitární infekce tvoří hypotéza imunologického trade-off provázaný komplex, který vysvětluje všechny doposud známé aspekty limitace exprese pohlavního znaku. Je zřejmé, že u zdravých jedinců se omezení dostatku karotenoidů v důsledku imunologického trade-off patrně neprojeví a že organismus samce bude v době přepečování maximalizovat množství karotenoidů v krvi a dalších tkáních, zatímco po zbytek roku se bude snažit hladinu karotenoidů optimalizovat (srovnej s výzkumy na zdravých lidech, které nepotvrdily pozitivní účinek zvýšené denní dávky karotenoidů; Hughes 2001). Nutnost omezit depozici karotenoidů do ornamentu se tak může projevit až u jedince nemocného, který má zároveň (v souladu s Hillovými předpoklady) omezený přístup k potravním zdrojům.

Zajímavou možností, která poněkud vybočuje z výše nastíněného schématu vztahu imunitního systému a exprese pohlavních znaků, je také uplatnění Zahaviho teorie v samčí pohlavní signalizaci. Tam, kde existuje nedostatek určitých minoritních složek potravy, např. vitamínu C, se může projevit toxická povaha karotenoidů (Hartley & Kennedy 2004; viz též Olson & Owens 1998). Není těžké si představit jedince, u kterého se snížila zásoba antioxidantů (vitamínu C, E apod.) v důsledku působení uvolňovaných radikálů produkovaných svalovou činností během migrace anebo oxidativním vzplanutím během intenzivní imunitní odpovědi. V tom případě by podle Hartleyho & Kennedyho (2004) z karotenoidů přítomných v nadbytku vznikaly pod atakem volných radikálů toxické sloučeniny (viz též kapitola V.9), které by poškozovaly organismus. Proto by bylo pro jedince výhodné, adaptivně snížit obsah karotenoidů ve svých tkáních a zabránit tak produkci takovýchto toxických sloučenin. Existenci podobných procesů by mohly potvrzovat například výsledky Alonso-Alvarez et al. (2004a), kteří u zebřičky zjistili, že hladina karotenoidů v krevní plasmě poklesla po pokusné stimulaci imunitního systému nezávisle na dostupnosti karotenoidů v potravě, což naznačuje možnost, že tělo karotenoidy odmítá, snad v důsledku nedostatku jiných látek. Množství karotenoidů manifestovaných v ornamentálním peří samců by tedy nemuselo signalizovat vlastní přítomnost karotenoidů, ale spíše přítomnost jiných biologicky významných látek. Jelikož nemáme prozatím jasnou představu o fyziologických procesech, které imunitní reakce v tělech volně žijících ptáků provázejí, je těžké posoudit, nakolik by se podobné procesy mohly skutečně při expresi pohlavního znaku uplatňovat. I Hartley & Kennedy (2004) sami

připouštějí, že významnou roli v intersexuální signalizaci může hrát i vlastní imunoregulační význam karotenoidů. Je proto téměř jisté, že rozřešení této problematiky nám umožní teprve detailnější pohled na působení environmentálních vlivů na imunitní systém a jejich souvislost s fyziologickými změnami příjmu a metabolizace karotenoidů ptačím organismem ve vztahu k jejich depozici do ornamentálních per.

IX.1.3 UV reflektance

Ptáci patří mezi živočichy, kteří jsou schopni vnímat UV záření. UV reflektance byla zjištěna u nejrůznějších znaků, mezi něž patří i žluté zbarvení čížka žlutého (*Carduelis tristis*, MacDougall & Montgomerie 2003), tmavomodré zbarvení lemčíka hedvábného (*Ptilonorhynchus violaceus*, Doucet & Montgomerie 2003) hřebínku bělokura rousného (*Lagopus lagopus*, Mougeot et al. 2005) či žluté zbarvení zobáků samců kachen (*Anas platyrhynchos*, Peters et al. 2004a). U některých druhů přitom patrně slouží tato vlastnost k signalizaci parazitární rezistence. Například Mougeot et al. (2005) prokázali, že UV reflektance červeného hřebínku nad okem samců i samic bělokura rousného koreluje s intenzitou jejich parazitace. U lemčíka hedvábného podobně Doucet & Montgomerie (2003) zjistili, že UV složka modravého zbarvení indikuje míru parazitace krevními parazity. Zajímavé přitom je, že toto zbarvení koreluje i s kvalitou samcova loubí, která sama predikuje samcovu ektoparazitaci.

Doposud jedinými pracemi, které zjišťovaly korelace UV reflektance a imunokompetence jsou studie Peterse et al. (2004a, 2004b) na kachnách. Ti zjistili, že čím více je jedinec schopen vyprodukovat protilátek po experimentální stimulaci SRBC, tím větší je pokles koncentrace karotenoidů v krvi, přičemž změna koncentrace karotenoidů odráží změny v UV reflektanci (čím menší pokles karotenoidů, tím větší UV reflektance.). Změny reflektance UV nesouvisely se změnami hladiny testosteronu a tedy se zdá, že je tento znak patrně testosteron-independentní. Mimo to Peters et al. (2004b) uvádějí, že reflektance v UV spektru korelovala negativně s aktivitou spermií v ejakulátech samců. Tímto způsobem by tedy mohla samice kachny tedy odhadnout i přímé výhody pramenící z vyšší pravděpodobnosti oplození vyvoleným samcem a zároveň i nižší pravděpodobnosti nákazy pohlavně přenosnými parazity (srovnej s Blount et al. (2001).

IX.1.4 Strukturní zbarvení

Významu strukturního zbarvení u ptáků bylo v ekologických studiích zabývajících se pohlavním výběrem věnováno ve srovnání s pigmentózním zbarvením jen skutečně velmi málo pozornosti. Důvodem může být skutečnost, že alespoň u některých druhů (např. vlaštovka obecná, *Hirundo rustica*, viz Perrier et al. 2002) se zdá, že strukturní zbarvení nemá žádný signální význam a nepodléhá pohlavnímu výběru. Některé studie (např. McGraw et al. 2002) ovšem u jiných druhů (např. u vlhovce hnědohlavého, *Molothrus ater*) naznačují, že by strukturní zbarvení mohlo odrážet potravní možnosti jedince v době pelichání. Mohlo by tak patrně mít podobný význam jako karotenoidní ornamenty, a tedy zároveň jiný signální význam než zbarvení melaninové, které spíše vypovídá o kompetitivních schopnostech samce. Pokud by tak bylo strukturní zbarvení indikátorem kondice, podobně jako zbarvení karotenoidní, mohlo by také vyjadřovat kondičně-podmíněnou schopnost jedince rozvinout adekvátní imunitní odpověď, a tak zabránit závažnější parazitární chorobě. Podobná souvislost však prozatím nebyla zkoumána.

IX.1 Morfologické struktury

IX.2.1 Hřebínky a laloky

Velikost a barva hřebínku u kura bankivského (*Gallus gallus*) je znakem, který podobně jako barva oční duhovky odráží kondici, zdravotní stav a míru dominance jedince (Zuk et al. 1995; Parker & Ligon 2002), přičemž oba tyto znaky jsou patrně testosteron-dependentní a jsou samicemi při výběru preferovány mnohem více než například zbarvení některých částí opeření, které může korelovat například s hodnotami hematokritu nebo množstvím eosinofilních granulocytů v krvi (shrnuto v Zuk 1996). Podle Parkera et al. (2002) odráží zvýšená hladina kortikosteronu a snížená hladina testosteronu sociální stres, ale ani hladina testosteronu ani kortikosteronu nekoreluje s velikostí hřebínku u izolovaných ptáků. Zuk et al. (1995) zjistili, že samci s většími hřebínky, kteří měli zároveň i vyšší hladinu testosteronu, měli v krvi méně lymfocytů než samci s hřebínky menšími. Zuk & Johnsen (1998) dále dokládají, že samci s většími hřebínky jsou schopni intenzivnější PHA-kožní reakce, což nám napovídá, že by mohli mít lépe vyvinutou T buněčnou složku imunity. Zároveň ale zjistili, že množství jednotlivých leukocytárních typů v krvi může být proměnlivé v čase – samci s většími hřebínky měli před hnízdní sezónou v krvi proporčně více lymfocytů než samci s menšími hřebínky, avšak během hnízdní sezóny byla situace opačná. Podobně Mougeot et al. (2004) zjistili, že velikost nadočního červeného hřebínku u bělokura rousného (*Lagopus lagopus*) je rovněž kondičně závislým, testosteron-dependentním znakem. Experimentálně navýšená hladina testosteronu u jedinců tohoto druhu velikost hřebínku významně zvyšuje,

ale zároveň snižuje funkceschopnost T buněčné imunity a celkovou kondici zvířete. Mimo to se tyto změny projeví i vyšší kokcidiální infekcí. Dále bylo u tohoto druhu zjištěno Mougeot & Redpath (2004), že velikost hřebínku nekoreluje přímo s intenzitou probíhající helmintózy *Trichostrongylus tenis*, ale koreluje jak s kondicí jedince tak i s jeho schopností reagovat na subkutánně aplikovaný PHA.

Ze všech výše uvedených výsledků tedy vyplývá, že samci s většími hřebínky jsou jednak pod vlivem testosteronu agresivnější, čímž zvyšují svou dominanci, u volně žijících populací i velikost svého teritoria, a tak snad i reprodukční úspěch a jednak také v souladu s hypotézou imunokompetenčního handicapu signalizují samicím svou lepší kondici a schopnost vyrovnat se i přes vyšší imunosupresivní vliv testosteronu s tlakem parazitů. Negativní vliv testosteronu na imunitu by mohl být v těchto případech zprostředkován energetickou náročností aktivity udržující dominantní postavení mezi ostatními samci, přičemž tato aktivita zvyšuje také stres a s ním i hladinu imunosupresivního kortikosteronu. Imunosuprese by také mohla být adaptivní odpovědí na trade-off mezi investicí do reprodukce a údržby vlastního organismu.

U krocana (*Meleagris gallopavo*) je délka laloku samicemi preferovaným znakem, který indikuje dominanci i parazitaci některými patogeny (Buchholz et al. 2004). Přitom bylo ovšem zjištěno, že délka laloku může naznačovat relativní složení MHC genotypu samce. Pokud je tomu skutečně tak, mohly by samice na základě tohoto znaku přímo vybírat „dobré geny“ pro své potomstvo. Bohužel tento a ani ostatní pohlavní znaky u tohoto druhu (délka ostruh a vlasovitá štětka peří na hrudi, Badyaev et al. 1998) nebyly do dnešní doby příliš podrobně studovány a ačkoliv se soudí, že by mohly indikovat viabilitu a snad i imunitní parametry jedince, bude patrně v tomto případě zapotřebí další výzkum.

Naproti výše uvedenému Ohlsson et al. (2002) nezjistili žádný obdobný vztah mezi barvou a velikostí laloků na hlavě bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) a buněčnou ani humorální imunitou u samců tohoto druhu. Tento znak má patrně spíše souvislost s nutričním stresem v raných fázích života (viz též kapitola IX.2.3).

IX.2.2 Ocasní pera

Nápadným samčím pohlavním znakem morfologické povahy je i délka nebo tvar ocasních per. Asi nejznámějším příkladem v tomto směru jsou „møllerovská“ ocasní pera vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*). Význam tohoto pohlavního znaku pro pohlavní výběr u tohoto druhu ukazují například studie využívající experimentální manipulace délky těchto per, kdy jejich prodloužení vedlo ke změnám rychlosti i úspěšnosti párování samců, včetně úspěšnosti v mimopárových kopulacích (viz např. Møller et al. 1998). Jak bylo zjištěno (Saino et al. 1995, 1999, 2002c, 2003c; Saino & Møller 1996), představuje tento znak čestný indikátor imunokompetence svého hostitele. Saino & Møller (1996) ukázali, že by mohla být v tomto

případě signalizace založena na teorii handicapu. Délka ocasních per u samců vlaštovek leží mimo optimum podporované přírodním výběrem a udržována je sexuální selekcí (důkazem toho může být například skutečnost, že mladí ptáci a samice nemají ocasní pera tak dlouhá jako dospělí samci (Møller et al. 1998). Møller et al. (1998) uvádějí v souvislosti s handicapem jednak náklady delších ocasních per na alokaci zdrojů do imunity a jednak zvýšené riziko predace a také snížení schopnosti získat dostatek potravy, obojí v důsledku zhoršení letových schopností. Možný je také handicap vyvstávající ze zvýšené metabolické aktivity.

Existují dukazy pro to, že existuje také vztah mezi délkou ocasních per a aktivitou imunitního systému. Saino & Møller (1996) prokázali, že schopnost tvořit protilátky je značně omezena v důsledku pokusného prodloužení ocasních per. Délka těchto per také pozitivně koreluje se schopností vyrovnat se s experimentálním navýšením této zátěže, což vypovídá o vyšší kvalitě samců, kteří měli už před manipulací ocasní pera dlouhá. Vskutku, samci s delšími ocasními pery jsou také schopni odpovědět intenzivnější reakcí na intradermální aplikaci PHA než krátkoocasí samci, což indikuje jejich lepší schopnost mobilizovat T-dependentní složky imunity (Saino et al. 2002c). Obdobné jsou i výsledky pro korelaci délky ocasních per a primární humorální odpovědi (Saino et al. 2003c). Není tedy s podivem, že u samců negativně koreluje délka ocasu s intenzitou parazitace (Saino et al. 1995). Právě parazitace je patrně z hlediska reprodukční úspěšnosti samce velmi důležitá. Bylo zjištěno, že pokusná manipulace hnízdních parazitů způsobí u vlaštovek nejen změny hnízdní úspěšnosti v dané sezóně, ale také ovlivní pelichání jedinců na zimovištích v Africe (více parazitovaným samcům narostou kratší ocasní pera) a ovlivněno je také datum přiletu v následující sezóně; tedy samci s kratšími ocasy přilétají později v důsledku své horší kondice a horších letových vlastností přepeřených per. Toto zpoždění má pak zcela zásadní vliv na reprodukční úspěch v této sezóně (Møller et al. 2004). Proto délka ocasních per indikuje spolehlivě reprodukční potenciál samce. Z výše uvedeného je tedy patrné, že vztah mezi délkou ocasních per a imunokompetencí by mohl být zprostředkován přes celkovou kondici jedince. Tak je možné vysvětlit i korelaci mezi funkceschopností samcovy buněčné imunity a datem jeho přiletu zjištěnou (Møller et al. 2004). Saino et al. (1999) také uvádějí, že délka ocasních per pozitivně koreluje s koncentrací karotenoidů v krevní plasmě (o významu karotenoidů v imunitním systému viz kapitola V.9). Jelikož navíc bylo zároveň zjištěno, že koncentrace karotenoidů v krvi negativně koreluje s množstvím protilátek a granulocytů, které indikují probíhající parazitární chorobu, zdá se, že je tato skutečnost stejně jako vlastní exprese znaku kondičně podmíněna.

Rovnováha celého tohoto mechanismu samčí čestné signalizace je patrně založena na citlivé hormonální regulaci. Bylo prokázáno, že délka ocasních per pozitivně koreluje s hladinou testosteronu v krvi (viz např. Møller et al. 1998). Výsledky Saino et al. (1995) navíc ukazují, že samci, jimž byla uměle zvýšena hladina testosteronu, se s menší pravděpodobností

dožili následující hnízdní sezóny. Mezi těmi, kteří se jí ovšem dožili, bylo větší procento samců s původně delšími ocasy, což poskytuje další důkaz o signalizaci kvality samce. Zároveň bylo zjištěno, že délka ocasu negativně korelovala se změnami v absolutním i relativním počtu eosinofilů v krvi samců, kterým byla implantována dávka testosteronu. Kvalitní samci tedy platí méně za vysoké hladiny testosteronu než samci méně kvalitní. Zároveň Saino et al. (2002c) detekovali nižší hladinu kortikosteronu v krvi samců s delšími pery.

Podobně jako ocasní pera vlaštovek, i prodloužené nadocasní krovky páva korunkatého (*Pavo cristatus*), které jsou u tohoto druhu pohlavním znakem, odrážejí patrně kondici samce (Møller & Petrie 2002). Bylo také zjištěno, že délka pavího ocasu pozitivně koreluje s PHA-kožní reakcí a H/L poměrem a negativně koreluje s primární humorální reakcí na SRBC. Zároveň se zdá, že by se velikost jednotlivých ok mohla nepřímo úměrně vztahovat k T buněčné imunitě. Otázkou však zůstává, zda samice pávů skutečně při svém výběru hodnotí právě tyto znaky.

IX.2.3 Ostruhy

Dnes již klasickou prací je studie von Schantz et al. (1996), která zjistila vztah délky ostruh bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) a MHC genotypem (viz též část VII). von Schantz et al. (1996) zjistili, že u jednoletých samců významně koreluje délka ostruh s genotypovou příslušností jejich MHC. Zdá se, že MHC genotyp zároveň predikuje přežití samce a že důležitější než heterozygotnost v MHC je přitom přítomnost určitého konkrétního MHC haplotypu. Naproti tomu u víceletých samců bylo zjištěno, že délka ostruh je kondičně závislým znakem (von Schantz et al. 1997). Zajímavé je také zjištění Ohlssona et al. (2002), kteří experimentálně manipulovali proteinovou bohatost potravy samců během raných fází života. Samcům krmeným na proteiny bohatší potravou narostly větší a výrazněji červeně zbarvené laloky na hlavě než samcům, kteří dostávali jen omezené množství proteinů v potravě, ale na délku ostruh neměl tento nutriční rozdíl vliv. Zároveň ale délka ostruh korelovala s intenzitou imunitní reakce vyšetřované PHA-kožním testem, zatímco velikost ani barva laloků neměla žádnou souvislost s imunitou a nebyl prokázán ani vliv rané diety na intenzitu imunitních reakcí. Je přitom ovšem zřejmé, že MHC genotyp nemůže (už z principu interakce, viz kapitola V.3) přímo ovlivňovat intenzitu reakce na PHA, takže zjištěná korelace vypovídá spíše o kondiční závislosti této T buněčné imunitní reakce. Ze všech výše uvedených poznatků se zdá, že samice, která se při pohlavním výběru rozhoduje podle délky ostruh, si může mezi jednoletými samci vybírat konkrétní MHC genotyp (nepreferuje jednoznačně samce s nejdelšími ostruhami, von Schantz et al. 1997), zatímco mezi staršími samci podle stejného znaku volí nejzdatnějšího samce (tedy toho, který má nejdelší ostruhy

a je patrně v nejlepší kondici), přičemž MHC genotyp má pravděpodobně stále klíčový vliv na zdatnost samce, neboť prostřednictvím dispozice pro určitou antiparazitární rezistenci spolurozhoduje o kondici samce. Z toho je patrné, že mezi staršími samci si samice vybírá „už odzkoušené“ a momentálně výhodné alely pro své potomky. von Schantz et al. (1997) navíc předkládají data, která ukazují, že mládřata dlouhostruhých samců skutečně přežívají lépe než jiná mládřata a že reprodukční úspěch samice koreluje s délkou ostruh jejího partnera. Zároveň ale může samice doplňkově vybírat samce podle velikosti a barvy laloků na hlavě, přičemž tyto znaky vypovídají o nutričním stavu samce během raných fází jeho života a mohly by tak samici informovat o dědičné citlivosti jedince na nedostatek potravy (Ohlsson et al. 2002).

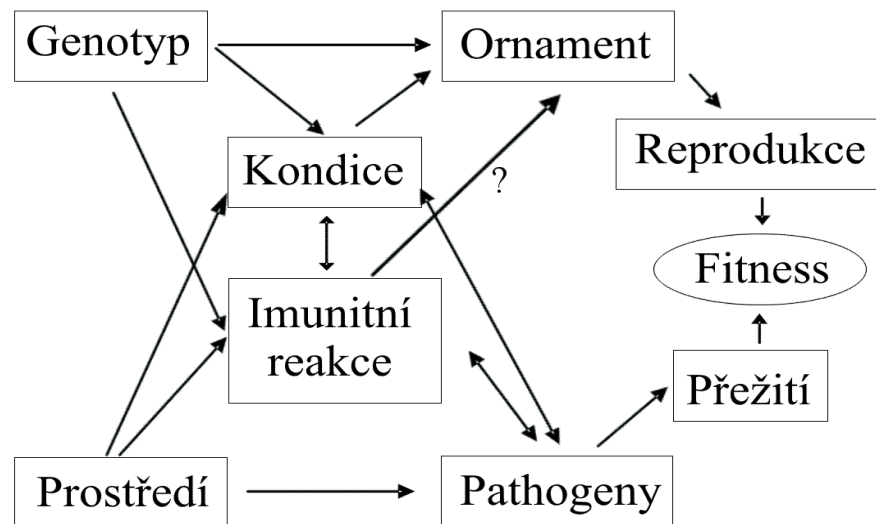
IX.3 Symetrie

Rozlišovat symetrii resp. asymetrii pohlavního znaku mohou v zásadě samice v případě všech výše uvedených typů samčích pohlavních znaků (tedy morfologických i těch založených na zbarvení). Při tom se obvykle předpokládá, že samice budou preferovat samce symetričtější, neboť symetrie je pro ně signálem dobře vyladěných ontogenetických a metabolických pochodů (viz např. Hill 2002). Dlužno přiznat, že mnoho experimentálních podkladů pro existenci této preference bylo získáno na kroužkování zebříček (*Taeniopygia guttata*) barevnými kroužky v symetrických a asymetrických kombinacích (Swaddle 1996; Waas & Wordsworth 1999, ačkoliv srovnaj s Jennions 1998), takže může být otázkou význam této charakteristiky při pohlavním výběru u volně žijících jedinců. V současné době není příliš jisté, zda by se mohlo jednat o znak vztahující se k funkčnosti imunitního systému. Alespoň u některých znaků nemá symetrie patrně žádný vliv na samičí volbu. Například tak bylo prokázáno, že asymetrie zbarvení ocasních per nesouvisí s mírou parazitace u ťuhýka obecného (*Lanius collurio*; Votýpka et al. 2003). Podobně ani (Cadee 2000) nezjistil u vlaštovek (*Hirundo rustica*) žádný vztah mezi symetrií ocasních per rodičů a kondicí či imunokompetencí mládřat sledovaných jedinců.

X ZÁVĚREM

X.1 Shrnutí našich znalostí o imunologické závislosti exprese pohlavních znaků sameců

Ačkoliv může být, jak patrně z přehledu v části IX, mechanismus tvorby samčích pohlavních znaků odlišný podle jejich typu, zdá se, že můžeme charakterizovat alespoň základní společné činitele ovlivňující procesy elaborace většiny samčích ornamentů. Je zřejmé, že genotyp a podmínky okolního prostředí jsou faktory jedincem neovlivnitelné, které mají zásadní determinační význam jak na expresi samčího pohlavního znaku, tak i na budoucí reprodukční úspěch a tím i celkovou fitness samce. To, s čím organismus operuje, je tedy především strategie, jak za daného vlastního genotypu a podmínek prostředí minimalizovat negativní vlivy různých okolních faktorů a optimalizovat fyziologické funkce organismu tak, aby byl výsledný celoživotní reprodukční úspěch a kvalita zplozených mláďat relativně co nejvyšší ve vztahu k ostatním jedincům dané populace. Úspěšnost této strategie určují vztahy k okolním organismům (např. parazitům) a relativizují vztahy jedince s jinými jedinci téhož druhu (kompetice a pohlavní selekce). Schéma na obrázku X.1.1/1 předkládá tu část vazeb, do kterých je podstatnou měrou zapojen imunitní systém. Je patrné, že parazité působí významným způsobem na imunitní systém a kondici jedince (viz též kapitola VIII.7), a tím zároveň určují i jeho přežití. Jejich negativní vliv potlačuje imunitní systém, ovšem na úkor zdrojů, které nemohou být proto investovány do pohlavní ornamentace či reprodukce (viz část IX). V tomto procesu jsou významným způsobem zapojeny hormony, které tyto procesy regulují (na schématu nezobrazeno), ale nejsou samy příčinou těchto změn. Imunitní systém by také mohl být spojen přímo s expresí pohlavního znaku, a to odčerpáváním důležitých mikronutričních zdrojů, například karotenoidů, jejichž alokace nemusí ovlivnit celkovou kondici jedince. Význam této přímé souvislosti je však prozatím nejasný (viz kapitola IX.1.2). Shrňme-li tyto skutečnosti, pak exprese samčího pohlavního znaku může být závislá na funkceschopnosti imunitního systému a ta tak může být sama předmětem pohlavního výběru.



Obr.X.1.1/1: Schéma základních činitelů a vztahů, které determinují imunologickou závislost exprese pohlavního znaku, a tak určují dopad funkceschopnosti imunitního systému na celkovou fitness jedince. Prostředí a genotyp jsou hlavní faktory ovlivňující kondici jedince. Pathogeny představují proměnnou, která působí na alokaci zdrojů (trade-off mezi reprodukcí a imunitou) a spoluurčuje jejich příjem. Vliv parazitů je suprimován aktivitou imunitního systému, která však vyvolává odezvu ze strany parazita. Kondice jedince určuje možnosti jeho imunitních reakcí a také tlak, který paraziti na hostitele vyvíjejí. Kondice, genotyp a imunitní systém mohou přímo determinovat expresi pohlavního znaku. S úpravami převzato z Gonzalez et al. (1999).

X.2 Doporučení pro další výzkum

Tato práce zřetelně vytýčila základní nedostatky současného poznání souvislostí mezi expresí pohlavních znaků u ptáků na straně jedné a funkceschopností imunitního systému na straně druhé. V následujících několika odstavcích proto shrnuji určitá doporučení, kterými se lze řídit při směřování další výzkumné aktivity na tomto poli. Jejich společným jmenovatelem je snaha o posun výzkumu na detailnější úroveň pohledu na imunitní mechanismy. To je, zdá se, jediná cesta, která by mohla pomoci oprostit naše výsledky od charakteru nepřímých korelací a pochopit fyziologické mechanismy, které stojí za intersexuální i intrasexuální pohlavní signalizací.

V první řadě je třeba připomenout, že každému podrobnějšímu výzkumu by měl předcházet pilotní náhled na zkoumanou problematiku, který by pomocí jednoduchých metod odhalil, zda existují nějaké významné imunologické rozdíly mezi zkoumanými jedinci, zda korelují s mírou exprese pohlavního znaku a zda lze určit jejich bazální příčinu (např. parazitace, limitace potravou apod.). Tato fáze je nutná, neboť nelze předpokládat, že právě fungování imunitního systému je veličinou, která významným způsobem spolurozhoduje o selekci všech pohlavních znaků bez výjimek. Jak bylo ukázáno v části VI, existuje v současné době již propracovaný metodologický aparát, který pak může pomoci posunout další práci na úroveň výzkumu aktivity jednotlivých typů buněk imunitního systému *in vitro*. Ačkoliv jsou pro ekologickou imunologii

povětšinou nepřístupné metody vyžadující usmrcení vyšetřovaného zvířete, zůstává využitelné relativně velké spektrum různých analýz buněk z krve nebo buněk odebraných za použití biopsie z místa, ve kterém byl pokusně stimulován zánět. Odebrané buňky je možno separovat podle jejich buněčného typu (například pomocí průtokové cytometrie za využití značených monoklonálních protilátek). Na takto izolovaných buňkách potom lze *in vitro* testovat nejen jejich proliferační nebo efektorovou aktivitu, ale také schopnost chemotaxe, produkci cytokinů a schopnost vzájemné stimulace několika buněčných typů najednou. Při tom je možné detailně rozlišit funkční příslušnost jednotlivých buněk – např. na T_H1 a T_H2 buňky. To by mohlo být v budoucnu zároveň významným podnětem pro studium imunologických regulací u volně žijících druhů ptáků. Z praktického hlediska bude ovšem potřeba ověřit využitelnost komerčně dostupných anti-kuřecích monoklonálních a polyklonálních protilátek, které při těchto výzkumných aktivitách mohou představovat výrazně neekonomičtější nástroje.

Zajímavá je otázka užití bakteriálních lipopolysacharidů při výzkumu funkce samčích pohlavních znaků. Jak jsem zmínil v kapitole V.3, jedná se o významné superantigeny, které stimulují nejrůznější buňky imunitního systému. Toho by bylo možno v budoucnu využít i při *in vivo* vyšetřeních, a to nejen pro stanovení produkce nespecifických IgM protilátek, ale také pro stanovení produkce cytokinů v reakci na tento podnět a možná i pro analýzu míry nespecifické aktivace T buněk a fagocytů.

Výrazně nový přístup ke studované problematice by pak představovalo stanovení funkčnosti antigeně nespecifických imunitních mechanismů (komplementu a fagocytů). Právě tyto bazální prvky imunity byly doposud povětšinou opomíjeny, ačkoliv právě ony mohou mít největší význam pro překonání parazitární infekce (Lochmiller & Deerenberg 2000). Např. současné výzkumy na domácí drůbeži ukazují, že alelická příslušnost různých TLR způsobuje rozdíly v aktivaci buněk imunitního systému i v rezistenci jedinců vůči různým chorobám (Dil & Qureshi 2002; Leveque et al. 2003). Mimo *in vitro* experimenty (např. schopnost fragmentu C3a chemotakticky působit na leukocyty nebo schopnost C3b iniciovat fagocytosu) by bylo možné v prvních fázích výzkumu použít stanovení koncentrace C3 složky v krevní plasmě. Při *in vitro* výzkumu aktivity makrofágů a heterofilních granulocytů by také bylo možno využít panel klíčových antagonistů TLR (A. Smith in litt. 2005). Jelikož mnoho imunitních reakcí začíná právě rozpoznáním pathogenních antigenů antigeně nespecifickými složkami imunity, jejichž receptory jsou pevně geneticky kódované, mohlo by právě toto mít zásadní význam pro naše chápání spojitosti mezi samčími signály a rezistencí vůči parazitům.

Prakticky všechny současné studie se potýkají s problémem, že experimentátoři nemohou vyloučit vliv jiných než sledovaných parazitů na imunitní systém během pokusu (viz např. Gonzalez et al. 1999). Tato skutečnost by mohla mít velmi závažné důsledky. Pokud dejme

tomu někteří jedinci trpí chronickou helmintosou, pak přechod z volné přírody do zajetí u nich může vyvolat změny, které mohou vést například ke zvýšení poměru eosinofilních granulocytů v krvi, které nemusí korelovat s účinky experimentální procedury, přičemž jejich původní příčinu není možno na základě výsledků experimentu správně vyhodnotit. Výhodou by tedy bylo použití SPF (specific pathogen free) zvířat. To by také mohlo pomoci k detailnějšímu výzkumu změn, které jednotlivé typy patogenů způsobují v organismech volně žijících ptáků a ke stanovení fyziologických hodnot pro mnohé imunologické parametry.

Jak bylo vysvětleno v části o fungování imunitního systému (V), je mnoho důvodů, proč by měl být imunitní systém různých jedinců různě citlivý vůči různým parazitům v závislosti na genetických dispozicích těchto jedinců. Většina ekoimunologických studií se při tom zaměřila na testování odpovědi jedince na podání nového antigenu, se kterým se nikdy předtím nesetkal (SRBC, BSA, srovnej také s poznámkou o užití těchto antigenů v podkapitolách VI.3.2 i VI.7.2). Přitom je ovšem pravděpodobné, že za reálných podmínek má pro jedince určitého druhu význam rezistence pouze proti několika druhům parazitů. Jak navrhuji (Westneat & Birkhead 1998), je pro jedince nezbytná nejen imunitní reakce účinná, ale zároveň vyvážená tak, aby nedocházelo k imunopathologickým stavům. Proto má význam také se ptát, jak je na tom sekundární imunitní reakce zkoumaných druhů na patogeny, které jsou významné v jejich přirozeném prostředí. Je zajímavé, že doposud nemnoho studií se touto intuitivně samozřejmou otázkou zabývalo (výjimku tvoří např. práce (Hill et al. 2004), která však není imunologicky orientovaná). Využití přirozených potenciálních patogenů při výzkumu povahy samičího výběru se tedy zdá být velmi perspektivní.

Aplikace výše uvedeného by tedy mohla přispět k doplnění alespoň některých „bílých míst“ a překonání některých překážek. Zmiňme se však ještě ve stručnosti o jednom zásadním problému současného výzkumu, který prozatím nejsme schopni zdolat. Tím je nedostatečná efektivita hematologických izolačních postupů a citlivost detekce imunologických reakcí. Výzkum většiny fenoménů sexuální signalizace je dnes studován na pěvcích. Jedná se tedy o ptáky menších rozměrů, kteří nemívají celkový objem krve v těle větší nežli 3 ml (tedy cca. 6-12 ml/100g), přičemž bez škodlivého účinku vyšetření na přežití jedince lze odebrat jen asi 150-200 μ l. To je množství naprosto nedostatečné pro komplexnější imunologické vyšetření. Určitým řešením tak v současné době patrně zůstává pouze využití větších modelových druhů, u nichž lze bez rizika odebrat dostatek krve. Podrobný výzkum na živých drobných pěvcích je tedy prozatím spíše výzvou budoucnosti.

X.3 Vlastní závěr

Tato práce předkládá velkou část v současnosti známých důkazů o vztahu fungování imunitního systému a exprese pohlavních znaků u samců ptáků. Odhalila zároveň mnohé nedostatky současného poznání i možnosti směřování dalšího výzkumu. Dokládá také, že při výzkumu fenoménu sexuální ornamentace nelze příliš očekávat, že z dat o imunokompetenci jednotlivých jedinců sestavíme jejich absolutní pořadí od „nejimunokompetentnějšího“ jedince, který se dobře vyrovná se všemi patogeny, až po jedince nejslabšího, který naopak uhynie po první infekci. Mnohem pravděpodobnější bude, že se námi sledovaní jedinci budou mezi sebou lišit v různých parametrech imunity, které spolu nebudou příliš korelovat, a bude záležet spíše na typu infekce, která složka imunity bude pro její překonání významná, a tedy, kteří jedinci se s ní vyrovnají lépe, což jim umožní posílit jejich reprodukční úspěch. To není ovšem v rozporu s představou, že jedinci v lepší kondici se budou lépe vyrovnávat s větší škálou patogenních infekcí. Značí to pouze, že nelze podceňovat genetickou a fyziologickou variabilitu jedinců v predispozici k imunitní reakci určitého typu (typicky třeba predispozice k silnější T_H1 či T_H2 odpovědi) a zjištěné vlastnosti jedinců je třeba posuzovat na ekologický kontext. Variabilita mezi jedinci je patrně pro celou populaci významná z evolučního hlediska, jelikož jí jako celku dává možnost vyrovnat se prakticky se všemi patogeny, se kterými přijde do kontaktu. Pro imunologicky orientovaného výzkumného pracovníka na ekologickém a evolučně biologickém poli toto celé ovšem představuje nemalou nesnáz, neboť to znamená, že z hlediska imunokompetence nemůže sledovaná zvířata charakterizovat jediným číslem, a pokud tak musí z nějakého důvodu učinit, měl by si být zároveň vědom omezenosti svého výroku. Jak naznačují mnohé práce shrnuté v tomto přehledu, je dnes mnohdy právě pochopení významu těchto skutečností v ekologické imunologii nedostatečné. To by mohlo do značné míry souviset s jen velmi omezenou škálou doposud používaných imunologických metod. Současná imunologicky orientovaná behaviorální ekologie a evoluční biologie v oblasti metodologie významně zaostává za molekulární imunologií i imunologií veterinárně-klinickou. Metody vyšetření aktivity imunitního systému v dnešních studiích jsou povětšinou staré více než dvacet let, a neumožňují tak proniknout do větších detailů mechanismů imunologické regulace pohlavního výběru. Příčinou tohoto stavu může být mimo jiné také téměř nulový zájem zejména molekulárních imunologů o jiné než standardně používané modelové druhy, mezi které ptáci patří jen okrajově. Například ještě před pěti lety se o cytokinech a mnoha povrchových molekulách vědělo i u tak komerčně využívaného druhu, jakým je kur domácí (*Gallus domesticus*), jen skutečně velmi málo. Jelikož je však aktuální situace v imunologii výrazně jiná, lze očekávat, že i ekologická imunologie projde u mnoha obratlovčích skupin v nejbližší době mnohými proměnami nastartovanými značným metodologickým posunem směrem k využití modernějších molekulárně-imunologických postupů. Je tedy v tuto chvíli jen otázkou připravenosti a finančního zabezpečení, která pracoviště budou určovat v tomto směru výzkumné trendy na příštích deset let.

XI PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě je mou milou povinností poděkovat všem, kteří přispěli ke zdárnému dokončení této práce. Můj dík patří zejména doc. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc., který si obětavě přečetl imunologickou část rukopisu a posléze mi ji připomínkoval. Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D., za připomínkování rukopisu a průběžné zasílání mnoha relevantních prací, z nichž některé jsem do této práce zahrnul. Můj dík patří také Mgr. Dagmar Vinklerové a Martině Pokorné za pročtení rukopisu a jeho korekci z hlediska gramatických chyb a stylistických obrátů. V neposlední řadě jsem zavázán také MVDr. Martinu Faldinovi, Ph.D., MVDr. Josefu Gerykovi, CSc., Ing. Jiřímu Plachému, CSc., RNDr. Petru Šímovi, CSc. a MUDr. Janu Živnému, Ph.D. za poskytnutí některých monografií a článků, z nichž jsem v této práci čerpal.

XII SLOVNÍK ZKRATEK

APC	–	Antigen presenting cell
BCR	–	B-cell receptor
BSA	–	Bovine serum albumine
CD	–	Cluster of differentiation (označení povrchové molekuly)
ELISA	–	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDC	–	Follicular dendritic cell
H/L	–	poměr heterofilních granulocytů ku lymfocytům
Ig	–	Imunoglobulin (např. IgM isotypu M)
KLH	–	Keyhole limpet hemocyanin
LPS	–	Lipopolysacharid
MHC	–	Major histocompatibility complex
PAMP	–	Pathogen associated molecular patterns
PBS	–	Phosphate buffer saline
SRBC	–	Sheep red blood cells
TCR	–	T-cell receptor
TLR	–	Toll-like receptor

XIII LITERATURA

- Afanassieff M, Goto RM, Ha J, Sherman MA, Zhong LW, Auffray C, Coudert F, Zoorob R, Miller MM (2001) At least one class I gene in restriction fragment pattern-Y (Rfp-Y), the second MHC gene cluster in the chicken, is transcribed, polymorphic, and shows divergent specialization in antigen binding region. *Journal of Immunology* 166:3324-3333
- Aitken ID, Parry SH (1974) The comparative serological response of the chicken, pheasant and quail to a soluble and particulate antigen. *Immunology* 27:623-629
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Gaillard M, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004a) An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *American Naturalist* 164:651-659
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004b) Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7:363-368
- Andersson M, Iwasa Y (1996) Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 11:A53-A58
- Arstila TP, Lassila O (1993) Androgen-Induced Expansion of the Peripheral-Blood Gamma-Delta T-Cell Population in the Chicken. *Journal of Immunology* 151:6627-6633
- Arstila TP, Toivanen P (1998) Avian Immunology: Ontogeny of immune system. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 101-104
- Arstila TP, Toivanen P, Lassila O (1993) Helper Activity of Cd4+ Alpha-Beta T-Cells Is Required for the Avian Gamma-Delta T-Cell Response. *European Journal of Immunology* 23:2034-2037
- Arstila TP, Vainio O, Lassila O (1994) Evolutionarily Conserved Function of Cd28 in Alpha-Beta-T-Cell Activation. *Scandinavian Journal of Immunology* 40:368-371
- Avery S, Rothwell L, Degen WDJ, Schijns VEJC, Young J, Kaufman J, Kaiser P (2004) Characterization of the first Nonmammalian T2 cytokine gene cluster: The cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24:600-610
- Bachen EA, Manuck SB, Marsland AL, Cohen S, Malkoff SB, Muldoon MF, Rabin BS (1992) Lymphocyte subset and cellular immune-responses to a brief experimental stressor. *Psychosomatic Medicine* 54:673-679
- Badyaev AV, Duckworth RA (2003) Context-dependent sexual advertisement: plasticity in development of sexual ornamentation throughout the lifetime of a passerine bird. *Journal of Evolutionary Biology* 16:1065-1076
- Badyaev AV, Etges WJ, Faust JD, Martin TE (1998) Fitness correlates of spur length and spur asymmetry in male wild turkeys. *Journal of Animal Ecology* 67:845-852
- Badyaev AV, Hill GE, Dunn PO, Glen JC (2001) Plumage color as a composite trait: Developmental and functional integration of sexual ornamentation. *American Naturalist* 158:221-235
- Badyaev AV, Young RL (2004) Complexity and integration in sexual ornamentation: an example with carotenoid and melanin plumage pigmentation. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1317-1327
- Balu S, Kaiser P (2003) Avian interleukin-12 beta (p40): Cloning and characterization of the cDNA and gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 23:699-707
- Beal RK, Powers C, Wigley P, Barrow PA, Smith AL (2004) Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Avian Pathology* 33:25-33
- Bendich A (1989) Carotenoids and the immune-response. *Journal of Nutrition* 119:112-115
- Bendich A (1991) Beta-carotene and the immune-response. *Proceedings of the Nutrition Society* 50:263-274
- Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* 16:363-377
- Birkhead TR, Fletcher F, Pellatt EJ (1999) Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:385-390
- Blomqvist D, Andersson M, Kupper C, Cuthill IC, Kis J, Lanctot RB, Sandercock BK, Szekely T, Wallander J, Kempenaers B (2002) Genetic similarity between mates and extra-pair parentage in three species of shorebirds. *Nature* 419:613-615

- Blount JD, Houston DC, Møller AP (2000) Why egg yolk is yellow. *Trends in Ecology & Evolution* 15:47-49
- Blount JD, Houston DC, Møller AP, Wright J (2003a) Do individual branches of immune defence correlate? A comparative case study of scavenging and non-scavenging birds. *Oikos* 102:340-350
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Surai PF (2003b) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300:125-127
- Blount JD, Møller AP, Houston DC (2001) Antioxidants, showy males and sperm quality. *Ecology Letters* 4:393-396
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* 161:367-379
- Bonneaud C, Sorci G, Morin V, Westerdahl H, Zoorob R, Wittzell H (2004) Diversity of Mhc class I and IIB genes in house sparrows (*Passer domesticus*). *Immunogenetics* 55:855-865
- Brawner WR, Hill GE, Sundermann CA (2000) Effects of coccidial and mycoplasmal infections on carotenoid-based plumage pigmentation in male House Finches. *Auk* 117:952-963
- Bucala R (1992) Polyclonal Activation of Lymphocytes-B by Lipopolysaccharide Requires Macrophage-Derived Interleukin-1. *Immunology* 77:477-482
- Buchanan KL, Evans MR, Goldsmith AR (2003) Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:50-59
- Buchholz R, Dukes MDJ, Hecht S, Findley AM (2004) Investigating the turkey's 'snood' as a morphological marker of heritable disease resistance. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121:176-185
- Bucy RP, Chen CLH, Cihak J, Losch U, Cooper MD (1988) Avian T-Cells Expressing Gamma-Delta-Receptors Localize in the Splenic Sinusoids and the Intestinal Epithelium. *Journal of Immunology* 141:2200-2205
- Burton GW (1989) Antioxidant Action of Carotenoids. *Journal of Nutrition* 119:109-111
- Cadeé N (2000) Parent Barn Swallow fluctuating asymmetry and offspring quality. *Journal of Avian Biology* 31:495-503
- Casto JM, Nolan V, Ketterson ED (2001) Steroid hormones and immune function: Experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *American Naturalist* 157:408-420
- Chai JY, Lillehoj HS (1988) Isolation and Functional-Characterization of Chicken Intestinal Intra-Epithelial Lymphocytes Showing Natural-Killer Cell-Activity Against Tumor Target-Cells. *Immunology* 63:111-117
- Chen CLH, Lehmeyer JE, Cooper MD (1982) Evidence for An Igd Homolog on Chicken Lymphocytes. *Journal of Immunology* 129:2580-2585
- Cheng S, Lamont SJ (1988) Genetic Analysis of Immunocompetence Measures in White Leghorn Chicken Line. *Poultry Science* 67:989-995
- Cheng YH, Lee DN, Wen CM, Weng CF (2004) Effects of beta-glucan supplementation on lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune responses in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17:1145-1149
- Chew BP (1993) Role of Carotenoids in the Immune-Response. *Journal of Dairy Science* 76:2804-2811
- Chew BP, Wong MW, Park JS, Wong TS (1999) Dietary beta-carotene and astaxanthin but not canthaxanthin stimulate splenocyte function in mice. *Anticancer Research* 19:5223-5227
- Choi KD, Lillehoj HS (2000) Role of chicken IL-2 on gamma delta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gamma delta T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73:309-321
- Choi KD, Lillehoj HS, Song KD, Han JY (1999) Molecular and functional characterization of chicken IL-15. *Developmental and Comparative Immunology* 23:165-177
- Christe P, de Lope F, Gonzalez G, Saino N, Møller AP (2001) The influence of environmental conditions on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* 126:333-338
- Christe P, Møller AP, Saino N, de Lope F (2000) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, *Delichon urbica* (the house martin). *Heredity* 85:75-83

- Cihak J, Hoffmannfezer G, Zieglerheibroek HWL, Stein H, Kaspers B, Chen CH, Cooper MD, Losch U (1991) T-Cells Expressing the V-Beta-1 T-Cell Receptor Are Required for Iga Production in the Chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10951-10955
- Dale J (2000) Ornamental plumage does not signal male quality in red-billed queleas. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:2143-2149
- Dalloul RA, Lillehoj HS, Shellem TA, Doerr JA (2002) Effect of vitamin A deficiency on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in broiler chickens. *Poultry Science* 81: 1509-1515
- Darwin C (1859) Sexual selection / Výběr pohlavní (sexuální). In: *Origin of species / O vzniku druhů Praha*, pp 77-78
- Daunt F, Monaghan P, Wanless S, Harris MP (2003) Sexual ornament size and breeding performance in female and male European Shags *Phalacrocorax aristotelis*. *Ibis* 145:54-60
- Deerenberg C, Arpanius V, Daan S, Bos N (1997) Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1021-1029
- Degen WGJ, van Daal N, van Zuilekom HI, Burnside J, Schijns VEJC (2004) Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *Journal of Immunology* 172:4371-4380
- Del Moral MG, Fonfria J, Varas A, Jimenez E, Moreno J, Zapata AG (1998) Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil. *Anatomical Record* 250:182-189
- Demaries SL, Ratcliffe MJH (1998) Avian Immunology: Cell Surface and Secreted Immunoglobulins in B Cell Development. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology Academic Press Limited, London*, pp 89-92
- Dietert RR, Golemboski KA, Austic RE (1994) Environment-Immune Interactions. *Poultry Science* 73:1062-1076
- Digby MR, Lowenthal JW (1995) Cloning and Expression of the Chicken Interferon-Gamma Gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 15:939-945
- Dil N, Qureshi MA (2002) Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 84:191-207
- Doucet SM, Montgomerie R (2003) Multiple sexual ornaments in stain bowerbirds: ultraviolet plumage and bowers signal different aspects of male quality. *Behavioral Ecology* 14:503-509
- Duckworth RA, Badyaev AV, Parlow AF (2003) Elaborately ornamented males avoid costly parental care in the house finch (*Carpodacus mexicanus*): a proximate perspective. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:176-183
- Duckworth RA, Mendonca MT, Hill GE (2001) A condition dependent link between testosterone and disease resistance in the house finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:2467-2472
- Dufva R, Allander K (1995) Intraspecific Variation in Plumage Coloration Reflects Immune-Response in Great Tit (*Parus major*) Males. *Functional Ecology* 9:785-789
- Dunon D, Cooper MD, Imhof BA (1993) Thymic Origin of Embryonic Intestinal Gamma/Delta T-Cells. *Journal of Experimental Medicine* 177:257-263
- Ehman KD, Scott ME (2001) Urinary odour preferences of MHC congenic female mice, *Mus domesticus*: implications for kin recognition and detection of parasitized males. *Animal Behaviour* 62:781-789
- Ehman KD, Scott ME (2002) Female mice mate preferentially with non-parasitized males. *Parasitology* 125:461-466
- Eklblom R, Grahn M, Hoglund J (2003) Patterns of polymorphism in the MHC class II of a non-passerine bird, the great snipe (*Gallinago media*). *Immunogenetics* 54:734-741
- Eklblom R, Saether SA, Grahn M, Fiske P, Kalas JA, Hoglund J (2004) Major histocompatibility complex variation and mate choice in a lekking bird, the great snipe (*Gallinago media*). *Molecular Ecology* 13:3821-3828
- El Abasy M, Motobu M, Shimura K, Na KJ, Kang CB, Koge K, Onodera T, Hirota Y (2002) Immunostimulating and growth-promoting effects of sugar cane extract (SCE) in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science* 64:1061-1063
- El-Lethey H, Huber-Eicher B, Jungi TW (2003) Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 95:91-101

- Eraud C, Duriez O, Chastel O, Faivre B (2005) The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Functional Ecology* 19:110-118
- Evans MR, Goldsmith AR, Norris SRA (2000) The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47:156-163
- Ewenson E, Zann R, Flannery G (2003) PHA immune response assay in captive zebra finches is modulated by activity prior to testing. *Animal Behaviour* 66:797-800
- 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
- Faivre B, Gregoire A, Preault M, Cezilly F, Sorci G (2003a) Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300:103
- Faivre B, Preault M, Salvadori F, Thery M, Gaillard M, Cezilly F (2003b) Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour* 65:1125-1131
- Ferro PJ, Swaggerty CL, He HQ, Rothwell L, Kaiser P, Kogut MH (2005) Recombinant chicken IL-6 does not activate heterophils isolated from day-old chickens in vitro. *Developmental and Comparative Immunology* 29:375-383
- Figuerola J, Domenech J, Senar JC (2003) Plumage colour is related to ectosymbiont load during moult in the serin, *Serinus serinus*: an experimental study. *Animal Behaviour* 65:551-557
- 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
- Finkelstein M, Grasman KA, Croll DA, Tershy B, Smith DR (2003) Immune function of cryopreserved avian peripheral white blood cells: Potential biomarkers of contaminant effects in wild birds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44:502-509
- Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection*. Dover, New Yourk
- Fitze PS, Tschirren B, Richner H (2003) Carotenoid-based colour expression is determined early in nestling life. *Oecologia* 137:148-152
- Flegr J (2005) *Evoluční biologie*. Academia, Praha
- Fleischer B (1980) Effector-Cells in Avian Spontaneous and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cyto-Toxicity. *Journal of Immunology* 125:1161-1166
- Fletcher OJ, Barnes HJ (1998) Avian Immunology: Lymphoid organs and their anatomical distribution. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 73-81
- Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT, Kempenaers B (2003) Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* 425:714-717
- Ford GW, Thaxton JP, Fredricksen TL, Tyczkowski JK, Chamblee TN, Morgan GW (2002) Growth promotion in chickens by interleukin-2. *Growth Development and Aging* 65:73-81
- Freeman-Gallant CR, Johnson EM, Saponara F, Stanger M (2002) Variation at the major histocompatibility complex in Savannah sparrows. *Molecular Ecology* 11:1125-1130
- Freeman-Gallant CR, Meguerdichian M, Wheelwright NT, Sollecito SV (2003) Social pairing and female mating fidelity predicted by restriction fragment length polymorphism similarity at the major histocompatibility complex in a songbird. *Molecular Ecology* 12:3077-3083
- Fritsche KL, Cassity NA, Huang SC (1991) Effect of Dietary-Fat Source on Antibody-Production and Lymphocyte-Proliferation in Chickens. *Poultry Science* 70:611-617
- Fudge AM (1989) Avian hematology: identification and interpretation. *Proceedings Association of Avian Veterinarians* 284-292
- Fuku A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y, Toyoshima K, Seya T (2001) Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors - A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *Journal of Biological Chemistry* 276:47143-47149
- Fulton JE, Thacker EL, Bacon LD, Hunt HD (1995) Functional-Analysis of Avian Class-I (B β v) Glycoproteins by Epitope Tagging and Mutagenesis In-Vitro. *European Journal of Immunology* 25:2069-2076
- Garamszegi LZ, Heylen D, Møller AP, Eens M, de Lope F (2005) Age-dependent health status and song characteristics in the barn swallow. *Behavioral Ecology* 16:580-591
- Garamszegi LZ, Møller AP, Erritzoe J (2003) The evolution of immune defense and song complexity in birds. *Evolution* 57:905-912

- Garamszegi LZ, Møller AP, Torok J, Michl G, Peczely P, Richard M (2004) Immune challenge mediates vocal communication in a passerine bird: an experiment. *Behavioral Ecology* 15: 148-157
- Gasper JS, Shiina T, Inoko H, Edwards SV (2001) Songbird genomics: Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75:26-34
- Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks GL, Mashaly MM (2002a) Initiation of humoral immunity. I. The role of cytokines and hormones in the initiation of humoral immunity using T-independent and T-dependent antigens. *Developmental and Comparative Immunology* 26:751-759
- Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks GL, Mashaly MM (2002b) Initiation of humoral immunity. II. The effects of T-independent and T-dependent antigens on the distribution of lymphocyte populations. *Developmental and Comparative Immunology* 26:761-771
- Geissmann F, Revy P, Brousse N, Lepelletier Y, Folli C, Durandy A, Chambon P, Dy M (2003) Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 198:623-634
- Gil D, Graves J, Hazon N, Wells A (1999) Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science* 286:126-128
- Gobel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, Staeheli P, Kaspers B (2003) IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4(+) T cells in the chicken: Conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *Journal of Immunology* 171: 1809-1815
- Gobel TWF, Kaspers B, Stangassinger M (2001) NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology* 13: 757-762
- Gonzalez G, Sorci G, Møller AP, Ninni P, Haussy C, de Lope F (1999) Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* 68:1225-1234
- Goto N, Kodama H, Okada K, Fujimoto Y (1978) Suppression of Phytohemagglutinin Skin Response in Thymectomized Chickens. *Poultry Science* 57:246-250
- Granbom M, Raberg L, Smith HG (2005) The spatial and temporal repeatability of PHA-responses. *Behavioral Ecology* 16:497-498
- Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 13:85-94
- Guillemot F, Turmel P, Charron D, Ledouarin N, Auffray C (1986) Structure, Biosynthesis, and Polymorphism of Chicken Mhc Class-II (B-L) Antigens and Associated Molecules. *Journal of Immunology* 137:1251-1257
- Guillermo LVC, DaMatta RA (2004) Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry Science* 83:776-782
- Hála K, Plachý J, Kaufman J (1998) Avian Immunology: Major histocompatibility complex (MHC) antigens. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 92-95
- Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable True Fitness and Bright Birds - A Role for Parasites. *Science* 218:384-387
- Hangalapura BN, Nieuwland MGB, Reilingh GD, Heetkamp MJW, van den Brand H, Kemp B, Parmentier HK (2003) Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poultry Science* 82: 1692-1700
- Hangalapura BN, Nieuwland MGB, Vries Reilingh G, van den Brand H, Kemp B, Parmentier HK (2004) Durations of cold stress modulates overall immunity of chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science* 83:765-775
- Hartley RC, Kennedy MW (2004) Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution* 19:353-354
- Hasselquist D, Marsh JA, Sherman PW, Wingfield JC (1999) Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45:167-175
- Hawley DM, Sydenstricker KV, Kollias GV, Dhondt AA . Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biology Letters* 1[3], 326-329. 2005. Article in press.
- Hess CM, Gasper J, Hoekstra HE, Hill CE, Edwards SV (2000) MHC class II pseudogene and genomic signature of a 32-kb cosmid in the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Genome Research* 10:613-623

- Hill GE (1990) Female House finches prefer colorful males: sexual selection for a condition-dependent trait. *Animal Behaviour* 40:563-572
- Hill GE (1991) Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature* 350:337-339
- Hill GE (1992) Proximate Basis of Variation in Carotenoid Pigmentation in Male House Finches. *Auk* 109:U1-12
- Hill GE (1999) Is there an immunological cost to carotenoid-based ornamental coloration? *American Naturalist* 154:589-595
- Hill GE (2000) Energetic constraints on expression of carotenoid-based plumage coloration. *Journal of Avian Biology* 31:559-566
- Hill GE (2002) A red bird in a brown bag: the function and evolution of colorful plumage in the House finch. Oxford University Press, New York
- Hill GE, Brawner WR (1998) Melanin-based plumage coloration in the house finch is unaffected by coccidial infection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1105-1109
- Hill GE, Farmer KL, Beck ML (2004) The effect of mycoplasmosis on carotenoid plumage coloration in male house finches. *Journal of Experimental Biology* 207:2095-2099
- Hill GE, Inouye CY, Montgomerie R (2002) Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 262:1119-1124
- Hill GE, Montgomerie R, Inouye CY, Dale J (1994) Influence of Dietary Carotenoids on Plasma and Plumage Color in the House Finch - Intrasexual and Intersexual Variation. *Functional Ecology* 8:343-350
- Hillgarth N (1996) Ectoparasite transfer during mating in ring-necked pheasants *Phasianus colchicus*. *Journal of Avian Biology* 27:260-262
- Hoelzer GA (1989) The Good Parent Process of Sexual Selection. *Animal Behaviour* 38:1067-1078
- 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, Jenni-Eiermann S, Ots I, Tegelmann L (1998) Health and reproduction: the sex-specific clinical profile of great tits (*Parus major*) in relation to breeding. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 76:2235-2244
- Hörak P, Ots I, Tegelmann L, Møller A (2000) Health impact of phytohaemagglutinin-induced immune challenge on great tit (*Parus major*) nestlings. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 78:905-910
- Hörak P, Ots I, Vellau H, Spottiswoode C, Møller AP (2001) Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia* 126:166-173
- Hörak P, Saks L, Ots I, Kullisaar T, Kollist H, Zilmer M (2003) Physiological effects of immune challenge in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 81:371-379
- Hörak P, Tegelmann L, Ots I, Møller AP (1999) Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* 121:316-322
- Hudec K, Čapek M, Hanák F, Klimeš J, Pavíza R (2003) Soustava a české názvosloví ptáků světa. Muzeum Komenského v Přerově, Přerov
- Hughes DA (2001) Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* 17:823-827
- Humphrey BD, Calvert CC, Klasing KC (2004) The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Developmental and Comparative Immunology* 28:665-672
- Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D (2000) Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:665-670
- Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL (2005a) Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104:117-127

- Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GSK, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL (2005b) Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity* 73:2344-2350
- Jarvi SI, Goto RM, Gee GF, Briles WE, Miller MM (1999) Identification, inheritance, and linkage of B-G-like and MHC class I genes in cranes. *Journal of Heredity* 90:152-159
- Jarvi SI, Tarr CL, McIntosh CE, Atkinson CT, Fleischer RC (2004) Natural selection of the major histocompatibility complex (Mhc) in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). *Molecular Ecology* 13:2157-2168
- Jenni L, Winkler R (1994) *Moult and Aging of European Passerines*. Academic Press Limited, London
- Jennions MD (1998) The effect of leg band symmetry on female-male association in zebra finches. *Animal Behaviour* 55:61-67
- Jeurissen SHM, Claassen E, Janse EM (1992) Histological and Functional-Differentiation of Nonlymphoid Cells in the Chicken Spleen. *Immunology* 77:75-80
- Jeurissen SHM, Vainio O, Ratcliffe MJH (1998) Avian Immunology: Leucocyte Markers in the Chicken. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 81-86
- Johnsen A, Andersen V, Sunding C, Lifjeld JT (2000) Female bluethroats enhance offspring immunocompetence through extra-pair copulations. *Nature* 406:296-299
- Johnsen A, Andersson S, Ornborg J, Lifjeld JT (1998) Ultraviolet plumage ornamentation affects social mate choice and sperm competition in bluethroats (*Aves* : *Luscinia s. svecica*): a field experiment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 1313-1318
- Jordan WC, Bruford MW (1998) New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81: 127-133
- Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M (2004) Variable inter-annual relationships between T-cell mediated immunity and individual traits in White Storks. *Ardeola* 51:357-364
- Kai C, Yoshikawa Y, Yamanouchi K, Okada H (1983) Isolation and Identification of the 3Rd Component of Complement of Japanese Quails. *Journal of Immunology* 130:2814-2820
- Kaiser P, Mariani P (1999) Promoter sequence, exon : intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15. *Immunogenetics* 49:26-35
- Kaiser P, Rothwell L, Goodchild M, Bumstead N (2004) The chicken proinflammatory cytokines interleukin-1 beta and interleukin-6: differences in gene structure and genetic location compared with their mammalian orthologues. *Animal Genetics* 35:169-175
- Kasahara Y, Chen CH, Cooper MD (1993) Growth Requirements for Avian Gamma-Delta-T-Cells Include Exogenous Cytokines, Receptor Ligation and In-Vivo Priming. *European Journal of Immunology* 23:2230-2236
- Kaspers B, Lillehoj HS, Jenkins MC, Pharr GT (1994) Chicken Interferon-Mediated Induction of Major Histocompatibility Complex Class-II Antigens on Peripheral-Blood Monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44:71-84
- Kaspers B, Lillehoj HS, Lillehoj EP (1993) Chicken Macrophages and Thrombocytes Share A Common Cell-Surface Antigen Defined by A Monoclonal-Antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36:333-346
- Kaufman J, Jacob J, Shaw I, Walker B, Milne S, Beck S, Salomonsen J (1999a) Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunological Reviews* 167:101-117
- Kaufman J, Milne S, Gobel TWF, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S (1999b) The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 401: 923-925
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarezmon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS (1986) Production of Transforming Growth-Factor-Beta by Human Lymphocytes-T and Its Potential Role in the Regulation of T-Cell Growth. *Journal of Experimental Medicine* 163: 1037-1050
- Kikkawa EF, Tsuda TF, Naruse TK, Sumiyama D, Fukuda M, Kurita M, Murata K, Wilson RP, LeMaho Y, Tsuda M, Kulski JK, Inoko H (2005) Analysis of the sequence variations in the Mhc DRB1-like gene of the endangered Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). *Immunogenetics* 57:99-107
- Klasing KC (1994) Avian Leukocytic Cytokines. *Poultry Science* 73:1035-1043

- Klasing KC (1998a) Avian macrophages: Regulators of local and systemic immune responses. *Poultry Science* 77:983-989
- Klasing KC (1998b) Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science* 77:1119-1125
- Kleven O, Lifjeld JT (2004) Extrapair paternity and offspring immunocompetence in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus*. *Animal Behaviour* 68:283-289
- Knabel M, Cihak J, Losch U (1993) Characterization of New Monoclonal-Antibodies Identifying Avian T-Lymphocyte Antigens. *Immunobiology* 188:415-429
- Kogut M, Rothwell L, Kaiser P (2002) Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Developmental and Comparative Immunology* 26:817-830
- Kogut MH (2002) Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteritidis*. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 25:159-172
- Kogut MH, Iqbal M, He HQ, Philbin V, Kaiser P, Smith A (2005a) Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Developmental and Comparative Immunology* 29:791-807
- Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P (2003) Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Molecular Immunology* 40:603-610
- Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P (2005b) IFN-gamma priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 25:73-81
- Kolodsick JE, Stepaniak JA, Hu WP, Sundick RS (2001) Mutational analysis of chicken interleukin 2. *Cytokine* 13:317-324
- Kondo Y, Cahyaningsih U, Abe A, Tanabe A (1992) Presence of the Diurnal Rhythms of Monocyte Count and Macrophage Activities in Chicks. *Poultry Science* 71:296-301
- Koppenheffer TL (1998) Avian Immunology: Complement. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 99-101
- Koppenheffer TL, Russell BA (1986) Unusual Complement Activation Properties of Serum Immunoglobulins of the Pigeon *Columba-Livia*. *Immunology* 57:473-478
- Koskela K, Kohonen P, Salminen H, Uchida T, Buerstedde JM, Lassila O (2004) Identification of a novel cytokine-like transcript differentially expressed in avian gamma delta T cells. *Immunogenetics* 55:845-854
- Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF (1985) Quantitation of Maternal-Fetal IgG Transport in the Chicken. *Immunology* 54:755-762
- Lahti JM, Chen CLH, Tjoelker LW, Pickel JM, Schat KA, Calnek BW, Thompson CB, Cooper MD (1991) 2 Distinct Alpha-Beta-T-Cell Lineages Can be Distinguished by the Differential Usage of T-Cell Receptor V-Beta-Gene Segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10956-10960
- Lam KM (1999) Chemotactic activities of avian lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 23:641-647
- Lam KM (2002) The macrophage inflammatory protein-1 beta in the supernatants of *Mycoplasma gallisepticum*-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 26:85-93
- Lambrecht B, Gonze M, Meulemans G, van den Berg TP (2000) Production of antibodies against chicken interferon-gamma: demonstration of neutralizing activity and development of a quantitative ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 74:137-144
- Lambrecht B, Gonze M, Meulemans G, van den Berg TP (2004) Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-gamma in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathology* 33:343-350
- Lamont SJ, Smyth JR (1984) Effect of Selection for Delayed Amelanosis on Immune-Response in Chickens .2. Cell-Mediated-Immunity. *Poultry Science* 63:440-442
- Lassila O (1989) Emigration of B-Cells from Chicken Bursa of Fabricius. *European Journal of Immunology* 19:955-958
- Lavoie ET, Grasman KA (2005) Isolation, cryopreservation, and mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from chickens (*Gallus domesticus*) and wild herring gulls (*Larus argentatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48:552-558

- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Chandramani P, Maul-Pavicic A, Jager M, Li XH, Breer H, Zufall F, Boehm T (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306:1033-1037
- Leshchinsky TV, Klasing KC (2003) Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary alpha-tocopheryl acetate. *Poultry Science* 82:1266-1273
- Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Ostí JC, Morgan K, Malo D (2003) Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity* 71:1116-1124
- Li GX, Lillehoj HS, Min WG (2001) Production and characterization of monoclonal antibodies reactive with the chicken interleukin-15 receptor alpha chain. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82:215-227
- Licastro F, Davis LJ, Morini MC (1993) Lectins and Superantigens - Membrane Interactions of These Compounds with T-Lymphocytes Affect Immune-Responses. *International Journal of Biochemistry* 25:845-852
- Lifjeld JT, Dunn PO, Whittingham LA (2002) Short-term fluctuations in cellular immunity of tree swallows feeding nestlings. *Oecologia* 130:185-190
- Lillehoj HS, Min WG, Choi KD, Babu US, Bumside J, Miyamoto T, Rosenthal BM, Lillehoj EP (2001) Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82:229-244
- Linville SU, Breitwisch R, Schilling AJ (1998) Plumage brightness as an indicator of parental care in northern cardinals. *Animal Behaviour* 55:119-127
- Liu W, Miller MM, Lamont SJ (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms with vaccine or challenge response to *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Immunogenetics* 54:582-590
- Livant EJ, Brigati JR, Ewald SJ (2004) Diversity and locus specificity of chicken MHC B class I sequences. *Animal Genetics* 35:18-27
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98
- Lochmiller RL, Vestey MR, Boren JC (1993) Relationship Between Protein Nutritional-Status and Immunocompetence in Northern Bobwhite Chicks. *Auk* 110:503-510
- Lozano GA, Ydenberg RC (2002) Transgenerational effects of maternal immune challenge in tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 80:918-925
- Lucas AM, Jamroz C (1961) Atlas of Avian Hematology. United States Department of Agriculture, Washington
- Lynagh GR, Bailey M, Kaiser P (2000) Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76:89-102
- Lynn DJ, Lloyd AT, O'Farrelly C (2003) In silico identification of components of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in clustered chicken expressed sequence tags (ESTs). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93:177-184
- MacDougall AK, Montgomerie R (2003) Assortative mating by carotenoid-based plumage colour: a quality indicator in American goldfinches, *Carduelis tristis*. *Naturwissenschaften* 90:464-467
- Majumdar G, Beachey EH, Tomai M, Kotb M (1990) Differential Signal Requirements in T-Cell Activation by Mitogen and Superantigen. *Cellular Signalling* 2:521-530
- Martinez J, Tomas G, Merino S, Arriero E, Moreno J (2003) Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* 17:700-706
- Marzal A, de Lope F, Navarro C, Møller AP (2005) Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142:541-545
- Masello JF, Quillfeldt P (2004) Are haematological parameters related to body condition, ornamentation and breeding success in wild burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? *Journal of Avian Biology* 35:445-454
- Maxwell MH (1981) Leukocyte diurnal rhythms in normal and pinealectomized juvenile female fowls. *Research in Veterinary Science* 31:113-115
- Mays HL, Hill GE (2004) Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution* 19:554-559
- McCorkle F, Olah I, Glick B (1980) Morphology of the Phytohemagglutinin-Induced Cell Response in the Chickens Wattle. *Poultry Science* 59:616-623

- McCormack WT (1998) Avian Immunology: T-cell receptors. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) Handbook of Vertebrate Immunology Academic Press Limited, London, pp 87-89
- McGraw KJ, Ardia DR (2003) Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. *American Naturalist* 162:704-712
- McGraw KJ, Ardia DR (2004) Immunoregulatory activity of different dietary carotenoids in male zebra finches. *Chemoecology* 14:25-29
- McGraw KJ, Ardia DR (2005) Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evolutionary Ecology Research* 7:251-262
- McGraw KJ, Dale J, Mackillop EA (2003a) Social environment during molt and the expression of melanin-based plumage pigmentation in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:116-122
- McGraw KJ, Hill GE (2000) Differential effects of endoparasitism on the expression of carotenoid- and melanin-based ornamental coloration. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:1525-1531
- McGraw KJ, Hill GE, Parker RS (2003b) Carotenoid pigments in a mutant cardinal: Implications for the genetic and enzymatic control mechanisms of carotenoid metabolism in birds. *Condor* 105:587-592
- McGraw KJ, Mackillop EA, Dale J, Hauber ME (2002) Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage. *Journal of Experimental Biology* 205:3747-3755
- McGraw KJ, Wakamatsu K, Ito S, Nolan PM, Jouventin P, Dobson FS, Austic RE, Safran RJ, Siefferman LM, Hill GE, Parker R (2004) You can't judge a pigment by its color: Carotenoid and melanin content of yellow and brown feathers in swallows, bluebirds, penguins, and domestic chickens. *Condor* 106:390-395
- Merino S, Martinez J, Møller AP, Sanabria L, de Lope F, Perez J, Rodriguez-Caabeiro F (1999) Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* 58:219-222
- Mesa CM, Thulien KJ, Moon DA, Veniamin SM, Magor KE (2004) The dominant MHC class I gene is adjacent to the polymorphic TAP2 gene in the duck, *Anas platyrhynchos*. *Immunogenetics* 56:192-203
- Milinski M, Wedekind C (2001) Evidence for MHC-correlated perfume preferences in humans. *Behavioral Ecology* 12:140-149
- Miller HC, Lambert DM (2004) Gene duplication and gene conversion in class II MHC genes of New Zealand robins (Petroicidae). *Immunogenetics* 56:178-191
- Miller MM, Bacon LD, Αριάλ, Hála K, Hunt HD, Ewald SJ, Kaufman J, Zoorob R, Briles WE (2004) 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics* 56:261-279
- Miller MM, Wang C, Parisini E, Coletta RD, Goto RM, Lee SY, Barral DC, Townes M, Roura-Mir C, Ford HL, Brenner MB, Dascher CC (2005) Characterization of two avian MHC-like genes reveals an ancient origin of the CD1 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:8674-8679
- Min WG, Lillehoj HS (2004) Identification and characterization of chicken interleukin-16 cDNA. *Developmental and Comparative Immunology* 28:153-162
- Min WG, Lillehoj HS, Li GX, Sohn EJ, Miyamoto T (2002) Development and characterization of monoclonal antibodies to chicken interleukin-15. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88:49-56
- Min WI, Lillehoj HS (2002) Isolation and characterization of chicken interleukin-17 cDNA. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22:1123-1128
- Miyamoto T, Lillehoj HS, Sohn EJ, Min WG (2001) Production and characterization of monoclonal antibodies detecting chicken interleukin-2 and the development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80:245-257
- Miyamoto T, Min WG, Lillehoj HS (2002) Kinetics of interleukin-2 production in chickens infected with *Eimeria tenella*. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 25:149-158
- Møller AP (1995) Hormones, Handicaps and Bright Birds. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 121
- Møller AP, Alatalo RV (1999) Good-genes effects in sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:85-91

- Møller AP, Barbosa A, Cuervo JJ, de Lope F, Merino S, Saino N (1998) Sexual selection and tail streamers in the barn swallow. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:409-414
- Møller AP, Biard C, Blount JD, Houston DC, Ninni P, Saino N, Surai PF (2000) Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian and Poultry Biology Reviews* 11:137-159
- Møller AP, Christe P, Garamszegi LZ (2005) Coevolutionary arms races: increased host immune defense promotes specialization by avian fleas. *Journal of Evolutionary Biology* 18:46-59
- Møller AP, Christe P, Lux E (1999) Parasitism, host immune function, and sexual selection. *Quarterly Review of Biology* 74:3-20
- Møller AP, de Lope F, Saino N (2004) Parasitism, immunity, and arrival date in a migratory bird, the barn swallow. *Ecology* 85:206-219
- Møller AP, Erritzoe J (2000) Predation against birds with low immunocompetence. *Oecologia* 122:500-504
- Møller AP, Erritzoe J, Saino N (2003) Seasonal changes in immune response and parasite impact on hosts. *American Naturalist* 161:657-671
- Møller AP, Petrie M (2002) Condition dependence, multiple sexual signals, and immunocompetence in peacocks. *Behavioral Ecology* 13:248-253
- Møller AP, Rozsa L (2005) Parasite biodiversity and host defenses: chewing lice and immune response of their avian hosts. *Oecologia* 142:169-176
- Morales J, Moreno J, Merino S, Tomas G, Martinez J, Garamszegi LZ (2004) Associations between immune parameters, parasitism, and stress in breeding pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) females. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 82:1484-1492
- Moreno J, de Leon A, Fargallo JA, Moreno E (1998) Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. *Oecologia* 115:312-319
- Moriguchi S, Okishima N, Sumida S, Okamura K, Doi T, Kishino Y (1996) beta-carotene supplementation enhances lymphocyte proliferation with mitogens in human peripheral blood lymphocytes. *Nutrition Research* 16:211-218
- Motobu M, El Abasy M, Na KJ, Hirota Y (2002) Detection of mitogen-induced lymphocyte proliferation by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in the chicken. *Journal of Veterinary Medical Science* 64:377-379
- Mougeot F, Irvine JR, Seivwright L, Redpath SM, Piernney S (2004) Testosterone, immunocompetence, and honest sexual signaling in male red grouse. *Behavioral Ecology* 15:930-937
- Mougeot F, Redpath SM (2004) Sexual ornamentation relates to immune function in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Journal of Avian Biology* 35:425-433
- Mougeot F, Redpath SM, Leckie F (2005) Ultra-violet reflectance of male and female red grouse, *Lagopus lagopus scoticus*: sexual ornaments reflect nematode parasite intensity. *Journal of Avian Biology* 36:203-209
- Navarro C, Marzal A, de Lope F, Møller AP (2003) Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101:291-298
- Nishimichi N, Aosasa M, Kawashima T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H (2005) Generation of a mouse monoclonal antibody against chicken interleukin-6. *Hybridoma* 24:115-117
- Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L (1998) Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1291-1298
- Norris K, Evans MR (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* 11:19-26
- Nowak MA, Tarczyhorno K, Austyn JM (1992) The Optimal Number of Major Histocompatibility Complex-Molecules in An Individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10896-10899
- O'Regan MN, Parsons KR, Tregaskes CA, Young JR (1999) A chicken homologue of the co-stimulating molecule CD80 which binds to mammalian CTLA-4. *Immunogenetics* 49:68-71
- Ohlsson T, Smith HG, Raberg L, Hasselquist D (2002) Pheasant sexual ornaments reflect nutritional conditions during early growth. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:21-27

- Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA (2004) Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 27:255-272
- Olah I, Glick B (1995) Dendritic Cells in the Bursal Follicles and Germinal-Centers of the Chickens Cecal Tonsil Express Vimentin But Not Desmin. *Anatomical Record* 243:384-389
- Olson VA, Owens IPF (1998) Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution* 13:510-514
- Ormerod MG (2000) *Flow Cytometry: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford
- Ots I, Hõrak P (1998) Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* 116:441-448
- Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Hõrak P (2001) Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:1175-1181
- Ots I, Murumagi A, Hõrak P (1998) Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12:700-707
- Owen-Ashley NT, Hasselquist D, Wingfield JC (2004) Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: Unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *American Naturalist* 164:490-505
- Owens IPF, Short RV (1995) Hormones, Handicaps and Bright Birds - Reply. *Trends in Ecology & Evolution* 10:121-122
- Parker TH, Knapp R, Rosenfield JA (2002) Social mediation of sexually selected ornamentation and steroid hormone levels in male junglefowl. *Animal Behaviour* 64:291-298
- Parker TH, Ligon JD (2002) Dominant male red junglefowl (*Gallus gallus*) test the dominance status of other males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:20-24
- Parmentier HK, Abuzeid SY, Reilingh GD, Nieuwland MGB, Graat EAM (2001) Immune responses and resistance to *Eimeria acervulina* of chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poultry Science* 80:894-900
- Parmentier HK, Nieuwland MGB, Barwegen MW, Kwakkel RP, Schrama JW (1997) Dietary unsaturated fatty acids affect antibody responses and growth of chickens divergently selected for humoral responses to sheep red blood cells. *Poultry Science* 76:1164-1171
- Parmentier HK, Schrama JW, Meijer F, Nieuwland MGB (1993a) Cutaneous Hypersensitivity Responses in Chickens Divergently Selected for Antibody-Responses to Sheep Red-Blood-Cells. *Poultry Science* 72:1679-1692
- Parmentier HK, Schrama JW, Meijer F, Nieuwland MGB (1993b) Cutaneous hypersensitivity responses in chickens divergently selected for antibody-responses to sheep red-blood-cells. *Poultry Science* 72:1679-1692
- Parmentier HK, Siemonsma R, Nieuwland MGB (1994) Immune-responses to bovine serum-albumin in chicken lines divergently selected for antibody-responses to sheep red-blood-cells. *Poultry Science* 73:825-835
- Parsons KR, Young JR, Collins BA, Howard CJ (1996) Cattle CTLA-4, CD28 and chicken CD28 bind CD86: MYPPPY is not conserved in cattle CD28. *Immunogenetics* 43:388-391
- Pemberton J (2004) Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are the best. *Trends in Ecology & Evolution* 19:613-615
- Perez-Tris J, Carbonell R, Telleria JL (2002) Parasites and the blackcap's tail: implications for the evolution of feather ornaments. *Biological Journal of the Linnean Society* 76:481-492
- Perrier C, de Lope F, Møller AP, Ninni P (2002) Structural coloration and sexual selection in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Behavioral Ecology* 13:728-736
- Peters A (2000) Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:883-889
- Peters A, Astheimer LB, Boland CRJ, Cockburn A (2000) Testosterone is involved in acquisition and maintenance of sexually selected male plumage in superb fairy-wrens, *Malurus cyaneus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47:438-445
- Peters A, Delhey K, Denk AG, Kempenaers B (2004a) Trade-offs between immune investment and sexual signaling in male mallards. *American Naturalist* 164:51-59
- Peters A, Denk AG, Delhey K, Kempenaers B (2004b) Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1111-1120

- Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y, Goodchild MJ, Beal RK, Bumstead N, Young J, Smith AL (2005) Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 114:507-521
- Pialek J, Albrecht T (2005) Choosing mates: complementary versus compatible genes. *Trends in Ecology & Evolution* 20:63
- Piertney SB (2003) Major histocompatibility complex B-LB gene variation in red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Wildlife Biology* 9:251-259
- Poiani A, Goldsmith AR, Evans MR (2000) Ectoparasites of house sparrows (*Passer domesticus*): an experimental test of the immunocompetence handicap hypothesis and a new model. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47:230-242
- Raberg L, Grahn M, Hasselquist D, Svensson E (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1637-1641
- Raberg L, Stjernman M, Hasselquist D (2003) Immune responsiveness in adult blue tits: heritability and effects of nutritional status during ontogeny. *Oecologia* 136:360-364
- Rath NC, Huff GR, Balog JM, Huff WE (1998) Fluorescein isothiocyanate staining and characterization of avian heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64:83-95
- Rath NC, Huff WE, Bayyari GR, Balog JM (1995) Identification of Transforming Growth-Factor-Beta and Interleukin-6 in Chicken Ascites-Fluid. *Avian Diseases* 39:382-389
- Rautenschlein S, Sharma JM (1998) Avian Immunology: Cytokines. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 95-99
- Reeve HK, Pfennig DW (2003) Genetic biases for showy males: Are some genetic systems especially conducive to sexual selection? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1089-1094
- Richardson DS, Westerdahl H (2003) MHC diversity in two *Acrocephalus* species: the outbred Great reed warbler and the inbred Seychelles warbler. *Molecular Ecology* 12:3523-3529
- Rose ME, Hesketh P, Ogilvie BM (1979) Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. *Immunology* 36:71-79
- Rothwell L, Hamblin A, Kaiser P (2001) Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83:149-160
- Rothwell L, Young JR, Zoorob R, Whittaker CA, Hesketh P, Archer A, Smith AL, Kaiser P (2004) Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *Journal of Immunology* 173:2675-2682
- Rubolini D, Romano M, Boncoraglio G, Ferrari RP, Martinelli R, Galeotti P, Fasola M, Saino N (2005) Effects of elevated egg corticosterone levels on behavior, growth, and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Hormones and Behavior* 47:592-605
- Ruff MD, Reid WM, Johnson JK (1974) Lowered blood carotenoid levels in chickens infected with coccidia. *Poultry Science* 53:1801-1809
- Safran RJ, McGraw KJ (2004) Plumage coloration, not length or symmetry of tail-streamers, is a sexually selected trait in North American barn swallows. *Behavioral Ecology* 15:455-461
- Saino N, Ambrosini R, Martinelli R, Ninni P, Møller AP (2003a) Gape coloration reliably reflects immunocompetence of barn swallow (*Hirundo rustica*) nestlings. *Behavioral Ecology* 14:16-22
- Saino N, Bertacche V, Ferrari RP, Martinelli R, Møller AP, Stradi R (2002a) Carotenoid concentration in barn swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and paternal ornamentation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1729-1733
- Saino N, Calza S, Møller AP (1997) Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology* 66:827-836
- Saino N, Ferrari RP, Romano M, Martinelli R, Møller AP (2003b) Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:2485-2489
- Saino N, Ferrari RP, Martinelli R, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2002b) Early maternal effects mediated by immunity depend on sexual ornamentation of the male partner. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1005-1009
- Saino N, Ferrari RP, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2003c) Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Journal of Evolutionary Biology* 16:1127-1134

- Saino N, Incagli M, Martinelli R, Møller AP (2002c) Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* 13:169-174
- Saino N, Møller AP (1996) Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behavioral Ecology* 7:227-232
- Saino N, Møller AP, Bolzern AM (1995) Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (*Hirundo rustica*): An experimental test of the immunocompetence hypothesis. *Behavioral Ecology* 6:397-404
- Saino N, Romano M, Ferrari RP, Martinelli R, Møller AP (2003d) Maternal antibodies but not carotenoids in barn swallow eggs covary with embryo sex. *Journal of Evolutionary Biology* 16:516-522
- Saino N, Stradi R, Ninni P, Pini E, Møller AP (1999) Carotenoid plasma concentration, immune profile, and plumage ornamentation of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *American Naturalist* 154:441-448
- Saino N, Suffritti C, Martinelli R, Rubolini D, Møller AP (2003e) Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology* 14:318-325
- Saino N, Szep T, Ambrosini R, Romano M, Møller AP (2004) Ecological conditions during winter affect sexual selection and breeding in a migratory bird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:681-686
- Saks L. Immune function, parasites, and carotenoid-based ornaments in greenfinches. 2004. Institute of Zoology and Hydrobiology, Faculty of Biology and Geography, University of Tartu, Estonia. Dissertation.
- Saks L, Ots I, Hõrak P (2003) Carotenoid-based plumage coloration of male greenfinches reflects health and immunocompetence. *Oecologia* 134:301-307
- Schneider K, Klaas R, Kaspers B, Staeheli P (2001) Chicken interleukin-6 - cDNA structure and biological properties. *European Journal of Biochemistry* 268:4200-4206
- Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, Elvers S, Staeheli P, Kaspers B, Weining KC (2000) cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 20:879-883
- Schwarz H, Harlin O, Ohnemus A, Kaspers B, Staeheli P (2004) Synthesis of IFN-gamma by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24:179-184
- Senar JC, Domenech J, Camerino M (2005) Female siskins choose mates by the size of the yellow wing stripe. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57:465-469
- Senar JC, Figuerola J, Domenech J (2003) Plumage coloration and nutritional condition in the great tit *Parus major*: the roles of carotenoids and melanins differ. *Naturwissenschaften* 90:234-237
- Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11:317-321
- Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanabe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H (2004) Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions. *Journal of Immunology* 172:6751-6763
- Sick C, Schneider K, Staeheli P, Weining KC (2000) Novel chicken CXC and CC chemokines. *Cytokine* 12:181-186
- Sick C, Schultz U, Staeheli P (1996) A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *Journal of Biological Chemistry* 271:7635-7639
- Sijben JWC, de Groot H, Nieuwland MGB, Schrama JW, Parmentier HK (2000) Dietary linoleic acid divergently affects immune responsiveness of growing layer hens. *Poultry Science* 79:1106-1115
- Siva-Jothy MT, Ryder JJ (2001) Assaying PHA-induced mitosis: out of control? *Functional Ecology* 15:813-814
- Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL (1999) Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* 13:567-572
- Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL (2001) Measurement repeatability and the use of controls in PHA assays: Reply. *Functional Ecology* 15:814-817
- Sorci G, Soler JJ, Møller AP (1997) Reduced immunocompetence of nestlings in replacement clutches of the European magpie (*Pica pica*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1593-1598

- Sowder JT, Chen CLH, Ager LL, Chan MM, Cooper MD (1988) A Large Subpopulation of Avian T-Cells Express A Homolog of the Mammalian T-Gamma/Delta Receptor. *Journal of Experimental Medicine* 167:315-322
- Spencer KA, Buchanan KL, Goldsmith AR, Catchpole CK (2003) Song as an honest signal of developmental stress in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Hormones and Behavior* 44: 132-139
- Staheli P, Puehler F, Schneider K, Gobel TW, Kaspers B (2001) Cytokines of birds: Conserved functions - A largely different look. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 21:993-1010
- Sundick RS, GillDixon C (1997) A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *Journal of Immunology* 159:720-725
- Svensson E, Raberg L, Koch C, Hasselquist D (1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology* 12:912-919
- Swaddle JP (1996) Reproductive success and symmetry in zebra finches. *Animal Behaviour* 51: 203-210
- Tella JL, Bortolotti GR, Forero MG, Dawson RD (2000) Environmental and genetic variation in T-cell-mediated immune response of fledgling American kestrels. *Oecologia* 123:453-459
- Tella JL, Figuerola J, Negro JJ, Blanco G, Rodriguez-Estrella R, Forero MG, Blazquez MC, Green AJ, Hiraldo F (2004) Ecological, morphological and phylogenetic correlates of interspecific variation in plasma carotenoid concentration in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 156-164
- Tella JL, Forero MG, Bertelotti M, Donazar JA, Blanco G, Ceballos O (2001) Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: a multiscale approach. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:1455-1461
- Tella JL, Scheuerlein A, Ricklefs RE (2002) Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1059-1066
- Thompson CW, Hillgarth N, Leu M, McClure HE (1997) High parasite load in house finches (*Carpodacus mexicanus*) is correlated with reduced expression of a sexually selected trait. *American Naturalist* 149:270-294
- Ticona A, Penna TJP (2003) Simulation of zahavi's handicap principle. *Brazilian Journal of Physics* 33:619-622
- Tomkins JL, Radwan J, Kotiaho JS, Tregenza T (2004) Genic capture and resolving the lek paradox. *Trends in Ecology & Evolution* 19:323-328
- Trivers RL (1972) Parental investment and sexual selection. In: Campbell B (ed) *Sexual Selection and the Descent of Man, 1871-1971* Aldine Publishing Company, Chicago, pp 136-179
- Tschirren B, Fitze PS, Richner H (2003) Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* 72:839-845
- Vainio O, Imhof BA (1995) The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunology Today* 16:365-370
- Vainio O, Veromaa T, Eerola E, Toivanen P, Ratcliffe MJH (1988) Antigen-Presenting Cell-T Cell-Interaction in the Chicken Is Mhc Class-II Antigen Restricted. *Journal of Immunology* 140:2864-2868
- Vershinin A (1999) Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *Biofactors* 10: 99-104
- von Schantz T, Wittzell H, Goransson G, Grahn M (1997) Mate choice, male condition-dependent ornamentation and MHC in the pheasant. *Hereditas* 127:133-140
- von Schantz T, Wittzell H, Goransson G, Grahn M, Persson K (1996) MHC genotype and male ornamentation: Genetic evidence for the Hamilton-Zuk model. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263:265-271
- Votýpka J, Simek J, Tryjanowski P (2003) Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici* 40:431-439
- Waas JR, Wordsworth AF (1999) Female zebra finches prefer symmetrically banded males, but only during interactive mate choice tests. *Animal Behaviour* 57:1113-1119
- Wakenell PS (1998) Avian Immunology: Immunocompetence of the embryo and the newly-hatched chick. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 104-105
- Wedekind C, Penn D (2000) MHC genes, body odours, and odour preferences. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15:1269-1271

- Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P (1998) A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *European Journal of Biochemistry* 258:994-1000
- Westerdahl H (2004) No evidence of an MHC-based female mating preference in great reed warblers. *Molecular Ecology* 13:2465-2470
- Westerdahl H, Wittzell H, von Schantz T (2000) Mhc diversity in two passerine birds: no evidence for a minimal essential Mhc. *Immunogenetics* 52:92-100
- Westerdahl H, Wittzell H, von Schantz T, Bensch S (2004) MHC class I typing in a songbird with numerous loci and high polymorphism using motif-specific PCR and DGGE. *Heredity* 92: 534-542
- Westneat DF, Birkhead TR (1998) Alternative hypotheses linking the immune system and mate choice for good genes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1065-1073
- Westneat DF, Hasselquist D, Wingfield JC (2003) Tests of association between the humoral immune response of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) and male plumage, testosterone, or reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:315-323
- Westneat DF, Weiskittle J, Edenfield R, Kinnard TB, Poston JP (2004) Correlates of cell-mediated immunity in nestling house sparrows. *Oecologia* 141:17-23
- Williams TD, Christians JK, Aiken JJ, Evanson M (1999) Enhanced immune function does not depress reproductive output. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:753-757
- Wittzell H, Madsen T, Westerdahl H, Shine R, von Schantz T (1998) MHC variation in birds and reptiles. *Genetica* 104:301-309
- Yilmaz A, Shen SX, Adelson DL, Xavier S, Zhu JJ (2005) Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics* 56:743-753
- Young JR, Davison TF, Tregaskes CA, Rennie MC, Vainio O (1994) Monomeric Homolog of Mammalian Cd28 Is Expressed on Chicken T-Cells. *Journal of Immunology* 152:3848-3851
- Young RL, Badyaev AV (2004) Evolution of sex-biased maternal effects in birds: I. Sex-specific resource allocation among simultaneously growing oocytes. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1355-1366
- Zahavi A (1975) Mate selection - a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 67: 603-605
- Zelano B, Edwards SV (2002) An Mhc component to kin recognition and mate choice in birds: Predictions, progress, and prospects. *American Naturalist* 160:S225-S237
- Zhou H, Buitenhuis AJ, Weigend S, Lamont SJ (2001) Candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: Interferon-gamma, interleukin-2, and immunoglobulin light chain. *Poultry Science* 80:1679-1689
- Zhou HJ, Lamont SJ (2003) Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. *Immunogenetics* 55:133-140
- Zhou JY, Chen JG, Wang JY, Wu JX, Gong H (2005a) cDNA cloning and functional analysis of goose interleukin-2. *Cytokine* 30:328-338
- Zhou JY, Wang JY, Chen JG, Wu JX, Gong H, Teng QY, Guo JQ, Shen HG (2005b) Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin-2. *Molecular Immunology* 42:589-598
- Zrzavý J, Storch D, Mihulka S (2004) Jak se dělá evoluce. L.Horáček - Paseka, Praha
- Zuckermann FA (1999) Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72:55-66
- Zuk M (1996) Disease, endocrine-immune interactions, and sexual selection. *Ecology* 77:1037-1042
- Zuk M, Johnsen TS (1998) Seasonal changes in the relationship between ornamentation and immune response in red jungle fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1631-1635
- Zuk M, Johnsen TS, Maclarty T (1995) Endocrine-Immune Interactions, Ornaments and Mate Choice in Red Jungle Fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 260:205-210

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.6.1/1: Základní metodický popis vybraných prací využívajících PHA-kožní test.

druh	PHA (mg)	stáří	PHA (mg)	konc (mg PHA / ml PBS)	místo injekce	„kontrola“	senzitizační injekce	přesnost měření (v mm)	počet měření	čas kontroly (h)	citace
Sphenisciformes											
<i>Pygoscelis antarctica</i>	0,1	ad	1	membrána mezi prsty na noze	ano	ne	0,01	5	27,9	Moreno et al. (1998)	
<i>Spheniscus magellanicus</i>	0,2	pull.	2	membrána mezi prsty na noze	ne	ne	0,001	3	24	Tella et al. (2001)	
Ciconiiformes											
<i>Ciconia ciconia</i>	0,2	37-67 dní	2	membrána mezi prsty na noze	ne	ne	0,001	3	24	Jovani et al. (2004)	
Falconiformes											
<i>Falco sparverius</i>	0,05	22 dní	1	patagium	ano	ne	0,001	4	24	Tella et al. (2000)	
Galliformes											
<i>Gallus domesticus</i>	0,2	16 týdnů	0,2	patagium	ano	ne	?	?	24	El Lethey et al. (2003)	
<i>Gallus domesticus</i>	0,075	48-141 dní	0,0075-0,75	patagium	ano	ne	?	?	různé	Goto et al. (1978)	
<i>Gallus domesticus</i>	1	26-30 týdnů	10	patagium	ano	ne	?	?	24	Cheng & Lamont (1988)	
<i>Gallus domesticus</i>	1,25	11 týdnů	10	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Lamont & Smyth (1984)	
<i>Gallus domesticus</i>	0,1	12-20 týdnů	1	patagium	ano	ne	?	?	24	McCorkle et al. (1980)	
<i>Gallus domesticus</i>	0,1	6-9 měsíců	1	patagium	ne	ne	?	?	24	Parmentier et al. (1993b)	
<i>Gallus gallus</i>	0,1	ad samci	1	patagium	ne	ne	0,01	3	6 a 24	Zuk & Johnsen (1998)	
<i>Lagopus lagopus scoticus</i>	0,2	ad samci	2	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Mougeot & Redpath (2004)	
<i>Lagopus lagopus scoticus</i>	0,2	ad samci	2	patagium	ano	ne	0,01	4	24	Mougeot et al. (2004)	
<i>Pavo cristatus</i>	0,2	ad samci	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Møller & Petrie (2002)	
<i>Phasianus colchicus</i>	1	ad samci	10	patagium	ne	ne	0,01	3	24	Ohlsson et al. (2002)	

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.6.1/1 - pokračování

druh	stáří	PHA (mg)	konc. (mg PHA / ml PBS)	místo injekce	„kontrola“	senzitivizační injekce	přesnost měření (v mm)	počet měření	čas kontroly (h)	citace
Passeriformes										
<i>Carduelis chloris</i>	ad samci	0,2	5	patagium	ne	ne	0,01	3	24	Saks et al. (2003)
<i>Delichon urbica</i>	15 dní	0,625	5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Christe et al. (2001)
<i>Delichon urbica</i>	15 dní	0,625	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Christe et al. (2000)
<i>Delichon urbica</i>	15 dní	0,2	4	patagium	ne	ne	0,01	?	24	Marzal et al. (2005)
<i>Delichon urbica</i>	12 dní	0,02	0,5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Merino et al. (1999)
<i>Emberiza schoeniclus</i>	7 dní	0,1	5	patagium	ano	ano	0,01	1 - 2	24	Kleven & Liffield (2004)
<i>Ficedula hypoleuca</i>	ad samice	0,2	5	patagium	ne	ne	0,01	3	24	Morales et al. (2004)
<i>Hirundo rustica</i>	12 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Cadeé (2000)
<i>Hirundo rustica</i>	ad	0,2	4	patagium	ano	ne	0,01	?	12 a 24	Møller et al. (2004)
<i>Hirundo rustica</i>	hnízdící samci	0,2	5	patagium	ano	ne	?	?	24	Saino et al. (2002c)
<i>Hirundo rustica</i>	12 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	?	?	24	Saino et al. (2003e)
<i>Hirundo rustica</i>	12 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Saino et al. (2003a)
<i>Hirundo rustica</i>	12 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Saino et al. (1997)
<i>Hirundo rustica</i>	12 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	?	?	24	Saino et al. (2003b)
<i>Junco hyemalis</i>	ad samci	0,25	5	patagium	ano	ano	0,025	?	24 a 48	Casto et al. (2001)
<i>Luscinia svecica</i>	7 dní	0,1	2,5	patagium	ano	ano	0,01	2	24	Johnsen et al. (2000)
<i>Melospiza melodia</i>	ad samci	0,025	0,5	patagium	ne	ne	0,01	5	24 a 48	Owen-Ashley et al. (2004)
<i>Parus major</i>	8 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Hórák et al. (1999)
<i>Parus major</i>	8 dní	0,2	5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Hórák et al. (2000)
<i>Passer domesticus</i>	ad	0,025	0,625	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Bonneaud et al. (2003)
<i>Passer domesticus</i>	ad samci	0,25	5	patagium	ano	ne	?	3	6 a 24	Buchanan et al. (2003)
<i>Passer domesticus</i>	jednoletí samci	0,025	0,625	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Gonzalez et al. (1999)
<i>Passer domesticus</i>	ad	0,2	4	patagium	ano	ne	0,01	?	různé	Navarro et al. (2003)
<i>Passer domesticus</i>	9 dní	0,04	1	patagium	ne	ano	0,01	4	24	Westneat et al. (2004)
<i>Pica pica</i>	15-18 dní	0,5	5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Sorci et al. (1997)

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.6.1/1 - pokračování

druh	stáří	PHA (mg)	konc. (mg PHA / ml PBS)	místo injekce	„kontrola“	senzitivizační injekce	přesnost měření (v mm)	počet měření	čas kontroly (h)	citace
<i>Serinus serinus</i>	9 dní	0,5	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Hoi-Leitner et al. (2001)
<i>Sturnus vulgaris</i>	11 dní	1	10	patagium	PHA dvakrát	ne	0,001	3	24	Granbom et al. (2005)
<i>Taeniopygia guttata</i>	11-13 dní	0,2	10	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Birkhead et al. (1999)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,05	2,5	patagium	ano	ne	0,01	2	24	Blount et al. (2003b)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,015	0,5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Ewenson et al. (2001)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,015	0,5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Ewenson et al. (2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,15	5	patagium	ne	ne	0,05	3	24	McGraw & Ardia (2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,15	5	patagium	ne	ne	0,01	3	24	McGraw & Ardia (2004)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,15	5	patagium	ne	ne	0,05	3	24	McGraw & Ardia (2005)
<i>Tachycineta bicolor</i>	ad	0,2	5	patagium	ano	ne	0,05	2	24	Liffeld et al. (2002)
<i>Tachycineta bicolor</i>	15 dní	0,06	2	patagium	ano	ne	?	?	24	Lozano & Ydenberg (2002)
<i>Turdus merula</i>	ad samci	1,25	10	patagium	ano	ne	0,01	2	24	Faivre et al. (2003b)
různé druhy	různé	0,2	4	patagium	ano	ne	0,01	3	6 a 24	Garamszegi et al. (2003)
různé druhy	různé	0,5	5	patagium	ano	ne	0,01	?	24	Blount et al. (2003a)
různé druhy	pull.	0,02	0,5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Møller & Rozsa (2005)
různé druhy	různé	0,2	4	patagium	ano	ne	0,01	?	6	Møller et al. (2003)
různé druhy	různé	0,02	0,5	patagium	ano	ne	0,01	3	24	Møller et al. (2005)

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.7.2/1: Výběr prací využívajících stanovení hladiny protilátek v krvi.

druh	stáří	zaměření výzkumu	imunizace	aplikace imunizační injekce	metoda stanovení protilátek	citace
Anseriformes						
<i>Anas platyrhynchos</i>	ad samci	signální význam žlutého zbarvení zobáku v souvislosti s imunitou a kvalitou spermií	SRBC	intrapéritoneálně	hemaglutinace	Peters et al. (2004b)
<i>Anas platyrhynchos</i>	ad samci	vztah imunity a karotenoidů a testosteronu k tvorbě pohlavního znaku	SRBC	intrapéritoneálně	hemaglutinace	Peters et al. (2004a)
Galliformes						
<i>Gallus domesticus</i>	11 týdnů	vliv stresu a kortikosteronu na imunitu	lidský serumalbumin (HSA)	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	El-Lethey et al. (2003)
<i>Gallus domesticus</i>	11 týdnů	vliv stresu a kortikosteronu na imunitu	SRBC	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	El-Lethey et al. (2003)
<i>Gallus domesticus</i>	11 týdnů	vliv stresu a kortikosteronu na imunitu	toxin tetanu	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	El-Lethey et al. (2003)
<i>Gallus domesticus</i>	19 dní	vliv mastných kyselin v potravě na imunitní reakce	SRBC	?	hemaglutinace	Fritsche et al. (1991)
<i>Gallus domesticus</i>	33 dní	vliv chladu na imunitní systém	KLH	subkutánně	ELISA	Hangalapura et al. (2003)
<i>Gallus domesticus</i>	26 dní	vliv chladu na imunitní systém	KLH	subkutánně	ELISA	Hangalapura et al. (2004)
<i>Gallus domesticus</i>	po 6. týdnu	vliv MHC na imunitní reakce	Mycoplasma gallisepticum	subkutánně, intramuskulárně	ELISA	Cheng & Lamont (1988)
<i>Gallus domesticus</i>	po 6. týdnu	vliv MHC na imunitní reakce	Pasteurella multocida	subkutánně, intramuskulárně	ELISA	Cheng & Lamont (1988)
<i>Gallus domesticus</i>	po 6. týdnu	vliv MHC na imunitní reakce	vakcína viru infekční bursální choroby (IBD)	subkutánně, intramuskulárně	ELISA	Cheng & Lamont (1988)
<i>Gallus domesticus</i>	35 dní	vliv složení diety na imunitní systém	SRBC	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Parmentier et al. (1997)
<i>Gallus domesticus</i>	ad samci	vliv genetického pozadí na rezistenci vůči parazitům	Eimeria acervulina	intrapéritoneálně	ELISA	Parmentier et al. (2001)

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.7.2/1 - pokračování

druh	stáří	zaměření výzkumu	imunizace	aplikace imunizační injekce	metoda stanovení protilátek	citace
<i>Gallus domesticus</i>	35 dní	vliv složení diety na imunitní systém	KLH	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Sijben et al. (2000)
<i>Gallus domesticus</i>	35 dní	vliv složení diety na imunitní systém	Mycobacterium butyricum	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Sijben et al. (2000)
<i>Pavo cristatus</i>	ad samci	vztah kondice, imunitních parametrů a mnohočetného pohlavního ornamentu	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Møller & Petrie (2002)
<i>Phasianus colchicus</i>	ad samci	vliv diety na délku ocasních per	vakcína diphtheria- tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Ohlsson et al. (2002)
Passeriformes						
<i>Agelaius phoeniceus</i>	ad	vliv testosteronu na humorální imunitu	KLH	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Hasselquist et al. (1999)
<i>Agelaius phoeniceus</i>	ad samci	vztah zbarvení, humorální imunity a testosteronu	vakcína diphtheria- tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Westneat et al. (2003)
<i>Carduelis chloris</i>	různé	charakterizace fyziologických změn v důsledku imunitní odpovědi	SRBC	intramuskulárně do prsního svalu	?	Hörak et al. (2003)
<i>Carduelis chloris</i>	ad samci	závislost zbarvení na imunokompetenci	SRBC	intramuskulárně do prsního svalu	hemaglutinace	Saks et al. (2003)
<i>Ficedula albicollis</i>	ad samice	vliv reprodukčního úsilí na imunitní odpovídavost	vakcína viru Newcastleské choroby	subkutánně	ELISA	Nordling et al. (1998)
<i>Ficedula hypoleuca</i>	ad samice	vliv stimulace imunitního systému na reprodukční investice	vakcína diphtheria- tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Ilmonen et al. (2000)
<i>Hirundo rustica</i>	ad samice	vliv kvality partnera na alokacimaternálních protilátek	vakcína viru Newcastleské choroby	subkutánně	ELISA	Saino et al. (2002b)
<i>Hirundo rustica</i>	ad	vliv senescence an imunitu	vakcína viru Newcastleské choroby	subkutánně	ELISA	Saino et al. (2003c)
<i>Junco hyemalis</i>	ad samci	vliv testosteronu na imunitní systém	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Casto et al. (2001)
<i>Malurus cyaneus</i>	ad	vliv testosteronu na imunosupresi	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Peters (2000)
<i>Melospiza melodia</i>	ad samci	vliv testosteronu na buněčnou i humorální imunitu	vakcína diphtheria- tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Owen-Ashley et al. (2004)

XIV PŘÍLOHY — Tabulka VI.7.2/1 - pokračování

druh	stáří	zaměření výzkumu	imunizace	aplikace imunizační injekce	metoda stanovení protilátek	citace
<i>Parus caeruleus</i>	ad	genetická a nutriční závislost intenzity imunitní odpovědi	vakcína diphtheria-tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Raberg et al. (2003)
<i>Parus caeruleus</i>	ad	vliv aktivity imunitního systému na energetické výdaje organismu	vakcína diphtheria-tetanus	intramuskulárně do prsního svalu	ELISA	Svensson et al. (1998)
<i>Passer domesticus</i>	ad	vliv imunitní odpovědi na kondici, aktivitu a reprodukční úspěch	LPS	intraperitoneálně	ELISA	Bonneaud et al. (2003)
<i>Passer domesticus</i>	ad samci	vliv testosteronu na imunosupresi	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Buchanan et al. (2003)
<i>Passer domesticus</i>	ad samci	vztah melaninového zbarvení a imunokompetence	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Evans et al. (2000)
<i>Passer domesticus</i>	jednoletí samci	vztah melaninového zbarvení, potravy a imunokompetence	SRBC	intraperitoneálně	densitometrická analýza elektroforetický separovaných proteinů z krevní plasmy	Gonzalez et al. (1999)
<i>Serinus serinus</i>	9 dní	vliv potravy na imunitní odpověď	SRBC	intraperitoneálně	densitometrická analýza elektroforetický separovaných proteinů z krevní plasmy	Hoi-Leitner et al. (2001)
<i>Sturnus vulgaris</i>	ad samice	vliv stimulace imunitního systému na reprodukční investice	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Williams et al. (1999)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	vliv reprodukčního úsilí na imunitní odpovědnost	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Deerenberg et al. (1997)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	vliv karotenoidů v potravě na zbarvení zobáku a imunitu	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	McGraw & Ardia (2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	imunologické rozdíly mezi pohlavími a vliv karotenoidů na imunitu	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	McGraw & Ardia (2005)
<i>Tachycineta bicolor</i>	15 dní	vliv maternální alokace protilátek na imunitu mláďat	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Lozano & Ydenberg (2002)
<i>Turdus merula</i>	ad samci	vztah zbarvení zobáku a imunokompetence	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Faivre et al. (2003b)
různé druhy	různé	vliv ekologie druhu na imunologické parametry	SRBC	intraperitoneálně	hemaglutinace	Blount et al. (2003a)
různé druhy	různé	použitelnost antikuřeční-Ig protilátek při ELISA jiných druhů	ne	ne	ELISA, elektroforéza, Western blotting	Martinez et al. (2003)