

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Barbora Bílková

Variabilita zdravotního stavu myši v rámci hybridní zóny *Mus musculus musculus* a  
*Mus musculus domesticus*

Variability in health state of mice in *Mus musculus musculus* and  
*Mus musculus domesticus* hybrid zone

Diplomová práce

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

Konzultant práce: prom. biol. Jaroslav Piálek, CSc.

Praha 2014

# Prohlášení

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci se skupinou Dr. Jaroslava Piálka z Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i. detašované pracoviště Studenec, skupinou Prof. Miloše Macholána z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a skupinou Prof. Vladimíra Holáně z Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.. Přestože hlavní podíl práce jsem zpracovávala samostatně, na této práci se vzhledem k její náročnosti a rozsahu podíleli i další spolupracovníci. Některá data, která jsem v rámci této diplomové práce zpracovávala, pocházela z terénních prací provedených v hybridní zóně v letech 2007, 2008 a 2009, kterých jsem se osobně neúčastnila. Podíl ostatních spolupracovníků na jednotlivých částech diplomové práce je zmíněn v poděkování.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovávala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze dne 8. 8. 2014

Bc. Barbora Bílková

# Abstrakt

Hybridní zóna myši domácí je dlouhodobě sledovaným komplexem jedinců poddruhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a jejich hybridů. Tato hybridní zóna je považována za tenzní zónu, která je udržována rovnováhou mezi disperzí jedinců ke středu hybridní zóny a negativní selekcí působící proti hybridním jedincům. Jedním ze selekčních faktorů udržujících tenzní zónu může být snížená rezistence hybridních jedinců k parazitárním nákazám. V této práci porovnávám variabilitu ve zdravotním stavu myší v rámci hybridní zóny myši domácí pomocí hematologických znaků a otokového kožního testu. Otokový kožní test je metoda měření prozánětlivé imunitní reakce. Protože doposud používaná metodika tohoto testu neumožňovala jasnou interpretaci výsledků, v této práci jsme se zaměřili i na optimalizaci této metody. Zjistili jsme, že použití konkanavalinu A (ConA) je u myší mnohem vhodnější než aplikace doposud používaného fytohemaglutininu (PHA). Porovnání zdravotního stavu pomocí hematologických metod i otokového kožního testu shodně ukázalo, že poddruh *M. m. musculus* má předpoklady pro zvýšenou schopnost anti-parazitární rezistence oproti poddruhu *M. m. domesticus*. Hematologické vyšetření dále ukazuje, že hybridní jedinci jsou v lepším zdravotním stavu oproti rodičovským poddruhům. Naše výsledky tedy podporují hypotézu hybridní rezistence. Parazity zprostředkovaná selekce patrně nehraje významnou roli v udržování stability hybridní zóny mezi oběma poddruhy.

**Klíčová slova:** hematologie, hybridizace, parazit, speciace, zánět, rezistence, konkanavalin A, fytohemaglutinin, ConA, PHA, otokový kožní test

# Abstract

House mouse hybrid zone is a complex of subspecies *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* and their hybrids. This hybrid zone is considered as a tension zone, maintained by balance between dispersion of individuals towards the zone center and negative selection against the hybrids. Decreased anti-parasite resistance could be one of selective factors which maintain the hybrid zone. In this thesis, I use hematological methods and skin-swelling test to compare variability in mouse health state within the house mouse hybrid zone. The skin-swelling test is a method measuring pro-inflammatory immune responsiveness. Since the commonly adopted method to perform this test does not allow clear interpretation of the test results, in this thesis I also aim to optimise the test protocol. I found that utilization of concanavalin A (ConA) is more suitable in mice than application of the commonly used phytohemagglutinin (PHA). Assessment of health state of mice by both hematological methods and skin-swelling test consistently indicates increased ability of anti-parasitic resistance in the subspecies *M. m. musculus* compared to subspecies *M. m. domesticus*. Hematological examination further shows better health state of hybrid individuals compared to parental subspecies. Our results support hybrid resistance hypothesis. Parasite mediated selection most likely does not play significant role in maintaining stability of hybrid zone between the two subspecies.

**Key words:** haematology, hybridisation, parasite, speciation, inflammation, resistance, Concanavalin A, Phytohemagglutinin, ConA, PHA, skin-swelling test

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>7</b>
1.1 Hematologie a vyšetření zdravotního stavu .....	9
1.2 Zánětlivá reakce .....	12
1.3 Hybridní zóny .....	13
1.4 Vznik hybridní zóny myši domácí .....	15
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>17</b>
<b>3 Hematologické parametry inbredních linií .....</b>	<b>18</b>
3.1 Metodika .....	18
3.1.1 Zvířata.....	18
3.1.2 Hematologie.....	19
3.1.3 Statistická analýza .....	20
3.2 Výsledky .....	21
3.3 Diskuze .....	29
<b>4 Hematologické parametry v hybridní zóně.....</b>	<b>32</b>
4.1 Metodika .....	33
4.1.1 Zvířata.....	33
4.1.2 Hematologie.....	34
4.1.3 Vyšetření parazitů.....	34
4.1.4 Stanovení hybridního indexu.....	34
4.1.5 Statistická analýza .....	34
4.2 Výsledky .....	37
4.3 Diskuze .....	41
<b>5 Otokový kožní test: ConA vs. PHA .....</b>	<b>48</b>

5.1	Metodika .....	48
5.1.1	Zvířata.....	48
5.1.2	Plán pokusu.....	48
5.1.3	Histologie a hematologie .....	49
5.1.4	Expresy cytokinů .....	50
5.1.5	Statistická analýza .....	50
5.2	Výsledky .....	51
5.3	Diskuze .....	56
<b>6</b>	<b>Prozánělivá reakce v rámci hybridní zóny .....</b>	<b>60</b>
6.1	Metodika .....	60
6.1.1	Zvířata.....	60
6.1.2	Plán pokusu.....	60
6.1.3	Statistická analýza .....	61
6.2	Výsledky .....	61
6.3	Diskuze .....	62
	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
	<b>Poděkování.....</b>	<b>67</b>
	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>68</b>
	<b>Seznam grafů .....</b>	<b>69</b>
	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>70</b>
	<b>Literatura .....</b>	<b>71</b>
	<b>Přílohy .....</b>	<b>83</b>

# 1 Úvod

Parazité jsou organismy, které napadají hostitelské jedince, žijí na jejich úkor a zhoršují jejich zdravotní stav (Windsor, 1998). Zdravotní stav jedince ovlivňuje zásadně schopnost přežívání a tedy i reprodukční zdatnost jedince – fitness. Jedinec napadený parazitem je tedy oproti zdravému jedinci znevýhodněn. Proto je pro hostitele naprosto zásadní účinná obrana proti parazitárním nákazám. Rozdílná schopnost kompetice zdravých jedinců s lepší schopností parazitům odolávat a jedinců nemocných je základem takzvané parazity zprostředkované selekce (Schmid-Hempel, 2011). Tato selekce by měla u hostitelského druhu vést k tvorbě adaptací imunitního systému účinných ke spektru parazitů, kteří se vyskytují v daném ekologickém kontextu. Těmto adaptacím se každý parazit neustále přizpůsobuje tak, aby mohl hostitele i nadále využívat a tak je hostitelský druh se svými parazity v neustálé koevoluci. Tato koevoluce se obvykle označuje jako evoluční „závody ve zbrojení“ (Dawkins and Krebs, 1979; Woolhouse et al., 2002). Tyto závody ve zbrojení plně zapadají do kontextu hypotézy Červené královny, která vysvětluje vznik extrémní variability v rámci hostitelských a parazitických druhů jejich vzájemnou koevolucí. Variabilita je dle této teorie adaptací hostitele, která znemožňuje parazitům napadat všechny jedince v populaci (Decaestecker et al., 2007; Gandon et al., 2008; Woolhouse et al., 2002). Závody ve zbrojení a evoluce ve smyslu Červené královny jsou však některými autory oddělovány (Gandon et al., 2008; Woolhouse et al., 2002). Interakce mezi hostitelem a parazitem zásadně ovlivňuje evoluci obou antagonistických druhů. Pokud se dva hostitelské druhy vyvíjí odděleně, pak je obvykle odlišná i jejich evoluční historie střetů s parazity. V takovém případě dochází u hostitelských druhů k odlišným adaptacím, které vedou k optimálnímu přizpůsobení imunitního systému k parazitům jednotlivých druhů. Tímto způsobem může koevoluce s parazity vést k diferenciaci druhů a mezidruhové variabilitě (Kvac et al., 2013; Thornhill and Fincher, 2013).

Odlišnost ve schopnosti jedinců odolávat parazitům lze po infekci pozorovat jako míru změny zdravotního stavu. Nejvhodnějšími indikátory zdravotního stavu jsou samozřejmě znaky, které přímo souvisí s aktivitou imunitního systému. Mnohé změny imunologických indikátorů zdravotního stavu jsou specifické pro určité typy parazitů a v případě infekce jinými druhy parazitů zůstávají beze změny. V případech, kdy klíčový typ parazita z hlediska parazity zprostředkované selekce není znám, je lepší využít obecné znaky indikující porušení homeostázy na systémové úrovni. Proto je vhodné k určování zdravotního stavu používat

například hematologické metody. Krev je totiž transportní médium organismu a do složení krve se určitou měrou promítají prakticky veškeré zásadní změny zdravotního stavu (Davis et al., 2008). Bílé krvinky, leukocyty, jsou hlavními efektorovými buňkami imunitního systému a jejich množství a zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi může indikovat závažnost a typ parazitární nákazy. Hematologické vyšetření proto může dát dobré první vodítko pro posouzení obecného zdravotního stavu jedince. Jeho nedostatkem je ovšem skutečnost, že rozbor krve pouze popisuje aktuální stav, ale nedokáže určit příčinu rozdílů mezi jedinci. Výhodou je proto kombinovat hematologická data přímo se základním parazitologickým vyšetřením. Abychom však byli schopni identifikovat rozdíly v imunoreaktivitě mezi jedinci a určit tak imunologické adaptace jednotlivých druhů, je potřeba provést funkční testy. Ty je již potřeba provádět cíleně s ohledem na určitou vybranou skupinu parazitů. V obecné rovině lze velice hrubě parazity obratlovců rozdělit na dvě velké skupiny, tj. na parazity k jejichž eliminaci vedou adaptace protilátkové odpovědi (imunologické mechanismy typu Th2) a na ty, které účinně eliminuje zánětlivá reakce (imunologické mechanismy typu Th1 a Th17) (Finlay et al., 2014; Xiong et al., 2014). Vzhledem k negativní regulaci jednotlivých složek adaptivní imunity přitom může intenzivní zánětlivá reakce indikovat jak účelné adaptace Th1 a Th17 imunity, tak i maladaptace a selhání Th2 imunity. Proto je další vhodnou metodou pro iniciační výzkum druhově specifických evolučních adaptací měření intenzity experimentálně navozené zánětlivé reakce.

V hybridních zónách pozorujeme křížení dříve oddělených populací či druhů, u kterých mohlo dojít k rozrušení imunitního systému právě vlivem parazity zprostředkované selekce (Mouliá and Joly, 2008). Podle hypotézy Dobzhanského a Müllera může postupné hromadění změn vést k inkompatibilitám druhů a zhoršení biologické zdatnosti hybridních jedinců (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1936; Muller, 1942). Bylo formulováno několik hypotéz, které předpokládají vliv hybridizace na schopnost anti-parazitární rezistence jedinců. Faktických příkladů potvrzujících jednotlivé hypotézy je však jen velmi málo (Fritz et al., 1994; Mouliá, 1999). Vliv hybridizace na fenotypové vlastnosti volně žijících jedinců je výhodné studovat v podmínkách geograficky definované hybridní zóny. Pravděpodobně nejstudovanější savčí hybridní zónou je hybridní zóna myši domácí, vznikající mezi poddruhy *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*. Přestože již tato hybridní zóna byla zkoumána i z hlediska anti-parazitární rezistence, výsledky jsou prozatím rozporuplné (Baird et al., 2012; Mouliá et al., 1991; Sage et al., 1986). Studován byl přitom pouze efekt hybridizace na výskyt a prevalenci různých vybraných druhů parazitů a nikoliv efekt na celkový zdravotní stav.

V této práci jsem se proto zaměřila na stanovení zdravotního stavu a imunologické reaktivity myši v této hybridní zóně a to především ve vztahu k rezistenci vůči helmintárním parazitům, kteří patří mezi nejlépe prostudované parazity myši (pojmem helmint jsou v této práci označováni mnohobuněční endoparazité).

## 1.1 Hematologie a vyšetření zdravotního stavu

Hematologické parametry, jsou považovány za vhodné znaky odrážející zdravotní stav jedinců (Chamond et al., 2010; da Silva et al., 2012). V ekologických studiích jsou používány především technicky a metodicky nenáročné metody, které lze využít při práci v terénních podmínkách (Davis and Maerz, 2008; Davis et al., 2008; Salvante, 2006). Patří mezi ně především určení hematokritu, absolutního počtu erytrocytů, leukocytů a absolutního a diferenciálního počtu jednotlivých typů leukocytů (Davis et al., 2008). K analýze většiny těchto parametrů se používá světelné mikroskopie, vyžadují tedy minimální technické zázemí.

Erytrocyty, tedy červené krvinky, jsou nejpočetnějšími buňkami v krvi obratlovců (u laboratorního kmene myši C57BL/6 zhruba  $9-10 \times 10^6 / \mu\text{L}$  krve; Klempt et al., 2006). Jejich hlavní funkcí je přenos kyslíku z plic do tkání (Granick, 1949). Snížený počet erytrocytů se označuje jako anemie a často se projevuje i sníženým hematokritem (poměr objemu erytrocytů k objemu krevní plazmy). Z parazitárních nákaz vyvolávají anemii především trypanosomy (Chamond et al., 2010; Coustou et al., 2012; Eze et al., 2013), v určitých případech lze anemii pozorovat i po nákaze extracelulárními bakteriemi (Talpur and Ikhwanuddin, 2013) či protozoálními parazity (Da Silva et al., 2011). Bílé krvinky, tedy leukocyty, patří mezi nejdůležitější buňky, které se účastní imunitních reakcí a přímo se podílí na ochraně organismu před parazitárními nákazami. Leukocyty se u savců tvoří v kostní dřeni, odkud putují do krve. U zdravého jedince se vyskytují leukocyty v krvi v relativně malém množství (např. u laboratorního kmene myši C57BL/6 zhruba  $3-4 \times 10^3 / \mu\text{L}$  krve; Klempt et al., 2006), při nákaze různými parazity však můžeme pozorovat jejich nárůst v periferní krvi (Fair et al., 2007; Ots et al., 1998; Salvante, 2006). Zvýšený počet bílých krvinek, takzvaná leukocytóza, je tedy obecně považován za indikátor zhoršeného zdravotního stavu. V savčí krvi se vyskytuje pět typů leukocytů:

### Lymfocyty

Lymfocyty tvoří 55-95 % všech bílých krvinek u savců (Campbell and Ellis, 2007). Jejich poměrné zastoupení je velmi závislé na druhu a na fyziologickém a zdravotním stavu zvířete.

U laboratorních myší jich v krvi pozorujeme  $1,3-8,4 \times 10^3 / \mu\text{L}$  (Campbell and Ellis, 2007). Lymfocyty můžeme rozdělit na tři velké skupiny (Cruse and Lewis, 1999): T a B lymfocyty a NK buňky, které však od sebe navzájem pomocí světelné mikroskopie nelze rozlišit. T lymfocyty pomocí T buněčného receptoru (TCR) na svojí membráně rozpoznávají tělu cizí peptidy navázané na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) antigen prezentujících buněk, což vede k jejich další diferenciaci. Aktivované T lymfocyty regulují imunitní odpověď organismu, především produkcí cytokinů a aktivací dalších buněk imunitního systému. B lymfocyty jsou buňky zodpovědné za protilátkovou imunitní odpověď savčího organismu. B lymfocyty se po rozpoznání patogenních organismů pomocí svých B-buněčných receptorů (BCR) a po stimulaci příslušnými T lymfocyty mění na plazmatické buňky produkující protilátky ke zničení patogenu. T i B lymfocyty jsou schopny tvořit paměťové buňky, které významně urychlují imunitní odpověď při sekundární nákaze. NK buňky (natural killers – „přirození zabijáci“) jsou buňky, které mají za úkol ničit především viry napadené buňky či jinak poškozené buňky (Cichocki et al., 2014). Zvýšený počet lymfocytů v krvi lze sledovat při bakteriálních infekcích (Chen et al., 2001; Gupta et al., 1999; Yu et al., 2010) ale i při nákaze malárií (Ricklefs and Sheldon, 2007) či prvokem *Trypanosoma vivax* (Blom-Potar et al., 2010).

### **Neutrofilní granulocyty (neutrofilny)**

Neutrofilní granulocyty, zkráceně neutrofilny, jsou fagocytické buňky s jádrem rozděleným do několika laloků (Cruse and Lewis, 1999). V krvi myší jich je  $0,4 - 2,0 \times 10^3 / \mu\text{L}$  (Campbell and Ellis, 2007). Obsahují granula označovaná jako azurofilní (primární), specifická (sekundární) a terciální (Nathan, 2006). Azurofilní granula obsahují myeloperoxidázu, elastázu, kathepsin G, azurocidin, lipopolysaccharide-binding bactericidal permeability increasing protein (BPI) a další antimikrobiální látky. Specifická a terciální granula obsahují například laktoferin a lipokalin, zabraňující bakteriím vázat pro ně esenciální železo, nebo matrix-metaloproteinázy degradující laminin a kolagen (Nathan, 2006). V neutrofilních granulocytech dochází také k oxidativnímu vzplanutí – tvorbě kyslíkových radikálů a hydroxidperoxidázy pro zničení bakterií. Zvýšení počtu neutrofilních granulocytů vyvolávají především nákazy extracelulárními bakteriemi (Gupta and Hill, 1995; Quevillon et al., 2013). Dalším z často měřených parametrů je také poměr neutrofilů k lymfocytům. Ten se zvyšuje především působením stresových faktorů (Davis et al., 2008; Gross and Siegel, 1983), mezi které mohou patřit i parazitární nákazy (Harrington et al., 2012; Johnstone et al., 2012).

### **Eosinofilní granulocyty (eosinofily)**

V myší krvi se nachází od 0 do 5 % eosinofilních granulocytů z celkového počtu leukocytů (Campbell and Ellis, 2007). Eosinofilní granulocyty jsou asociované především s obranou proti mnohobuněčným živočišným parazitům (Geering et al., 2013). V jejich cytoplasmě jsou granula obsahující cytotoxické, antibakteriální a anti-helmintární látky jako je major basic protein, eosinofilní peroxidáza, neurotoxiny a kationický protein (Cruse and Lewis, 1999; Doyle et al., 2013; Swaminathan et al., 2005). Eosinofilie je častým průvodním jevem schistozomálních infekcí (Eriksson et al., 2007; Horii et al., 1984; Silveira-Lemos et al., 2008), dále je běžná při nákazách hlísticemi (Doligalska et al., 1999; Knott et al., 2009; Yasuda et al., 2012) či tasemnicemi (Rausch and Fay, 2011).

### **Basofilní granulocyty (basofily)**

Basofily jsou bílé krvinky s nejnižším zastoupením v savčí krvi – od 0 do 1 % (Campbell and Ellis, 2007). Spíše, než s protektivní imunitou jsou basofily dávány do souvislosti s alergickými reakcemi. V jejich granulech je produkován především heparin a histamin. Basofily ovšem hrají roli i v obraně hostitele před helminty či ektoparazity (Falcone et al., 2001; Karasuyama et al., 2011).

### **Monocyty**

Monocyty jsou v průměru největší z leukocytů a vyskytují se v krvi zhruba ve frekvenci 0 až 10 % z celkového počtu leukocytů (Campbell and Ellis, 2007). Z krve putují do tkání, především do míst kontaktu s vnějším prostředím, kde se mění na makrofágy nebo dendritické buňky (Gwinn and Vallyathan, 2006). Jejich hlavním úkolem je fagocytóza a prezentace antigenu. Fagocytované patogeny zabíjejí pomocí oxidativního vzplanutí a produkcí NO. Nárůst v absolutním počtu monocytů lze sledovat při infekcích, kdy dochází k celkovému nárůstu počtu bílýchrvinek (Da Silva et al., 2011; Quevillon et al., 2013).

Hematologické vyšetření je v zoologickém výzkumu výhodné zejména díky technické nenáročnosti a nízké ceně. Porovnáním jednotlivých parametrů můžeme zjistit zdravotní stav vyšetřovaných jedinců. Změny některých parametrů jsou typické při infekci určitým typem parazitů a mohou tedy dobře posloužit pro odhad onemocnění jedince. Reakce na různé parazitické druhy a následná změna hematologických znaků je ale značně variabilní. Vyšetření hematologických parametrů tedy není přesnou diagnostickou metodou, ale může být dobrým prvním vodítkem při určování zdravotního stavu jedince.

## 1.2 Zánětlivá reakce

Zánět je obranou reakcí těla na poškození tkání, která má za cíl zlikvidovat zdroj poškození a znovunastolit homeostázi organismu (Medzhitov, 2008). Zánět provází čtyři základní příznaky – bolest, zvýšení teploty, zarudnutí a otok. Při zánětu se zvyšuje propustnost cév, aby do tkáně mohly lépe proudit složky krve, jako je krevní plasma a především bílé krvinky. Zánětlivá reakce je spouštěna rozpoznáním cizorodých struktur, které pronikly do organismu, a to především makrofágy a žírnými buňkami v napadené tkáni (Ashley et al., 2012). To vede k tvorbě chemokininů, které atrahují další bílé krvinky z krve do napadené tkáně. Zánětlivá reakce se projeví zvýšeným množstvím leukocytů v periferní krvi a změnou hematologických parametrů. Jako první do místa zánětu putují neutrofilní granulocyty, jejichž úkolem je především fagocytace bakteriálních a virových částic (Geering et al., 2013; Kobayashi, 2010). Zároveň dochází k diferenciaci Th1 lymfocytů, které stimulují makrofágy k produkci toxických látek k ničení intracelulárních patogenů a dále prohlubují zánětlivou reakci produkcí prozánětlivých cytokinů (Anthony et al., 2007). Do místa zánětu jsou v pozdějších fázích atrahovány také eosinofilní a basofilní granulocyty produkující množství antimikrobiálních peptidů (Geering et al., 2013). Na zánětlivé reakci se tedy mohou podílet všechny typy bílých krvinek specifickými i nespecifickými imunitními mechanismy.

V ekologických studiích patří zánětlivá odpověď mezi často měřené aspekty imunologické reaktivity u volně žijících zvířat. K jejímu měření se používá kožní otokový test (skin-swelling test; Kennedy and Nager, 2006; Smits et al., 1999). Při této metodě se do podkoží zvířete injikuje zánětlivý stimulant, který vyvolá agregaci bílých krvinek ve tkáni a výše popsanou zánětlivou reakci vedoucí ke vzniku otoku v místě vpichu (Smits et al., 1999). Jako zánětlivý stimulant se používána zejména rostlinný lektin fytohemaglutinin (PHA) izolovaný z *Phaseolus vulgaris* (Ando et al., 2014; Kennedy and Nager, 2006; Smits et al., 1999). Obdobně by bylo možné použít lektin konkanavalin A (ConA) izolovaný z *Canavalia ensiformis*, který se jako PHA běžně používá v *in vitro* studiích (Akla et al., 2012; Ando et al., 2014; Chen et al., 2014). Jak bylo popsáno výše, za normálních podmínek je zánětlivá reakce spouštěna rozpoznáním patogenních částic bílými krvinkami a její další průběh je do značné míry závislý na stimulaci TCR T lymfocytů příslušnými antigeny. Mitogeny ConA a PHA jsou schopné vázat se na receptory T buněk a tak stimulovat zánětlivou reakci bez přítomnosti antigenu (Ando et al., 2014; Stadelcke and Leskowitz, 1974). ConA a PHA ale působí na krevní buňky různým způsobem a reakce na tyto dva mitogeny je proto odlišná. ConA váže v rámci

T-buněčného receptoru (TCR) koreceptor CD3, který zprostředkovává přenos signálu do buňky, a je tak zodpovědný za selektivní aktivaci T buněk (Leavitt et al., 1977). PHA váže jak řetězce  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  TCR tak podjednotky membrán erytrocytů (Leavitt et al., 1977). Pokusy provedené na morčatech ukazují, že při zánětlivé reakci vyvolané PHA je do místa zánětu atrahováno velké množství basofilů oproti reakci vyvolané ConA (Stadecke and Leskowitz, 1974). PHA tedy pravděpodobně stimuluje poněkud odlišnou subpopulaci T lymfocytů než ConA, která lépe stimuluje basofilní granulocyty (Leavitt et al., 1977; Stobo and Paul, 1973). ConA ale u morčat stimuluje silnější zánětlivou reakci a v *in vitro* testech u myši stimuluje větší množství thymocytů i lymfocytů (Jones, 1973). V imunologických studiích je u ptáků i savců nejčastěji používaným mitogenem PHA (de Bellocq et al., 2006; de Bellocq et al., 2007; Fernandez-de-Mera et al., 2009; Kennedy and Nager, 2006). Průběh reakce na PHA byl testován především na ptačím modelu, kde byla prokázána souvislost mezi velikostí otoku a intenzitou imunitní zánětlivé reakce (Martin et al., 2006; Vinkler et al., 2010; Vinkler et al., 2014). Průběh zánětu vyvolaného PHA u savců ale nebyl detailně prozkoumán. Výzkum provedený na netopýrech druhu *Tadarida guánová* (*Tadarida brasiliensis*) dokonce ukazuje, že velikost otokové reakce neodpovídá množství jednotlivých typů bílých krvinek infiltrovaných do tkáně a má tedy poněkud nejasnou výpovědní hodnotu ve vztahu k prozánětlivé buněčné reaktivitě (Turmelle et al., 2010). Vhodnějším mitogenem pro stimulaci zánětlivé reakce u savců by tedy mohl být ConA.

### 1.3 Hybridní zóny

Hybridní zóna je definována jako geografická oblast, ve které dochází k setkávání a křížení dvou dříve oddělených druhů či poddruhů a k produkci životaschopného hybridního potomstva (Barton and Hewitt, 1985). Jako tenzní hybridní zóny jsou označovány relativně úzké a dlouhodobě stabilní zóny (Key, 1968). Jejich udržování závisí na rovnováze mezi disperzí jedinců rodičovských druhů do zóny a selekcí proti hybridním jedincům. Pokud by proti hybridům selekce nepůsobila, došlo by postupně k rozšíření hybridní zóny a splývání druhů. Příliš silná selekce by naopak znamenala zánik zóny v důsledku eliminace hybridních jedinců. Selekcí proti hybridním jedincům je dle teorie Dobzhanského a Müllera způsobená hromaděním inkompatibilit v rodičovských druzích. V hybridních jedincích se pak dle této teorie setkávají evolucí dosud nevyzkoušené kombinace alel (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1936; Muller, 1942). Studium hybridních zón je velmi zásadní z hlediska pochopení vzniku a

vývoje druhů. Pokud zjistíme příčiny zhoršené fitness hybridních jedinců, pochopíme, jaké evoluční, genetické, či environmentální faktory hrají roli při speciaci.

V hybridních zónách, kde dochází k sekundárnímu kontaktu již dříve oddělených druhů, se setkávají druhy, které mají odlišnou evoluční minulost a tedy i odlišnou historii střetů s parazity (Schmid-Hempel, 2011). V průběhu času, kdy se druhy vyvíjely odděleně, pravděpodobně došlo u každého z druhů k různým adaptacím imunitního systému na parazity vyskytující se v jejich prostředí (Woolhouse et al., 2002). Je zřejmé, že jedinci, vzniklí křížením takto diferencovaných druhů mohou mít oproti jedincům původních druhů modifikovanou parazitární rezistenci. Bylo formulováno několik hypotéz, které popisují anti-parazitární rezistenci hybridních jedinců (Fritz et al., 1994). Podle Aditivní hypotézy se rezistence jedinců první generace hybridů (F1) neliší od průměrné rezistence jedinců obou rodičovských druhů. Tato hypotéza předpokládá aditivní dědičnost znaků určujících odolnost k parazitům (Fritz et al., 1994; Orians and Fritz, 1995). Takováto průměrná náchylnost hybridů k fytofágnímu hmyzu v porovnání s rodičovskými druhy byla popsána například u křížení dubu šedého (*Quercus grisea*) a dubu Gambelova (*Q. gambeli*) (Aguilar and Boecklen, 1992). Stejně tak u hybridních jedinců mezi lejskem bělokrkým (*Ficedula albicollis*) a lejskem černohlavým (*F. hypoleuca*) byla pozorována průměrná schopnost odolávat parazitům rodu *Haemoproteus* (Wiley et al., 2009). Další hypotézou je Hypotéza hybridní dominance. Ta popisuje situace, kdy se hybridní jedinci mírou svojí rezistence podobají spíše jednomu z rodičovských druhů (Fritz et al., 1994). V takovém případě jsou znaky od jednoho rodičovského druhu předávány dominantně. Pokud je rezistence hybridních jedinců vyšší než rezistence obou rodičovských druhů, pak platí hypotéza hybridní rezistence (Fritz et al., 1994; Mouliá, 1999). V takovém případě pravděpodobně působí tzv. heterozní efekt (heterosis), kdy křížením dochází k potlačení inbreedingu a vlivu recesivních alel, nebo se naopak projeví výhoda heterozygotních jedinců. Jako příklad hybridní rezistence se často uvádí situace popsána v hybridní zóně pytlonošů, která zároveň i velmi dobře demonstruje vzájemnou koevoluci a adaptaci parazita a hostitele. Všichni *Geomydoecus geomydis* parazitují hojně, ale přísně specificky na pytlonoších nížinných *Geomys bursarius* a stejně tak všichni *Geomydoecus nebrathkensis* jsou adaptovány pouze na život pytlonoších *Geomys lutescens* (Heaney and Timm, 1985). Hybridní pytlonoše není schopen díky silné koadaptaci napadnout ani jeden z druhů vši. Velmi malé množství vši *G. nebrathkensis* však bylo na některých hybridech pozorováno, proto se hybridní zóna pytlonošů někdy uvádí i jako příklad hypotézy hybridní dominance (Fritz et al., 1999; Mouliá, 1999). Poslední ze čtyř základních hypotéz je

Hypotéza náchylnosti hybridů (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 1994; Siemens et al., 1994; Whitham et al., 1994). Tato hypotéza se týká, na rozdíl od předchozích hypotéz, především dalších generací hybridů (F2) a jedinců vzniklých zpětným křížením. Hybridní jedinci mají dle této hypotézy sníženou schopnost rezistence a to především kvůli takzvanému hybridnímu rozpadu, tedy rozpadu komplexů koadaptovaných genů rodičovských druhů při rekombinaci. Za typický příklad hypotézy náchylnosti hybridů byla považována situace v hybridní zóně myši domácí, která vzniká mezi poddruhy *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* (Mouliá, 1999; Mouliá et al., 1991; Mouliá et al., 1995; Sage et al., 1986). Nejasnost a mnoho dalších otázek do situace v této hybridní zóně ovšem vnesl poslední výzkum, který ukázal, že v jiné části této hybridní zóny vykazují hybridi spíše zvýšenou rezistenci k helmintárním parazitům (Baird et al., 2012).

## 1.4 Vznik hybridní zóny myši domácí

Předek dnešní myši domácí (*Mus musculus*) obýval původně oblast Asie (Suzuki and Aplin, 2012). Myš se stala synantropním druhem a v průběhu holocénu společně s člověkem osídlila Evropský kontinent (Bonhomme et al., 2011). Podruh myši domácí *Mus musculus domesticus* (myš západoevropská) putoval do Evropy takzvanou jižní cestou, přes Malou Asii a podél Mediteránní oblasti až do západní Evropy. Podruh *Mus musculus musculus* (myš východoevropská) se šířil podél severního břehu Černého moře a dnes obývá východní a severní část Evropy. Po sekundárním kontaktu těchto poddruhů vznikla napříč Evropou hybridní zóna, procházející Jutským poloostrovem, Německem a dále celou střední Evropou až k Balkánskému poloostrovu a pobřeží Černého moře. Tato tenzní hybridní zóna je asi 20km široká a 2500km dlouhá (Macholan et al., 2007).

Hybridní zóna myši domácí je pravděpodobně nejzkoumanější savčí hybridní zónou vůbec (Shurtliff, 2013). Platí to i z hlediska vztahu k parazitárním nákazám. Silný vliv koevoluce mezi poddruhy myši domácí a jejich parazity byl demonstrován na vztahu s *Cryptosporidium tyzzeri* (Kvac et al., 2013). Populace parazita napadající *M. m. musculus* se liší od populace napadající *M. m. domesticus* a to nejen geneticky, ale i morfologicky. To naznačuje silný disruptivní vliv interakce mezi hostitelem a parazitem na evoluci druhů. Hybridní zóna myši domácí byla z hlediska parazitace hybridních jedinců zkoumána již na konci minulého století (Sage et al., 1986). Studie provedená na 93 jedincích v části hybridní zóny procházející jižním Německem popisuje, že hybridní jedinci jsou výrazně více napadeni helmintárnimi parazity než jedinci čistých poddruhů vyskytující se ve větší vzdálenosti od

středu hybridní zóny. U jedinců rodičovských poddruhů bylo ve střevech nalezeno v průměru 40 jedinců parazitů, hybridní jedinci byli oproti tomu parazitováni i více než 500 helminty (Sage et al., 1986). Podobný výzkum se stejným výsledkem byl na 120 jedincích proveden i v Dánské části hybridní zóny (Mouliá et al., 1991). Obě práce předpokládají, že v hybridní zóně dochází k rozpadu koadaptovaných genových komplexů zajišťujících obranu před metazoálními parazity. Autorům druhé studie se později povedlo experimentálně ověřit zvýšenou náchylnost F1 k parazitické hlístici *Aspiculuris tetraptera* (Mouliá et al., 1993). Stejně tak byla v laboratorních podmínkách demonstrována i zvýšená náchylnost hybridních jedinců k parazitovi *Sarcocystis muris* (Derothe et al., 2001). Ovšem například u protozoického parazita *Trypanosoma musculi* nebyla zvýšená náchylnost hybridů prokázána (Derothe et al., 1999). Překvapivě, nejnovější a také dosud nejrozsáhlejší studie hybridní zóny ale přináší přesně opačný výsledek. Analýza 689 myší odchycených v česko-bavorském úseku hybridní zóny ukazuje výrazně snížený počet i diverzitu parazitických druhů helmintů (Cestoda a Nematoda) u hybridních myší. Ačkoliv je možné, že různé, geograficky a časově oddělené populace obou poddruhů myší vykazují odlišné tendence, není vyloučeno ani to, že jsou jednotlivé studie zatíženy určitou chybou v důsledku relativně malé početnosti hybridů se středními hodnotami hybridního indexu. Dalším problémem je pak skutečnost, že dosavadní výzkum byl vždy z větší části zaměřen na makroparazitické druhy (tasemnice a hlístice), přičemž zásadní roli v udržování a evoluci hybridní zóny mohou mít jiné skupiny parazitů – např. patogenní bakterie či viry. Odpověď na současné otázky tak může přinést pouze další výzkum a to výzkum zaměřený na zhodnocení celkového zdravotního stavu myší v hybridní zóně a jejich imunologické reaktivity a nikoliv pouze na detekci početnosti a prevalence jednotlivých skupin parazitů.

Tato práce se snaží zmapovat imunologickou variabilitu v rámci hybridní zóny myší domácí. Přestože hybridní zóna myší domácí patří mezi nejkoumanější hybridní zóny, není dodnes zřejmé, jaký vliv má hybridizace jedinců na zdravotní stav myší. Základem mojí diplomové práce je zmapování zdravotního stavu a imunologické reaktivity myší pomocí dvou odlišných metod – pomocí hematologických parametrů a otokového kožního testu. Pro zjištění geneticky determinovaných rozdílů v hematologických znacích jsme použily inbrední linie myší domácí odvozené z volně žijících jedinců odchycených v hybridní zóně (wild-derived strains). V rámci hybridní zóny jsme hematologické parametry využili k determinaci zdravotního stavu jedinců. Abychom mohli blíže určit příčiny změn ve zdravotním stavu myší, byli všichni jedinci v hybridní zóně vyšetřeni na přítomnost mnohobuněčných parazitů.

Kromě zdravotního stavu vyšetřuji ve své diplomové práci i schopnost imunitní reaktivity volně žijících jedinců metodou otokového kožního testu. Protože výpovědní hodnota a metodika tohoto testu nebyla u savců zatím dobře prostudována, je součástí práce i porovnání dvou látek používaných pro tento test. Tato práce tedy jako první porovnává průběh zánětlivé reakce experimentálně vyvolané u myši aplikací PHA a ConA *in vivo*. Pro výzkum imunofenotypové variability v hybridní zóně jsme tedy provedli několik nezávislých výzkumných prací, které jsou popsány v samostatných kapitolách a v závěru jsou společně shrnuty.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem mé diplomové práce je zhodnotit variabilitu ve zdravotním stavu myši v rámci hybridní zóny *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, pokusit se identifikovat její příčiny a posoudit její význam pro udržování hybridní zóny mezi těmito dvěma poddruhy myši. Dílčími cíli práce pak je:

- Porovnat hematologické parametry z přírody odvozených inbredních linií myši domácí
- Pomocí hematologických parametrů určit zdravotní stav myši v hybridní zóně myši domácí a zjistit, jak silná existuje závislost mezi hematologickými parametry a údaji o mnohobuněčných parazitech myši v rámci hybridní zóny
- S použitím laboratorního kmene C57BL/6 zjistit, zda je pro využití při otokovém kožním testu u myši vhodnější stimulant ConA či PHA
- Porovnat schopnost prozánětlivé imunitní reaktivity myši v rámci hybridní zóny pomocí otokového kožního testu

## 3 Hematologické parametry inbredních linií

Inbrední linie myši chované ve standardizovaných podmínkách představují cenný nástroj imunologického i ekologického výzkumu (Pialek et al., 2008). Smyslem hematologického vyšetření u inbredních linií myši je především stanovení referenčních hodnot pro jednotlivé hematologické parametry pro další srovnání. Krom toho však z přírody odvozené inbrední linie mohou poskytnout také první vodítko pro stanovení hematologických rozdílů mezi poddruhy u myši chovaných v jednotných podmínkách. To může odlišit genetické predispozice od vlivu ekologických faktorů působících na jednotlivé hematologické parametry. Jednotlivé, běžně používané laboratorní kmeny myši se vzájemně liší ve vyšetřovaných hematologických parametrech (Kelada et al., 2012; Klempt et al., 2006), je tedy zřejmé, že jsou hematologické poměry v periferní krvi geneticky determinované. Rozdíl mezi kmeny odvozenými z přirozených populací *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* však dosud nebyl zkoumán. V této práci porovnávám 15 inbredních kmenů myši, z toho 13 odvozených z myši odchycených v rámci hybridní zóny a dva klasické laboratorní kmeny. Toto srovnání si klade za cíl ukázat, zda jsou hematologické znaky u myši chovaných ve stejných podmínkách uniformní, či zda se liší mezi jednotlivými inbredními liniemi a mezi poddruhy myši domácí.

### 3.1 Metodika

#### 3.1.1 Zvířata

K vyšetření hematologických znaků jsme použili 64 jedinců myši domácí. Použili jsme pouze jedno pohlaví, a to samce, protože hodnoty hematologických parametrů se mezi pohlavími liší a u samic se mohou měnit v průběhu estrálního cyklu (Willson et al., 2012). Jedinci pocházeli z vybraných inbredních linií myši domácí reprezentujících různé myši populace, a to z laboratorních linií AJ (7 jedinců) a C57BL/6 (6 jedinců) a dále z linií odvozených z volně žijících populací *M. m. domesticus* (SFEL, 6; SCHEFE, 7; SCHEST, 3; SCHUNT, 8; SIT, 6; STRA, 6; STRB, 6), a z populací *M. m. musculus* (BULS, 7; BUSNA, 6; PWD, 7; STUF, 7; a STUS, 6) a z jedné linie odvozené z hybridní populace těchto dvou poddruhů (SPLY, 9) (Pialek et al., 2008). Geografický původ linií odvozených z volné přírody je znázorněn na Obrázku 1. Všichni jedinci byli chováni v plastových klecích (16 x 28 x 15 cm) při stabilní fotoperiodě (14h osvětlení / 10h tma) a s přístupem ke granulovanému

krmení (ST1, VELAZ, Praha) a vodě *ad libitum*. Všichni jedinci pocházeli z chovů prom. biol. Jaroslava Piálka, Csc. z detašovaného pracoviště Ústavu biologie obratlovců, Akademie věd ČR, v. v. i. ve Studenci.

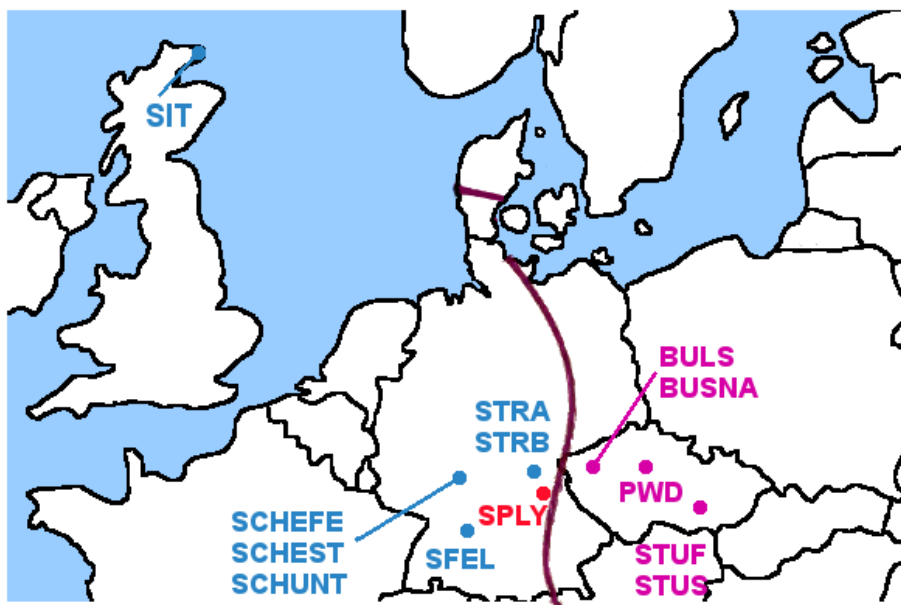
### 3.1.2 Hematologie

Odběry krve jsme prováděli v letech 2011-2014, vždy skupině 6 až 20 myší (celkem 7 skupin). Každé myši bylo odebráno 50-100  $\mu\text{L}$  krve z retro-orbitálního sinu heparinizovanou skleněnou kapilárou (Klempert et al., 2006; Yardeni et al., 2011). 15  $\mu\text{L}$  krve bylo napipetováno do 285  $\mu\text{L}$  Turkova roztoku (ředění 20 $\times$ ) pro analýzu absolutního počtu bílých krvinek. Analýzu absolutního počtu bílých krvinek jsme provedli pod světelným mikroskopem (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japonsko) dle metodiky popsané v (Campbell and Ellis, 2007) v Bürkerových komůrkách v objemu 0,4  $\mu\text{L}$ . Pro výpočet absolutního počtu červených krvinek jsme 15  $\mu\text{L}$  krve napipetovali do 2985  $\mu\text{L}$  Heyemova roztoku (ředění 200 $\times$ ). Heyemův roztok s krví byl napipetován do Bürkerových komůrek. Šest velkých polí Bürkerovy komůrky o celkovém objemu 0,024  $\mu\text{L}$  jsme vyfotili pod mikroskopem se zvětšením 100 $\times$  (mikroskop Olympus BX51 s digitální kamerou Olympus DP71). V těchto šesti polích byl následně absolutní počet erytrocytů analyzován v programu CellCounter, který byl speciálně pro tyto účely vyvinut Mgr. Karlem Štěpkou a RNDr. Pavlem Matulou, Ph.D. na Katedře počítačové grafiky a designu, Fakulta informatiky, Masarykova Univerzita v Brně. Zbytek krve jsme ponechali v kapilárách pro analýzu hematokritu. Kapiláry s krví jsme centrifugovali v hematologické centrifuze Nüve HN 075 (Nüve, Ankara, Turecko) při rychlosti 11 000g po dobu 5 minut. Hematokrit jsme měřili digitálním posuvným měřítkem (KINEX CZ, Praha, ČR) s přesností 0,01 mm, jako poměr objemu červených krvinek k celkovému objemu krve v kapiláře. Konečnou hodnotu hematokritu jsme stanovili průměrem z měření jedné až tří kapilár s krví.

Dále byl z krve zhotoven krevní nátěr. Všechny krevní nátěry byly obarveny činidlem Wright-Giemsa modified (produktové č. WG128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dle pokynů výrobce. Krevní nátěry jsme analyzovali pod mikroskopem Olympus CX-31 (Olympus, Tokyo, Japonsko) se zvětšením 1000 $\times$ . Ke stanovení diferenciálního počtu leukocytů jsme na každém nátěru spočítali frekvence lymfocytů, neutrofilů, eosinofilů, basofilů a monocytů ve vzorku 100-130 buňek (Ots et al., 1998). Buňky byly identifikovány dle atlasu Campbell and Ellis (2007).

### 3.1.3 Statistická analýza

V dílčích modelech jsme pomocí zobecněných lineárních modelů testovali závislost hematologických parametrů (hematokrit, absolutní počet erytrocytů, absolutní počet leukocytů, absolutní a diferenciální počet lymfocytů, neutrofilů a eosinofilů) na poddruhu, linii, věku a datu odběru a interakcích poddruhu a věku, poddruhu a data odběru, linie a věku a linie a data odběru. Proměnná poddruh obsahovala čtyři skupiny: *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, hybridní jedinci a laboratorní linie. Závislost absolutního a diferenciálního počtu basofilů a eosinofilů nebyla testována z důvodu nízkého počtu těchto typů krvinek v krvi. Pro každý hematologický parametr jsme testovali vždy dva modely, a to jeden obsahující závislost na poddruhu a druhý testující závislost na linii. V modelech jsme použili quasipoissonovo rozdělení, kromě absolutního počtu leukocytů a lymfocytů, kde bylo z důvodu overdispersion použito negativní binomické rozdělení. Kategorie *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* byli porovnány pomocí Wilcoxonova testu porovnávajícího reziduály z minimálních adekvátních modelů bez proměnné kategorie. Statistická analýza byla provedena v programu R verze 3.1.0. (The R Foundation for Statistical Computing 2014).



Obrázek 1 Geografický původ z přírody odvozených inbredních linií zkoumaných v této práci

Modré body znázorňují linie *M. m. domesticus*, fialové body *M. m. musculus* a červený bod hybridní linií. Tmavě fialová linie značí pozici hybridní zóny myši domácí.

## 3.2 Výsledky

Pro posouzení významu geneticky daných rozdílů ve zdravotním stavu myši, které jsou nezávislé na okolním prostředí, jsme testovali u myši chovaných v konvenčních chovech závislost jednotlivých hematologických znaků na poddruhu (skupiny: *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, hybridy, laboratorní kmeny) a na inbrední linii (vždy dva nezávislé testy). Zjistili jsme, že hematokrit je u inbredních myši závislý pouze na příslušnosti jedince k dané inbrední linii (MAM: Df=14/72, F=4,26, P<0,001) a na poddruhu je nezávislý (P>0,05). Také absolutní počet erytrocytů ovlivňuje příslušnost k linii dále datum odběru a interakce mezi inbrední linií a datem odběru (Tabulka 1), na poddruhu absolutní počet erytrocytů závislý není (P>0,05). Na rozdíl od hematokritu je absolutní počet erytrocytů také závislý na věku myši. Absolutní počet erytrocytů s věkem stoupá. Naproti tomu absolutní počet leukocytů byl závislý jak na poddruhu a datu odběru krve a na interakci stáří myši a poddruhu, tak i na linii, datu odběru a interakci linie a data odběru (viz Tabulka 2). Množství leukocytů se stářím myši stoupá. Poddruh *M. m. domesticus* má nejnížší absolutní počet leukocytů, nejvyšší absolutní počet pozorujeme u hybridní linie (viz. Graf 1), skupiny *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se neliší (P>0,050), výrazně se ale odlišují jednotlivé linie (viz Graf 2). Diferenciální počet lymfocytů je pak závislý na poddruhu (MAM: Df=3/77, F=-25,01, P=0,015), ale kategorie *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se neliší (P>0,050), a je též závislý na linii, interakci mezi linií a datem odběru a věkem a linií (viz Tabulka 3).

**Tabulka 1** Závislost hodnot absolutního počtu erytrocytů na linii (MAM: linie+věk+odběr+linie:odběr Df=-53/36; D=-2950,80; P<<0,001); odběr – datum odběru vzorku, věk – věk jedince

proměnná	Df	Deviance	P
linie	-46/36	-2721,700	<<0,001
věk	-1/36	-104,000	0,003
odběr	-38/36	-1980,100	<<0,001
odběr:linie	-32/36	-1670,100	<<0,001

**Tabulka 2 Závislost hodnot absolutního počtu leukocytů na a) poddruhu (MAM: věk+poddruh+odběr+věk:poddruh Df=13/83, LR=55,039, P<<0,001) a b) inbrední inii (MAM: linie+odběr+linie:odběr Df=49/83, LR=163,9387,7; P<<0,001). odběr – datum odběru vzorku; poddruh – příslušnost z přírody odvozené inbrední linie k poddruhu *Mus musculus***

proměnná	Df	LR	P
a) odběr	6/76	42,06	<<0,001
poddruh	3/73	11,68	0,069
věk	4/74	96,27	0,014
věk:poddruh	3/73	8,47	0,037
b) linie	43/77	124,93	<<0,001
odběr	35/69	121,17	<<0,001
linie:odběr	29/63	99,53	<<0,001

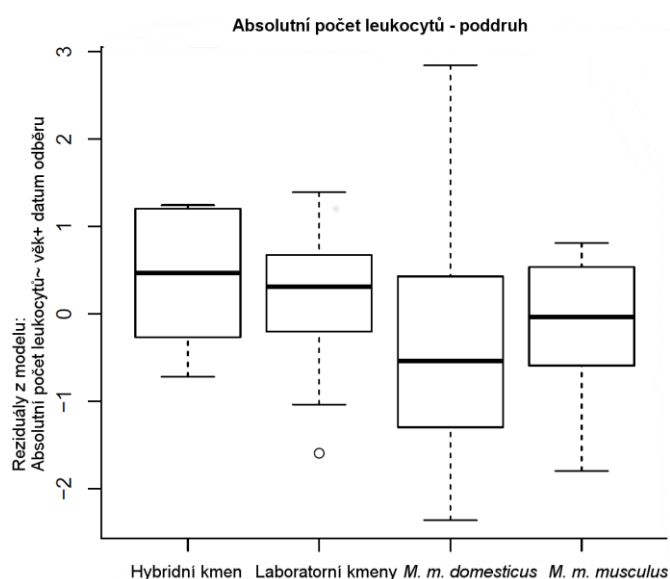
**Tabulka 3 Závislost hodnot diferenciálního počtu lymfocytů na linii (MAM: věk+linie+odběr+věk:linie+linie:odběr Df=-63/17; D=-216,71, P<<0,001); odběr – datum odběru vzorku, věk – věk jedince**

proměnná	Df	Deviance	P
linie	-56/17	-196,61	<<0,001
věk	-11/17	-14,74	0,018
odběr	-34/17	-63,44	<<0,001
linie:odběr	-28/17	-39,75	<<0,001
věk:linie	-10/17	-12,60	0,034

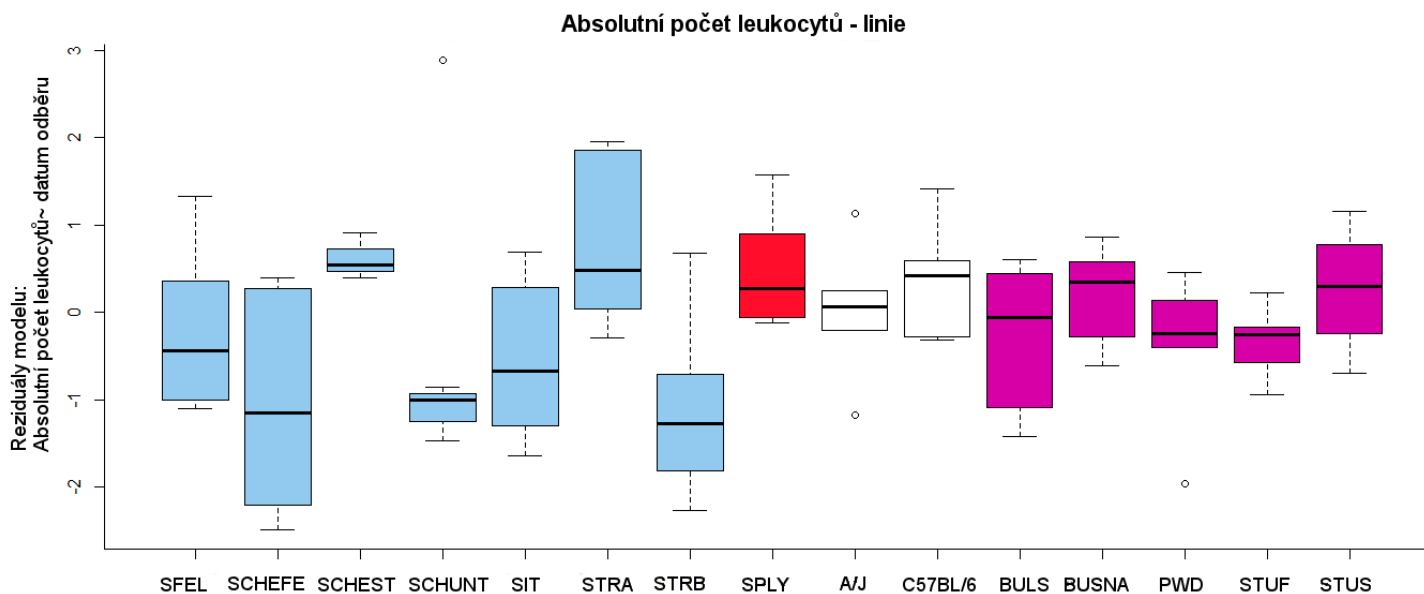
**Tabulka 4 Závislost hodnot diferenciálního počtu neutrofilů na linii (MAM: věk+linie+odběr+linie:odběr Df=-53/27; D=-144,48; P<<0,001); odběr – datum odběru vzorku, věk – věk jedince**

proměnná	Df	Deviance	P
věk	-1/27	-10,18	0,033
linie	-46/27	-415,65	<<0,001
odběr	-38/27	-125,05	0,030
linie:odběr	-32/27	-117,86	0,012

Na poddruhu je závislý i diferenciální počet neutrofilů (MAM: Df=-3/77, D=-67,704, P=0,012), kategorie *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se neliší (P>0,050). Diferenciální počet neutrofilů je dále ovlivněn i linií, datem odběru a interakcí mezi datem odběru a linií a také věkem myši (viz Tabulka 4). Diferenciální počet eosinofilů je závislý na linii (MAM: Df=-14/66, D=-152,82, P<<0,001). Dále je též závislý na poddruhu a interakci poddruh:datum odběru (viz Tabulka 5). Diferenciální počet eosinofilů je nejnižší u hybridní skupiny, mezi kategoriemi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se neliší (P>0,050). Absolutní počet lymfocytů je ovlivněn poddruhem a datem odběru, mezi kategoriemi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se neliší (P>0,050; viz Graf 3). Test závislosti absolutního počtu lymfocytů na inbrední linii prokázal jako signifikantní linii, odběr a interakci mezi datem odběru a linií (viz Tabulka 6; Graf 4). Stejně tak absolutní počet neutrofilů závisí na linii, datu odběru a interakci data odběru s linií (viz. Tabulka 7, Graf 5). Oproti tomu ale nezávisí na poddruhu (P<0,05). Absolutní počet eosinofilů je závislý na inbrední linii (MAM: Df=-14/58, D=-224,72, P<<0,001; viz Graf 6). V testu závislosti absolutního počtu eosinofilů na poddruhu pak jako proměnné signifikantně ovlivňující tento parametr vychází poddruh, věk, datum odběru a interakce poddruh:věk a poddruh:datum odběru (viz Tabulka 8; Graf 7). Kategorie *M. m. musculus* má větší počet eosinofilů než kategorie *M. m. domesticus* (W=580, P=0,025). I zde se počet eosinofilů zvyšuje se zvyšujícím se věkem myši. Všechny měřené parametry se signifikantně liší mezi inbredními liniemi. Pro průměrné hodnoty jednotlivých parametrů viz Příloha 1.



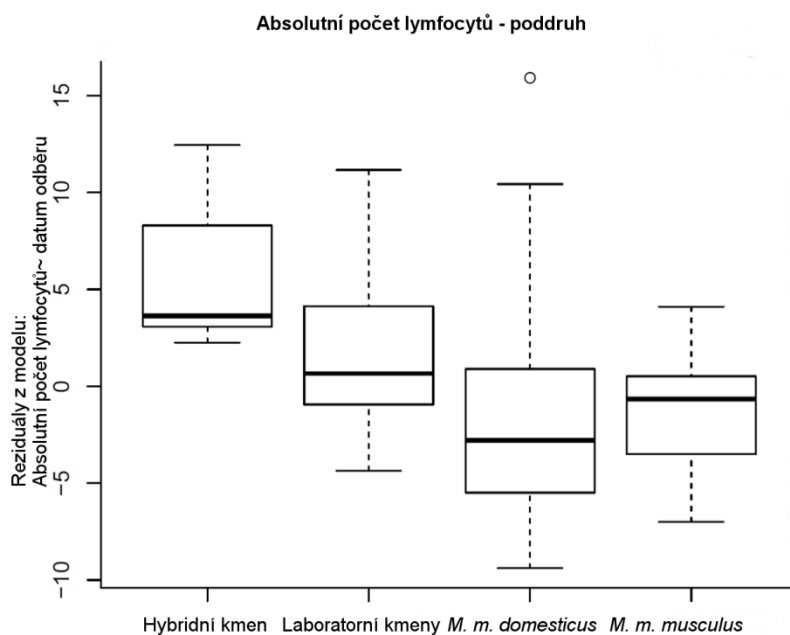
**Graf 1** Závislost absolutního počtu leukocytů na poddruhu Pro odfiltrování vlivu věku a odběru jsou na ose Y zobrazeny reziduály z modelu závislosti absolutního počtu leukocytů na věku a datu odběru. Pro analýzu bylo použito 9 jedinců hybridního kmene, 12 jedinců laboratorních kmenů, 33 jedinců *M. m. musculus* a 36 jedinců *M. m. domesticus*.



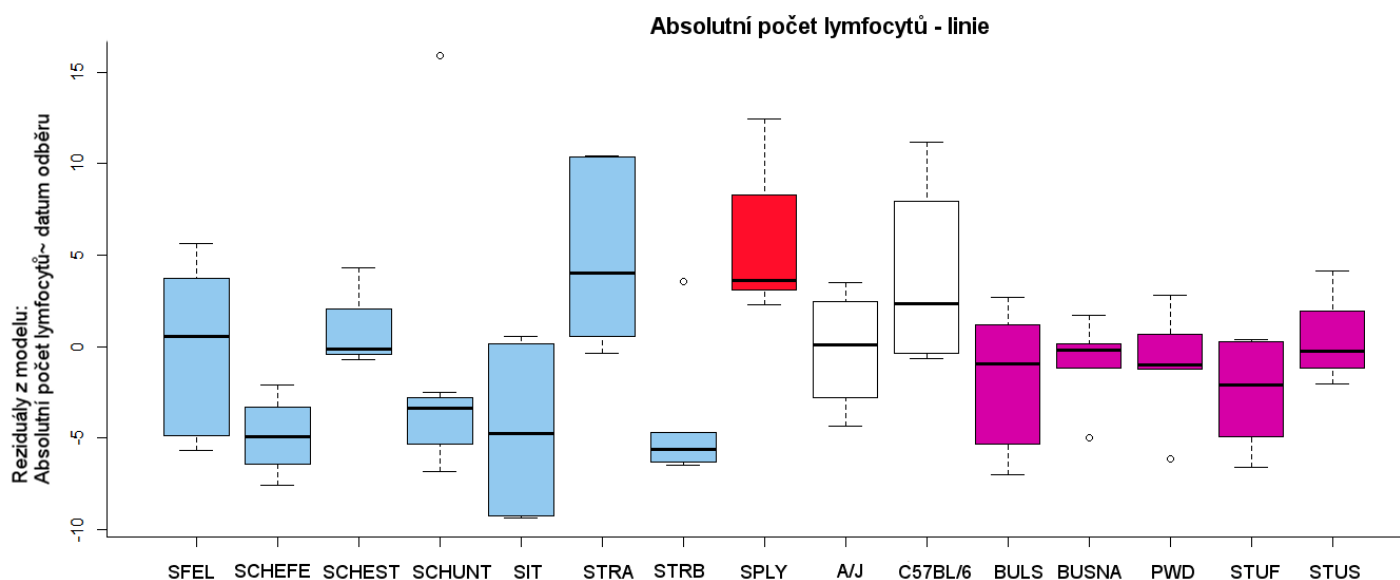
**Graf 2 Závislost absolutního počtu leukocytů na linii.** Pro odfiltrování vlivu data odběru jsou na ose Y zobrazeny reziduály z modelu závislosti absolutního počtu leukocytů na datu odběru. Modře jsou znázorněny linie poddruhu *M. m. domesticus*, fialově *M. m. musculus*, červeně hybridní linie a bíle laboratorní linie.

**Tabulka 5 Závislost hodnot diferenciálního počtu eosinofilů na poddruhu** (MAM: poddruh+odběr+poddruh:odběr Df=-23/57; D=-152,76; P<<0,001); odběr – datum odběru vzorku; poddruh – příslušnost z přírody odvozené inbrední linie k poddruhu *Mus musculus*.

proměnná	DF	Deviance	P
poddruh	-17/57	-141,51	<<0,001
odběr	-20/57	-101,55	<<0,001
poddruh:odběr	-14/57	-92,42	<0,001



**Graf 3 Závislost absolutního počtu lymfocytů na poddruhu.** Pro odfiltrování vlivu data odběru jsou na ose Y zobrazeny reziđuály z modelu závislosti absolutního počtu lymfocytů na datu odběru. Pro analýzu bylo použito 9 jedinců hybridního kmene, 12 jedinců laboratorních kmenů, 33 jedinců *M. m. musculus* a 36 jedinců *M. m. domesticus*.



**Graf 4 Závislost absolutního počtu lymfocytů na linii.** Pro odfiltrování vlivu data odběru jsou na ose Y zobrazeny reziđuály z modelu závislosti absolutního počtu lymfocytů na datu odběru. Modře jsou znázorněny linie poddruhu *M. m. domesticus*, fialově *M. m. musculus*, červeně hybridní linie a bíle laboratorní linie.

**Tabulka 6 Závislost hodnot absolutního počtu lymfocytů na a) poddruhu (MAM: odběr+poddruh Df=9/72 D=42,55, P<<0,001) a b) inbrední linii (MAM: odběr+linie+odběr:linie Df=-46/26; D=-2761,7; P<<0,001). odběr – datum odběru vzorku; poddruh – příslušnost z přírody odvozené inbrední linie k poddruhu *Mus musculus***

	proměnná	DF	Deviance	P
a)	odběr	6/69	33,13	<<0,001
	druh	8/71	27,83	<0,001
b)	linie	-40/26	-1541,00	<<0,001
	odběr	-32/26	-1343,10	<<0,001
	odběr:linie	-26/26	-722,66	0,007

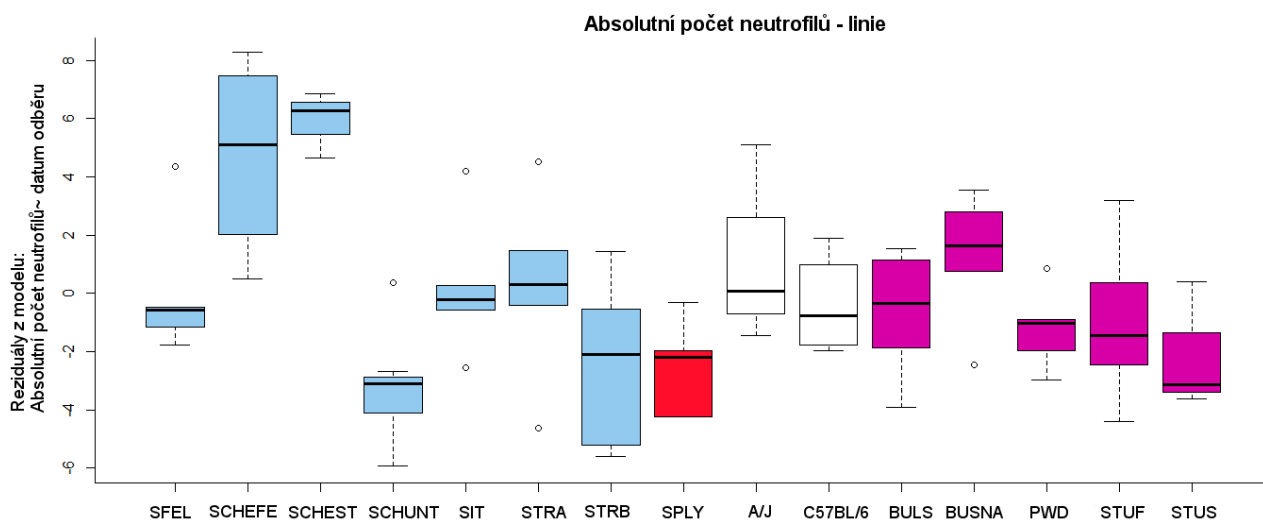
**Tabulka 7 Závislost hodnot absolutního počtu neutrofilů na linii (MAM: odběr+linie+odběr:linie Df=-46/26; D=-955,98; P<<0,001); odběr – datum odběru vzorku; poddruh – příslušnost z přírody odvozené inbrední linie k poddruhu *Mus musculus***

	proměnná	DF	Deviance	P
	linie	-40/26	-587,93	<<0,001
	odběr	-32/26	-455,62	<<0,001
	odběr:linie	-26/6	188,89	0,033

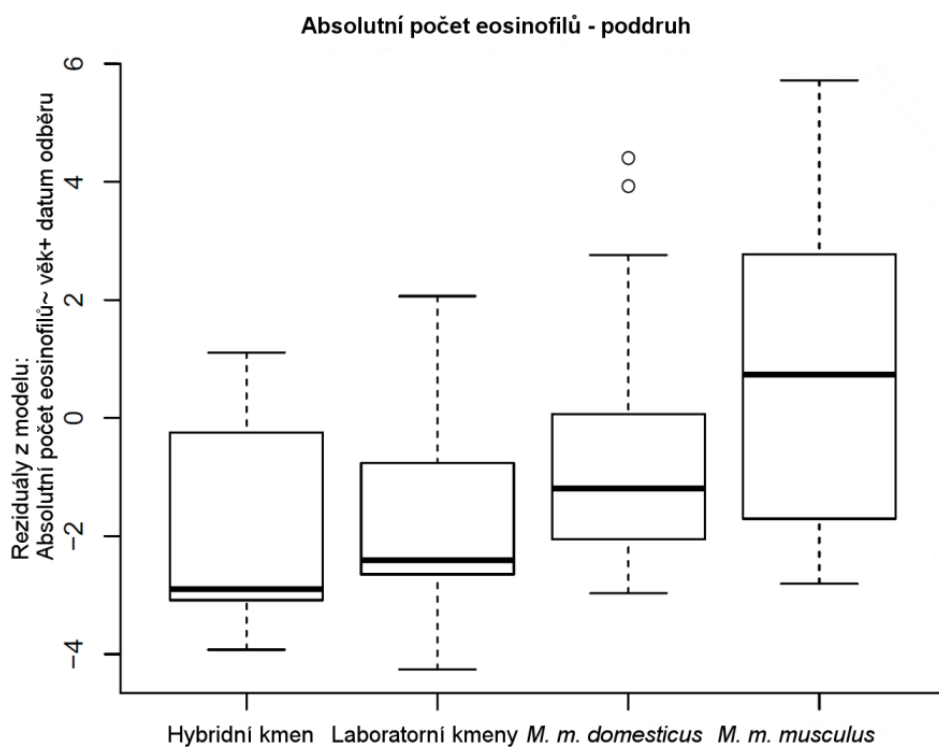
**Tabulka 8 Závislost hodnot absolutního počtu eosinofilů na poddruhu**

(MAM: odběr+druh+věk+odběr:druh+druh:věk Df=-24/48; D=-311,04; P<0,01); odběr – datum odběru vzorku; poddruh – příslušnost z přírody odvozené inbrední linie k poddruhu *Mus musculus*, věk – věk jedince

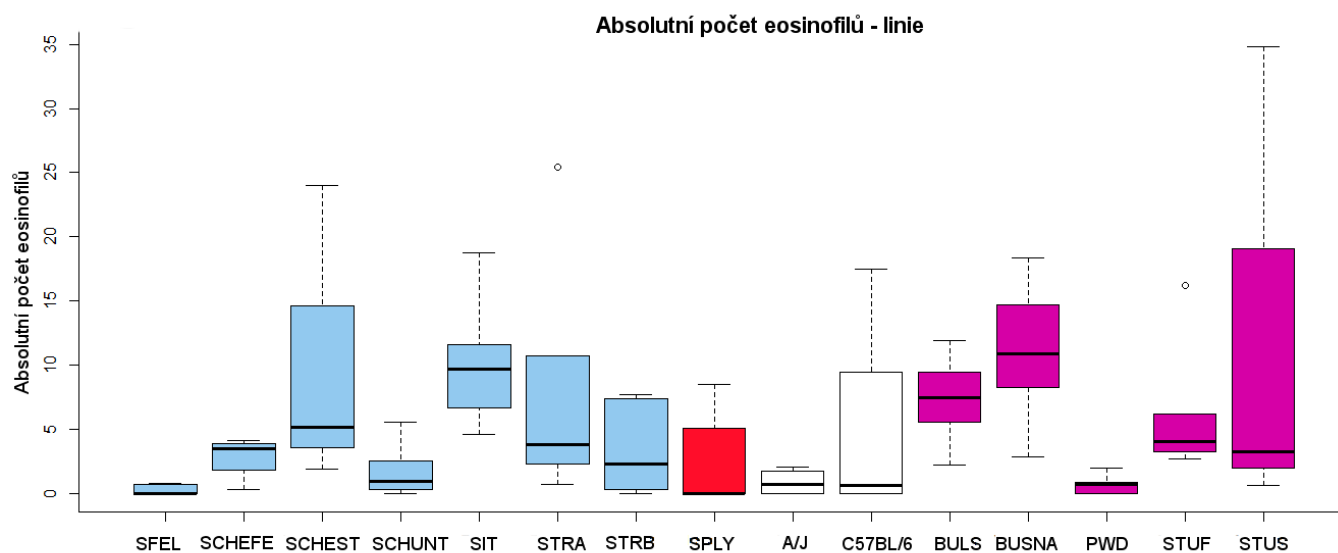
	proměnná	DF	Deviance	P
	poddruh	-17/48	-197,86	<0,001
	věk	-3/48	-62,16	0,002
	odběr	-17/48	-198,71	<0,001
	odběr:poddruh	-11/48	-98,51	0,0195
	poddruh:věk	-2/48	-29,18	0,0346



**Graf 5 Závislost absolutního počtu neutrofilů na linii.** Pro odfiltrování vlivu data odběru jsou na ose Y zobrazeny reziduály z modelu závislosti absolutního počtu neutrofilů na datu odběru. Modře jsou znázorněny linie poddruhu *M. m. domesticus*, fialově *M. m. musculus*, červeně hybridní linie a bíle laboratorní linie.



**Graf 6 Závislost absolutního počtu eosinofilů na poddruhu.** Pro odfiltrování vlivu data odběru a věku jsou na ose Y zobrazeny reziduály z modelu závislosti absolutního počtu eosinofilů na věku a datu odběru. Pro analýzu bylo použito 9 jedinců hybridního kmene, 12 jedinců laboratorních kmenů, 33 jedinců *M. m. musculus* a 36 jedinců *M. m. domesticus*.



**Graf 7 Závislost absolutního počtu eosinofilů na inbrední linii.** Modře jsou znázorněny linie poddruhu *M. m. domesticus*, fialově *M. m. musculus*, červeně hybridní linie a bíle laboratorní linie.

### 3.3 Diskuze

Hematologické znaky jsou alespoň částečně geneticky determinovány (Kelada et al., 2012) a mohou tedy být jak druhově tak individuálně (genotypově) specifické. Přesto jsou však výrazně ovlivněny i dalšími faktory, ať už vnitřními nebo vnějšími (Kelada et al., 2012; Klempt et al., 2006).

Závislost hematologických znaků na kategorii poddruh jsme objevili u absolutního počtu leukocytů, diferenciálního i absolutního počtu lymfocytů, diferenciálního počtu neutrofilů, a diferenciálního i absolutního počtu eosinofilů. Diferenciální počet neutrofilů je nižší u hybridní skupiny oproti všem ostatním skupinám. Absolutní i diferenciální počet eosinofilů je nižší u hybridní skupiny a skupiny laboratorních kmenů oproti skupinám *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Nejvyšší absolutní počet eosinofilů můžeme sledovat u kategorie *M. m. musculus* (viz Graf 6). V tomto parametru ale existuje vysoká variabilita mezi liniemi (viz Graf 7) a zřejmě zde spíše hraje roli vliv inbrední linie (vysoký absolutní počet eosinofilů u linie STUS), než rozdílnost poddruhů. Opačný trend pozorujeme u absolutního i diferenciálního počtu leukocytů a lymfocytů, tedy nižší počet můžeme pozorovat u skupin *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* oproti hybridním a laboratorním kmenům (viz Graf 1 a 3). Všechny zkoumané hematologické znaky se liší v závislosti na inbrední linii. Ve většině zkoumaných znaků můžeme mezi inbredními liniemi sledovat obrovskou variabilitu, jak již bylo zmíněno ve vztahu k eosinofilům (viz. Graf 4, 5 a 6). V hematologických znacích se tedy ve většině případů liší spíše jednotlivé linie, než celé poddruhy myši domácí, neboť hematologické znaky nejsou příliš specifické pro jednotlivé poddruhy. I v parametrech, u kterých lze pozorovat signifikantní rozdíl mezi poddruhy se jednotlivé linie stejného poddruhu odlišují. Všechny zkoumané hematologické parametry jsou závislé na datu odběru, a to často v interakci s linií (absolutní počet leukocytů a erytrocytů a diferenciální i absolutní počet lymfocytů a neutrofilů) a v interakci s poddruhem (absolutní a diferenciální počet eosinofilů). U myších inbredních linií ovlivňuje věk absolutní počet erytrocytů, v interakci s poddruhem dále absolutní počet eosinofilů a leukocytů, a v interakci s linií diferenciální počet lymfocytů. Hodnoty všech parametrů stoupají s věkem myši.

Jediný testovaný hybridní kmen SPLY má oproti kmenům odvozených od čistých rodičovských poddruhů vyšší absolutní počet leukocytů a lymfocytů a nižší počet eosinofilů (viz Graf 1, 3 a 7). Množství eosinofilních granulocytů je spojováno především s nákazami mnohobuněčnými parazity (Eriksson et al., 2007; Geering et al., 2013; Yasuda et al., 2012).

Myši nebyly chovány ve sterilních ale v konvenčních chovech, a proto zde může, byť v malé míře docházet k parazitárním nákazám. Nízký počet eosinofilů by mohl značit lepší zdravotní stav hybridních jedinců. Na druhou stranu jsme u hybridního kmene zaznamenali vyšší absolutní počet leukocytů i lymfocytů. Leukocytóza je častým příznakem mnohých onemocnění (Fair et al., 2007; Ots et al., 1998; Quevillon et al., 2013; Salvante, 2006). V podmínkách chovů, kde mají myši dostatečné množství zdrojů, může ale vysoké množství bílých krvinek indikovat spíše zvýšenou investici do imunitního systému, než zhoršený zdravotní stav v důsledku parazitace (Salvante, 2006). Zvýšení absolutního počtu leukocytů a lymfocytů u hybridní linie společně s nízkým počtem eosinofilních granulocytů může proto být ukazatelem jejich lepší kondice a zdravotního stavu (Salvante, 2006). Protože jsme měli k dispozici pouze jeden hybridní laboratorní kmen, je těžké tyto výsledky příliš zobecňovat a usuzovat z nich jednoznačně na lepší celkový zdravotní stav hybridních jedinců. I mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se vyskytují linie, které mají nízký počet eosinofilů, či vysoký počet lymfocytů a leukocytů jako hybridní linie SPLY (viz Graf 4,5 a 6). Důležitý tedy nemusí být vlastní hybridní status, ale spíše alelická výbava jednotlivých linií. To také vyplývá ze skutečnosti, že u inbredních linií byla heterozygotnost potlačena oproti jedincům/populacím v přírodě v závislosti na počtu generací po které byly drženy v zajetí. Variabilita v hematologických parametrech je tak v souladu s touto hypotézou spíše způsobena odlišností jednotlivých inbredních linií, než rozdíly mezi rodičovskými poddruhy a hybridními jedinci. Zvýšení počtu leukocytů a lymfocytů a snížení eosinofilů oproti poddruhům *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* jsme zaznamenali i u skupiny myší pocházejících z laboratorních kmenů A/J a C57BL/6. Laboratorní kmeny myší vznikly křížením *M. m. domesticus* s hybridy mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (Takada et al., 2013; Yang et al., 2011), jsou tedy také hybridního původu. Podobnost mezi linií SPLY a laboratorními liniemi může naznačovat, že hybridizace způsobuje změny v alelických kombinacích genů imunitního systému, které nesouvisí s heterozygotností jedinců a které se mohou projevit v námi měřených hematologických parametrech.

Hematologické parametry jsou bohužel vždy silně ovlivněny vnějšími podmínkami (Champy et al., 2004; Klempt et al., 2006). Významnou roli hraje u všech námi zkoumaných parametrů linie v interakci s datem odběru či samotné datum odběru. To znamená, že hematologické znaky se mění v průběhu roku různě u různých inbredních linií a to i za standardního světelného a tepelného režimu chovného zařízení. Dalším faktorem, který ovlivňuje hematologii myší je věk. Ovlivnění hematologických znaků stářím zvířete je

běžným jevem u mnoha druhů (Champy et al., 2004; Lugada et al., 2004; Mohri et al., 2007; Xie et al., 2013). U myši inbredních linií ovlivňuje věk absolutní počet erytrocytů, v interakci s poddruhem dále absolutní počet leukocytů a eosinofilů, a v interakci s linií také diferenciální počet lymfocytů. Všechny tyto znaky stoupají se zvyšujícím se věkem zvířete. Nárůst absolutního počtu erytrocytů s věkem byl u myši prokázán i v dalších studiích (Mazzaccara et al., 2008; Restel et al., 2014). Ve studii porovnávající různé věkové skupiny myši ale nebyl mezi všemi skupinami pozorován nárůst absolutního počtu leukocytů s věkem (Restel et al., 2014), v jiné studii byl u některých inbredních linií zaznamenán dokonce pokles absolutního počtu leukocytů s věkem (Mazzaccara et al., 2008).

Tyto výsledky ukazují, že hematologické znaky jsou u myši značně ovlivněny vnějšími vlivy i genetickým pozadím. Rozdíly jsou ale patrné spíše mezi liniemi, než mezi poddruhy myši domácí. Rozdíly mezi hybridním kmenem, laboratorními kmeny a rodičovskými poddruhy by mohly poukazovat na zvýšenou schopnost investice hybridů do imunitního systému, způsobenou ovšem nikoliv zvýšenou heterozygotností na jednotlivých lokusech, ale spíše tvorbou nových alelických kombinací genů v hybridním genomu. Bohužel máme k dispozici hodnoty pouze jediné hybridní linie, proto jsou tyto závěry poněkud odvážnou spekulací a z našich výsledků nelze spolehlivě posoudit rozdíly mezi hybridními jedinci a rodičovskými poddruhy.

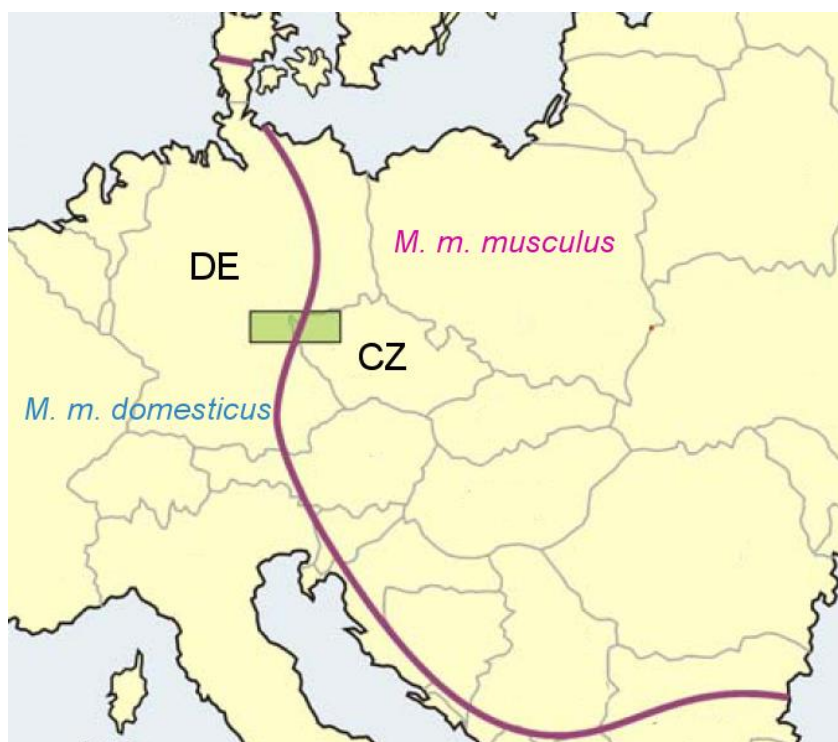
## 4 Hematologické parametry v hybridní zóně

V hybridní zóně myši domácí dochází ke křížení jedinců poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* a vzniku hybridního potomstva. V hybridní zóně došlo díky mnoha generacím zpětného křížení rodičovských poddruhů a hybridních jedinců k introgresi genomů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* a již zde prakticky nelze nalézt potomky první generace křížení (Albrechtova et al., 2012; Macholan et al., 2007). Ačkoliv se na základě předchozích parazitologických výzkumů předpokládá, že existují rozdíly ve zdravotním stavu mezi rodičovskými poddruhy a hybridy, dodnes v tomto ohledu nepanuje shoda (Baird et al., 2012; Moulia et al., 1991; Sage et al., 1986). Výskyt parazitů sám o sobě ještě nemusí být nutně významným narušením homeostázy organismu vedoucím ke zhoršení zdravotního stavu. Imunologické výzkumy ukázaly, že mnohé střevní mikroorganismy i helminti hrají roli endosymbiontů, kteří modulují střevní imunitu a pomáhají tak udržet správnou funkci trávicího traktu (Maizels, 2009; van den Biggelaar et al., 2000). To ovšem platí jen pro určité druhy střevních helmintů a jen do určité míry. Přesto je potřeba odlišit pouhý výskyt parazitů od jejich širšího vlivu na zdravotní stav. Jednou z metod, kterou lze použít pro určení zdravotního stavu obratlovců je stanovení odchylek hodnot hematologických parametrů. V této studii jsme použili soubor základních hematologických parametrů pro vyšetření zdravotního stavu myši v hybridní zóně. Abychom odhadli relevanci původních parazitologických dat, byly všechny myši vyšetřeny také na přítomnost mnohobuněčných parazitů. Očekáváme, že existuje závislost mezi parazitací jedince a hematologickými parametry indikujícími zdravotní stav jedince. Pokud je zdravotní stav dvou poddruhů myši a jejich hybridů rozdílný, budou se lišit hematologické znaky v závislosti na hybridním indexu, který určuje příbuznost jedince ke dvěma zkoumaným poddruhům.

## 4.1 Metodika

### 4.1.1 Zvířata

Za účelem vyšetření hematologických parametrů a určení množství parazitů bylo v letech 2008 a 2009 odchyceno 251 jedinců myši ve zhruba 145 km dlouhém a 50 km širokém česko-bavorském úseku hybridní zóny (viz Obrázek 2) (Bozikova et al., 2005; Macholan et al., 2011; Macholan et al., 2008). Myši byly odchyceny do dřevěných či kovových živochytných pastí na 77 lokalitách. Jelikož mohou být hematologické znaky i nákaza parazity silně ovlivněny ročním obdobím, odchyt probíhal v obou letech vždy v rozmezí deseti dnů v polovině září. Tím byl omezen vliv sezóny (Baird et al., 2012). Myši byly po odchytu umístěny do samostatných klecí s přístupem vody a krmení *ad libitum*.



**Obrázek 2** Pozice česko-bavorského transektu v rámci hybridní zóny myši domácí Fialová linie značí polohu hybridní zóny myši domácí na evropském kontinentu. Zelený obdélník označuje česko-bavorský transekt, ve kterém probíhal odchyt jedinců. Upraveno podle Macholan et al. (2008).

### 4.1.2 Hematologie

Krev byla myším odebírána v celkové anestezii. Myš jsme uspali inhalací halothanu, krev jsme odebrali nastříhnutím karotid, a poté myš usmrtili cervikální dislokací. Všem myším jsme odebrali přibližně 500  $\mu$ L arteriální krve do heparinizované mikrozkušavky. Jednotlivé hematologické parametry jsme stanovili způsobem popsaným v kapitole 3.1.2.

### 4.1.3 Vyšetření parazitů

Všichni jedinci byli *post mortem* vyšetřeni na přítomnost mnohobuněčných živočišných parazitů (helmintů). Intenzitu nákazy myši helmintárními parazity určila Joëlle Goüy de Bellocq (University of Antwerp, Belgie) a Alexis Ribas (University of Barcelona, Španělsko). Vyšetřování helmintární parazitů patřili do tříd Nematoda (hlístice) a Cestoda (tasemnice) a řadí se mezi nejčastější parazity myši. V rámci těchto skupin byl určen počet nejběžnějších druhů parazitů: *Aspicularis tetrapera*, *Hymen diminuta*, *Taenia taeniformis*, *Microthrix sp.*, *Mesocestoides*, *Calodium hepaticum*, *Masthoporus muris*, *Trichuris muris*, *Heterakis pumosa*, *Symphacia obovata* a *Aspicularis tetrapera*. U všech myši byla dutina břišní, játra a zažívací trakt vyšetřena na přítomnost parazitů pod binokulární lupou. Nalezení helmintární parazitů byli skladováni v oddělených zkumavkách 70% etanolu a později určeni do úrovně druhu. V případě, že bylo myši slepé střevo vysoce parazitováno (>100 parazitů) bylo do druhů určeno pouze 100 helmintů a celkový počet byl určen pomocí graduovaných Petriho misek. Prevalence jednotlivých druhů parazitů viz Tabulka 9.

### 4.1.4 Stanovení hybridního indexu

Hodnotu hybridního indexu jsme převzali z prací Albrechtova et al. (2012) a Baird et al. (2012). K určení hybridního indexu bylo použito 1400 SNP markerů rozmístěných po genomu ve vzdálenosti zhruba 1,86 Mb (Wang et al., 2011a). Hybridní index byl pro každého jedince vypočítán jako proporce alel poddruhu *musculus* přes všechny SNP.

### 4.1.5 Statistická analýza

Pomocí Pearsonova korelačního testu jsme zjistili vzájemnou korelaci hematologických parametrů a vzájemné korelace hmotnosti jedince, množství parazitů, hematologických znaků a hybridního indexu. Abychom se vyhnuli efektu mnohačetného testování, byly pro určení signifikance korelací použity P hodnoty upravené Holmovou metodou korekce. Do dalších analýz jsme následně použili vždy pouze jeden ze dvou korelovaných

hematologických znaků – tedy absolutní počet erytrocytů, leukocytů, lymfocytů, neutrofilů a eosinofilů. Počty monocytů a basofilů jsme nepoužili z důvodu jejich velmi nízké frekvence v periferní krvi. Závislost mezi hematologickými parametry a množstvím parazitárních nákaz jsme analyzovali pomocí zobecněných lineárních modelů. V modelech bylo použito normální rozdělení, kromě modelu popisujícího závislost absolutního počtu eosinofilů (zde použito quasipoissonovo rozdělení). Pro tuto analýzu jsme použili pouze počet parazitů druhu *Trichuris muris*, *Symphacia oblevata* a *Aspiculuris tetraptera* a celkový počet parazitů skupiny Nematoda a skupiny Cestoda (tyto proměnné jsou na sobě nezávislé;  $r=0,056$ ,  $P>0,050$ ). Ostatní druhy parazitů jsme nepoužili kvůli jejich nízkému výskytu u myši (viz Tabulka 9). Závislost mezi hematologickými parametry a množstvím parazitárních nákaz byla analyzována pomocí zobecněných lineárních modelů. Do modelů byla jako vysvětlující proměnná zahrnuta i hmotnost jedince, přestože ta koreluje s množstvím parazitů skupiny Cestoda. Tato korelace je totiž relativně slabá a vysvětluje tedy pouze malé procento variability ( $r=0,241$ ). Absolutní hodnoty leukocytů, lymfocytů a neutrofilů byly zlogaritmovány pro dosažení normality rozdělení dat. V modelech bylo použito normální rozdělení, kromě modelu popisujícího závislost absolutního počtu eosinofilů (zde použito quasipoissonovo rozdělení). Závislost mezi hybridním indexem a hematologickými znaky byla testována pomocí lineární a polynomické regrese s normálním a quasipoissonovým rozdělením. Absolutní počty jednotlivých typů buněk byly zlogaritmovány pro dosažení normality residuí. Pro porovnání hematologických znaků mezi poddruhy byli jedinci rozděleni do 3 kategorií dle HI (*M. m. domesticus*  $<0,06$ , hybrid  $0,06-0,94$ , *M. m. musculus*  $>0,94$ ). Pro zjištění rozdílů mezi kategoriemi jsme použili ANOVU a následně Tukeyho test. Mezi volně žijícími a inbredními jedinci jsme porovnali hematologické parametry Wilcoxonovým dvouvýběrovým testem. Statistickou analýzu jsme provedli v programu R verze 3.0.1.

**Tabulka 9 Prevalence parazitárních nákaz v hybridní zóně myši domácí**

Celkový počet parazitů udává celkové množství jedinců daného druhu parazita nalezených v dutině břišní 253 volně žijících myši. Prevalence udává procento myši nakažených daným parazitem.

druh parazita	celkový počet parazitů	prevalence
<i>Hymenolepis diminuta</i>	7	0,008
<i>Taenia taeniformis</i>	77	0,100
<i>Microthrix sp.</i>	107	0,42
<i>Mesocestoides</i>	54	0,025
<i>Calodium hepaticum</i>	1	0,004
<i>Mastophorus muris</i>	214	0,104
<i>Trichuris muris</i>	800	0,246
<i>Heterakis spumosa</i>	19	0,029
<i>Syphacia obvelata</i>	1927	0,600
<i>Aspicularis tetraptera</i>	1329	0,438

**Tabulka 10 Korelace hematologických parametrů u volně žijících myši**

P hodnoty jsou upraveny Holmovou metodou; r – Pearsonův korelační koeficient

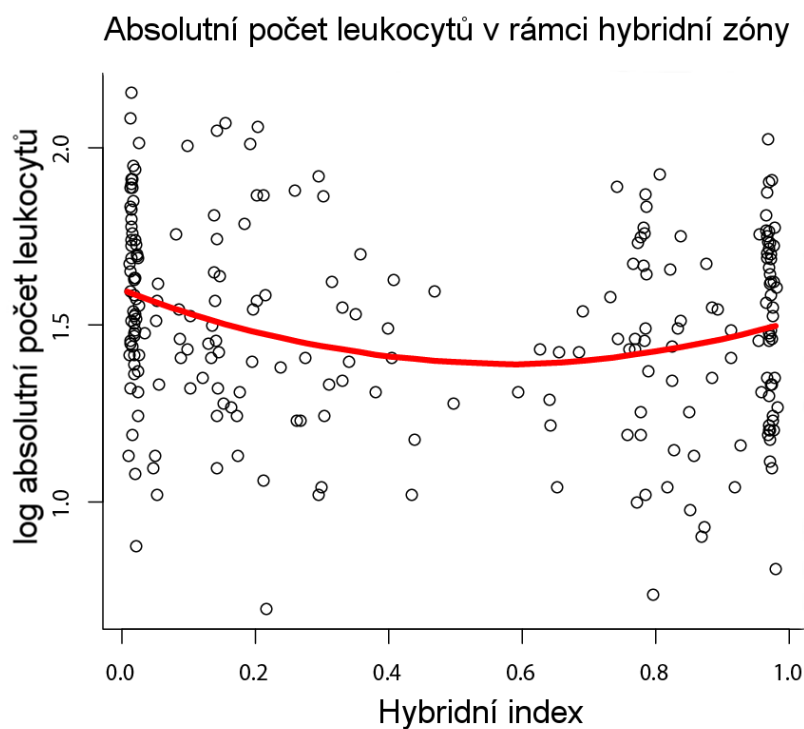
korelované hematologické parametry	P	r
Absolutní počet erytrocytů / hematokrit	<0,001	0,72
Absolutní / diferenciální počet lymfocytů	<0,001	0,38
Absolutní / diferenciální počet neutrofilů	<0,001	0,63
Absolutní / diferenciální počet eosinofilů	<0,001	0,78
Absolutní počet leukocytů / neutrofilů	<0,001	0,65
Absolutní počet leukocytů / lymfocytů	<0,001	0,88
Absolutní počet leukocytů / eosinofilů	<0,001	0,53
Absolutní počet lymfocytů / neutrofilů	0,023	0,22
Absolutní počet lymfocytů / eosinofilů	<0,001	0,49
Diferenciální počet lymfocytů / neutrofilů	<0,001	-0,94

## 4.2 Výsledky

Při iniciální analýze dat jsme u volně žijících myší našli korelaci mezi několika hematologickými parametry (viz Tabulka 10). Z hlediska dalších analýz byla nejdůležitější pozitivní korelace mezi absolutními a diferenciálními počty jednotlivých typů buněk a dále pak mezi hematokritem a absolutním počtem erytrocytů. Také existuje korelace mezi hmotností myši a množstvím tasemnic (Cestoda;  $r=0,25$ ,  $P=0,010$ ), hmotnosti a absolutním počtem eosinofilů ( $r=0,22$ ,  $P=0,034$ ) a HI a hmotností ( $r=-0,38$ ,  $P<<0,001$ ). Nenalezli jsme žádný vztah mezi absolutním počtem erytrocytů a počtem parazitů ( $P>0,05$ ). Celkový počet bílých krvinek je závislý na počtu tasemnic (MAM:  $Df=-2/234$ ,  $F=7,14$ ,  $P<0,01$ ; tasemnice:  $Df=-1/234$ ,  $F=4,62$ ,  $P=0,033$ ; hmotnost:  $Df=-1/234$ ,  $F=6,25$ ,  $P=0,013$ ). Absolutní počet neutrofilů je také závislý na nákaze myši tasemnicemi a hmotnosti (MAM:  $Df=2/236$ ,  $F=12,93$ ,  $P<<0,001$ , hmotnost:  $Df=-1/234$ ,  $F=7,87$ ;  $P<<0,005$ ; tasemnice:  $Df=-1/234$ ,  $F=11,858$ ,  $P<0,01$ ). Stejně tak i absolutní počet eosinofilů závisí na nákaze tasemnicemi a hmotnosti myši (MAM:  $Df=-2/234$ ,  $F=-117,0$ ,  $P<<0,001$ ; hmotnost:  $Df=-1/235$ ,  $F=22,961$ ,  $P=0,001$ ; tasemnice:  $DF=-1/234$ ,  $F=-63,85$ ,  $P<<0,001$ ). Naproti tomu absolutní počet lymfocytů není závislý na množství žádných mnohobuněčných parazitů ( $P<0,05$ ). Vliv jednotlivých druhů běžných parazitů (*Trichuris muris*, *Symphacia oblevata* a *Aspiculuris tetraptera*) na hematologické parametry jsme neprokázali ( $P>0,05$ ).

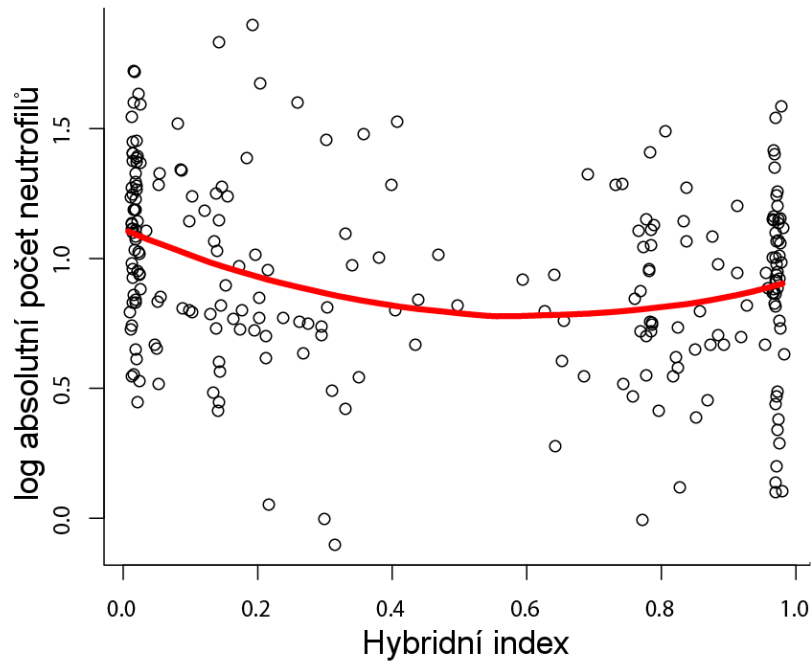
Absolutní počet erytrocytů u myši nemá souvislost s hybridním indexem ( $P<0,05$ ). Závislost mezi hybridním indexem myši, hmotností a množstvím krevních buněk jsme však prokázali u absolutního počtu leukocytů (MAM:  $Df=-3/240$ ,  $F=5,58$ ,  $P=0,001$ ; hmotnost:  $Df=1/241$ ,  $F=5,23$ ,  $P=0,023$ ; HI:  $Df=-2/240$ ,  $F=3,30$ ,  $P=0,038$ ; viz Graf 8), absolutního počtu neutrofilů (MAM:  $Df=3/239$ ;  $F=8,67$ ;  $P<<0,001$ ; hmotnost:  $Df=1/240$ ,  $F=5,34$ ,  $P=0,021$ ; HI:  $Df=-2/239$ ,  $F=6,12$ ,  $P=0,003$ ; viz Graf 9) a absolutního počtu eosinofilů (MAM:  $Df=-3/233$ ,  $D=-100,43$ ,  $P<<0,001$ ; hmotnost:  $Df=-1/233$   $D=-30,67$ ,  $P<0,001$ ; HI:  $Df=-2/233$ ,  $D=-47,27$ ,  $P<0,001$ ; viz Graf 10). Závislost na hybridním indexu jsme neprokázali u absolutního počtu lymfocytů ( $P<0,05$ ). Námi stanovené kategorie *M. m. musculus*, *M. m. domesticus* a hybridní kategorie se liší v absolutním počtu leukocytů ( $Df=250/2$ ,  $F=4,12$ ,  $P=0,0173$ ), Tukeyho test ale jako průkazný prokázal pouze rozdíl mezi kategorií hybrid a *M. m. domesticus* ( $P=0,041$ ) Prokázali jsme ale také odlišnost v absolutním počtu neutrofilů ( $Df=250/2$ ,  $F=6,00$ ,  $P=0,003$ ) a to jak mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* ( $P=0,022$ ) tak mezi skupinami *M. m. domesticus* a hybrid ( $P=0,003$ ). Dále se kategorie liší v absolutním počtu eosinofilů

(Df=250/2, F=9,22, P<0,001). Signifikantní jsou zde rozdíly mezi kategoriemi *M. m. domesticus* a hybrid (P<0,001) a *M. m. musculus* a hybrid (P=0,028). Porovnání absolutních počtů krevních buněk mezi inbredními a volně žijícími jedinci ukazuje, že inbrední jedinci mají zvýšený počet všech typů krvinek, kromě neutrofilů (viz Tabulka 11).



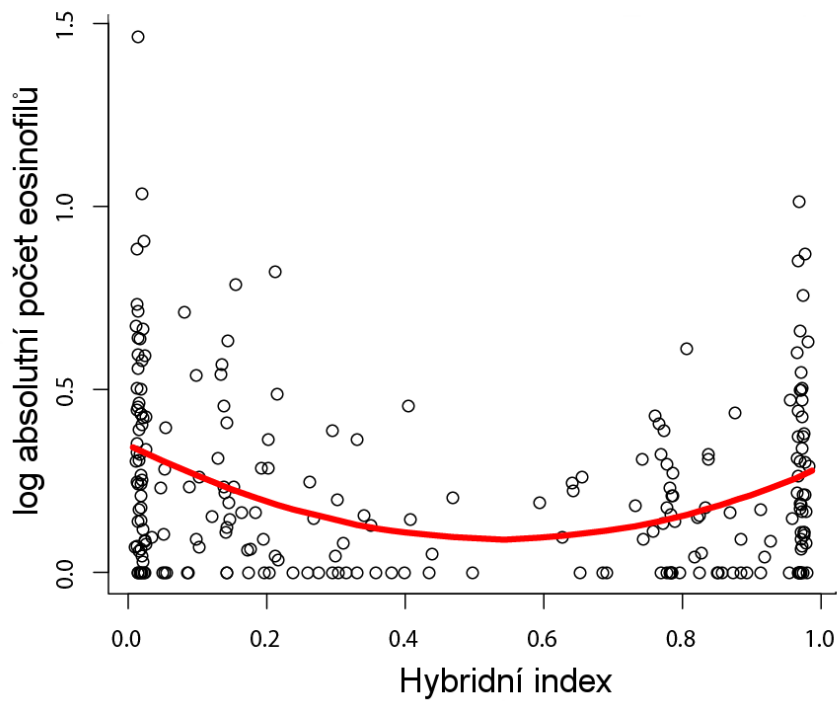
**Graf 8** Závislost absolutního počtu leukocytů na hybridním indexu Na ose Y je znázorněn logaritmus hodnot absolutního počtu leukocytů. Pro analýzu bylo použito 251 jedinců.

Absolutní počet neutrofilů v rámci hybridní zóny



**Graf 9** Závislost absolutního počtu neutrofilů na hybridním indexu Na ose Y je znázorněn logaritmus hodnot absolutního počtu neutrofilů. Pro analýzu bylo použito 251 jedinců.

Absolutní počet eosinofilů v rámci hybridní zóny



**Graf 10** Závislost absolutního počtu eosinofilů na hybridním indexu Na ose Y znázorněn logaritmus hodnot absolutního počtu eosinofilů. Pro analýzu bylo použito 251 jedinců.

**Tabulka 11 Porovnání absolutního počtu krvinek u volně žijících a inbredních myší**

Porovnání bylo provedeno Wilcoxonovým dvouvýběrovým testem Pro porovnání bylo použito 251 volně žijících jedinců a 78 inbredních jedinců. SD – směrodatná odchylka

	Volně žijící jedinci		Inbrední kmeny		Wilcoxonův test	
	průměr	SD	průměr	SD	W	P
Absolutní počet erytrocytů	1021,07	± 168,83	1068,86	± 204,90	8410	0,003
Absolutní počet leukocytů	38,02	± 24,28	69,51	± 42,97	14945	<<0,001
Absolutní počet lymfocytů	62,05	± 16,59	68,98	± 13,78	1233	<<0,001
Absolutní počet neutrofilů	32,45	± 16,83	20,40	± 12,37	4037	<<0,001
Absolutní počet eosinofilů	2,44	± 2,96	3,79	± 3,72	4856,5	<<0,001
Absolutní počet basofilů	0,34	± 0,79	1,50	± 2,43	12413	<<0,001
Absolutní počet monocytů	2,74	± 2,44	5,33	± 4,92	15209	<<0,001

## 4.3 Diskuze

Bílé krvinky jakožto hlavní efektorové buňky imunitního systému zprostředkovávají obranu proti parazitárním nákazám (Danilova, 2006). Proto jejich množství v periferní krvi může odrážet zdravotní stav jedinců (Roletto, 1993).

V naší studii jsou některé hematologické znaky vzájemně korelované (viz Tabulka 10). Především existuje zřejmá korelace mezi absolutními a diferenciálními počty jednotlivých typů krevních buněk, což je dáno povahou těchto hodnot a metodou jejich výpočtu. Diferenciální počet je totiž určen jako procentuální zastoupení jednotlivých typů bílých krvinek a absolutní počet je pak vypočítán jako toto procento násobené absolutním počtem všech bílých krvinek. Proto korelace mezi absolutními a diferenciálními počty jednotlivých typů leukocytů nejsou nijak překvapivé. Podobně se dá vysvětlit i korelace mezi absolutním počtem erytrocytů a hematokritem. Hematokrit je stanovován jako celkový objem, který zabírají červené krvinky na jednotku krve a odráží tak v sobě i informaci o jejich počtu na objemovou jednotku. Tato korelace ale nemusí platit vždy – vyšší hematokrit může také značit větší erytrocyty, ne jejich vyšší počet. Tak tomu může být například u ptáků, kdy se do krve uvolní větší počet velkých nezralých erytrocytů (Campbell and Ellis, 2007). U savců je však takovýto vztah nepravděpodobný, protože nezralá stádia červených krvinek se u nich v krevním oběhu prakticky nevyskytují. Zajímavá je pozitivní korelace absolutního počtu lymfocytů s absolutním počtem neutrofilů a eosinofilů. Tyto korelace značí, že společně vzrůstají počty všech typů bílých krvinek. Kromě hematologických znaků jsme našli korelaci i mezi hmotností myši a hybridním indexem. To není nic překvapivého, neboť myši poddruhu *M. m. musculus* jsou menší než poddruh *M. m. domesticus* (Schwarz and Schwarz, 1943), je tedy zřejmé, že mají i nižší hmotnost. S hmotností dále pozitivně koreluje množství parazitů skupiny Cestoda (tasemnice) a absolutní počet eosinofilů. V podrobné analýze se nám pak podařilo prokázat, že množství mnohobuněčných parazitů ovlivňuje hematologické znaky myši. Zejména tasemnice ovlivňují absolutní počet leukocytů, neutrofilů i eosinofilů. Čím více je myš parazitována, tím větší má i množství bílých krvinek v periferní krvi. Absolutní počet všech leukocytů, neutrofilů i eosinofilů je také ovlivněn hmotností myši – myši s větší hmotností mají větší množství těchto buněk na objemovou jednotku krve. Prevalence jednotlivých druhů parazitů je uvedena v Tabulce 9. Pro porovnání zdravotního stavu myši v rámci hybridní zóny jsme analyzovali pouze vztah absolutního počtu vybraných typů buněk s hybridním indexem. Absolutní počet leukocytů, neutrofilů i eosinofilů, tedy

všechny parametry, u kterých jsme prokázali vztah k parazitárním nákazám, jsou závislé na hybridním indexu. U všech těchto parametrů pozorujeme stejný trend – tedy snížení absolutního počtu buněk směrem ke středním hodnotám hybridního indexu (viz Graf 8, 9, a 10). Myši v rámci hybridní zóny nemají odlišný absolutní počet lymfocytů, což je parametr, u kterého jsme neprokázali ani souvislost s přítomností parazitárních nákaz. Absolutní počet neutrofilů se ale liší nejen mezi hybridními jedinci a rodičovskými poddruhy, ale je také signifikantně nižší u poddruhu *M. m. musculus* oproti *M. m. domesticus*. Dále jsme zjistili, že inbrední jedinci, mají oproti volně žijícím myším vyšší absolutní počet všech typů krevních buněk, vyjma neutrofilních granulocytů.

Vliv mnohobuněčných parazitů na hematologické znaky byl pozorován u mnoha hostitelských druhů (Haenen et al., 2010; Palstra et al., 2007; Roletto, 1993). Tento typ parazitárních nákaz je spojován převážně s eosinofilií (Al-Obaidi, 2012; Balla et al., 2010; Geering et al., 2013; Ovington and Behm, 1997). Infekce mnohobuněčnými červy vyvolává u savců imunitní odpověď Th2 typu, která vede především k produkci protilátek typu IgE, sekreci regulačních cytokinů IL-4 a IL-5 následované aktivací eosinofilů (Ovington and Behm, 1997). I u myši v hybridní zóně můžeme pozorovat závislost mezi množstvím eosinofilů v krvi a intenzitou nákazy, ovšem pouze v souvislosti s nákazou tasemnicemi. Zvýšení počtu eosinofilů v periferní krvi bylo dokumentováno například při experimentálních nákazách myši tasemnicemi *Mesocostoides corti* (Riley and Chernin, 1994) či *Hymenolepis nana* (Parvathi and Karemungikar, 2011). Přestože existují mnohé doklady o zvýšené aktivaci eosinofilů způsobené nákazou hlísticemi u myši i dalších druhů (Bonne-Annee et al., 2011; Gebreselassie et al., 2012; Knott et al., 2009; Reinhardt et al., 2011; Yasuda et al., 2012), naše studie poněkud překvapivě neprokázala závislost mezi nákazou hlísticemi a absolutním počtem eosinofilů. Experimentálně bylo ovšem prokázáno, že aktivace eosinofilních granulocytů se nemusí nutně projevit v periferní krvi (Dixon et al., 2006). Porovnání nákazy myši parazity *Trichinella spiralis* a *T. muris* v rámci této studie také ukazuje, že imunitní reakce na různé druhy hlístic má různý efekt na hematologické znaky. Zatímco *T. spiralis* vyvolá zvýšení eosinofilních granulocytů, po infekci *T. muris* zůstávají hematologické parametry v normě (Dixon et al., 2006). Právě *T. muris* patří mezi nejhojnější parazity ze skupiny tasemnic, které jsme v hybridní zóně pozorovali. Studie provedená Dixon et al. (2006) tedy může podat vysvětlení, proč jsme nepozorovali vztah mezi počtem eosinofilních granulocytů a intenzitou nákazy hlísticemi. Změny v absolutním počtu eosinofilů v periferní krvi tedy neodrážejí infekci všemi mnohobuněčnými parazity. Množství

eosinofilů zároveň koreluje s hmotností myši, s kterou je také korelované množství tasemnic. Hmotnost myši souvisí úzce s jejím věkem, můžeme tedy předpokládat, že myši s vyšší hmotností jsou také starší. Vzájemný počet eosinofilů s věkem myši jsme prokázali i u inbredních linií, což je ve shodě s touto pozorovanou korelací. S věkem myši vzrůstá také riziko střetů s parazity. To může být vysvětlením pro nalezené vyšší množství parazitů u myši s vyšší hmotností. Závislost intenzity parazitární nákazy na stáří jedince bylo popsáno například u surikat (*Suricata suricatta*), kde prevalence střevních parazitů *Toxocara suricattae* vzrůstá s věkem (Leclaire and Faulkner, 2014), či u ještěrky Lilfordovi (*Podarcis lilfordi*), kde subadultní jedinci mají menší množství parazitů než dospělí jedinci (Garrido and Perez-Mellado, 2013). Studie parazitů na zajících (*Lepus europaeus*) ale ukazuje, že v některých případech může počet různých parazitárních druhů s věkem stoupat i klesat (Chroust et al., 2012).

Intenzita nákazy tasemnicemi souvisí i se zvýšením absolutního počtu neutrofilů v periferní krvi myši. Neutrofilní granulocyty jsou především fagocyty drobných částic (Geering et al., 2013), nehrají tedy významnou roli v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Zvýšení počtu neutrofilů může být způsobeno celkovým zhoršením kondice a zvýšeným stresem u jedinců napadených tasemnicemi (Davis et al., 2008). Vysoký počet neutrofilů mohou vyvolat také ko-infekce helmintárních parazitů s bakteriemi a viry, k jejichž eliminaci jsou tyto buňky přizpůsobeny. S ko-infekcemi různými parazitárními druhy se v přírodě setkáváme velmi často (Pathak et al., 2012; Petney and Andrews, 1998). Jedinci ve špatné kondici mohou být zároveň parazitováni větším množstvím jiných typů parazitů (např. bakterií či virů), které zvyšují počet neutrofilů (Gupta et al., 1999; Quevillon et al., 2013). V případě infekce některými bakteriální či virovými infekcemi dochází k aktivaci imunitního systému směrem k prozánětlivé imunitní odpovědi (Abbas et al., 1996). Modulace imunitní odpovědi tímto směrem brání rozvoji Th2 reakce, která je nutná k eliminaci helmintárních parazitů (Abbas et al., 1996). U jedinců, u kterých propukla zánětlivá reakce spojená s aktivací neutrofilů pak můžeme pozorovat vyšší množství helmintárních parazitů.

Silná závislost mezi hematologickými parametry a parazitárními nákazami, především tasemnicemi, ukazuje, že hematologické znaky u volně žijících živočichů jsou dobrým vodítkem k určení zdravotního stavu. V rámci hybridní zóny je možné sledovat rozdíly v hematologických parametrech, které odrážejí intenzitu parazitárních nákaz, v závislosti na hybridním indexu myši. Z toho vyplývá, že poddruhy myši domácí a jejich hybridy se zřejmě odlišují ve zdravotním stavu a schopnosti odolávat parazitům.

Absolutní počet neutrofilů i eosinofilů se snižuje směrem ke středním hodnotám hybridního indexu (viz Graf 9 a 10). Hematologické parametry tedy mohou naznačovat, že hybridní jedinci jsou méně parazitováni a jsou tedy v lepším zdravotním stavu. Naše studie tedy podporuje hypotézu hybridní rezistence (Fritz et al., 1999; Moulia, 1999), podle které mají hybridní jedinci zvýšenou schopnost odolávat parazitárním nákazám. Tuto hypotézu podporuje i studie Baird et al. (2012), ve které bylo porovnáváno množství parazitů *T. muris*, *Taenia taeniaeformis* a *A. tetraptera* and *S. obvelata* v závislosti na hybridním indexu myši. Všichni tito parazité se u hybridních jedinců vyskytovali v menším množství než u rodičovských poddruhů. Platnost hypotézy hybridní rezistence v hybridní zóně myši domácí podporuje i porovnání průběhu experimentální nákazy u hybridů a rodičovských poddruhů parazitickým druhem *A. tetraptera* (Derothe et al., 2004). Hybridi první i dalších (F3 a F4) generací křížení mají zvýšenou rezistenci k *A. tetraptera* (byl u nich pozorován nižší počet parazitických jedinců) oproti rodičovským poddruhům. Experimentální nákaza prvokem *Trypanosoma musculi* ale neprokázala žádný rozdíl v náchylnosti poddruhů a jejich hybridů (Derothe et al., 1999), a nákaza *Sarcocystis muris* ukazuje vyšší náchylnost hybridních jedinců (Derothe et al., 2001). Zvýšená rezistence hybridních jedinců tedy nemusí být všeobecně platná. Rezistence k různým parazitárním nákazám je ustanovena různými způsoby a může se mezi druhy i jedinci lišit. Rozpoznání parazitárních nákaz u hostitelem z části funguje na takzvaném principu „zámku a klíče“ (Agrawal and Lively, 2003; Flor, 1971; Frank, 1993; Thompson and Burdon, 1992). Protože rozpoznání a eliminace nákazy může být vzhledem k této nauce specifická, určitý genotyp hostitele zajišťuje rezistenci pouze vůči určité parazitární nauce, či vůči konkrétnímu genotypu parazita (Thompson and Burdon, 1992; Westerdahl et al., 2005). O rezistenci hostitele lze potom mluvit pouze ve vztahu ke konkrétní parazitární nauce (Vinkler and Albrecht, 2011). U hybridních jedinců může kombinace rodičovských genotypů vést v některých případech k heteroznímu efektu (Derothe et al., 2004; Moulia et al., 1995). To ovšem neznamená, že u jiných adaptací nemůže po křížení poddruhů docházet například k rozpadu koadaptovaných genových komplexů způsobujících maladaptaci na parazitární nauce a snížení rezistence jedince. Naopak hybridní rezistence by mohla vznikat právě jako důsledek vzniku nových alelických kombinací napříč geny v genomu. Něco takového, do určité míry, naznačují i naše výsledky hematologické studie u myši inbredních linií chovaných v konvenčních chovech (kapitola 3).

Porovnání množství mnohobuněčných parazitů v rámci hybridní zóny ukazuje také rozdíly mezi rodičovskými poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Baird et al., 2012). Jedinci

příbuznější poddruhu *M. m. musculus* jsou mnohem méně parazitováni, tento rozdíl je nejvýraznější u nákazy tasemnicí *Taenia taeniaeformis* (Baird et al., 2012). I tyto výsledky se shodují s naší prací. Porovnání absolutního počtu neutrofilů ukazuje signifikantní rozdíl mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Myši geneticky bližší poddruhu *M. m. musculus* mají menší počet neutrofilů oproti poddruhu *M. m. domesticus*. Jak již bylo zmíněno výše, absolutní počet neutrofilů u myši v hybridní zóně odráží parazitaci jedince a pravděpodobně celkový zdravotní stav myši. U inbredních jedinců v podmínkách chovů jsme nenašli významný rozdíl v absolutním počtu neutrofilů mezi poddruhy (kapitola 3), což značí, že tato změna je skutečně vyvolaná změnou zdravotního stavu. Vyšetření hematologických parametrů ukazuje na lepší anti-parazitární rezistenci podruhu *M. m. musculus*. Odlišná náchylnost rodičovských druhů k parazitům byla popsána i v hybridní zóně slávky, či v hybridní zóně parmy, ovšem v těchto případech měli hybridní jedinci vždy průměrnou rezistenci k parazitům (Coustau et al., 1991; Lebrun et al., 1992). Na druhou stranu vyšetření myši v hybridní zóně myši domácí na přítomnost parazitických microsporidií (*Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon spp.*) či bakterií rodu *Helicobacter* neprokázalo žádný rozdíl v nákaze mezi poddruhy (Sak et al., 2011; Wasimuddin et al., 2012). Poddruhy, které se vyvíjejí odděleně, si vytváří v důsledku koevoluce s parazitem nezávisle na sobě adaptace imunitního systému. Adaptace na různé parazitární nákazy se samozřejmě liší v důsledku vzájemné koevoluce s daným parazitem. Tato koevoluce byla recentně popsána i u myši domácí a prvoka *Cryptosporidium tyzzeri* (Kvac et al., 2013). Rezistence či náchylnost k parazitárním nálezům je specifická (Agrawal and Lively, 2002; Thompson and Burdon, 1992; Westerdahl et al., 2005). Nelze tedy očekávat odlišnou schopnost anti-parazitární rezistence mezi druhy proti všem parazitům.

Imunitní systém a jeho jednotlivé složky jsou obecně pokládány za fyziologicky nákladné (Brown, 2003; Sadd and Schmid-Hempel, 2009; Strauss et al., 2002). Z toho vyplývá, že kvalita a množství zdrojů ovlivňuje funkci imunitního systému (Seppala and Jokela, 2010; Siva-Jothy and Thompson, 2002; Venesky et al., 2012). Jedinci žijící v prostředí chudém na zdroje si nemohou dovolit příliš investovat do obrany proti parazitárním nálezům. Stejně tak jedinci ve špatné kondici mají zhoršenou anti-parazitární rezistenci kvůli nedostatku zdrojů, které mohou investovat do rozvoje a udržování imunitního systému. To potvrzuje i srovnání hematologických znaků inbredních linií a myši žijících volně v hybridní zóně (viz Tabulka 11). Absolutní počet bílých krvinek je u inbredních myši výrazně vyšší než u volně žijících myši. Inbrední myši v chovech mají stálý přísun potravy a všeobecně lepší podmínky

než volně žijící myši, což jim umožňuje alokovat zdroje do imunitního systému a udržovat stálý vysoký počet leukocytů. Signifikantně se mezi inbredními a volně žijícími jedinci odlišují i všechny ostatní hematologické parametry (viz. Tabulka 11). Takové rozdíly jsou očekávatelné u myší žijících v naprosto odlišném prostředí. Evidence o změnách hematologických parametrů mezi volně žijícími zvířaty a zvířaty chovanými v zajetí ale není jednoznačná. U volně žijících buvolů (*Syncerus caffer*) byli naměřeny vyšší hodnoty absolutního počtu bílých krvinek než u afrických buvolů chovaných v zajetí (Beechler et al., 2009). Stejně tak u volně žijících kočky divoké (*Felis silvestris silvestris*) byly zjištěny vyšší počty bílých krvinek, neutrofilů a eosinofilů oproti kočce divoké chované v zajetí, ale naopak nižší hodnoty absolutního počtu červených krvinek (Marco et al., 2000; Racnik et al., 2004). Hematologické vyšetření volně žijících a v zajetí chovaných plameňáků přineslo podobné výsledky jako náš výzkum a ukazuje vyšší absolutní počet bílých krvinek u jedinců v zajetí (Puerta et al., 1992). Vliv odlišného prostředí ve volné přírodě a v zajetí není tedy jednoznačný. Jak jsme ukázali i v naší práci, hematologické parametry jsou velmi proměnné v závislosti na mnoha vnitřních i vnějších faktorech. Patří mezi ně i strava, stres, manipulace se zvířetem či změna jeho prostředí (Fisher et al., 2010; Galeotti et al., 2010). Výsledky porovnání hematologických parametrů u různých druhů ve volné přírodě a v zajetí může být nejednoznačný, právě kvůli nesnadnému odlišení působení dalších vlivů, které hematologické parametry ovlivňují. Jediný absolutní počet buněk, který je zvýšený u volně žijících myší oproti inbredním myším je absolutní počet neutrofilů. Volně žijící myši mají jistě větší množství parazitárních nákaz, u kterých jsme prokázali vliv na absolutní počet neutrofilů. Dle našich výsledků ale množství parazitárních nákaz ovlivňuje i absolutní počet leukocytů a eosinofilů, které jsou u volně žijících myší sniženy oproti inbredním jedincům. Zvýšení počtu neutrofilů v periferní krvi myší v hybridní zóně tedy pravděpodobně ovlivňuje spíše celkový fyziologický stres jedince (Davis et al., 2008; Dhabhar, 2002; Gross and Siegel, 1983). Inbrední myši v chovech jsou zřejmě více zvyklé na manipulaci a proto u nich odchyt a odběr krve nemusí vyvolávat tak silnou stresovou reakci a zvýšení počtu neutrofilů, jako u volně žijících myší.

Pokud zvýšený počet bílých krvinek u inbredních jedinců skutečně značí jejich lepší kondici a investici do imunitního systému, pak by zvýšený absolutní počet bílých krvinek u rodičovských poddruhů oproti hybridním jedincům v hybridní zóně mohl také naznačovat opačný trend, než je popsán výše. Tedy že rodičovské poddruhy jsou v lepší kondici oproti hybridním jedincům. Protože jsme však prokázali silnou závislost mezi jednotlivými

buněčnými typy a množstvím parazitárních nákaz a naše výsledky jsou také ve shodě se studií porovnávající množství parazitů v hybridní zóně (Baird et al., 2012), není tento scénář pravděpodobný. Předpokládáme, že všichni volně žijící jedinci mají celkově snížené množství všech buněčných typů, kvůli celkově velmi odlišným podmínkám prostředí. Zvýšení absolutního počtu leukocytů u jedinců v rámci hybridní zóny tedy neznačí lepší kondici, ale spíše naopak vyšší parazitaci a zhoršený zdravotní stav.

## 5 Otokový kožní test: ConA vs. PHA

Otokový kožní test (skin-swelling test) je nejběžněji používaný test prozánětlivé imunitní reaktivity v ekoimunologickém výzkumu (Kennedy and Nager, 2006; Martin et al., 2006; Vinkler et al., 2010). Nejčastěji používaným stimulantem pro tento test je PHA (de Bellocq et al., 2006; Fernandez-De-Mera et al., 2008; Finger et al., 2013; Vinkler et al., 2012). Jelikož však PHA váže kromě TCR i komponenty buněčných membrán erytrocytů (Leavitt et al., 1977), je použití PHA v těchto studiích zatíženo interpretačními nejasnostmi ze strany mechanismu aktivace imunity (Vinkler et al., 2010). *In vitro* studie navíc ukazují, že PHA je relativně slabším mitotickým aktivátorem T lymfocytů než ConA (Jacobsson and Blomgren, 1974; Jones, 1973; Lindahlk, 1972). ConA se váže specificky na koreceptor CD3 v rámci receptorového komplexu TCR (Leavitt et al., 1977) a mechanismus aktivace imunity tímto mitogenem je tedy interpretačně přímočarý. Naším cílem bylo vylepšit metodiku otokového kožního testu použitím ConA namísto PHA jako stimulantu. ConA však dosud nebyl v ekoimunologických studiích aplikován a ani mechanismus vlivu těchto dvou látek na zánětlivou reakci u myši nebyl dosud podrobně prozkoumán. Aby bylo možné testovat a správně interpretovat prozánětlivou imunitní reakci u myši v hybridní zóně, bylo nejdříve nutné porovnat vliv těchto dvou látek a zhodnotit vhodnost jejich použití pro otokový kožní test.

### 5.1 Metodika

#### 5.1.1 Zvířata

Třicet pět myších samců laboratorního kmene C57BL/6 ve věku 44-121 dní bylo získáno z chovů Ústavu biologie obratlovců, Akademie věd České Republiky, v.v.i. ve Studenci. Každý jedinec byl umístěn v samostatné kleci s přístupem ke krmení a vodě *ad libitum*.

#### 5.1.2 Plán pokusu

Těchto 35 myši bylo rozděleno do 7 skupin po 5 jedincích. Všichni jedinci byli zvázeni s přesností na 0,01 g. Před pokusem jsme všem jedincům odebrali vzorek krve z ocasní žíly (ca 5  $\mu$ L) a připravili krevní nátěr. Dále jsme změřili tloušťku pravé i levé tlapky v metatarsální oblasti, vždy třikrát, pomocí digitálního tloušťkoměru s přesností na 0,01mm (Mitutoyo547-301, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japonsko). Po přeměření jsme

pokusným myším do podkoží středu ventrální strany metatarsu levé tlapky injikovali 0,025 mg konkanavalinu A (ConA) typ IV (produkt č. C2010, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) zředěného 20  $\mu$ L sterilního DPBS (produkt č. D5652, Sigma-Aldrich) a stejné množství fytohemaglutininu (PHA-P; produkt č. L8754, Sigma-Aldrich) zředěného ve stejném množství DPBS bylo injikováno do pravé tlapky. Kontrolní skupině myši (n=5) jsme do podkoží levé tlapky injikovali 20  $\mu$ L DPBS a pravá tlapka zůstala neošetřena. U všech jsme toto ošetření provedli ve stejné denní době – mezi 16:00 a 20:00h. Poté byly myši vráceny zpět do svých klecí a ponechány zde v klidu do doby měření odpovědi. Velikost otokové odpovědi jsme měřili po daných časových úsecích v jednotlivých skupinách, tzn. po 3 h (n=5), 6 h (n=5), 12 h (n=5), 24 h (n=5), 48 h (n=5) a 72 h (n=5). Opět jsme třikrát změřili tloušťku tlapky s přesností 0,01 mm (s repetabilitou  $r=0,99$ ). Otoková odpověď byla vypočítána jako průměr ze tří měření velikosti tlapky myši po pokusu mínus průměr z měření velikosti tlapky před pokusem. Ihned po pokusu jsme odebrali druhý vzorek krve (ca 5  $\mu$ L) k přípravě dalšího krevního nátěru. Následně jsme všechny myši usmrtili cervikální dislokací. Z každé tlapky jsme odebrali nekropsii tkáně (vertikální průřez tlapkou distálně od zápěstí, cca 3 mm) a vzorek fixovali v 10% formalinu ředěném v DPBS.

### 5.1.3 Histologie a hematologie

Metody zde použité se shodují s hematologickými a histologickými metodami popsány mi ve Vinkler et al. (2010). Tkáň z tlapek byla skladována v 10% formalinu při +4°C a následně zpracována v komerční histologické laboratoři (BIOLAB Praha Laboratory, Praha). Zde byly zalaty do parafínu, nařezány na 1 $\mu$ m řezy a obarveny hematoxylinem a eosinem. Byly zhotoveny vždy 3 řezy z oblasti metatarsu každého vzorku tlapky. Každý obarvený řez jsme nafotili na třech nezávislých místech (tzn. 9 fotografií na vzorek) pod objektivem se 40 $\times$  zvětšením (mikroskop Olympus BX51 s digitální kamerou Olympus DP71; software Quick PHOTO Industrial verze 2.3; Promicra, Praha, Česká republika). Buňky na řezu jsme počítali na ploše o velikosti 0,0025 mm<sup>2</sup> v programu IMAGEJ 1.44p software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Ve vzorku jsme určili pět buněčných typů: lymfocyty, monocyty, neutrofilny, basofily and erytrocyty. Z celkového počtu buněk byl přepočten počet a typ buněk na plochu 0,01 mm<sup>2</sup>. Všechny krevní nátěry byly obarveny barvivem Wright-Giemsa Modified (product No. WG128, Sigma-Aldrich). Diferenciální počet buněk v krevním nátěru byl stanoven podle Campbell and Ellis (2007) viz kapitola 3.1.2.

### 5.1.4 Exprese cytokinů

Abychom určili intenzitu imunitní odpovědi, byl následně proveden druhý experiment, při němž byla měřena exprese hlavních prozánětlivých cytokinů (IL-6 a IFN- $\gamma$ ) v tlapkách myši po aplikaci PHA a ConA v době maxima otokové reakce zjištěné v pilotním experimentu. Měření exprese cytokinů bylo provedeno Ing. Miladou Chudíčkovou v laboratoři Prof. RNDr. Vladimíra Holáně, DrSc na Ústavu molekulární genetiky AVČR, v.v.i. a zde je popsáno pouze stručně. Exprese prozánětlivých cytokinů IL-6 a IFN- $\gamma$  byla zjišťována ve vzorcích tkáně z tlapek kontrolní skupiny (nic a PBS, n=11 kontrolních jedinců), nebo tlapek ošetřených ConA, PHA (n=11 pokusných jedinců) pomocí qPCR. Tkáň byla zmrazena ve zkumavkách s 500  $\mu$ l roztoku TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). RNA byla izolována s použitím roztoku TRI a polyacrylového nosiče (Molecular Research Center) dle instrukcí výrobce. Jeden  $\mu$ g RNA byl ošetřen deoxyribonulázou I (Promega, Madison, WI) a zároveň použit na pro reverzní transkripci. cDNA byla nasyntetizována za použití M-MLV reverzní transkriptázy a náhodných primerů (Promega) v celkovém reakčním objemu 25  $\mu$ l. Pro kvantitativní real-timePCR (qPCR) byl použit iCycler (BioRad, Hercules, CA) a iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA) (Trosan et al., 2012). Pro amplifikaci byly použity následující primery: GAPDH (housekeeping gen): 5'-CCCAACGTGTCTGTCGTG-3'(sense), 5'-CCGACCCAGACGTACAGC-3' (antisense), IL-6: 5'-GGGCAAGATGATGCCAAA-3'(sense), 5' - TTGTGATGACAGTTTGGTGAGTC - 3' (antisense), IFN $\gamma$ : 5'-GGGTAAGTGTGAATGTTCAATGG-3'(sense), 5'-GCTCAGAAACCCAGTTGCAT-3' (antisense). Každý experiment byl proveden v duplikátu. PCR probíhala při těchto podmínkách: denaturace při 95°C po 3 min, následně 40 cyklů při 95°C po 20 s, nasedání vláken (annealing) při 60°C po 30 s a elongace při 72°C po 30 s. Data o fluorescenci byla měřena v každém cyklu po elongaci při 75°C po 5s a analyzováno pomocí systému iCycler Detection, verze 3.1. Každý experiment byl proveden v triplikátu. Pro výpočet exprese cílového genu v porovnání s expresí referenčního GAPDH (použitým jako endogenní kontrola) byl použit model relativní kvantifikace ( $\Delta$ Cp).

### 5.1.5 Statistická analýza

Rozdíl tloušťky pravé a levé tlapy před pokusem a porovnání infiltrace buněk do tkáně u kontrolních skupin jsme porovnali Wilcoxonovým testem. Pro srovnání infiltrace buněk do tkáně u tlapek ošetřených ConA a PHA jsme použili Studentův t-test. Pro porovnání otoku tlapek kontrolní skupiny a skupiny ošetřené zánětlivými stimulanty jsme použili analýzu

variance (ANOVA). Jednotlivé pokusné skupiny (ošetření v různých časových bodech) jsme mezi sebou porovnali Tukeyho testem. Závislost velikosti otoku a infiltrace buněk na čase odběru, hmotnosti a věku jsme testovali pomocí zobecněných lineárních modelů (GLM). Porovnání exprese cytokinů jsme testovali pomocí neparametrického Wilcoxonova testu. Závislost diferenciálního počtu jednotlivých typů buněk v periferní krvi myši na čase po stimulaci jsme taktéž testovali pomocí GLM. Jako další vysvětlující proměnné jsme, kromě času po stimulaci, použili počet daného typu buněk v krvi před stimulací, hmotnost a věk myši. Statistickou analýzu jsme provedli v programu R verze 3.0.1.

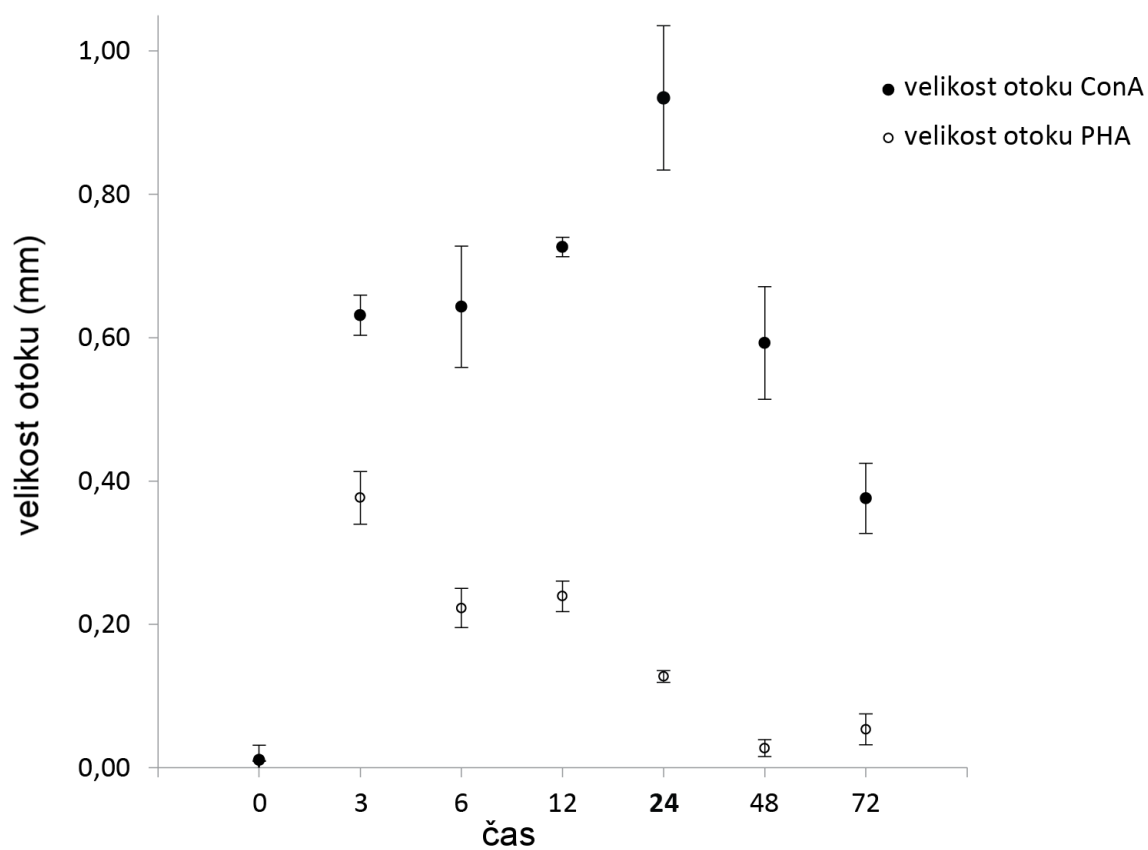
## 5.2 Výsledky

Tloušťka nestimulovaných tlapek (levá a pravá) před pokusem se signifikantně nelišila (Wilcoxonův test,  $W = 541,50$ ,  $P = 0,407$ ). V čase 24h po stimulaci nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v tloušťce tlapek mezi nestimulovanou tlapkou a tlapkou ošetřenou sterilním PBS (T-test,  $T = -0,3758$ ,  $Df = 6,357$ ,  $P = 0,719$ ). PBS tedy nestimuluje otokovou reakci. Naopak aplikace mitogenů PHA i ConA vyvolává otokovou reakci spojenou se zvětšením tloušťky tlapek oproti kontrolní skupině ošetřené čistým PBS (ANOVA, PHA:  $Df=6/28$ ,  $F=31,97$ ,  $P \ll 0,001$ , ConA:  $Df=6/28$ ,  $F=17,78$ ,  $P \ll 0,001$ ). K signifikantnímu zvětšení tloušťky tlapek přitom dochází v časech po 3, 6, 12, 24 hodinách po aplikaci PHA a ve všech časových bodech po aplikaci ConA (Tukeyho test, PHA pro časy 3,6,12,24  $P < 0,050$ , ConA pro všechny časové body  $P < 0,050$ , viz Graf 11).

Výsledky hematologického vyšetření ukázaly, že počet neutrofilů v periferní krvi myši po stimulaci mitogeny (párově ConA a PHA) je závislý na čase po stimulaci, není ale závislý na stáří, hmotnosti či podílu neutrofilů před aplikací mitogenů (GLM:  $Df=1/28$ ,  $F=8,15$ ,  $P < 0,001$ ). V prvních třech hodinách po stimulaci mitogeny došlo ke zvýšení relativního počtu neutrofilů v periferní krvi (Wilcoxonův test:  $W=0$ ,  $P=0,008$ ), mezi dalšími časovými body (3 až 72 h) se pak poměr neutrofilů snižoval zpět k původním hodnotám.

Přestože aplikace PBS nestimuluje otokovou reakci, dochází ve tkáni k signifikantnímu nárůstu počtu buněk oproti kontrolním neošetřeným tlapkám, tj. k infiltraci buněk do tkáně (Wilcoxonův test,  $W=25$ ,  $P=0,011$ ). Tato změna je dána především infiltrací neutrofilů do PBS stimulované tkáně (Wilcoxonův test,  $W=23,5$ ,  $P=0,028$ ), počet ostatních buněčných typů se mezi nestimulovanou tkání a tkání s injikovaným PBS neliší.

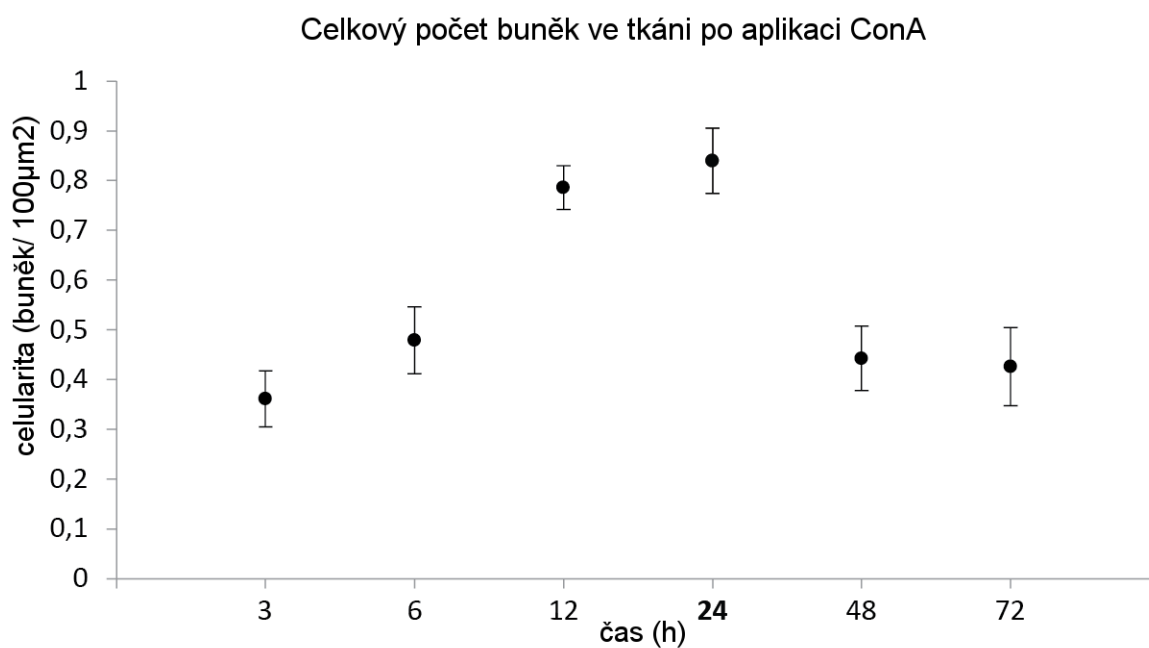
## Časová dynamika otoku



**Graf 11 Časová dynamika otoku**

Porovnání velikosti otoku po použití dvou stimulantů v jednotlivých časových bodech. Plné body značí velikost otoku po použití konkanavalinu A (ConA), prázdné body velikost otoku po použití fytohemaglutininu (PHA). ConA vyvolává výrazně větší otok než PHA. Pro analýzu bylo použito vždy 5 jedinců na každý časový bod.

Po aplikaci ConA infiltrují bílé krvinky do tkáně a jejich celkový počet je závislý na čase odběru histologického vzorku po stimulaci (LM: Df=6/34, F=11,63, P<<0,01). Tukeyho test ukazuje rozdíl v celkovém počtu buněk oproti času 0 (signifikantní rozdíl v časech 12 a 24 hodin po ošetření), i mezi dalšími časovými body (viz Graf 12). Z jednotlivých buněčných typů byla závislost infiltrace na čase po stimulaci prokázána pouze u neutrofilů (LM: Df=6/34, F=12,40, P<0,01) kde byly Tukeyho testem prokázány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými časovými body (viz Graf 13), a u makrofágů, kde jsme našli signifikantní závislost na věku a hmotnosti myši (MAM: Df=8/34, F=4,95, P<0,001; čas po stimulaci: Df=6/32, F=3,04, P=0,021; věk: Df=1/27, F=11,74 P=0,002; hmotnost: Df=1/27, F=3,13, P=0,089). Počet lymfocytů je po stimulaci ConA naopak nezávislý na čase měření (P>0,05).

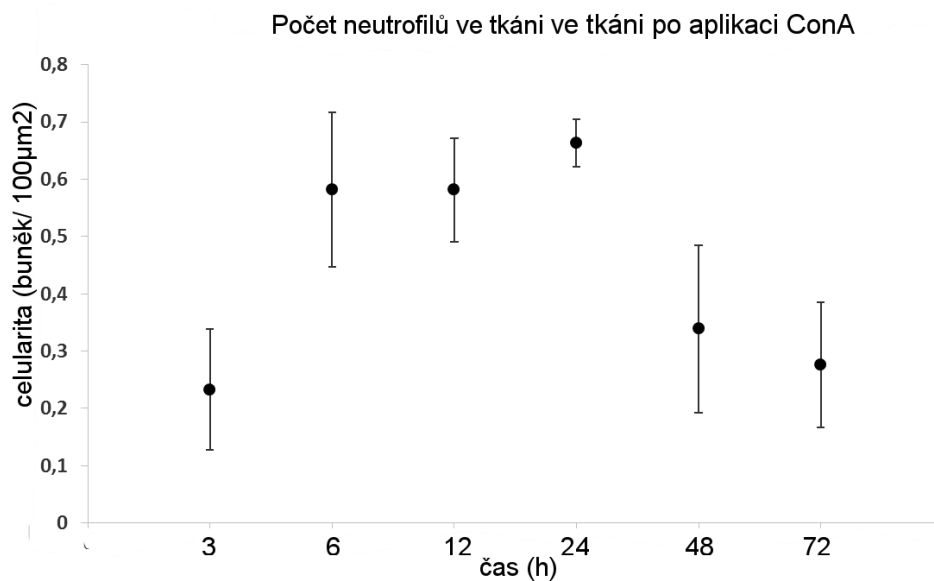


**Graf 12 Celkový počet buněk ve tkáni po aplikaci ConA**

Množství všech buněk infiltrovaných do tkáně po aplikaci konkanavalinu (ConA) v jednotlivých časových bodech. Po aplikaci ConA infiltruje do tkáně největší množství buněk po 48 hodinách. Tukeyho testem jsme prokázali signifikantní rozdíly mezi časovými body 24h - 3h (P<0,001) a 12h-3h, 12h-6h, 24h-6h, 48h-12h, 72h-12h, 48h-24h, 72h-24h (P<0,05). Pro analýzu bylo použito vždy 5 jedinců na časový bod.

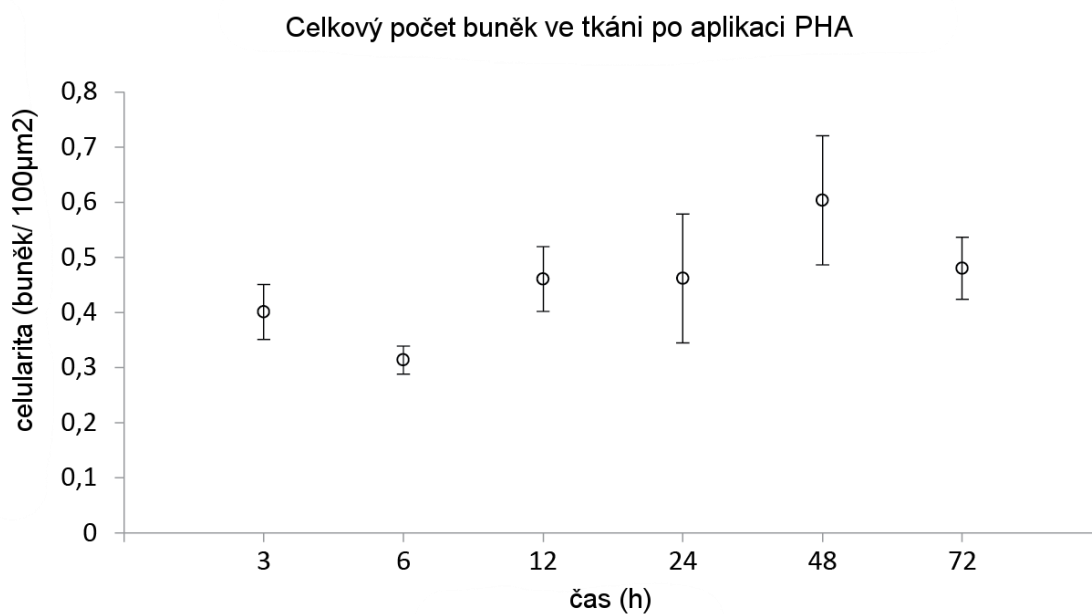
Rovněž po aplikaci PHA závisí celkový počet buněk infiltrujících do stimulované tkáně na čase po aplikaci mitogenu a rovněž na hmotnosti (MAM:  $Df=7/34$ ,  $F=3,24$ ,  $P=0,0125$ ; čas po stimulaci:  $Df=6/33$ ,  $F=3,45$ ,  $P=0,0117$ ; hmotnost:  $Df=1/28$ ,  $F=5,14$ ,  $P=0,031$ ). Tukeyho test však prokázal signifikantní rozdíl pouze mezi infiltrací buněk v čase 0 a 48 hodin po stimulaci (viz Graf 14). Infiltrace jednotlivých typů leukocytů se ale po aplikaci PHA na rozdíl od ConA neliší v závislosti na čase po stimulaci tkáně. Párové srovnání ukázalo signifikantní rozdíl mezi celkovým počtem leukocytů infiltrovaných do tkáně po stimulaci ConA a PHA (párový t-test:  $T=2,06$ ,  $Df=34$ ,  $P=0,047$ ). Ten je patrně dán rozdílem v počtu neutrofilů ve tkáni (párový t-test:  $T=2,04$ ,  $Df=34$ ,  $P=0,049$ ). Počet lymfocytů a makrofágů ve tkáni se mezi odlišně ošetřenými tlapkami neliší ( $P>0,050$ ). Rozdíl v celkovém počtu buněk infiltrovaných do pravé (ošetřené PHA) a levé (ošetřené ConA) tlapy je taktéž závislý na čase po stimulaci (MAM:  $Df=6/29$ ,  $F=3,30$ ,  $P=0,017$ ; čas po stimulaci:  $Df=5/28$ ,  $F=3,093$ ,  $P=0,028$ ; hmotnost:  $Df=1/24$ ,  $F=3,85$ ,  $P=0,062$ ). Tukeyho test ovšem ukázal, že rozdíl mezi celkovým počtem buněk v pravé a levé tlape se mezi jednotlivými časovými body signifikantně neliší, liší se pouze marginálně nesignifikantně mezi časovými body 24 a 48 hodin ( $P=0,072$ ). Stejně tak rozdíl v počtu infiltrovaných neutrofilů mezi tlapkami ošetřenými ConA a PHA je závislý na čase po stimulaci (LM:  $Df=5/29$ ,  $F=3,70$ ,  $P=0,013$ ). Zde jsme prokázali signifikantní změnu v rozdílu infiltrace do tkáně mezi 24 a 48 hodinami po stimulaci (Tukeyho test,  $P=0,035$ ). U PHA nebyla prokázána žádná souvislost mezi velikostí otoku a složením buněčného infiltrátu či množstvím buněk ve tkáni. U ConA je na druhou stranu závislost mezi otokem a množstvím buněk infiltrovaných do tkáně silná (LM:  $Df=1/33$ ,  $F=21,925$ ,  $P<0,001$ ), což je dáno silným vztahem mezi počtem neutrofilů ve tkáni a velikostí otoku (MAM:  $Df=1/33$ ,  $F=20,87$ ,  $P<0,001$ ; viz Graf 15).

V neošetřených tlapkách a v tlapkách ošetřených PBS ( $n=11$ ) nebyla po 24 hodinách zjištěna žádná exprese měřených cytokinů (IL-6 a INF- $\gamma$ ). Exprese IL6 byla signifikantně odlišná od kontrolní skupiny v tlapkách ošetřených ConA ( $n=11$ ,  $W=121$ ,  $P<<0,001$ ) i PHA ( $n=11$ ,  $W=110$ ,  $P<0,001$ ). Stejně tak byla zjištěna výrazná exprese INF- $\gamma$  v tlapkách ošetřených ConA ( $n=11$ ,  $W=115,5$ ,  $P<<0,001$ ) i PHA ( $n=11$ ,  $W=60,5$ ,  $P<0,05$ ). ConA vyvolává výrazně vyšší expresi obou cytokininů oproti PHA (IL6:  $W=121$ ,  $P<<0,001$ ; INF- $\gamma$ :  $W=115,5$ ,  $P<<0,001$ ).



**Graf 13 Počet neutrofilů ve tkáni po aplikaci ConA**

Počet neutrofilů infiltrovaný do tkáně po stimulaci konkanavalinem (ConA) v jednotlivých časových bodech. K největší infiltraci neutrofilů dochází po 24 hodinách. Prokázali jsme rozdíly mezi časovými body 24h-3h ( $P < 0,001$ ), 12h-3h, 12h-6h, 24h-6h, 48h-12h, 72h-12h, 48h-24h, 72h-24h ( $P < 0,05$ ). Pro analýzu bylo použito vždy 5 jedinců na časový bod.



**Graf 14 Celkový počet buněk ve tkáni po aplikaci PHA**

Množství všech buněk infiltrovaných do tkáně po aplikaci fytohemaglutininu (PHA) v jednotlivých časových bodech. Po aplikaci PHA infiltruje do tkáně největší množství buněk po 48 hodinách. Pro analýzu bylo použito vždy 5 jedinců na časový bod.

## 5.3 Diskuze

Otokový kožní test je velmi rozšířenou a hojně používanou metodou testování zánětlivé imunitní reaktivity volně žijících zvířat (de Bellocq et al., 2006; Fernandez-De-Mera et al., 2008; Finger et al., 2013; Wiley et al., 2009). Cílem naší práce bylo porovnání působení dvou mitogenů ConA a PHA. Přestože je PHA nejpoužívanějším stimulantem při tomto testu, ConA se v *in vitro* testech jeví jako silnější stimulant T buněk savců a díky odlišné aktivaci lymfocytů se interpretace jeho působení zdá být jednoznačnější (Leavitt et al., 1977; Licastro et al., 1993).

Oba stimulanty, ConA i PHA vyvolávají signifikantní otok tkáně i infiltraci buněk do tkáně oproti kontrolním skupinám. Tři hodiny po stimulaci mitogeny dochází ke zvýšení počtu neutrofilů v periferní krvi myši, v dalších časových bodech se ale vrací k původní hodnotě. Toto krátkodobé zvýšení je velmi pravděpodobně vyvolané pouze stresem, způsobeným manipulací s myši (Davis et al., 2008). U kontrolní skupiny, které bylo aplikováno PBS jsme také zaznamenali průnik buněk do tkáně, a to zejména neutrofilů. To lze vysvětlit reakcí imunitního systému na vpich jehly a poškození tkáně. Takováto reakce je ale mírná a nevyvolává žádný měřitelný otok ani měřitelnou expresi prozánětlivých cytokinů. Velikost otoku i infiltrace buněk do tkáně po aplikaci ConA a PHA je závislá na čase po stimulaci tkáně, průběh reakce se ale mezi ConA a PHA liší. Po aplikaci ConA dochází k signifikantnímu zvětšení tloušťky tlapky ve všech časových bodech, přičemž nejvyšší otok jsme zaznamenali v po 24 hodinách (viz Graf 11). Celkové množství buněk infiltrovaných do tkáně se liší v závislosti na čase po stimulaci, stejně tak jako množství neutrofilních granulocytů a makrofágů. Nejvyšší počet buněk ve tkáni jsme zaznamenali opět po 24 hodinách (viz Graf 12). Po aplikaci PHA dochází k signifikantnímu zvětšení tloušťky tlapky pouze do 24 hodin po aplikaci, přičemž otok je nejvyšší ve 3 hodinách, později otok tlapky postupně mizí (viz Graf 11). Množství buněk ve tkáni je oproti kontrolní skupině vyšší pouze po 48 hodinách a na rozdíl od ConA závisí na hmotnosti myši a množství jednotlivých typů buněk ve tkáni se v čase neliší (viz Graf 14). Do tkáně ošetřené ConA infiltruje výrazně vyšší množství neutrofilních granulocytů. Rozdíl v počtu buněk mezi ConA a PHA se v čase liší, což ukazuje na odlišný průběh reakce na tyto dva mitogeny. Rozdílná reakce na ConA a PHA u myši byla pozorována i v *in vitro* testech. ConA lépe stimuluje myši thymocyty (Jacobsson and Blomgren, 1974) i T buňky (Jones, 1973) je možné, že dokonce stimuluje odlišné subpopulace T buněk, než PHA (Stobo and Paul, 1973).

Velikost otoku vyvolaná ConA odpovídá množství infiltrovaných buněk do tkáně, a to především neutrofilních granulocytů.

Dále jsme pro porovnání intenzity zánětlivé reakce vyvolané ConA a PHA změřili množství cytokinů IL-6 a INF- $\gamma$  exprimovaných ve tkáních stimulovaných těmito mitogeny. Produkce IL-6 vede jednak k diferenciaci B-buněk na plazmatické buňky a v kombinaci s TGF- $\beta$  k diferenciaci Th17 buněk a jednak k produkci proteinů akutní fáze hepatocyty a ke zvyšování teploty v místě zánětu (Balkwill, 1992). Dále také stimuluje hematopoézu granulocytů (Caracciolo et al., 1989). INF- $\gamma$  je produkován především prozánětlivými T lymfocyty a NK buňkami. Stimuluje fagocytující buňky k produkci ROIs, RNIs a NO (Kobayashi, 2010). Dále vede k zvyšování exprese MHC proteinů, stimulaci Th1 odpovědi a tím prohlubování zánětlivé reakce (Balkwill, 1992). Naše data ukazují, že obě látky, ConA i PHA, vyvolávají expresi těchto cytokinů. Exprese IL-6 i IFN- $\gamma$  je ale signifikantně vyšší v tlapkách stimulovaných ConA. Přestože je PHA dosud nejpoužívanějším stimulantem u tohoto testu (Kennedy and Nager, 2006), ConA se při použití na myších jeví ve všech směrech jako vhodnější stimulant zánětlivé reakce. Reakce na ConA je u myší oproti PHA mnohem výraznější jak z hlediska velikosti otoku, infiltrace buněk do tkáně, tak v míře exprese prozánětlivých cytokinů.

Již dříve bylo demonstrováno, že velikost otoku i infiltrace buněk do tkáně po stimulaci PHA je v čase proměnná (Martin et al., 2006; Turmelle et al., 2010). U ptáků byl největší otok po aplikaci PHA pozorován až po 24h (Martin et al., 2006), u krokodýlů po 12h (Finger et al., 2013). Odlišný průběh může být způsoben rozdílnou dávkou mitogenu vzhledem k velikosti zvířete. U myší je otok vyvolaný PHA nejvyšší již po 3h a dále jeho velikost prudce klesá, největší počet buněk byl zaznamenán ve 48h (viz Graf 11 a 14). V čase proměnná je i reakce na ConA. Otok vyvolaný ConA u myší dosahuje nejvyšší velikosti až po 24h, oproti otoku vyvolanému PHA je ale výrazně větší (viz Graf 11). Vyšší je i infiltrace bílých krvinek do místa otoku. Po aplikaci ConA se mezi jednotlivými časovými body mění jak infiltrace neutrofilů tak infiltrace makrofágů (viz Graf 13). Neutrofilny jsou majoritními buňkami, které do tkáně infiltrují. Tím se naše výsledky odlišují od výsledků pokusů provedených na morčatech, kde aplikace ConA vedla především k infiltraci lymfocytů a makrofágů (Stadecke and Leskowitz, 1974). Průběh zánětlivé reakce vyvolané ConA se tedy může lišit i mezi příbuznými druhy. Velké množství neutrofilů ve tkáni ukazuje na Th17 zprostředkovanou zánětlivou reakci (Iwakura et al., 2008). Je možné, že ConA u myší stimuluje právě Th17 subpopulaci lymfocytů. Th17 jsou buňky, které jsou známé svým

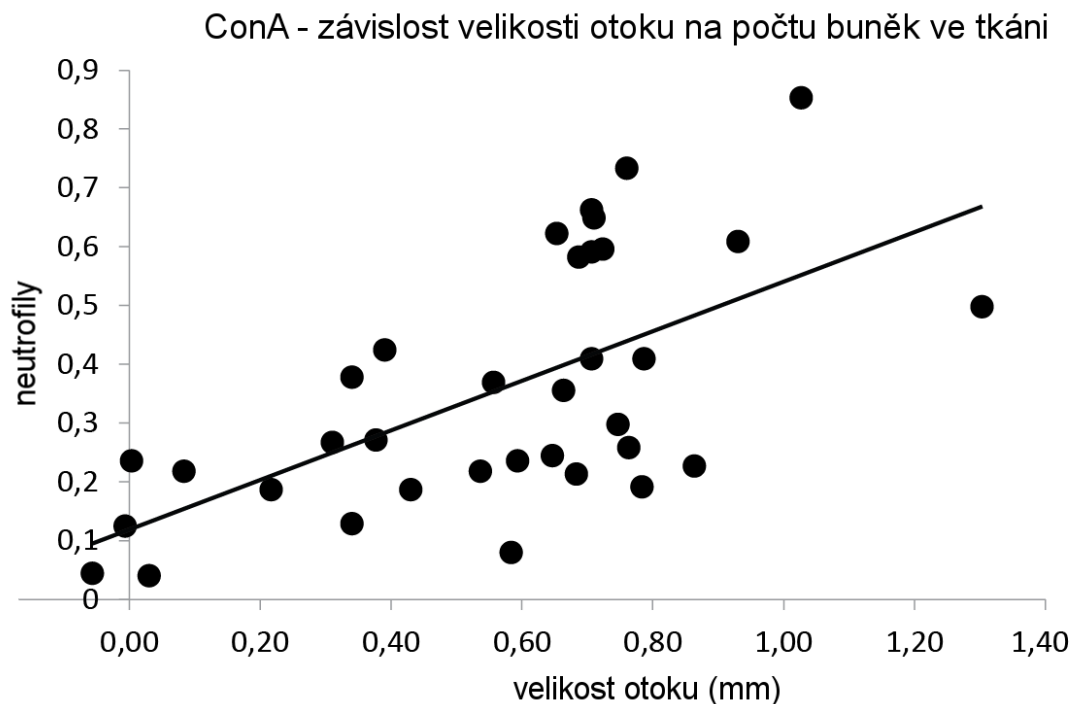
výskytem v chronických zánětlivých onemocněních, při kterých dochází k tvorbě granulomů a nadměrné aktivitě neutrofilů (Pene et al., 2008; Tondell et al., 2014; Wang et al., 2011b). Hlavním produktem Th17 buněk je interleukin 17 (IL-17). Tento cytokin indukuje v epiteliálních a endoteliálních buňkách expresi prozánětlivých mediátorů, především IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$  (Ouyang et al., 2008). Jak již bylo zmíněno, ve tkáni stimulované ConA jsme pozorovali vysokou expresi IL-6. Exprese zmíněných cytokininů vede ke stimulaci a chemotaxi neutrofilních granulocytů (Ouyang et al., 2008; Pelletier et al., 2010). Th17 ale stimulují neutrofile i přímo, produkcí GM-CSF, TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  (Fossiez et al., 1996; Pelletier et al., 2010). Prokázali jsme, že i prozánětlivý cytokin INF- $\gamma$  je exprimován v tlapkách stimulovaných ConA ve velké míře. IL-17 je produkován také neutrofilními granulocyty, což vede k pozitivní zpětné vazbě a prohlubování zánětlivé reakce (Pelletier et al., 2010).

Základním předpokladem metody otokového kožního testu je, že velikost otoku je odrazem imunitní reakce probíhající ve tkáni. Tak je tomu při použití PHA u ptáků – velikost otoku odpovídá počtu lymfocytů, heterofilů a basofilů infiltrovaných do tkáně (Martin et al., 2006; Vinkler et al., 2012). Oproti tomu u myši jsme po aplikaci PHA neprokázali žádnou souvislost mezi množstvím buněk ve tkáni a velikostí otokové reakce. Stejný výsledek, tedy nezávislost velikosti otoku na množství jednotlivých typů infiltrovaných leukocytů, byl prokázán i u netopýřů (Turmelle et al., 2010). Otoková reakce vyvolaná PHA tedy neodpovídá buněčné imunitní reaktivitě, kterou jsme schopni histologickými metodami detekovat. Protože není zřejmé, jaké imunologické pochody velikost otoku při použití PHA ovlivňují, není možné výsledky takového testu ani jednoznačně interpretovat. Naopak po použití ConA je závislost mezi velikostí otoku a buněčnou infiltrací silná. Množství buněk ve tkáni je nejvyšší 24h po aplikaci ConA, tedy v čase, kdy je nejvyšší i otok tkáně (viz Graf 11). Počet lymfocytů ve tkáni se při ConA stimulované zánětlivé reakci během 72 hodin, na rozdíl od počtu neutrofilů, signifikantně nemění. Lymfocyty jsou tedy aktivovány již na začátku zánětlivé reakce a jejich aktivita vede ke stimulaci neutrofilů, zvyšování počtu těchto buněk ve tkáni a zvětšování otokové reakce. Silnou závislost jsme prokázali právě mezi velikostí otoku a množstvím infiltrovaných neutrofilů (viz Graf 15).

Náš výzkum ukazuje, že ConA je u myši vhodnějším stimulantem pro otokový kožní test, než PHA, protože vyvolává výrazně silnější a tedy i lépe měřitelnou zánětlivou reakci. Zásadním zjištěním je, že oproti PHA, po aplikaci ConA odpovídá množství buněk infiltrovaných do tkáně velikosti otoku. Proto jsou výsledky otokového kožního testu

s použitím ConA jasněji interpretovatelné. Interpretaci zjednodušuje také známý mechanismus aktivace T buněk vazbou ConA výhradně na CD3 TCR komplexu (Licastro et al., 1993).

Měření otokové reakce vyvolané ConA odpovídá pravděpodobně schopnosti zánětlivé odpovědi především Th17 lymfocytů. Reakce na ConA je ale v čase proměnná, mění se jak velikost otoku, tak buněčný infiltrát ve tkáni. Je tedy nutné provádět měření velikosti otoku vždy ve stejné době po aplikaci stimulantu. Nejvhodnější je měření po 24 hodinách, kdy je velikost otoku největší.



**Graf 15 ConA – závislost velikosti otoku na počtu buněk ve tkáni**

Počet neutrofilů infiltrovaných do tkáně po aplikaci konkanavalinu (ConA) závisí na velikosti otokové reakce vyvolané tímto stimulantem. Pro analýzu bylo použito 30 jedinců.

## 6 Prozánělivá reakce v rámci hybridní zóny

Zánětlivá reakce je imunitní odpověď na porušení homeostáze a patří mezi základní mechanismy zajišťující obranu organismu před patogeny (Danilova, 2006). Pro srovnání schopnosti prozánětlivé imunitní reaktivity myši v hybridní zóně jsme použili výše uvedený otokový kožní test (kapitola 1.2). Na základě pilotních testů (potvrzených výsledky v předchozí kapitole) jsme pro otokový kožní test v hybridní zóně vybrali injekci ConA. Velikost vyvolaného otoku pak odráží aktivaci T buněk prostřednictvím antigen-nespecifické stimulace koreceptoru CD3 (Licastro et al., 1993), která vyvolává lokální zánět spojený s otokovou reakcí, která reflektuje schopnost prozánětlivé imunitní reaktivity jedince. Pokud se liší schopnost imunitní odpovědi mezi poddruhy a hybridními jedinci v hybridní zóně, bude velikost otoku závislá na hybridním indexu, který udává příbuznost jedinců k poddruhům myši domácí.

### 6.1 Metodika

#### 6.1.1 Zvířata

V česko-bavorském transektu hybridní zóny (viz Obrázek 2) bylo v září roku 2007 a 2008 odchyceno 170 myši na 31 lokalitách. Myši byly odchyceny do dřevěných či kovových živochytných pastí, následně umístěny do samostatných klecí s přístupem vody a krmení *ad libitum* a zde po dobu od 1 do 7 dnů ponechány až do provedení experimentu.

#### 6.1.2 Plán pokusu

Každé myši byla před pokusem změřena vždy tloušťka jedné tlapky třikrát, pomocí digitálního tloušťkoměru s přesností 0,01 mm (Mitutoyo547-301, Mitutoyo Corporation). Do podkoží této tlapky jsme injikovali 0,025 mg ConA typ IV (produkt č. C2010, Sigma-Aldrich) zředěný 20  $\mu$ L sterilního DPBS (product No. D5652, Sigma-Aldrich). Experiment proběhl vždy v odpoledních a večerních hodinách mezi 13:00 a 00:00 h. Po 24 hodinách jsme změřili šířku oteklé tlapky, opět třikrát pomocí digitálního tloušťkoměru s přesností 0,01mm. Tloušťka tlapky před i po experimentu byla vypočtena jako průměr ze tří měření. Velikost otoku, vyvolaného ConA v čase 24h byla vypočtena jako rozdíl mezi tloušťkou tlapky po experimentu a před experimentem.

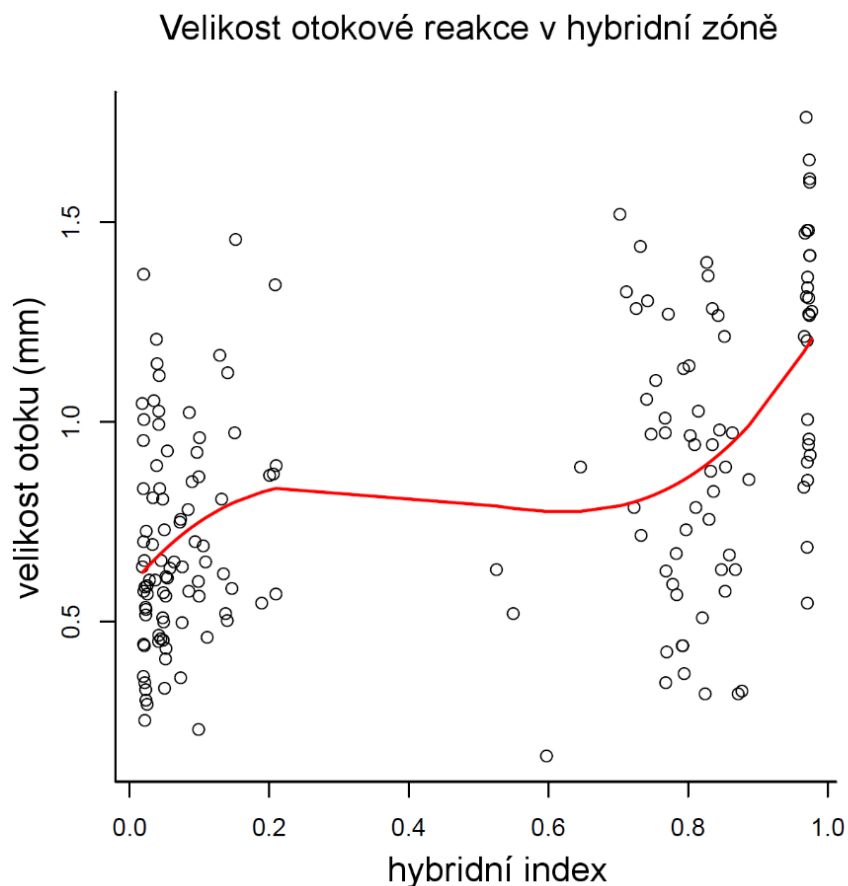
Hybridní index byl stanoven stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.1.5.

### 6.1.3 Statistická analýza

Závislost velikostí otoku na hybridní indexu, váze myši, pohlaví a roku, ve kterém byl experiment proveden, byla testována pomocí polynomické regrese. Údaj o velikosti otoku jsme zlogaritovali pro dosažení normálních reziduí modelu. Statistickou analýzu jsme provedli v programu R verze 3.0.1.

## 6.2 Výsledky

Testovali jsme závislost velikosti otoku na hybridním indexu myši, váze myši, a pohlaví. Velikost otoku není závislá na hmotnosti myši ani na pohlaví myši ( $P > 0,050$ ). Velikost otoku závisí pouze na hybridním indexu ( $F=21,19$ ,  $Df=3/166$ ,  $P << 0,001$ ).



**Graf 16 Velikost otokové reakce v hybridní zóně**

Závislost velikosti otoku po aplikaci ConA na hybridním indexu myši. Otoková reakce je větší u myši příbuznějším poddruhu *M. m. musculus*. Pro analýzu bylo použito 170 jedinců.

## 6.3 Diskuze

Pro porovnání imunitní reaktivity myši v rámci hybridní zóny jsme použili otokový kožní test s ConA jako stimulační látkou. Tento test prokázal silnou závislost mezi hybridním indexem myši a velikostí otokové reakce. Naše výsledky neukazují rozdílnost jedinců z čistých rodičovských poddruhů od jedinců se středními hodnotami hybridního indexu. Objevili jsme ale zřejmou odlišnost ve schopnosti prozánětlivé imunitní odpovědi mezi poddruhy myši domácí. Jedinci příbuznější poddruhu *M. m. musculus* reagují na stimulační ConA výrazně větším otokem, dochází u nich tedy k masivnější aktivaci imunitního systému a zánětlivých pochodů (viz Graf 16). To by mohlo znamenat, že poddruh *M. m. musculus* má lépe vyvinutou schopnost odolávat parazitárním nákazám. Dřívější studie zaměřená na použití otokového kožního testu u myši *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* tvrdí, že tato metoda nijak nevypovídá schopnosti anti-parazitární rezistence (de Bellocq et al., 2007). V této práci byl ale jako stimulační mitogen použit PHA, u kterého jsme ani my neprokázali závislost mezi velikostí otoku a intenzitou buněčné odpovědi. Zmíněná práce také porovnává velikost otoku s resistencí k helmintárním parazitům, jejichž eliminace je závislá na Th2 buněčné odpovědi. ConA, který jsme použili, ale stimuluje zánětlivou odpověď pravděpodobně zprostředkovanou Th17 lymfocyty. Předpokládáme tedy, že poddruh *M. m. musculus* je lépe adaptován na parazitární nákazy, jejichž eliminace je závislá na prozánětlivé imunitní odpovědi. Na druhou stranu, použití otokového testu u hýla rudého ukázalo, že větší otoková reakce značí naopak horší zdravotní stav (Vinkler et al., 2012). V této studii byla prokázána negativní korelace mezi velikostí otoku a sytostí ptačího ornamentu, který je ukazatelem zdraví jedince a odpovídá schopnosti odolávat parazitům (Hill and Farmer, 2005). Interpretace velikosti zánětlivé reakce tedy nemusí být jednoznačná. Silný průběh zánětu může být jak známkou vyšší investice do tohoto obranného mechanismu, tak také znakem neschopnosti správné regulace imunitní odpovědi a vzniku imunopatologické reakce poškozující organismus (Graham et al., 2005).

Naše studie hematologických znaků v rámci hybridní zóny ale podporuje spíše hypotézu, že velikost otokové reakce u myši odpovídá schopnosti prozánětlivé reakce vedoucí k eliminaci parazita a koreluje pozitivně se zdravotním stavem myši. Jak již bylo zmíněno výše, v periferní krvi myši poddruhu *M. m. musculus* jsme pozorovali menší množství neutrofilních granulocytů. Množství neutrofilů v krvi souvisí se zdravotním stavem jedince (Davis et al., 2008; Gupta et al., 1999). Předpokládáme, že kromě nákazy parazity ze skupiny

Cestoda (kde jsme prokázali závislost) odráží především množství bakteriálních a virových onemocnění, k jejichž eliminaci jsou neutrofilny přizpůsobeny (Geering et al., 2013; Quevillon et al., 2013). Obranu proti těmto typům onemocnění zprostředkovává právě prozánětlivá odpověď, kterou jsme testovali pomocí otokové reakce. Lepší zdravotní stav poddruhu *M. m. musculus* ukazuje i srovnání množství parazitárních nákaz v rámci hybridní zóny. Naše výsledky ukazují lepší schopnost zánětlivé odpovědi poddruhu *M. m. musculus* v porovnání s *M. m. domesticus*. U poddruhu *M. m. musculus* byla také recentně popsána výrazně vyšší genetická variabilita v receptoru TLR4 (Toll like receptor) oproti *M. m. domesticus* (Fornuskova et al., 2014). TLR4 je transmembránový receptor rozpoznávající bakteriální lipopolysacharidy a hraje tedy významnou roli v obraně organismu před bakteriálními nákazami. Vyšší variabilita v tomto receptoru může pro populaci *M. m. musculus* jako celek znamenat schopnost obrany proti širšímu spektru bakteriálních nákaz. Variabilita v genech imunitního systému v rámci populace spíše než schopnost rezistence jedince odráží sílu selekce ze strany parazitů. Například variabilita v jiných zásadních receptorech imunitního systému MHC (major histocompatibility complex) u mnoha hostitelských druhů koreluje s množstvím parazitárních druhů, které tyto druhy napadají (de Bellocq et al., 2008; Simkova et al., 2006). Vyšší variabilita u *M. m. musculus* tedy může ukazovat na silnější selekční tlak na tento poddruh, zároveň ale může být také ukazatelem lepší schopnosti na selekční tlak reagovat a adaptovat se na přirozeně se vyskytující parazitární nákazy.

Otokový kožní test ale na rozdíl od hematologických znaků neukazuje na rozdílnost hybridních jedinců od rodičovských poddruhů. Ve schopnosti prozánětlivé reakce tedy pravděpodobně nepůsobí heterozní efekt jako u schopnosti eliminace mnohobuněčných parazitů. V této studii bylo ovšem použito menší množství jedinců a velmi malé množství jedinců se středními hodnotami hybridního indexu, je tedy možné, že odlišnou reakci se nám nepodařilo prokázat kvůli nedostatečně velkému vzorku.

## Závěr

Základním cílem této práce bylo zmapovat variabilitu ve zdravotním stavu v hybridní zóně myši domácí. Pomocí dvou nezávislých metod jsme našli evidenci o rozdílech ve zdravotním stavu jak mezi dvěma poddruhy, tak mezi poddruhy a jedinci hybridního původu. Vyšetření hematologických parametrů jedinců z přírody odvozených inbredních linií ukazuje, že v podmínkách standardizovaného chovu neexistují výrazné rozdíly mezi jedinci poddruhu *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Při výzkumu volně žijících myši jsme ale našli výrazné rozdíly v hematologických parametrech odrážející zřejmě jejich odlišnou míru parazitovanosti. Hybridní jedinci mají snížené množství absolutního počtu všech leukocytů, specificky eosinofilů a neutrofilů. U všech těchto parametrů jsme prokázali silnou souvislost s nákazou mnohobuněčnými parazity. Naše studie ukazuje, že hybridní jedinci jsou zdravější a to patrně díky zvýšené rezistenci k parazitárním nákazám oproti rodičovským poddruhům. Naše zjištění potvrzují také výsledky výzkumu, který porovnává přímo množství helmintárních parazitů u jedinců v rámci hybridní zóny (Baird et al., 2012). V hybridní zóně myši domácí tedy pravděpodobně platí hypotéza resistance hybridů (Fritz et al., 1994). To by znamenalo, že parazitární nákazy nehrají významnou roli v udržování stabilní hybridní zóny oddělených poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Hybridní zóna myši domácí tedy pravděpodobně není udržovaná parazity zprostředkovanou selekcí a v hybridní zóně nedochází k hybridnímu rozpadu, jak postulovaly dvě předchozí studie zabývající se tímto tématem (Mouliá et al., 1991; Sage et al., 1986). Dle teorie červené královny je pro hostitelské populace výhodné udržování vysoké genetické variability, která znemožňuje parazitům přizpůsobit se všem jedincům v populaci (Ladle, 1992; Wolinska et al., 2008). Hybridizace dvou poddruhů myši domácí může vést k vytváření nové genetické variability, na kterou se parazité neměli možnost adaptovat a dochází tak k zvýhodnění hybridních jedinců. U hybridů působí takzvaný heterozní efekt, kdy křížením dochází k odstranění negativně působících recesivních mutací a k získání výhod obou poddruhů (Hannon et al., 2011). Hypotéza Dobzhanského a Müllera ale předpovídá, že v alopatrických populacích dochází k vzniku a fixaci odlišných alel (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1936; Muller, 1942). Při sekundárním kontaktu a křížení těchto populací vznikají genotypy, ve kterých se setkávají dosud nevyzkoušené kombinace alel, které mohou být vzájemně inkompatibilní a vést k znevýhodnění hybridních jedinců. Baird et al. (2012) navrhuje, že vznik takových inkompatibilit je v genech imunitního systému nepravděpodobný, právě díky působení efektu

Červené královny. Díky udržování vysoké genetické variability frekvenčně závislou selekcí, nedochází v oddělených populacích k fixaci odlišných alel a mezi poddruhy je udržován značná polymorfismus. Pokud se ale zaměříme na dílčí imunologické obranné mechanismy, jako je například vyšetření zánětlivé imunitní reaktivity myši pomocí otokového kožního testu, pak naše výsledky nijak nepodporují představu zvýšené prozánětlivé imunoreaktivity hybridů. Obranu proti helmintárním parazitům zajišťuje především Th2 typ imunitní odpovědi (Ovington and Behm, 1997), zatímco otokový kožní test s použitím ConA vyvolává zánětlivou reakci, pravděpodobně zprostředkovanou Th17 lymfocyty. Je tedy pravděpodobné, že heterozní efekt působí jen na určité aspekty imunitního systému myši domácí, zatímco jiné se řídí spíše hypotézou dominance (Fritz et al., 1994). S tím by pak mohl souviset i odlišný význam různých typů parazitů při udržování hybridní zóny nebo při průchodu různých genotypů parazitů přes tuto zónu.

Obě použité metody vyšetření zdravotního stavu ale ukazují na zvýšenou rezistenci poddruhu *M. m. musculus* oproti *M. m. domesticus*. Hematologické parametry *M. m. musculus* vypovídají o nižší parazitaci a tedy vyšší rezistenci tohoto poddruhu k parazitárním nákazám. Poddruhy se liší především v absolutním počtu neutrofilních granulocytů, což jsou fagocytické buňky zajišťující především obranu proti virovým a bakteriálním nákazám (Geering et al., 2013). Prokázali jsme ale i souvislost jejich počtu s množstvím parazitických tasemnic. Hematologické parametry se u inbredních linií myši dvou studovaných poddruhů v kontrolovaných podmínkách chovů výrazně neliší. To značí, že změny pozorované v rámci hybridní zóny jsou skutečně vyvolány parazitací a změnou zdravotního stavu. U poddruhu *M. m. musculus* jsme pozorovali i zvýšenou schopnost prozánětlivé imunitní reakce oproti poddruhu *M. m. domesticus*. Naše práce ukazuje, že poddruh *M. m. musculus* je méně parazitován a má lepší schopnost prozánětlivé obrany proti nákazám. S tím je opět ve shodě i práce studující množství mnohobuněčných červů napadajících myši v hybridní zóně (Baird et al., 2012). U myši poddruhu *M. m. musculus* byl pozorován výrazně nižší počet i nižší diverzita parazitů oproti *M. m. domesticus*. Mezi poddruhy myši domácí bylo nalezeno mnoho dalších odlišností a to i behaviorálních. Samci poddruhu *M. m. domesticus* jsou oproti samcům druhého poddruhu agresivnější (Frynta et al., 2005; Munclinger and Frynta, 2000) a jejich častější konfliktní interakce mohou vést k zvýšenému vzájemnému předávání parazitárních nákaz a zhoršenému zdravotnímu stavu tohoto poddruhu. Pokud je poddruh *M. m. musculus* skutečně celkově zdravější a tedy selektivně výrazně zvýhodněn, mělo by docházet k jeho postupnému šíření na území *M. m. domesticus* k posunu hybridní zóny.

Studium chromosomu X skutečně naznačuje, že se hybridní zóna v minulosti pohybovala západním směrem a tedy že poddruh *M. m. musculus* postupně vytlačuje *M. m. domesticus* z jeho území (Macholan et al., 2007).

Z našich výsledků vyplývá, že parazity zprostředkovaná selekce nehraje roli v udržování tenzní hybridní zóny myši domácí. Hybridní jedinci jsou pravděpodobně znevýhodněni jinými mechanismy, než zvýšenou náchylností k parazitům. Velkou roli v udržování tenzní zóny hraje patrně hybridní sterilita (Albrechtova et al., 2012; Janousek et al., 2012; Turner et al., 2012). Snížená schopnost reprodukce byla prokázána jak u laboratorního křížení tak i přímo u myší v hybridní zóně (Turner et al., 2012). U hybridních jedinců můžeme pozorovat snížený počet spermií i jejich zhoršenou pohyblivost (Albrechtova et al., 2012). Za hybridní sterilitu jsou pravděpodobně zodpovědné některé geny na chromosomu X (Bhattacharyya et al., 2014; Janousek et al., 2012) mechanismy hybridní sterility a udržování hybridní zóny ale nejsou stále dokonale vysvětleny.

# Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce. V první řadě školiteli této diplomové práce Michalu Vinklerovi za cenné rady v průběhu zpracování diplomové práce a konzultantovi Jaroslavu Piálkovi za veškerou pomoc a poskytnutí množství dat a inbredních linií. Dále chci poděkovat Ivě Martinové a Lucii Vlčkové za organizaci hematologických vyšetření u inbredních linií a Ludovítovi Ďureje za odběry krve u těchto linií v rámci prováděných experimentů. Děkuji také Joëlle Goüy de Bellocq a Alexisovi Ribasovi za poskytnutí dat o parazitaci jedinců v hybridní zóně. Tato práce by nemohla vzniknout bez účasti početného týmu, který se podílel na terénních pracích v hybridní zóně, za což všem členům děkuji, jmenovitě potom Milošovi Macholánovi, Tomášovi Albrechtovi, Pavlovi Munclingerovi, Lucii Peřinové, Zuzaně Bainové a Stuartovi J. E. Bairdovi. Poděkování patří také Miladě Chudíčkové a celé laboratoři Vladimíra Holáně za zpracování a poskytnutí dat o expresi cytokinů. Za pomoc se statistickým zpracováním výsledků děkuji Tomášovi Albrechtovi. Celá práce vznikala za přispění podnětné a pozitivní atmosféry týmu Evoluční a ekologické imunologie.

V neposlední řadě děkuji také celé svojí rodině a Markovi Sýkorovi za finanční i morální podporu v průběhu celého studia.

# Seznam tabulek

Tabulka 1 Závislost hodnot absolutního počtu erytrocytů na linii str. 21

Tabulka 2 Závislost hodnot absolutního počtu leukocytů str. 22

Tabulka 3 Závislost hodnot diferenciálního počtu lymfocytů na linii str. 22

Tabulka 4 Závislost hodnot diferenciálního počtu neutrofilů na linii str. 22

Tabulka 5 Závislost hodnot diferenciálního počtu eosinofilů na poddruhu str. 24

Tabulka 6 Závislost hodnot absolutního počtu lymfocytů str. 26

Tabulka 7 Závislost hodnot absolutního počtu neutrofilů na linii str. 26

Tabulka 8 Závislost hodnot absolutního počtu eosinofilů na poddruhu str. 26

Tabulka 9 Prevalence parazitárních nákaz v hybridní zóně myši domácí str. 36

Tabulka 10 Korelace hematologických parametrů u volně žijících myší str. 36

Tabulka 11 Porovnání absolutního počtu krvinek u volně žijících a inbredních myší str. 40

# Seznam grafů

- Graf 1 Závislost absolutního počtu leukocytů na poddruhu str. 23
- Graf 2 Závislost absolutní počtu leukocytů na linii str. 24
- Graf 3 Závislost absolutního počtu lymfocytů na poddruhu str. 25
- Graf 4 Závislost absolutní počtu lymfocytů na linii str. 25
- Graf 5 Závislost absolutní počtu neutrofilů na linii str. 27
- Graf 6 Závislost absolutního počtu eosinofilů na poddruhu str. 28
- Graf 7 Závislost absolutní počtu eosinofilů na linii str. 28
- Graf 8 Závislost absolutního počtu leukocytů na hybridním indexu str. 38
- Graf 9 Závislost absolutního počtu neutrofilů na hybridním indexu str. 39
- Graf 10 Závislost absolutního počtu eosinofilů na hybridním indexu str. 39
- Graf 11 Časová dynamika otoku str. 52
- Graf 12 Celkový počet buněk ve tkáni po aplikaci ConA str. 53
- Graf 13 Počet neutrofilů ve tkáni po aplikaci ConA str. 55
- Graf 14 Celkový počet buněk ve tkáni po aplikaci PHA str. 55
- Graf 15 ConA – závislost velikosti otoku na počtu buněk ve tkáni str. 59
- Graf 16 Velikost otokové reakce v hybridní zóně str. 61

# Seznam obrázků

Obrázek 1 str. 20

Geografický původ z přírody odvozených inbredních linií zkoumaných v této práci

Obrázek 2 str. 33

Pozice česko-bavorského transektu v rámci hybridní zóny myši domácí

Upraveno podle: Macholan, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufkova, P., Bimova, B., Pialek, J., 2008. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *Bmc Evolutionary Biology* 8.

# Literatura

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Agrawal, A., Lively, C.M., 2002. Infection genetics: gene-for-gene versus matching-alleles models and all points in between. *Evolutionary Ecology Research* 4, 79-90.
- Agrawal, A.F., Lively, C.M., 2003. Modelling infection as a two-step process combining gene-for-gene and matching-allele genetics. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 323-334.
- Aguilar, J.M., Boecklen, W.J., 1992. PATTERNS OF HERBIVORY IN THE QUERCUS-GRISEA X QUERCUS-GAMBELII SPECIES COMPLEX. *Oikos* 64, 498-504.
- Akla, N., Pratt, J., Annabi, B., 2012. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research* 318, 2498-2506.
- Al-Obaidi, Q.T., 2012. Prevalence of Internal Helminthes in Stray Cats (*Felis Catus*) in Mosul City, Mosul-Iraq. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11, 2732-2736.
- Albrechtova, J., Albrecht, T., Baird, S.J.E., Macholan, M., Rudolfsen, G., Munclinger, P., Tucker, P.K., Pialek, J., 2012. Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 279, 4803-4810.
- Ando, Y., Yasuoka, C., Mishima, T., Ikematsu, T., Uede, T., Matsunaga, T., Inobe, M., 2014. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 50, 313-320.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology* 7, 975-987.
- Ashley, N.T., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Vol 43 43, 385-406.
- Baird, S.J.E., Ribas, A., Macholan, M., Albrecht, T., Pialek, J., de Bellocq, J.G., 2012. WHERE ARE THE WORMY MICE? A REEXAMINATION OF HYBRID PARASITISM IN THE EUROPEAN HOUSE MOUSE HYBRID ZONE. *Evolution* 66, 2757-2772.
- Balkwill, F., 1992. THE CYTOKINE HANDBOOK - THOMSON,A. *Nature* 360, 28-28.
- Balla, K.M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J.M., Stachura, D.L., Hu, Y., Banuelos, K., Romo-Fewell, O., Aroian, R.V., Traver, D., 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood* 116, 3944-3954.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M., 1985. ANALYSIS OF HYBRID ZONES. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 113-148.
- Bateson, W., 1909. Heredity and variation in modern lights, in: A. Seward (Ed.), *Darwin and Modern Science*. University Press, Cambridge.
- Beechler, B.R., Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., 2009. EVALUATION OF HEMATOLOGIC VALUES IN FREE-RANGING AFRICAN BUFFALO (*SYNCERUS CAFFER*). *Journal of Wildlife Diseases* 45, 57-66.

- Bhattacharyya, T., Reifova, R., Gregorova, S., Simecek, P., Gergelits, V., Mistrik, M., Martincova, I., Pialek, J., Forejt, J., 2014. X Chromosome Control of Meiotic Chromosome Synapsis in Mouse Inter-Subspecific Hybrids. *Plos Genetics* 10, 15.
- Blom-Potar, M.C., Chamond, N., Cosson, A., Jouvion, G., Droin-Bergere, S., Huerre, M., Minoprio, P., 2010. *Trypanosoma vivax* Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. II. Immunobiological Dysfunctions. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4.
- Bonne-Annee, S., Hess, J.A., Abraham, D., 2011. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunologic Research* 51, 205-214.
- Bozikova, E., Munclinger, P., Teeter, K.C., Tucker, P.K., Macholan, M., Pialek, J., 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society* 84, 363-378.
- Brown, J.K.M., 2003. A cost of disease resistance: paradigm or peculiarity? *Trends in Genetics* 19, 667-671.
- Campbell, T., Ellis, C., 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology, in: E. CK (Ed.). Blackwell, Ames.
- Caracciolo, D., Clark, S.C., Rovera, G., 1989. HUMAN INTERLEUKIN-6 SUPPORTS GRANULOCYTIC DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS AND ACTS SYNERGISTICALLY WITH GM-CSF. *Blood* 73, 666-670.
- Chamond, N., Cosson, A., Blom-Potar, M.C., Jouvion, G., D'Archivio, S., Medina, M., Droin-Bergere, S., Huerre, M., Goyard, S., Minoprio, P., 2010. *Trypanosoma vivax* Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4.
- Champy, M.F., Selloum, M., Piard, L., Zeitler, V., Caradec, C., Chambon, P., Auwerx, J., 2004. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mammalian Genome* 15, 768-783.
- Chen, S.C., Thompson, K.D., Adams, A., Richards, R.H., 2001. The production of a lymphokine (macrophage activating factor) by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocytes stimulated with the extracellular products of *Mycobacterium* sp. *Journal of Fish Diseases* 24, 217-223.
- Chen, Y.L., Peng, H., Chen, Y.Y., Wei, H.M., Sun, R., Tian, Z.G., 2014. CD49a promotes T-cell-mediated hepatitis by driving T helper 1 cytokine and interleukin-17 production. *Immunology* 141, 388-400.
- Chroust, K., Vodnansky, M., Pikula, J., 2012. Parasite load of European brown hares in Austria and the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* 57, 551-558.
- Cichocki, F., Sitnicka, E., Bryceson, Y.T., 2014. NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed. *Seminars in Immunology* 26, 114-126.
- Coustau, C., Renaud, F., Maillard, C., Pasteur, N., Delay, B., 1991. DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY TO A TREMATODE PARASITE AMONG GENOTYPES OF THE MYTILUS-EDULIS-GALLOPROVINCIALIS COMPLEX. *Genetical Research* 57, 207-212.
- Coustou, V., Plazolles, N., Guegan, F., Baltz, T., 2012. Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. *Cellular Microbiology* 14, 431-445.
- Cruse, J.M., Lewis, R.E., 1999. Atlas of immunology, II ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Da Silva, A.S., Franca, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii*

- in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology* 128, 347-352.
- da Silva, R.D., Rocha, L.O., Fortes, B.D.A., Vieira, D., Fioravanti, M.C.S., 2012. Hematological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under air exposure stress. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32, 99-107.
- Danilova, N., 2006. The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 306B, 496-520.
- Davis, A.K., Maerz, J.C., 2008. Sex-related differences in hematological stress indices of breeding paedomorphic Mole Salamanders. *Journal of Herpetology* 42, 197-201.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22, 760-772.
- Dawkins, R., Krebs, J.R., 1979. ARMS RACES BETWEEN AND WITHIN SPECIES. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 205, 489-511.
- de Bellocq, J.G., Charbonnel, N., Morand, S., 2008. Coevolutionary relationship between helminth diversity and MHC class II polymorphism in rodents. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 1144-1150.
- de Bellocq, J.G., Krasnov, B.R., Khokhlova, I.S., Pinshow, B., 2006. Temporal dynamics of a T-cell mediated immune response in desert rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 145, 554-559.
- de Bellocq, J.G., Porcherie, A., Moulia, C., Morand, S., 2007. Immunocompetence does not correlate with resistance to helminth parasites in house mouse subspecies and their hybrids. *Parasitology Research* 100, 321-328.
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J.A.M., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., De Meester, L., 2007. Host-parasite 'Red Queen' dynamics archived in pond sediment. *Nature* 450, 870-U816.
- Derothe, J.M., Le Brun, N., Loubes, C., Perriat-Sanguinet, M., Moulia, C., 2001. Susceptibility of natural hybrids between house mouse subspecies to *Sarcocystis muris*. *International Journal for Parasitology* 31, 15-19.
- Derothe, J.M., Loubes, C., Perriat-Sanguinet, M., Orth, A., Moulia, C., 1999. Experimental trypanosomiasis of natural hybrids between house mouse subspecies. *International Journal for Parasitology* 29, 1011-1016.
- Derothe, J.M., Porcherie, A., Perriat-Sanguinet, M., Loubes, C., Moulia, C., 2004. Recombination does not generate pinworm susceptibility during experimental crosses between two mouse subspecies. *Parasitology Research* 93, 356-363.
- Dhabhar, F.S., 2002. Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behavior and Immunity* 16, 785-798.
- Dixon, H., Blanchard, C., deSchoolmeester, M.L., Yuill, N.C., Christie, J.W., Rothenberg, M.E., Else, K.J., 2006. The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *European Journal of Immunology* 36, 1753-1763.
- Dobzhansky, T., 1936. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterilityfactors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids, *Genetics* 21:113-135.
- Doligalska, M., Moskwa, B., Stear, M.J., 1999. Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and faecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70, 299-308.

- Doyle, A.D., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Shim, K.G., Nguyen, D.T.C., Protheroe, C., Colbert, D., Kloeber, J., Neely, J., Shim, K.P., Dyer, K.D., Rosenberg, H.F., Lee, J.J., Lee, N.A., 2013. Expression of the secondary granule proteins major basic protein 1 (MBP-1) and eosinophil peroxidase (EPX) is required for eosinophilopoiesis in mice. *Blood* 122, 781-790.
- Eriksson, J., Reimert, C.M., Kabatereine, N.B., Kazibwe, F., Ireri, E., Kadzo, H., Eltahir, H.B., Mohamed, A.O., Vennervald, B.J., Venge, P., 2007. The 434(G > C) polymorphism within the coding sequence of Eosinophil Cationic Protein (ECP) correlates with the natural course of *Schistosoma mansoni* infection. *International Journal for Parasitology* 37, 1359-1366.
- Eze, J.I., Okeke, M.C., Ngene, A.A., Omeje, J.N., Abonyi, F.O., 2013. Effects of dietary selenium supplementation on parasitemia, anemia and serum proteins of *Trypanosoma brucei brucei* infected rats. *Experimental Parasitology* 135, 331-336.
- Fair, J., Whitaker, S., Pearson, B., 2007. Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis* 149, 535-552.
- Falcone, F.H., Pritchard, D.I., Gibbs, B.F., 2001. Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends in Parasitology* 17, 126-129.
- Fernandez-de-Mera, I.G., Vicente, J., Hoefle, U., Ruiz Fons, F., Ortiz, J.A., Gortazar, C., 2009. Factors affecting red deer skin test responsiveness to bovine and avian tuberculin and to phytohaemagglutinin. *Preventive Veterinary Medicine* 90, 119-126.
- Fernandez-De-Mera, I.G., Vicente, J., Hofle, U., Rodriguez, O., Gaspar-Lopez, E., Gortazar, C., 2008. The effects of sex and age on phytohaemagglutinin skin-testing of deer. *New Zealand Veterinary Journal* 56, 71-73.
- Finger, J.W., Adams, A.L., Thomson, P.C., Shilton, C.M., Brown, G.P., Moran, C., Miles, L.G., Glenn, T.C., Isberg, S.R., 2013. Using phytohaemagglutinin to determine immune responsiveness in saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Australian Journal of Zoology* 61, 301-311.
- Finlay, C.M., Walsh, K.P., Mills, K.H.G., 2014. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological Reviews* 259, 206-230.
- Fisher, A.D., Niemeyer, D.O., Lea, J.M., Lee, C., Paull, D.R., Reed, M.T., Ferguson, D.M., 2010. The effects of 12, 30, or 48 hours of road transport on the physiological and behavioral responses of sheep. *Journal of Animal Science* 88, 2144-2152.
- Flor, H.H., 1971. CURRENT STATUS OF GENE-FOR-GENE CONCEPT. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-&.
- Fornuskova, A., Bryja, J., Vinkler, M., Pialek, J., 2014. Contrasting patterns of polymorphism and selection in bacterial-sensing toll-like receptor 4 in two house mouse subspecies. *Ecology and Evolution* 4, 2931-2944.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., FloresRomo, L., AitYahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., DasMahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., Lebecque, S., 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 183, 2593-2603.
- Frank, S.A., 1993. SPECIFICITY VERSUS DETECTABLE POLYMORPHISM IN HOST-PARASITE GENETICS. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 254, 191-197.
- Fritz, R.S., Moulija, C., Newcombe, G., 1999. Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens, and parasites. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30, 565-591.
- Fritz, R.S., Nicholsons, C.M., Brunfeldt, S.J., 1994. INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION OF PLANTS AND RESISTANCE TO HERBIVORES - HYPOTHESES, GENETICS, AND VARIABLE RESPONSES IN A DIVERSE HERBIVORE COMMUNITY. *Oecologia* 97, 106-117.

- Frynta, D., Slabova, M., Vachova, H., Volfova, R., Munclinger, P., 2005. Aggression and commensalism in house mouse: a comparative study across Europe and the Near East. *Aggressive Behavior* 31, 283-293.
- Galeotti, P., Pellitteri-Rosa, D., Sacchi, R., Gentili, A., Pupin, F., Rubolini, D., Fasola, M., 2010. Sex-, morph- and size-specific susceptibility to stress measured by haematological variables in captive common wall lizard *Podarcis muralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 157, 354-363.
- Gandon, S., Buckling, A., Decaestecker, E., Day, T., 2008. Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 1861-1866.
- Garrido, M., Perez-Mellado, V., 2013. Prevalence and intensity of blood parasites in insular lizards. *Zoologischer Anzeiger* 252, 588-592.
- Gebreselassie, N.G., Moorhead, A.R., Fabre, V., Gagliardo, L.F., Lee, N.A., Lee, J.J., Appleton, J.A., 2012. Eosinophils Preserve Parasitic Nematode Larvae by Regulating Local Immunity. *Journal of Immunology* 188, 417-425.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., Simon, H.U., 2013. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in Immunology* 34, 398-409.
- Graham, A.L., Allen, J.E., Read, A.F., 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36, 373-397.
- Granick, S., 1949. THE CHEMISTRY AND FUNCTIONING OF THE MAMMALIAN ERYTHROCYTE. *Blood* 4, 404-441.
- Gross, W.B., Siegel, H.S., 1983. EVALUATION OF THE HETEROPHIL LYMPHOCYTE RATIO AS A MEASURE OF STRESS IN CHICKENS. *Avian Diseases* 27, 972-979.
- Gupta, R.P., Verma, P.C., Chaturvedi, G.C., 1999. Experimental salmonellosis in guinea-pigs: Haematological and biochemical studies. *Veterinary Research Communications* 23, 415-424.
- Gupta, S., Hill, A.V.S., 1995. DYNAMIC INTERACTIONS IN MALARIA - HOST HETEROGENEITY MEETS PARASITE POLYMORPHISM. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261, 271-277.
- Gwinn, M.R., Vallyathan, V., 2006. Respiratory burst: Role in signal transduction in alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 9, 27-39.
- Haenen, O.L.M., Lehmann, J., Engelsma, M.Y., Stuerenberg, F.J., Roozenburg, I., Kerkhoff, S., Breteler, J.K., 2010. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture* 309, 15-24.
- Hannon, R.M., Meek, T.H., Acosta, W., Maciel, R.C., Schutz, H., Garland, T., 2011. Sex-Specific Heterosis in Line Crosses of Mice Selectively Bred for High Locomotor Activity. *Behavior Genetics* 41, 615-624.
- Harrington, L.A., Gelling, M., Simpson, V., Harrington, A., Macdonald, D.W., 2012. Notes on the health status of free-living, non-native American mink, *Neovison vison*, in southern England. *European Journal of Wildlife Research* 58, 875-880.
- Heaney, L.R., Timm, R.M., 1985. MORPHOLOGY, GENETICS, AND ECOLOGY OF POCKET GOPHERS (GENUS *GEOMYS*) IN A NARROW HYBRID ZONE. *Biological Journal of the Linnean Society* 25, 301-317.
- Hill, G.E., Farmer, K.L., 2005. Carotenoid-based plumage coloration predicts resistance to a novel parasite in the house finch. *Naturwissenschaften* 92, 30-34.

- Horii, Y., Owhashi, M., Ishii, A., Bandou, K., Usui, M., 1984. EOSINOPHIL AND NEUTROPHIL CHEMOTACTIC ACTIVITIES OF ADULT WORM EXTRACTS OF SCHISTOSOMA-JAPONICUM INVIVO AND INVITRO. *Journal of Parasitology* 70, 955-961.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H., 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews* 226, 57-79.
- Jacobsson, H., Blomgren, H., 1974. RESPONSES OF MOUSE THYMIC CELLS TO MITOGENS - COMPARISON BETWEEN PHYTOHEMAGGLUTININ AND CONCANAVALIN-A. *Cellular Immunology* 11, 427-441.
- Janousek, V., Wang, L.Y., Luzynski, K., Dufkova, P., Vyskocilova, M.M., Nachman, M.W., Munclinger, P., Macholan, M., Pialek, J., Tucker, P.K., 2012. Genome-wide architecture of reproductive isolation in a naturally occurring hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*. *Molecular Ecology* 21, 3032-3047.
- Johnstone, C.P., Lill, A., Reina, R.D., 2012. Does habitat fragmentation cause stress in the agile antechinus? A haematological approach. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 182, 139-155.
- Jones, G., 1973. NUMBER OF REACTIVE CELLS IN MOUSE LYMPHOCYTE CULTURES STIMULATED BY PHYTOHEMAGGLUTININ, CONCANAVALIN-A OR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN. *Journal of Immunology* 111, 914-920.
- Karasuyama, H., Obata, K., Wada, T., Tsujimura, Y., Mukai, K., 2011. Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy* 66, 1133-1141.
- Kelada, S.N.P., Aylor, D.L., Peck, B.C.E., Ryan, J.F., Tavarez, U., Buus, R.J., Miller, D.R., Chesler, E.J., Threadgill, D.W., Churchill, G.A., de Villena, F.P.-M., Collins, F.S., 2012. Genetic Analysis of Hematological Parameters in Incipient Lines of the Collaborative Cross. *G3-Genes Genomes Genetics* 2, 157-165.
- Kennedy, M.W., Nager, R.G., 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 653-655.
- Key, K.H.L., 1968. CONCEPT OF STASIPATRIC SPECIATION. *Systematic Zoology* 17, 14-&.
- Klempert, M., Rathkolb, B., Fuchs, E., de Angelis, M.H., Wolf, E., Aigner, B., 2006. Genotype-specific environmental impact on the variance of blood values in inbred and F-1 hybrid mice. *Mammalian Genome* 17, 93-102.
- Knott, M.L., Matthaei, K.I., Foster, P.S., Dent, L.A., 2009. The roles of eotaxin and the STAT6 signalling pathway in eosinophil recruitment and host resistance to the nematodes *Nippostrongylus brasiliensis* and *Heligmosomoides bakeri*. *Molecular Immunology* 46, 2714-2722.
- Kobayashi, Y., 2010. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 1157-1162.
- Kvac, M., McEvoy, J., Loudova, M., Stenger, B., Sak, B., Kvetonova, D., Ditrich, O., Raskova, V., Moriarty, E., Rost, M., Macholan, M., Pialek, J., 2013. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology* 43, 805-817.
- Ladle, R.J., 1992. PARASITES AND SEX - CATCHING THE RED QUEEN. *Trends in Ecology & Evolution* 7, 405-408.
- Leavitt, R.D., Felsted, R.L., Bachur, N.R., 1977. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *J. Biol. Chem.* 252, 2961-2966.
- Lebrun, N., Renaud, F., Berrebi, P., Lambert, A., 1992. HYBRID ZONES AND HOST-PARASITE RELATIONSHIPS - EFFECT ON THE EVOLUTION OF PARASITIC SPECIFICITY. *Evolution* 46, 56-61.

- Leclaire, S., Faulkner, C.T., 2014. Gastrointestinal parasites in relation to host traits and group factors in wild meerkats *Suricata suricatta*. *Parasitology* 141, 925-933.
- Licastro, F., Davis, L.J., Morini, M.C., 1993. LECTINS AND SUPERANTIGENS - MEMBRANE INTERACTIONS OF THESE COMPOUNDS WITH T-LYMPHOCYTES AFFECT IMMUNE-RESPONSES. *International Journal of Biochemistry* 25, 845-852.
- Lindahk, K., 1972. MECHANISM OF PHYTOHEMAGGLUTININ (PHA) ACTION .5. PHA COMPARED WITH CONCAVALIN A(CON A). *Experimental Cell Research* 40, 17-&.
- Lugada, E.S., Mermin, J., Kaharuza, F., Ulvestad, E., Were, W., Langeland, N., Asjo, B., Malamba, S., Downing, R., 2004. Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 29-34.
- Macholan, M., Baird, S.J.E., Dufkova, P., Munclinger, P., Bimova, B.V., Pialek, J., 2011. ASSESSING MULTILOCUS INTROGRESSION PATTERNS: A CASE STUDY ON THE MOUSE X CHROMOSOME IN CENTRAL EUROPE. *Evolution* 65, 1428-1446.
- Macholan, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufkova, P., Bimova, B., Pialek, J., 2008. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *Bmc Evolutionary Biology* 8.
- Macholan, M., Munclinger, P., Sugerkova, M., Dufkova, P., Bimova, B., Bozikova, E., Zima, J., Pialek, J., 2007. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61, 746-771.
- Maizels, R.M., 2009. Exploring the immunology of parasitism - from surface antigens to the hygiene hypothesis. *Parasitology* 136, 1549-1564.
- Marco, I., Martinez, F., Pastor, J., Lavin, S., 2000. Hematologic and serum chemistry values of the captive European wildcat. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 445-449.
- Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, K.C., Wikelski, M., 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology* 20, 290-299.
- Mazzaccara, C., Labruna, G., Cito, G., Scarfo, M., De Felice, M., Pastore, L., Sacchetti, L., 2008. Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *Plos One* 3.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Mohri, M., Sharifi, K., Eidi, S., 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Science* 83, 30-39.
- Mouliá, C., 1999. Parasitism of plant and animal hybrids: Are facts and fates the same? *Ecology* 80, 392-406.
- Mouliá, C., Aussel, J.P., Bonhomme, F., Boursot, P., Nielsen, J.T., Renaud, F., 1991. WORMY MICE IN A HYBRID ZONE - A GENETIC-CONTROL OF SUSCEPTIBILITY TO PARASITE INFECTION. *Journal of Evolutionary Biology* 4, 679-687.
- Mouliá, C., Joly, P., 2008. Parasitism and hybrid zones, in: F. **Thomas**, J. **Guégan**, F. **Renaud** (Eds.), *Ecology and Evolution of Parasitism*. Oxford University Press, Oxford.
- Mouliá, C., Lebrun, N., Dallas, J., Orth, A., Renaud, F., 1993. EXPERIMENTAL-EVIDENCE OF GENETIC DETERMINISM IN HIGH SUSCEPTIBILITY TO INTESTINAL PINWORM INFECTION IN MICE - A HYBRID ZONE MODEL. *Parasitology* 106, 387-393.
- Mouliá, C., Lebrun, N., Loubes, C., Marin, R., Renaud, F., 1995. HYBRID VIGOR AGAINST PARASITES IN INTERSPECIFIC CROSSES BETWEEN 2 MICE SPECIES. *Heredity* 74, 48-52.

- Muller, H.J., 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol.Symp.* 6:71–125. .
- Munclinger, P., Frynta, D., 2000. Social interactions within and between two distant populations of house mouse. *Folia Zoologica* 49, 1-6.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* 6, 173-182.
- Orians, C.M., Fritz, R.S., 1995. SECONDARY CHEMISTRY OF HYBRID AND PARENTAL WILLOWS - PHENOLIC GLYCOSIDES AND CONDENSED TANNINS IN SALIX SERICEA, S-ERIOCEPHALA, AND THEIR HYBRIDS. *Journal of Chemical Ecology* 21, 1245-1253.
- Ots, I., Murumagi, A., Horak, P., 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12, 700-707.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y., 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467.
- Ovington, K.S., Behm, C.A., 1997. The enigmatic eosinophil: Investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 93-104.
- Palstra, A.P., Heppener, D.F.M., van Ginneken, V.J.T., Szekely, C., van den Thillart, G.E.E.J.M., 2007. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 244-256.
- Parvathi, J., Karemungikar, A., 2011. Leucocyte Variation, an Insight of Host Defenses During Hymenolepiasis and Restoration with Praziquantel. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, 76-U151.
- Pathak, A.K., Pelensky, C., Boag, B., Cattadori, I.M., 2012. Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infections: Observations from the field and evidence from the laboratory. *International Journal for Parasitology* 42, 647-655.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., Cassatella, M.A., 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115, 335-343.
- Pene, J., Chevalier, S., Preisser, L., Venereau, E., Guilleux, M.-H., Ghannam, S., Moles, J.-P., Danger, Y., Ravon, E., Lesaux, S., Yssel, H., Gascan, H., 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *Journal of Immunology* 180, 7423-7430.
- Petney, T.N., Andrews, R.H., 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28, 377-393.
- Pialek, J., Vyskocilova, M., Bimova, B., Havelkova, D., Pialkova, J., Dufkova, P., Bencova, V., Dureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H.C., Macholan, M., Munclinger, P., Storchova, R., Zajicova, A., Holan, V., Gregorova, S., Forejt, J., 2008. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *Journal of Heredity* 99, 34-44.
- Puerta, M.L., Delcampo, A.L.G., Abelenda, M., Fernandez, A., Huecas, V., Nava, M.P., 1992. HEMATOLOGICAL TRENDS IN FLAMINGOS, PHOENICOPTERUS-RUBER. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 102, 683-686.
- Quevillon, E.L., Diaz, F., Jaramillo, L., Lascrain, R., Gutierrez-Pabello, J.A., Castaneda, F.A., Arriaga, C., Perez, R., Gonzalez, X.E., 2013. Comparison of immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *Mycobacterium bovis* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 153, 194-201.

- Racnik, J., Skrbinek, T., Tozon, N., Nemec, A., Potocnik, H., Kljun, F., Kos, I., Bidovec, A., 2004. Blood and urine values of free-living European wildcats in slovenia. *European Journal of Wildlife Research* 50, 44-47.
- Rausch, R.L., Fay, F.H., 2011. *Toxascaris leonina* in Rodents, and Relationship to Eosinophilia in a Human Population. *Comparative Parasitology* 78, 236-244.
- Reinhardt, S., Scott, I., Simpson, H.V., 2011. Neutrophil and eosinophil chemotactic factors in the excretory/secretory products of sheep abomasal nematode parasites NCF and ECF in abomasal nematodes. *Parasitology Research* 109, 627-635.
- Restel, T.I., Porfirio, L.C., de Souza, A.S., Silva, I.S., 2014. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. *Acta Cirurgica Brasileira* 29, 306-312.
- Ricklefs, R.E., Sheldon, K.S., 2007. Malaria prevalence and white-blood-cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. *Auk* 124, 1254-1266.
- Riley, S.L., Chernin, J., 1994. THE EFFECT OF THE TETRATHYRIDIA OF MESOCESTOIDES-CORTI ON THE LIVERS AND PERIPHERAL-BLOOD OF 3 DIFFERENT STRAINS OF MICE. *Parasitology* 109, 291-297.
- Roletto, J., 1993. HEMATOLOGY AND SERUM CHEMISTRY VALUES FOR CLINICALLY HEALTHY AND SICK PINNIPEDS. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24, 145-157.
- Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., 2009. Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications* 2, 113-121.
- Sage, R.D., Heyneman, D., Lim, K.C., Wilson, A.C., 1986. WORMY MICE IN A HYBRID ZONE. *Nature* 324, 60-63.
- Sak, B., Kvac, M., Kvetonova, D., Albrecht, T., Pialek, J., 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Veterinary Parasitology* 178, 246-250.
- Salvante, K.G., 2006. Techniques for studying integrated immune function in birds. *Auk* 123, 575-586.
- Schmid-Hempel, P., 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. Oxford University Press.
- Schwarz, E., Schwarz, H., 1943. The Wild and Commensal Stocks of the House Mouse, *Mus musculus* Linnaeus. *Journal of Mammalogy* 24, 59-72.
- Seppala, O., Jokela, J., 2010. MAINTENANCE OF GENETIC VARIATION IN IMMUNE DEFENSE OF A FRESHWATER SNAIL: ROLE OF ENVIRONMENTAL HETEROGENEITY. *Evolution* 64, 2397-2407.
- Shurtliff, Q.R., 2013. Mammalian hybrid zones: a review. *Mammal Review* 43, 1-21.
- Siemens, D.H., Ralston, B.E., Johnson, C.D., 1994. ALTERNATIVE SEED DEFENSE-MECHANISMS IN A PALO VERDE (FABACEAE) HYBRID ZONE - EFFECTS ON BRUCHID BEETLE ABUNDANCE. *Ecological Entomology* 19, 381-390.
- Silveira-Lemos, D., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Oliveira, L.F.A., Costa-Silva, M.F., Matoso, L.F., De Souza, L.J., Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., 2008. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Tropica* 108, 150-159.
- Simkova, A., Ottova, E., Morand, S., 2006. MHC variability, life-traits and parasite diversity of European cyprinid fish. *Evolutionary Ecology* 20, 465-477.
- Siva-Jothy, M.T., Thompson, J.J.W., 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology* 27, 206-212.

- Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Tella, J.L., 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* 13, 567-572.
- Stadecke, M., Leskowitz, S., 1974. CUTANEOUS BASOPHIL RESPONSE TO MITOGENS. *Journal of Immunology* 113, 496-500.
- Stobo, J.D., Paul, W.E., 1973. FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF MURINE LYMPHOID-CELLS .3. DIFFERENTIAL RESPONSIVENESS OF T CELLS TO PHYTOHEMAGGLUTININ AND CONCAVALIN A AS A PROBE FOR T CELL SUBSETS. *Journal of Immunology* 110, 362-375.
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A., Irwin, R.E., 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 278-285.
- Suzuki, H., Aplin, P.K., 2012. Phylogeny and biogeography of the genus *Mus* in Eurasia., *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Swaminathan, G.J., Myszka, D.G., Katsamba, P.S., Ohnuki, L.E., Gleich, G.J., Acharya, K.R., 2005. Eosinophil-granule major basic protein, a C-type lectin, binds heparin. *Biochemistry* 44, 14152-14158.
- Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, T.M., Adams, D.J., Narita, T., Shin, T.I., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., Obata, Y., Sakaki, Y., Moriwaki, K., Fujiyama, A., Kohara, Y., Shiroishi, T., 2013. The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Research* 23, 1329-1338.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., 2013. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 254-264.
- Thompson, J.N., Burdon, J.J., 1992. GENE-FOR-GENE COEVOLUTION BETWEEN PLANTS AND PARASITES. *Nature* 360, 121-125.
- Thornhill, R., Fincher, C.L., 2013. The parasite-driven-wedge model of parapatric speciation. *Journal of Zoology* 291, 23-33.
- Tondell, A., Moen, T., Borset, M., Salvesen, O., Ro, A.D., Sue-Chu, M., 2014. Bronchoalveolar Lavage Fluid IFN-gamma(+) Th17 Cells and Regulatory T Cells in Pulmonary Sarcoidosis. *Mediators of Inflammation*, 9.
- Turmelle, A.S., Ellison, J.A., Mendonca, M.T., McCracken, G.F., 2010. Histological assessment of cellular immune response to the phytohemagglutinin skin test in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 180, 1155-1164.
- Turner, L.M., Schwahn, D.J., Harr, B., 2012. REDUCED MALE FERTILITY IS COMMON BUT HIGHLY VARIABLE IN FORM AND SEVERITY IN A NATURAL HOUSE MOUSE HYBRID ZONE. *Evolution* 66, 443-458.
- van den Biggelaar, A.H.J., van Ree, R., Rodrigues, L.C., Lell, B., Deelder, A.M., Kremsner, P.G., Yazdanbakhsh, M., 2000. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 356, 1723-1727.
- Venesky, M.D., Wilcoxon, T.E., Rensel, M.A., Rollins-Smith, L., Kerby, J.L., Parris, M.J., 2012. Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. *Oecologia* 169, 23-31.
- Vinkler, M., Albrecht, T., 2011. Handling immunocompetence' in ecological studies: do we operate with confused terms? *Journal of Avian Biology* 42, 490-493.
- Vinkler, M., Bainova, H., Albrecht, T., 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct. Ecol.* 24, 1081-1086.

- Vinkler, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., Albrecht, T., 2012. Phytohaemagglutinin skin-swelling test in scarlet rosefinch males: low-quality birds respond more strongly. *Animal Behaviour* 83, 17-23.
- Vinkler, M., Svobodova, J., Gabrielova, B., Bainova, H., Bryjova, A., 2014. Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. *Journal of Avian Biology* 45, 43-50.
- Wang, L.Y., Luzynski, K., Pool, J.E., Janousek, V., Dufkova, P., Vyskocilova, M.M., Teeter, K.C., Nachman, M.W., Munclinger, P., Macholan, M., Pialek, J., Tucker, P.K., 2011a. Measures of linkage disequilibrium among neighbouring SNPs indicate asymmetries across the house mouse hybrid zone. *Molecular Ecology* 20, 2985-3000.
- Wang, Z., Lee, J., Zhang, Y., Wang, H., Liu, X., Shang, F., Zheng, Q., 2011b. Increased Th17 cells in coronary artery disease are associated with neutrophilic inflammation. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 45, 54-61.
- Wasimuddin, Cizkova, D., Bryja, J., Albrechtova, J., Hauffe, H.C., Pialek, J., 2012. High Prevalence and Species Diversity of *Helicobacter* spp. Detected in Wild House Mice. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 8158-8160.
- Westerdahl, H., Waldenstrom, J., Hansson, B., Hasselquist, D., von Schantz, T., Bensch, S., 2005. Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272, 1511-1518.
- Whitham, T.G., Morrow, P.A., Potts, B.M., 1994. PLANT HYBRID ZONES AS CENTERS OF BIODIVERSITY - THE HERBIVORE COMMUNITY OF 2 ENDEMIC TASMANIAN EUCALYPTS. *Oecologia* 97, 481-490.
- Wiley, C., Qvarnstrom, A., Gustafsson, L., 2009. Effects of hybridization on the immunity of collared *Ficedula albicollis* and pied flycatchers *F-hypoleuca*, and their infection by haemosporidians. *Journal of Avian Biology* 40, 352-357.
- Willson, C.J., Chandra, S.A., Kimbrough, C.L., Jordan, H.L., 2012. Effect of estrous cycle phase on clinical pathology values in beagle dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 41, 71-76.
- Windsor, D.A., 1998. Most of the species on Earth are parasites. *International Journal for Parasitology* 28, 1939-1941.
- Wolinska, J., Lively, C.M., Spaak, P., 2008. Parasites in hybridizing communities: the Red Queen again? *Trends in Parasitology* 24, 121-126.
- Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 32, 569-577.
- Xie, L., Xu, F., Liu, S., Ji, Y., Zhou, Q., Wu, Q., Gong, W., Cheng, K., Li, J., Li, L., Fang, L., Zhou, L., Xie, P., 2013. Age- and Sex-Based Hematological and Biochemical Parameters for *Macaca fascicularis*. *Plos One* 8.
- Xiong, X.L., Qi, Y., Jiao, J., Gong, W.P., Duan, C.S., Wen, B.H., 2014. Exploratory Study on Th1 Epitope-Induced Protective Immunity against *Coxiella burnetii* Infection. *Plos One* 9, 8.
- Yang, H., Wang, J.R., Didion, J.P., Buus, R.J., Bell, T.A., Welsh, C.E., Bonhomme, F., Yu, A.H.-T., Nachman, M.W., Pialek, J., Tucker, P., Boursot, P., McMillan, L., Churchill, G.A., de Villena, F.P.-M., 2011. Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nature Genetics* 43, 648-U173.
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H.D., Huizing, M., Hoogstraten-Miller, S., 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Animal* 40, 155-160.

Yasuda, K., Muto, T., Kawagoe, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y., Matsushita, K., Taki, Y., Futatsugi-Yumikura, S., Tsutsui, H., Ishii, K.J., Yoshimoto, T., Akira, S., Nakanishi, K., 2012. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3451-3456.

Yu, J.H., Han, J.J., Park, S.W., 2010. Haematological and biochemical alterations in Korean catfish, *Silurus asotus*, experimentally infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research* 41, 295-302.

# Přílohy

Příloha 1 – hematologické parametry inbredních linií

Příloha 2 – hematologické parametry volně žijících a inbredních myší