

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Monika Pokorná

**Faktory ovlivňující depozici vybraných antimikrobiálních složek
do jednotlivých struktur vejce**

Factors affecting deposition of selected antimicrobial substances
into the egg structure

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Veronika Javůrková, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím všech uvedených literárních pramenů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2016

Podpis

Monika Pokorná

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří se na výzkumu podíleli a bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Především děkuji své školitelce, Veronice Javůrkové, za vedení diplomové práce, cenné rady, drobná i větší „nakopnutí“, zejména pak za pomoc při zpracování statistických dat, konzultantům této práce, Michalu Vinklerovi a Jakubu Kreisingerovi, za postřehy k výsledkům, zapůjčení vybavení, zvláště skeneru, umožnění uskladnění vzorků přechodně i velmi dlouhodobě v jejich mrazácích. Mé poděkování dále patří týmům Lucie Sosvorové a Ivana Mikšíka za provedení analýz hormonů a pigmentů, Tomáši Albrechtovi za zapůjčení přenosného spektrofotometru, Jirkovi Eliášovi za zaučení, zprovoznění a neskutečně pohotový servis tohoto světlavého přístroje, Juanu Gallego Zamoranovi za asistenci při měření reflektance skořápek, Anežce Pojezdné a Haně Velové za pomoc při sběru a přípravě materiálu, týmu Pavla Němce za neskonalou toleranci a trpělivost, kterou se mnou měli při okupaci digestoře v histologické laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za materiální i morální podporu během celé doby studia, za nemalou pomoc při zajišťování objednávek a vyzvedávání vajec od chovatelů, dále svým pěti bratrům, že mě nenechali na holičkách, když jsem si nevěděla rady se stávkujícími počítači a programy, a mnohým dalším, že to se mnou vydrželi, byli na blízku, když bylo třeba.

„Život je umění, jak od mylných předpokladů dojít ke správným závěrům.“

Samuel Butler ml.

Abstrakt

Jak během ovogeneze, tak ihned po snesení je ptačí vejce vystaveno silnému tlaku ze strany mikroorganismů, které jsou schopny pronikat póry ve skořápce a infikovat jeho vnitřní struktury. Vzhledem k prokázaným negativním dopadům na líhivost, životaschopnost a fenotyp mláďat se vyvinula kaskáda bariér, které dokážou riziko bakteriální infekce minimalizovat. Za jedny z nich se považuje depozice antimikrobiálních složek do skořápky a bílku vejce. Jedná se o celou řadu bílkových proteinů, mezi nimiž svým zastoupením a antimikrobiálním efektem dominují lysozym a ovotransferin, které jsou ukládány částečně i do skořápky a kutikulární vrstvy skořápky. Z nejnovějších studií vyplývá, že se antimikrobiální obranu vejce mohou zprostředkovávat také skořápkové pigmenty – biliverdin a protoporfyrin, které zvýšenou absorpcí UV záření a regulací vodivosti a srážení vodních par na povrchu vejce brání jeho kolonizaci mikroorganismy. Přestože je přítomnost těchto antimikrobiálních složek v různých strukturách vejce prokázána, není dosud známa komparativní studie zabývající se vztahem mezi depozicí vybraných antimikrobiálních složek do povrchových – skořápka a kutikula, a vnitřních struktur vejce – bílek, u vajec s různě barevnou skořápkou. Rovněž chybí uspokojivá odpověď na otázku, jakou roli v procesu deponace antimikrobiálních složek hrají androgenní hormony.

V této práci jsme se zaměřili na zkoumání vzájemných vztahů dvou klíčových a nejhojněji studovaných antimikrobiálních proteinů – lysozymu a ovotransferinu, ukládaných do bílku, a pigmentu protoporfyrinu IX, deponovaného do kalcifikované skořápky i proteinové kutikuly. Pro lepší pochopení fyziologického pozadí těchto interakcí jsme rovněž analyzovali koncentrace steroidních hormonů v bílku (kortikosteronu, progesteronu, testosteronu, pregnenolonu a 17 hydroxypregnenolonu), které odráží fyziologický stav samice i změny v jejím prostředí během ovogeneze. Jako modelový druh pro studium vnitrodruhové variability v pigmentaci skořápky a jejího vlivu na celkový antimikrobiální potenciál různě barevných vajec jsme analyzovali vejce 24 plemen kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), lišících se barvou skořápky.

Naše studie prokázala, že koncentrace obou antimikrobiálních proteinů v bílku souvisí s barvou skořápky. Nejvyšší koncentrace obou proteinů vykazovala vejce s krémově zbarvenou skořápkou, nejnižší koncentrace lysozymu a ovotransferinu pak

měla vejce s bílou a modrou skořápkou. Zajímavým zjištěním také byl na barvě vejce závislý vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku a koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořáčky. Zatímco u bílých vajec se s klesající koncentrací protoporfyrinu v kutikule koncentrace lysozymu v bílku zvyšovala, u krémových a tmavě hnědých vajec tomu bylo naopak. Tento výsledek může naznačovat možný trade-off při investicích do antimikrobiálního potenciálu povrchových a vnitřních struktur vejce u ptáků s různě zbarvenou skořápkou, která často souvisí s typem hnízdění, kdy bílá vejce jsou doménou především dutinových ptáků a vejce s různě zbarvenou skořápkou pak kladou druhy hnízdící v otevřených hnízdech

Z našich výsledků obecně vyplývá, že proces deponace lysozymu a ovotransferinu do bílku jsou na sobě navzájem nezávislé procesy, kdy deponace lysozymu je na rozdíl od ovotransferinu více ovlivněna vlivy prostředí než genetickou predispozicí k plemeni. Naopak koncentrace ovotransferinu v bílku se jeví být více pod vlivem genetického pozadí plemene. S tímto zjištěním korespondují i analýzy vztahu mezi hormonálním statutem samice v době ovogeneze. Koncentrace téměř všech studovaných androgenních hormonů vykazovaly buďto pozitivní (testosteron, 17 hydroxypregnenolon) či negativní (pregnenolon) korelaci s koncentracemi lysozymu v bílku. Naproti tomu u ovotransferinu nebyly pro žádný z hormonů nalezeny významné korelace.

Na základě změřených koncentrací kortikosteronu v bílku se nepodařilo prokázat žádný efekt stresu v době ovogeneze na koncentrace antimikrobiálních látek do různých struktur vejce. Nicméně negativní korelace mezi koncentracemi pregnenolonu, jako prokázaného přímého prekurzoru pro syntézu kortikosteronu u ptáků, na koncentraci lysozymu v bílku může naznačovat zásadní vliv stresu na míru investic do antimikrobiálního potenciálu vejce u ptáků.

Klíčová slova: vejce, skořápka, kutikula, mikroorganismy, pigmenty, antimikrobiální proteiny

Abstract

Both during the ovogenesis and immediately after the laying is a bird egg exposed to strong pressure from the microorganisms which are able to penetrate the egg through eggshell pores and infect its inner structures. With regard to the proved negative effects on hatchability, viability and phenotype of offspring, a cascade of obstacles has evolved which are able to minimize the risk of bacterial infection. The deposition of antimicrobial components into the eggshell and the egg white is considered to be one of them. A whole group of egg white proteins belong to them, among which lysozyme and ovotransferrin, which are also partially deposited into the eggshell and cuticular layer of the eggshell, dominate with their antimicrobial effect. The implication of the newest studies is that the microbial protection of the egg can be also performed by the eggshell pigments – biliverdin and protoporphyrin, which protect the egg from being colonized by microorganisms with an increased UV light and regulation of conductivity and water vapour condensation on the egg surface. Even though the presence of these antimicrobial components in different structures of the egg has been proved, there is no known comparative study which addresses the relation between deposition of selected antimicrobial components into surface – the eggshell and cuticle, and inner egg structures – the egg white, of eggs with variously coloured eggshells. A satisfactory answer to the question which role in the depositing process of the antimicrobial components the androgenic hormones play also does not exist.

In this thesis, we focused on the research of mutual relations of two key and most frequently studied antimicrobial proteins – lysozyme and ovotransferrin which are deposited into the egg white and into the pigment protoporphyrin IX, which is deposited into the calcified eggshell and also into the protein cuticle. For better understanding of the physiological background of their interactions we have also analysed the concentrations of steroid hormones in the eggshell (corticosteroid, progesterone, testosterone, pregnenolone and 17 hydroxypregnenolone) which reflect physiological condition of the hen and the changes in its environment during the ovogenesis. As a model species for the research of intraspecies variability of the eggshell pigmentation and its influence on the overall antimicrobial potential of differently coloured eggs we have analysed eggs of 24 breeds of domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) which differ in eggshell colour.

Our research has proved that the concentration of both antimicrobial proteins in the egg white is related to the eggshell colour. The eggs with cream-coloured eggshells have shown highest concentration of both proteins, on the other hand the eggs with white or blue eggshells had the lowest concentration of lysozyme and ovotransferrin. An interesting finding is the relation between the concentration of lysozyme in the egg white and concentration of protoporphyrin in cuticular layer of the eggshell which depends on the eggshell colour. While by the white eggs the concentration of lysozyme in the egg white increased with the decreasing concentration of protoporphyrin, it was the other way around in case of cream-coloured and dark brown eggs. This result could indicate possible trade-off in case of investment in the antimicrobial potential of the surface and inner structures of bird eggs with variously coloured eggshell which usually depends on the type of nesting. The white eggs are mainly laid by cavernous birds and the eggs with variously coloured eggshell are laid by species which nest in open nests.

The results of our research show that the processes of depositing of lysozyme and ovotransferrin into the egg white are mutually independent processes. As opposed to the depositing of ovotransferrin, the depositing of lysozyme is more influenced by the environment than by genetic predispositions of the breed. On the contrary, the concentration of ovotransferrin in the egg white seems to be more influenced by the genetic background of the breed. The analyses of the relation between the hormonal status of the hen during oogenesis also correspond with these findings. The concentration of almost all studied androgenic hormones demonstrated either positive (testosterone, 17 hydroxypregnenolone) or negative (pregnenolone) correlation with the concentrations of lysozyme in the egg white. On the other hand, by ovotransferrin there were not found significant correlations for any of the hormones.

No effect of stress on the concentrations of antimicrobial substances in different structures of the egg during the oogenesis was found on the basis of measured concentrations of corticosterone in the egg white. Nevertheless, the negative correlation between the concentrations of pregnenolone, as the substantiated direct precursor for the synthesis of corticosterone by birds, on the concentration of lysozyme in the egg white might indicate fundamental influence of the stress on the rate of investment into antimicrobial potential of bird eggs.

Key words: egg, eggshell, cuticle, microorganisms, pigments, antimicrobial proteins

Obsah

1. Úvod.....	11
1.1 Proteiny s významným antimikrobiálním potenciálem v ptačím bílku a kutikule	14
1.1.1 Lysozym	16
1.1.2 Ovotransferin.....	17
1.2 Pigmenty	17
1.2.1 Biliverdin.....	19
1.2.2 Protoporfyrin	19
1.3 Faktory ovlivňující deponaci proteinů a pigmentů	21
1.3.1 Role steroidních hormonů při deponaci antimikrobiálních složek do bílku a kutikuly.....	23
2. Hypotézy a cíle práce.....	25
3. Metodika	26
3.1 Modelový druh – kur domácí (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	26
3.2 Sběr a příprava materiálu	27
3.3 Analýza koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku	28
3.3.1 Určení inhibiční konstanty EDTA/Mercaptoethanolu pro lysozym a ovotransferin.....	28
3.3.2 Stanovení lysozymu pomocí radiální difúze	30
3.3.3 Stanovení ovotransferinu pomocí kolorimetrické metody	30
3.4 Analýza koncentrace antimikrobiálních proteinů v kutikule	31
3.4.1 Pre - analýza roztoků kutikul.....	31
3.4.2 Pre - analýza kutikul.....	31
3.5 Analýza pigmentů v kutikule	33
3.6 Analýza hormonů v bílku.....	35
3.7 Spektrofotometrické charakteristiky skořápek u jednotlivých plemen	36
3.8 Statistické zpracování dat.....	37

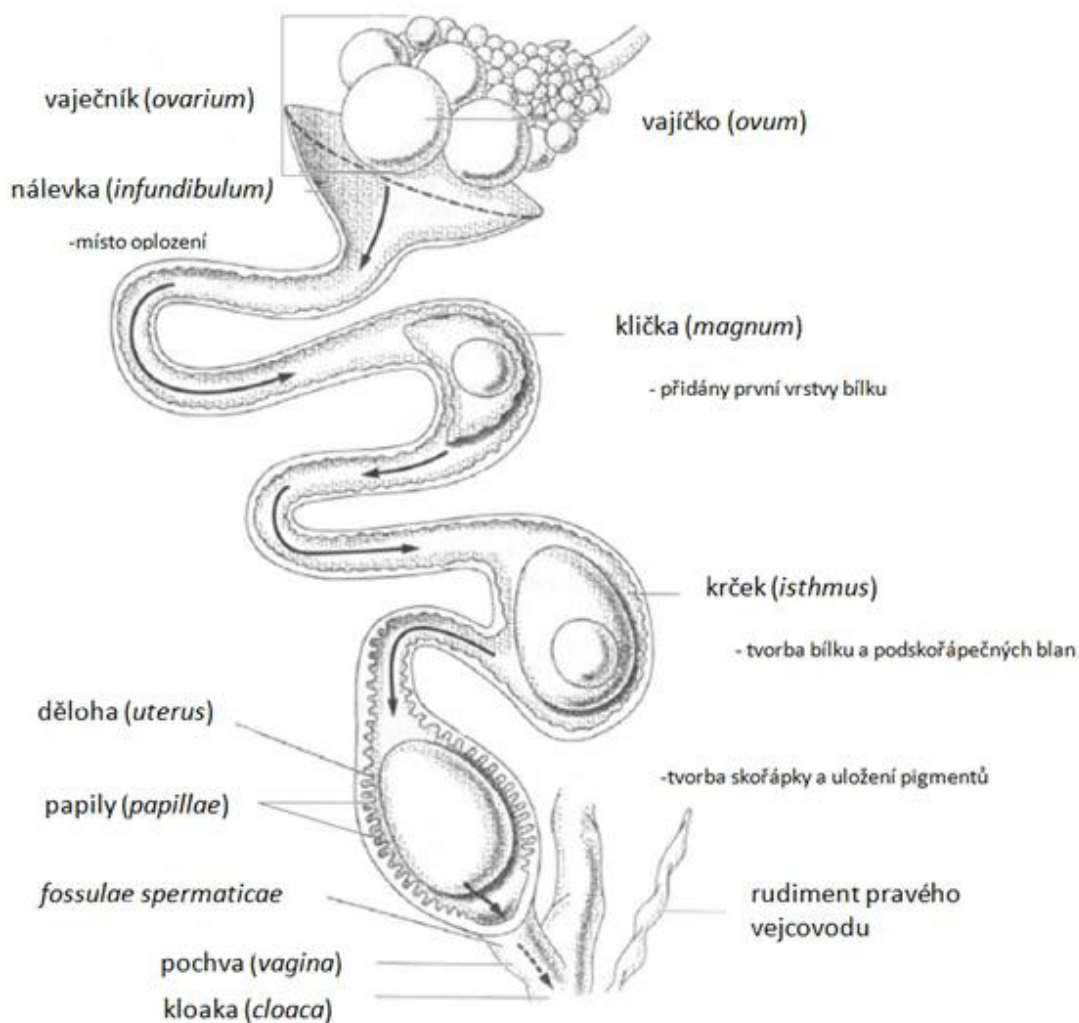
3.8.1 Výpočty koncentrací lysozymu a ovotransferinu v bílku.....	37
3.8.2 Analýzy efektu barevnosti skořápky na koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku.....	37
3.8.3 Analýzy vzájemných vztahů mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky, antimikrobiálními proteiny v bílku a androgenními hormony v bílku.....	39
4. Výsledky	40
4.1 Vztah mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů v bílku v závislosti na barvě skořápky	40
4.1.1 Koncentrace lysozymu v závislosti na barvě skořápky.....	40
4.1.2 Koncentrace ovotransferinu v závislosti na barvě skořápky	42
4.1.3 Koncentrace lysozymu a ovotransferinu v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky.....	44
4.2 Analýza pigmentů v kutikule	48
4.2.1 Vztah mezi množstvím protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky a antimikrobiálními proteiny v bílku.....	48
4.3 Analýza hormonů v bílku.....	50
4.3.1 Vztah mezi množstvím protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky a hormonálním statutem samice.....	50
4.3.2 Vztah mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů v bílku a hormonálním statutem samice	51
4.3.3 Vliv stresu na deponaci antimikrobiálních proteinů do bílku a protoporfyrinu do kutikulární vrstvy skořápky	54
5. Diskuze	56
5.1 Variabilita v koncentracích antimikrobiálních proteinů v bílku u plemen s různě zbarvenou skořápkou	57
5.2 Variabilita v koncentracích antimikrobiálních proteinů v kutikule	59
5.3 Koncentrace antimikrobiálních proteinů v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky	60

5.4 Variabilita v koncentracích pigmentů v kutikule u plemen s různě zbarvenou skořápkou vejce.....	61
5.5 Vliv hormonů na deponaci antimikrobiálních proteinů do bílku.....	63
5.6 Vliv hormonů na deponaci pigmentů do kutikuly.....	66
6. Závěr	67
7. Literatura.....	68
Přílohy.....	77

1. Úvod

Ptačí vejce je fenomén, který nemá v živočišné říši obdoby. Tato reprodukční struktura byla evolucí zformována k odolnosti vůči fyzickému, mikrobiálnímu i tepelnému útoku z vnějšího, často agresivního prostředí, a zároveň k uspokojení potřeb vyvíjejícího se embrya (Hincke et al., 2008).

Jedinečnost ptačího vejce jistě podtrhuje i jeho specifická stavba a způsob vzniku. Skládá se z centrálního žloutku obklopeného bílkem, podskořápečnými blánami a vápenatou skořápkou, nerovnoměrně pokrytou po celé své ploše kutikulou. Procentuální zastoupení jednotlivých částí vejce se napříč ptačí říší může výrazně lišit a to zejména v obsahu žloutku vzhledem k celkové velikosti vejce (od 15% u terejů až do více než 69% ve vejcích kivi; Sotherland a Rahn, 1987; Gill, 2007). K vytvoření této kompozice dochází při průchodu zralého a většinou oplozeného vajíčka vejcovodem. Tvorba vejce trvá obvykle okolo 24 h, ale může vyžadovat i týden (terejové, zoborožci; Gill, 2007). Po krátké, asi 20 minutové zastávce zralého vajíčka v nálevce (*infundibulum*) vejcovodu, kde dochází k jeho oplození, sestupuje do nejdelší části vejcovodu, zvané *magnum*. Během následujících 2-3 hodin, kdy komplex žloutek /vajíčko prochází kličkami tohoto úseku, jsou postupně nanесeny čtyři vrstvy bílku (Nys et al., 2004). Následně je vejce peristaltickými pohyby vrstvy hladké svaloviny posunuto do proximálního (bílého) krčku (*isthmus*). Zde jsou vytvořeny za 1-2 hodiny dvě skořápkové membrány (podskořápečné blány). V posledním úseku vejcovodu je vejce pokryto tvrdou skořápkou. Mineralizace skořáčky je zahájena v distálním (červeném) krčku (*isthmus*) a je dokončena v děloze (*uterus*) během následujících 16 -17 h (Nys et al., 2004). Na konci tohoto procesu je ojedinělý mnohvrstevný, vysoce uspořádaný a mineralizovaný kompozitní biomateriál (Arias et al., 1993). Základ tvoří tři kalcifikované vrstvy mamilární, spongiózní (palisádová) a vertikální krystalová, které jsou zesponženy do dvou nekalcifikovaných podskořápečných blan (Nys et al., 1999). V závěru je povrch skořáčky pokryt ještě tenkou kutikulou, nekalcifikovanou organickou vrstvou, do které jsou deponovány skořápkové pigmenty. U některých druhů ptáků (např. holubů) může kutikula chybět (Board, 1974).



Obr. 1: Formování vejce ve vejcovodu začíná vstupem zralého vajíčka do nálevky vejcovodu. Při sestupu vajíčka vejcovodem jsou postupně přidány vrstvy bílku, podskořápečné blány, vytvořena skořápka. Posledním krokem je deponace pigmentů v děloze. Převzato a upraveno podle Gill (2007).

Přirozená obrana vejce před působením mikroorganismů probíhá na dvou úrovních. Klíčovou roli v ní hraje skořápka, která slouží jako fyzická bariéra proti vlivům z vnějšího prostředí. Neméně důležitou složkou je chemický obranný systém složený z endogenních antibakteriálních proteinů, které byly zjištěny především ve vaječném bílku a podskořápečných blánách (Hincke et al., 2008). Mezi nejvíce studované a zásadní komponenty bílku, zajišťující jeho baktericidní či bakteriostatickou povahu, patří lysozym (Board a Tranter, 1986), ovotransferin (Lock a Board, 1992),

ovoalbumin, dále různé proteiny vázající vitamíny (avidin, protein vázající riboflavin, protein vázající thiamin) či inhibitory proteináz (cystatin, ovomukoid, ovoinhibitor, ovostatin; Stevens, 1991). V poslední době bylo identifikováno velké množství (cca 600) proteinů skořápkové matrix (Mann et al., 2006, 2008; Mikšík et al., 2010) a kutikuly (Rose-Martel et al., 2012, Mikšík et al., 2014), které by mohly plnit podobnou funkci jako zmíněné proteiny uvnitř vejce (Wellman-Labadie et al., 2008b). Kromě výše uvedených (lysozymu, ovotransferinu, ovoalbuminu) byly ve skořápce nalezeny i proteiny specifické pouze pro skořápkovou matrix – ovokalyxiny a ovokleidiny. Hlavní funkcí těchto proteinů je regulace mineralizace skořápky a její antimikrobiální obrana (Rose a Hincke, 2009). Mezi ty, které mohou mít významnou roli v ochraně vaječného obsahu před mikroorganismy na úrovni skořápky, bývají řazeny zejména dva z nich - OCX – 32 a OCX - 36. Avšak výzkum proteinů obsažených ve skořápce a kutikule je zatím na začátku. Hlavní důraz je proto stále kladen na ovotransferin, lysozym a avidin.

Další raritou ptáků je, že kladou vejce se skořápkami zbarvenými pigmentem. První ptačí vejce však pigmentaci zřejmě postrádala, byla celá bílá jako například vejce dnešních pštrosů. Existuje nesčetné množství interpretací tohoto unikátního rysu ptačích vajec (viz Kilner, 2006). Mezi jinými i ta, že skořápkové pigmenty se mohou jistou měrou podílet také na antimikrobiální obraně obsahu vejce (Ishikawa et al., 2010). Nicméně jen velmi málo studií se tímto zabývá, proto jednoznačný důkaz pro tuto hypotézu zatím stále chybí.

Kvalita vejce může být ovlivněna různými vnějšími faktory, jako jsou živiny, teplota okolního prostředí, podmínky chovu, i vnitřními faktory, jako jsou věk a příslušnost k druhu, konkrétnímu plemenu (např. Scott a Silversides, 2000). Důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledné složení vejce, je také stres. Experimentální studie prokázaly, že environmentální stres může různě modifikovat expresi proteinů vaječného bílku u nosnic prostřednictvím steroidních hormonů (např. Kim a Choi, 2014). Jako primární stresový hormon u ptáků je označován kortikosteron, který stimuluje glukoneogenezi s cílem poskytnout energii potřebnou pro přežití u vystresovaných kuřat (Saino et al., 2005). Stres tedy může ovlivnit expresi kvalitativních i kvantitativních znaků, stejně jako zdraví kuřat působením endokrinních, metabolických, fyziologických i behaviorálních změn (Henriksen a Rettenbacher, 2013).

1.1 Proteiny s významným antimikrobiálním potenciálem v ptačím bílku a kutikule

Ptačí bílek je komplexní multifunkční médium, podporující růst a vývoj embrya. U kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) je tvořen z 88% vodou a z 10% proteiny (Burley a Vadehra, 1989), které jsou ukládány během tvorby bílku v magnu. Mann et al. (2008) identifikovali celkem 78 proteinů tvořících tento proteinový podíl. Později tento počet navýšili až na 158 proteinů (Mann a Mann, 2011). Kromě poskytování vody a živin vyvíjejícímu se embryu bílek zabraňuje také růstu mikroorganismů. K významnému snížení mikrobiální proliferace napomáhá alkalické pH vaječného bílku a zvláště přítomnost proteinů s antimikrobiálními účinky (Deeming, 2002), jako jsou cystatin (Wesierska et al., 2005), makroglobulin (Miyagawa et al., 1991), avidin, ovotransferin, lysozym, ovoalbumin aj.

Neminerální složky představují okolo 2% hmotnosti kalcifikované skořápky. Pravděpodobně ovlivňují mechanické vlastnosti skořápky a podílí se různou měrou na její antimikrobiální obraně. Skořápkové proteiny lze na základě jejich chování v kyselinách (např. HCl, kyselině octové) či chelatačních činidlech (EDTA, EGTA) rozčlenit na rozpustné a nerozpustné. Toto dělení není zcela přesné. Závisí na postupu, který byl k izolaci proteinů matrix použit. Zástupci jedné skupiny se tak mohou vyskytovat i ve skupině druhé.

V poslední době bylo identifikováno okolo 530 proteinů skořápkové matrix rozpustných v kyselinách (Mann et al., 2006, 2008). Zdá se, že většinu z tohoto počtu tvoří rezidua z předchozích fází formování vejce, nebo intracelulární proteiny uvolněné rozpadem buněk ze stěn vejcovodu, které byly během procesu kalcifikace často nesespecifickým způsobem asimilovány z děložní tekutiny do skořápky (Mann et al., 2006). U řady z nich není známa a ani předpokládána jejich specifická funkce ve skořápce. U jiných, hojněji zastoupených proteinů matrix, naopak existují studie, které jejich vlastnosti a funkci dobře mapují.

Tyto proteiny můžeme dále rozčlenit do tří skupin podle jejich primárního umístění ve skořápce (Mann et al., 2006; Rose a Hincke, 2009):

- 1) proteiny a glykoproteiny bílku, které jsou také přítomny ve skořápce (ovalbumin, lysozym a ovotransferrin),

2) všudypřítomné proteiny, které se nacházejí v mnoha tkáních (osteopontin, klusterin, sérový albumin, keratiny, kolageny a hemoglobin)

3) proteiny specifické pro skořápkovou matrix, tj. proteiny unikátní pro proces kalcifikace skořáčky, které jsou vylučovány buňkami ve specifických oblastech vejcovodu (ovokalyxiny a ovokleidiny).

Mezi proteiny s prokázanou antimikrobiální aktivitou patří zejména nejhojnější bílkový protein ovoalbumin, který zaujímá až 54% celkového množství proteinů v bílku (Hincke et al, 1995) a byl také nalezen ve vnitřní mamilární vrstvě skořáčky (Mikšík et al., 2010). Neméně důležitými antimikrobiálními proteiny jsou ovotransferin a lysozym (viz 1.1.1 a 1.1.2). Protein OVAX (protein X spojený s ovoalbuminem) se vyskytuje v bílku přibližně v množství 2,4 mg/ml v průměru a podobně jako ovalbumin vykazuje antimikrobiální aktivitu (Rehault-Godbert et al., 2013). Antimikrobiální obranu na úrovni skořáčky zajišťují též specifické skořápkové proteiny ovokalyxiny a ovokleidiny. Jedním z možných kandidátů pro antimikrobiální činnost v extraktech ptačí skořáčky je OCX-32 (Wellman-Labadie et al., 2008b). Rekombinantní OCX-32 slepice inhibuje růst *Bacillus subtilis* a má inhibiční karboxypeptidázovou aktivitu (Xing et al., 2007). Další zástupce ovokalyxinů OCX-36 se zdá být homologní k lipopolysacharid - vázajícím proteinům, tj. proteinům zvyšujícím baktericidní permeabilitu, stejně jako k proteinům rodiny Plunc. Gautron et al. (2007) navrhli, že by se mohl podílet na antimikrobiální obraně uvnitř kuřecí skořáčky.

Ner rozpustné složky matrix zůstávají stále málo prozkoumanou skupinou. Mikšík et al. (2010) identifikovali postupnou dekalifikaci skořáčky roztokem EDTA odlišné proteinové profily v kutikule, palisádové a mamilární vrstvě skořáčky. Nalezli celkem 28 proteinů nerozpustných v EDTA. Mezi nimi i klíčové složky matrix jmenované výše (OCX - 32, OCX - 36, OC - 17 a 116, klusterin a ovalbumin, ovotransferin, lysozym).

Jedním z nejhojnějších nerozpustných proteinů skořápkové matrix je „Kunitz-like protease inhibitor“. Tento protein s peptidázovou inhibiční aktivitou je přítomný ve všech vrstvách skořáčky. Ukazuje se, že má též antimikrobiální funkci. Je pravděpodobné, že odpovídá dříve popsanému ovokalyxinu - 25 (OCX - 25) (Gautron et al., 2007).

1.1.1 Lysozym

Lysozym je selektivní, ale efektivní antimikrobiální protein s hydrolytickou aktivitou proti peptidoglykanům na buněčné stěně gram-pozitivních bakterií (např. *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*) (Hincke et al., 2000; Ibrahim et al., 1991; Wellman-Labadie et al., 2008a; Callewaert a Michiels, 2010), kde štěpí S vazbu mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-glukosaminem. V menší míře působí také proti gram-negativním bakteriím. Patří mezi nejhojněji zastoupené proteiny v živočišné říši. Poprvé byl objeven zcela náhodou Alexandrem Flemingem v roce 1922. Mimo jiné se nachází v mléce, slinách, slzách a krevní plazmě. Tvoří také 1 - 4% proteinové složky bílku v závislosti na druhu (Smolelis a Hartsell, 1951). Podle ptačích řádů, pro které jsou typické, rozlišujeme dva typy lysozymu v bílku – lysozym c (chicken) a lysozym g (goose). Lysozym typu c se však nevyskytuje pouze u zástupců řádu hrabavých (Galliformes), můžeme ho také nalézt samotný či spolu s lysozymem typu g v bílcích vrubozobých (Anseriformes) (Wellman-Labadie et al., 2008a). Oba lysozymy se navzájem liší v sekvencích, ale podobají se v terciální struktuře. Jejich antimikrobiální aktivita se odvíjí od pH (Callewaert a Michiels, 2010). Spolu s ovotransferinem se lysozym vyskytuje v podskořápečných blánách a modifikuje růst krystalů (Gautron et al., 2001). Lysozym typu c byl zjištěn v proteinových extraktech z vnějších vrstev skořápky a kutikuly slepičích, kachních a husích vajec (Wellman-Labadie et al., 2008b). Bylo prokázáno, že proteázová a glykolytická aktivita bakterií rodu *Bacillus spp.* i hub může rozložit kutikulu skořápky a tím usnadnit všeobecnou mikrobiální invazi prostřednictvím radikálně zvýšeného počtu otevřených pórů (Cook et al., 2003). Lysozym, zastoupený v proteinové části kutikuly, může tedy být jedním z činitelů, kteří mohou redukovat bakteriální zátěž skořápky likvidací pionýrských mikroorganismů, jež narušují kutikulu, tím pomáhá zachovat strukturální integritu povrchu vajec. V konečném důsledku brání vnikání dalších, již k lysozymu necitlivých mikroorganismů, které by se mohly množit po dosažení bílku. Lysozym typu c uvnitř vaječné kutikuly a vnější skořápky může tedy potenciálně snížit kontaminaci vaječného obsahu houbami a bakteriemi (Wellman - Labadie et al., 2008b). Jeho význam pro obranu ptačího vejce se jeví být klíčový v souvislosti se skutečností, že gram-pozitivní bakterie jsou primárními patogeny a původci infekcí, jež u většiny druhů ptáků způsobují mortalitu embrya (Deeming, 2002; Bruce a Drysdale, 1994).

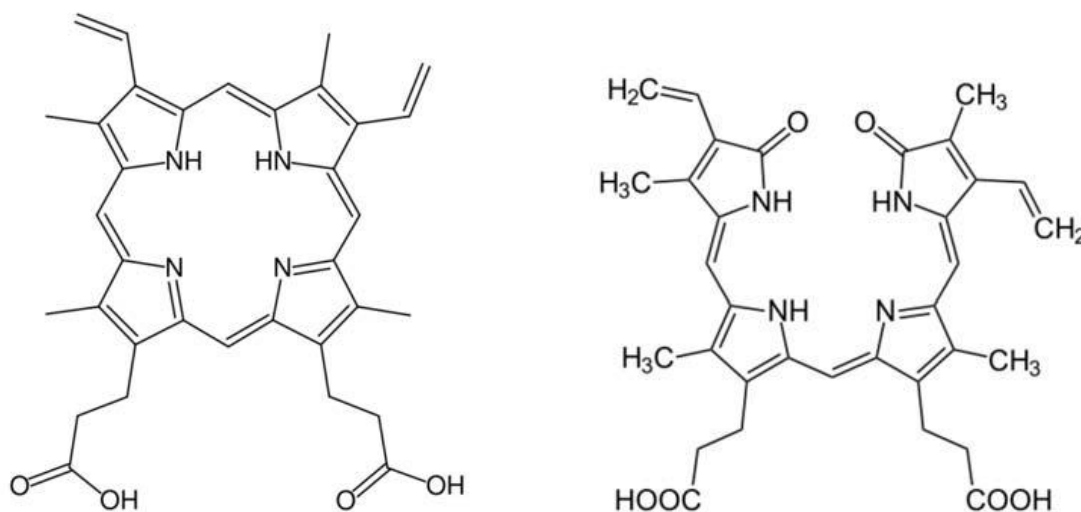
1.1.2 Ovotransferin

Ovotransferin je jednořetězcový glykoprotein bohatý na disulfidické vazby (15 vazeb) s molekulovou hmotností 78 kDa, tvořený 686 aminokyselinami. Představuje 13% z celkového množství proteinů bílku (Guerin-Dubiard et al., 2005). Vyskytuje se hlouběji v skořápkové matrix. Ve vysoké koncentraci se nachází zvláště v podskořápečných blánách. V poslední době byl rovněž identifikován v kutikulární vrstvě, avšak jeho koncentrace zde jsou dosud neznámy (Mikšík et al., 2014). Ovotransferin je členem rodiny transferinů, které mají vysokou schopnost vázat dva Fe^{3+} ionty a mohou být transportovány do bílku přes vejcovod slepice (Giansanti et al., 2012). Jeho hladina v děložní tekutině je zvýšená v počáteční fázi mineralizace skořáčky. V testech *in vitro* ovotransferin modifikoval morfologii krystalů kalcitu. Může tedy hrát roli při kontrole tvorby uhličitanu vápenatého. Z mnoha studií vyplývá, že ovotransferin a jeho hydrolyzáty mají rozvinutou antimikrobiální, antivirovou a antioxidační aktivitu. Ovotransferin izoluje železo nutné pro bakteriální růst (Gautron et al., 2001). Kromě tohoto bakteriostatického účinku (tj. inhibici růstu díky chelaci železa) byl pozorován i silný baktericidní účinek (tj. snížení bakteriální populace vyvoláním buněčné smrti) u bakterií skupiny *Bacillus cereus* (Baron et al., 2014). Prokázalo se, že ovotransferrin mění elektrochemický potenciál cytoplazmatické membrány. Je tedy možné, že ovotransferinem zprostředkovaný mechanismus poškození cytoplazmatické membrány může být zapojen do lýze bakterií skupiny *B. cereus* inkubovaných v bílku (Baron et al., 2014). Giansanti et al. (2012) našli zvýšené koncentrace ovotransferinu v séru kuřat infikovaných patogeny, nebo ošetřených zánětlivými faktory. Ovotransferin koncentrovaný v tenké vrstvě nebo ve specifických zónách (např. v okolí pórů) skořáčky by mohl přispět k antimikrobiální obraně (Wellman-Labadie et al., 2008b).

1.2 Pigmenty

Za celou pestrou paletu barev a vzorů ptačí skořáčky mohou zejména tři pigmenty - protoporfyrin IX, biliverdin IXa a zinkový chelát biliverdinu (Mikšík et al., 1996). Zatímco biliverdin s protoporfyrinem byly identifikovány jako klíčové pigmenty ptačí skořáčky před více než sto lety, funkce posledního z této trojice byla odhalena

relativně nedávno a zůstává do jisté míry stále nepotvrzena. Gorchein et al. (2009) ve své studii zpochybňují podíl zinkových komplexů protoporfyrinu či biliverdinu na zbarvení skořápky, považují je za pouhé artefakty analytických postupů. Tyto tetrapyrolové sloučeniny jsou odvozeny z metabolické dráhy hemu, cirkulují v krvi a jsou metabolizovány v děloze (Wang et al., 2009). Zvýšení hladiny jednoho předvídá snížení hladiny druhého z nich, protože jsou odvozeny ze stejného prekurzoru. Předpokládá se, že protoporfyrin IX je též prekurzorem biliverdinu (Cassey et al., 2012).



Obr. 2: Tetrapyrolové struktury protoporfyrinu IX a biliverdinu. Převzato od Sparks (2011).

Výsledná skvrnitost skořápky pak závisí na množství a přesné lokalizaci deponovaných pigmentů ve skořápce. Převládá názor, že výrazné skvrnky na skořápce jsou způsobeny sekrecí pigmentu do kutikulární vrstvy, zatímco větší fleky a pruhy jsou výsledkem deponace velkého množství pigmentu během závěrečných fází tvorby skořápky, pravděpodobně v důsledku rotace vejce (Sparks, 2011).

Výrazná mezidruhová i vnitrodruhová variabilita ve zbarvení a ornamentaci ptačí skořápky poutá pozornost vědců již staletí. Za tu dobu byla vytvořena celá řada adaptivních hypotéz, které se snaží tento fenomén ptačí skořápky vysvětlit. Nejstarší z nich pochází z 19. století, kdy Wallace (1890) vyslovil předpoklad, že zbarvení skořápky má kryptickou funkci. I v dnešní době se zdá tato teorie nejpravděpodobnější spolu s hnízdním parazitismem (Kilner, 2006). Mezi další hojně diskutovaná vysvětlení

variability ve zbarvení a vzorování ptačí skořápky patří aposematismus, mimeze, termoregulace, rozpoznání vajec, sexuální konflikt, konstrukční vyztužení a signalizace (Kilner, 2006). Avšak práce z posledních let poukazují na fakt, že rozdílná distribuce pigmentů by mohla odrážet odlišnou míru bakteriální zátěže, které jsou snůšky ptáků vystaveny (Polačiková et al., 2009).

1.2.1 Biliverdin

Biliverdin a jeho zinkový chelát vytvářejí modré a modrozelené odstíny skořápek (Mikšík et al., 1996). Biliverdin je účinný antioxidant. Jeho depozice může tedy signalizovat antioxidační kapacitu (Moreno a Osorno, 2003). Modrozelené zbarvení by mohlo být sexuálně selektované jako signál samcům o genetické kvalitě samice. Existuje celá řada důkazů o spojení kvality samice s intenzitou modrozeleného zbarvení (Jagannath et al., 2008), avšak chybí důkazy o tom, jaká na základě toho dělají samci reprodukční rozhodnutí. Lahti (2008) navrhl, že modrozelená pigmentace poskytuje ochranu embryu před slunečním zářením. Účinně absorbuje záření v oblasti UV (Shafey, 2004), které je smrtelné pro většinu hub a bakterií. Vykazuje silné antibakteriální účinky. Existují domněnky, že biliverdin také odráží míru hnízdního parazitismu (Polačiková et al., 2009). Vysoké koncentrace biliverdinu ve skořápce jsou spojeny s druhy hnízdícími v otevřeném prostoru a s biparentální péčí o potomstvo. Je možné, že koncentrace biliverdinu pozitivně ovlivňuje délku a načasování reprodukce, odráží se v intenzitě rodičovské péče.

1.2.2 Protoporfyrin

Protoporfyrin IX je nejhojnějším skořápkovým pigmentem. Donedávna převládal názor, že většina protoporfyrinu (70%) je přítomna v kutikule, zhruba 27% se pak nachází v nejsvrchnější části palisádové vrstvy (Mikšík et al., 2007). Samiullah a Roberts však v roce 2013 přišli s nečekaným zjištěním, že u slepic s hnědě zbarvenými vejci je protoporfyrin především deponován do kalcifikované skořápky (80 – 87%), kutikula obsahuje pouze 13 – 20% tohoto pigmentu. Protoporfyrin produkuje červené, hnědé a černé zbarvení skořápky (Mikšík et al., 1996; Gorchein et al, 2009). Zodpovídá

nejen za sytost barvy pozadí, ale i za tvorbu skvrn (Duval et al., 2013). Téměř zcela chybí v bílých vaječných skořápkách. Podobně jako biliverdin je odvozen z metabolické dráhy hemu u ptáků (Frankenberg et al., 2003; Wang et al., 2009). Ačkoliv syntetická dráha protoporfyrinu je dobře známa, o přesném místě syntézy se stále vedou debaty (Sparks, 2011). Nicméně přibývá důkazů, že k syntéze dochází v děloze, konkrétně v části zvané „shell gland“, která produkuje skořápku (Wang et al., 2013). Protoporfyrin má pro-oxidační vlastnosti, tzn. indukuje oxidativní stres (Martínez de la Puente et al., 2007). Jeho koncentrace ve skořápce a kutikule jsou vysoké především u druhů hnízdicích v dutinách či na zemi (Cassey et al., 2012).

Vedle poskytování kamufláže (Jagannath et al., 2008) hnědé protoporfyrinové skvrny mohou zesílit skořápku. Gosler et al. (2005) ukázali, že počet skvrn na vejcích sýkory koňadry negativně koreluje s tloušťkou skořápky. Tmavší protoporfyrinové skvrny byly lokalizovány na tenčích a více propustných (tj. pórovitých) částech skořápky. Některé studie rovněž prokázaly, že skvrnitost skořápky odráží dostupnost vápníku, kdy s klesající hladinou vápníku se zvyšuje skvrnitost ptačích vajec (Gosler et al., 2005). Skvrnění vajec tedy může omezit propustnost skořápky, ovlivnit tak rychlost odparu vody z vejce během inkubace (Higham a Gosler, 2006). Pravděpodobně umožňuje vedení plynů přes matrix skořápky (Cassey et al., 2012). Složitý systém skvrn může sloužit sekundárně jako unikátní podpis vlastních vajec, nástroj pro jejich rozpoznání, a tedy jako obrana proti vnitro i mezidruhovému hnízdnímu parazitismu (Avilés et al., 2006). Protoporfyrin podobně jako biliverdin absorbuje UV záření, hraje roli v eliminaci mikrobiální infekce. Protoporfyriny jsou využívány v medicíně jako fotosenzitizery. V poslední době Ishikawa et al. (2010) prokázali v laboratoři a pod viditelným světlem, že bakteriální růst byl nižší v přítomnosti hnědé a zelené skořápky v porovnání s bílými skořápkami. Tyto výsledky ukazují na možnost, že pigmenty deponované ptačími samicemi do vaječné skořápky se mohly, mimo jiné, vyvinout v přírodě jako obranný systém proti mikrobiálním patogenům (Ishikawa et al., 2010). V důsledku toho, pigmentace skořápky může být rovněž považována za adaptivní mateřskou strategii, jejímž cílem je zabránit vystavení potomků patogenům ovlivňujícím jejich fenotyp jak během raného vývoje, tak i v postnatální fázi (Javůrková et al., 2014). Na druhou stranu nová studie Fargallo et al. (2014), provedená na poštolce obecné (*Falco tinnunculus*), neprokázala negativní efekt vlivu snížení pigmentů

skořápky na líhnutí vejce, úmrtnost mláďat během hnízdního období, tělesnou kondici mláďat, či na lokální imunitní odpověď mláďat na antigen PHA (phytohaemagglutinin).

1.3 Faktory ovlivňující deponaci proteinů a pigmentů

Deponace lysozymu do bílku je vnímána jako významný maternální efekt. Předpokládá se, že samice může zvýšenou sekrecí lysozymu do bílku navýšit antimikrobiální potenciál vejce, tzn. jeho obranyschopnost proti patogenům, a tím zlepšit životaschopnost vajec a přežívání potomků. Saino et al. (2002) ve studii na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*) prokázali, že první vejce ve snůšce obsahovalo více lysozymu než vejce poslední, které bývá vystaveno vlivům okolí, mikroorganismům nejkratší dobu. Roli v deponaci tohoto proteinu do bílku může hrát také atraktivita partnera. U sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) byla zaznamenána vyšší koncentrace lysozymu v bílku vajec produkovaných po spáření s atraktivnějším samcem (D'Alba et al., 2010). Zdá se, že koncentrace lysozymu v bílku se může měnit i v závislosti na pohlaví embrya (Bonisoli-Alquati, 2010). Koncentrace ovotransferinu je pak spíše ovlivněna fylogenezí. Při porovnání antibakteriální aktivity bílku u kura (*Gallus gallus*), krocana (*Meleagris gallopavo*), kachny (*Anas platyrhynchos*) a husy (*Anser anser*) byly naměřeny vyšší koncentrace ovotransferinu v bílku vajec zástupců hrabavých (Galliformes) než u vrubozobých (Anseriformes) (Wellman-Labadie et al., 2008a). Obdobné výsledky měření zaznamenal i Miguel (2005) u bažanta (*Phasianus colchicus*), kura (*Gallus gallus*) a křepelky (*Coturnix coturnix*) ve srovnání s kachnou (*Anas platyrhynchos*). Studie provedené na pěvcích (Passeriformes) ukazují značnou mezidruhovou variabilitu v množství ovotransferinu ve vaječném bílku (Shawkey et al., 2008). O faktorech ovlivňujících deponaci antimikrobiálních proteinů do skořápky se toho mnoho zatím neví. Wellman-Labadie et al. (2008b) našli proteiny kutikulární vrstvy skořápky s podobnou antimikrobiální aktivitou ve vejcích druhů lišících se fylogenezí, které byly vystaveny podobným enviromentálním tlakům.

Variabilita ve zbarvení skořápky souvisí s různým poměrem zastoupení obou pigmentů. Wang et al. (2009) prokázali, že modrá a hnědá vejce se navzájem liší poměrem protoporfyrinu a biliverdinu ve skořápce, což vyplývá ze skutečnosti, že jsou

odvozeny ze stejného výchozího materiálu (viz 1.2). Jednotlivé pigmenty jsou pod nezávislou genetickou kontrolou. Odstín skořápky závisí na různých úrovních genové exprese sedmi genů, kódujících klíčové enzymy biosyntetické dráhy hemu, uvnitř tkání produkujících vejce (Zheng et al., 2014). Intenzita tmavých (červených, hnědých, černých) skvrn, způsobených protoporfyrinovými pigmenty, je pak ještě regulována dalšími specifickými geny samice (Gosler, Barnett a Reynolds, 2000). Genetické mechanismy kontrolující skvrnitost mohou být mezidruhově variabilní (Mahler et al., 2008). Nicméně na deponaci pigmentů do skořápky se podílejí také epigenetické faktory prostředí (Avilés et al., 2007). Například bylo dokumentováno, že ve zvláště vlhkých hnízdních habitatech, kde je vyšší riziko mikrobiální infekce, ptáci ukládají do skořápek více protoporfyrinu (Cassey et al., 2012). Stejně tak dutinová ptáci, přestože mají tendenci klást bílá vejce (Hewiston, 1846), jejichž UV reflektance je vyšší, než ta u druhů hnízdicích v otevřených habitatech (Avilés et al., 2006), mají ve svých skořápkách a kutikulách vyšší koncentrace protoporfyrinu než biliverdinu. Podobně ptáci tropů, kde je sice zvýšená intenzita UV záření, ale také větší bakteriální zátěž, ukládají více protoporfyrinu než ptáci mírného pásma (Feister et al. 2002). Jak již bylo zmíněno výše, intenzita hnědých skvrn se také liší mezi lokalitami podle dostupnosti vápníku potřebného k produkci skořápky. Při nedostatku antioxidantů v potravě samice japonských křepelek (*Coturnix coturnix japonica*) snížily svou hmotnost, ale nezměnily kvalitu snesených vajec. Studie ukázala, že došlo k trade-off mezi kvalitou vejce a kondicí samic, tedy ke zvýšení investic do protoporfyrinu a snížení množství uloženého biliverdinu do skořápek bez viditelné změny ve zbarvení skořápky. Snížení tělesné kondice samice mohlo být spojeno s poklesem antioxidační kapacity, resp. zvýšením oxidačního stresu, spojeného s investicemi do pigmentace skořápky. Jinými slovy, vyšší deponace protoporfyrinu do skořápky byla cestou k odstranění tohoto pro-oxidantu z těla samice (Duval et al., 2013). V neposlední řadě, vlivy okolního prostředí, ve kterém se samice nachází, jsou překládány do řeči hormonů a fyziologických procesů, hladina deponovaných pigmentů může být tedy ovlivněna skrze prostředí také hormonálně.

1.3.1 Role steroidních hormonů při deponaci antimikrobiálních složek do bílku a kutikuly

Přestože hormonální podstata pigmentace nebyla dosud zevrubně studována, existuje studie prokazující, že proces ukládání pigmentů do skořápky je regulován primárně steroidním hormonem progesteronem (Soh a Koga, 1997). Tento pohlavní hormon také reguluje syntézu calbindinu, proteinu, který váže Ca^{2+} během formování skořápky. Jak již bylo zmíněno, nedostatek vápníku způsobuje zeslabení skořápky, které je kompenzováno zvýšenou deponací protoporfyrinu do kutikuly a vnější vrstvy palisád (Gosler et al., 2011). Za změny v intenzitě a způsobu pigmentace může tedy dostupnost vápníku během kladení vajec. Avšak ve skutečnosti to není nedostatek vápníku, ale právě koncentrace progesteronu, která ovlivňuje pigmentaci vejce. Zvýšená koncentrace progesteronu v plazmě samice snižuje transport Ca^{2+} do žlázy sekretující pigmenty a snižuje dostupnost Ca^{2+} během formování skořápky, ale naopak zvyšuje deponaci protoporfyrinu.

Na rozdíl od savců, ptáci nemají v krvi speciální globuliny, které by vážaly pohlavní steroidy (Deviche et al., 2001). Proto jejich plazmové globuliny vážající kortikosteroidy (CBGs) vyvazují glukokortikoidy, stejně jako androgeny. Avšak bylo pozorováno, že mají vyšší nebo stejnou afinitu ke kortikosteronu a progesteronu. Vzhledem k tomu jen velmi malé množství hormonů zůstává nevázané, nebo jen slabě vázané (Malish a Breuner, 2010). Nicméně, pouze volné hormony mohou být fyziologicky aktivní (Hammond, 1995; Andersen, 2002). Soupeření kortikosteronu a progesteronu o volná vazebná místa na CBGs pak může hrát roli v deponaci pigmentů, kdy fyziologickým stresem vyvolané zvýšení hladiny kortikosteronu v plazmě vytěsňuje navázaný progesteron na CBGs. Volný progesteron pak výše popsaným mechanismem vyvolává hromadění pigmentů, vede k intenzivnější pigmentaci skořápky.

Podobně jako pigmenty i proteiny jsou deponovány na základě hormonálního vyladění samice. Experimentální studie ukázaly, že glukokortikoidy kortizol a kortikosteron modulují množství proteinů v bílku (Kim a Choi, 2014). Dean et al. (1996) zjistili, že glukokortikoidy zvyšují expresi mRNA v buňkách syntetizujících významný bílkový protein ovoalbumin v magnu slepičího vejcovodu. Obdobně reaguje na podání glukokortikoidů i ovotransferin (Le Bouc et al., 1985). Nicméně Le Bouc

et al. již v roce 1985 prokázali, že efekt glukokortikoidů závisí na jejich dodaném množství. V jejich studii byla exprese genu pro ovoalbumin a ovotransferin a syntéza proteinů v magnu zvýšena u kuřat, kterým byly podávány glukokortikoidy v množství 2 mg/mládě v 6 hodinových intervalech, ale poklesla u nich při ošetření dávkou 10 mg glukokortikoidů. Naopak ve studii Kim a Choi (2014) bylo zastoupení proteinu OVAX významně zvýšeno v bílku slepic, kterým byl podáván kortikosteron společně se stravou v dávce 30 mg/kg stravy, zatímco exprese ovoalbuminu a OVAY proteinu zůstala nezměněna jak u stresované, tak i kontrolní skupiny. Ovotransferin pak byl významně zvýšen v magnu a mírně zvýšen i v bílku, nicméně exprese jeho genu v magnu byla významně snížena, což naznačuje, že exprese ovotransferinu je závislá na použité koncentraci kortikosteronu (Kim a Choi, 2014).

Syntéza a sekrece ovoalbuminu jsou také řízeny estrogenem (Dougherty a Sanders, 2005). Manipulace kortikosteronem snižuje rovněž plazmatickou koncentraci estrogeneru (Henriksen et al., 2011) a expresi ovoalbuminu (Dean et al., 1996; Le Bouc et al., 1985). Obdobně stres (např. pelichání, termální či environmentální stres) může také snížit plazmatickou koncentraci estrogeneru (Berry, 2003) a snížit tak expresi proteinu ovoalbuminu a jeho deponaci do různých struktur vejce (Ahmed et al., 2005). Zdá se tedy, že exprese genů pro různé bílkové a skořápkové proteiny je regulována glukokortikoidy rozdílně v závislosti na typu proteinů, koncentraci hormonů a závažnosti stresu.

2. Hypotézy a cíle práce

Jelikož primární, vizuálně signální funkce pigmentace ptačích vajec začíná být v nejrecentnějších studiích zpochybnována (např. Hanley et al. 2015), dostávají se do popředí hypotézy o mechanické a antimikrobiální funkci pigmentace ptačího vejce. Na základě těchto hypotéz si tato práce kladla za cíl objasnit, zda existují korelační vztahy či trade-off mezi deponací vybraných antimikrobiálních složek (proteinů a pigmentů) do jednotlivých struktur ptačího vejce a stanovit, jak se na těchto procesech podílejí hormonálně regulační mechanismy, které jsou ve smyslu sekrece antimikrobiálních složek do vejce studovány velmi okrajově. Konkrétně si práce kladla za cíl:

- porovnat koncentrace vybraných antimikrobiálních proteinů v bílku - lysozymu a ovotransferinu, u vajec s různě barevnou skořápkou a stanovit, jakou míru variability vysvětlují fyziologické a genetické faktory
- stanovit, zda existuje vztah mezi koncentracemi pigmentů v kutikulární vrstvě skořápky a koncentracemi antimikrobiálních proteinů - lysozymu a ovotransferinu v bílku vejce
- stanovit, jak steroidní hormony ovlivňují intenzitu deponace pigmentů do kutikulární vrstvy skořápky a antimikrobiálních proteinů do bílku

Na základě prokázané antimikrobiální funkce pigmentu protoporfyrinu a biliverdinu jsme předpokládali, že vejce s nízkými koncentracemi pigmentů v kutikule, tedy vejce s bílou a světlou skořápkou, budou mít vyšší obsah antimikrobiálních proteinů v bílku v porovnání s vejci hnědými či tmavě hnědými, tedy vejci s vysokými koncentracemi pigmentů v kutikule.

Jelikož s navrhovanou antimikrobiální funkcí pigmentace skořápky lze očekávat i vysoký stupeň plasticity v deponaci antimikrobiálních složek do různých struktur vejce, předpokládali jsme silný vztah mezi hormonálním statutem samice v době tvorby vejce a deponací studovaných antimikrobiálních látek do kutikulární vrstvy skořápky a bílku.

3. Metodika

3.1 Modelový druh – kur domácí (*Gallus gallus domesticus*)

Jako modelový druh pro studium vzájemných interakcí jednotlivých antimikrobiálních složek v ptačím vejci byl vybrán kur domácí (*Gallus gallus domesticus*). Tento domestikovaný potomek divokého kura bankivského (*Gallus gallus*) je díky intenzivnímu chovu nejpočetnějším ptačím druhem. Ačkoliv bývá chován hlavně kvůli gastronomickým účelům (maso a vejce), neméně významným impulsem k šlechtění byla i krása jeho peří či bojovná povaha jeho předka. Postupně bylo vyšlechtěno několik set plemen (Verhoef-Verhallen a Rijs, 2013). Díky své oblibě u chovatelů, kteří předvádí nejhezčí exempláře splňující náročné parametry na soutěžních výstavách, a zvláště péči svazů odborných chovatelů, které zabezpečují plemenitbu zvířat, ochranu genofondu a zvyšování úrovně plemen, nabízí tento druh rozmanitou a přesto standardizovanou škálu morfometrických, fyziologických znaků. Mezi takové znaky patří i zbarvení vejce.

Na základě rozdílného zbarvení skořápky bylo vybráno 24 plemen, od kterých bylo během let 2012 až 2015 sesbíráno celkem 408 vajec, tj. přibližně 17 vajec/plemeno. Postupně došlo z praktických důvodů k rozdělení plemen do 5 barevných skupin. Vzorky konkrétního plemene pochází většinou od 2 - 3 chovatelů. Výjimku tvoří plemeno jokohama a brabantka, jež jsou v České republice chovány velmi vzácně, proto jsou reprezentovány vejci pouze od 1 chovatele.

Tabulka 1: Rozdělení plemen podle barvy skořápky

Plemena, která nejsou zastoupena dostatečným počtem vzorků, zvýrazněna šedě.

barevná kategorie	počet plemen	vybraná plemena	počet vajec na plemeno
bílá	7	brabantka, bantamka, minorika, holanďanka, paduánka, japonka čabo, jokohamka	cca 17
krémová	7	holokrčka, sebritka, rousná zakrslá, hedvábnička, češka, fénixka, kočinka	cca 18
hnědá	7	amrokska, plymutka, australka, hempširka, vyandotka, bojovnice šamo, bojovnice ko šamo	cca 20
tmavě hnědá	2	maranska, bameveldka	cca 21
modrá	1	araukana	cca 20

3.2 Sběr a příprava materiálu

Čerstvá (max. 6 dní stará) vejce byla nejprve v laboratoři změřena digitální šuplerou (šířka, délka). V případě silného znečištění vejce trusem či stelivem byl tento nános mechanicky opatrně odstraněn, avšak vejce nebyla nijak omývána ani otírána, aby nedošlo k poškození kutikuly na jejím povrchu. Následně byla vejce přenesena do plastických, uzavíratelných sáčků (80 x 120 mm) s 40 ml roztoku 5 % EDTA a 10 mM Mercaptoethanol. Roztok byl připraven smícháním 1000 ml ddH₂O s 50 g EDTA a 17 g NaOH, postupně přisypávanými za stálého míchání na magnetické míchačce. Po vypufrování na pH 7,4 přidáváním NaOH či CH₃COOH bylo do roztoku v digestoři napipetováno 780 μ l Mercaptoethanolu. Vše bylo dobře promícháno. Po hodině luhování byl vždy tento roztok slit do šroubovacích zkumavek (50 ml), z každého vejce byla s použitím skalpelu a stříčky s ddH₂O seškrabána kutikula na Petriho misku, odkud byla poté přenesena do 1 – 4 eppendorfek (1,5 – 2 ml), v některých případech i do šroubovacích mikrozkušavek (1 ml) dle získaného množství. Vejce byla důkladně omyta vodou a osušena, aby nedošlo při jejich rozklepnutí k případné kontaminaci bílky zbytky roztoku EDTA/Mercaptoethanol. Následovalo oddělení bílky od žloutku nad Petriho miskou. Po odebrání bílků do šroubovacích zkumavek (50 ml) a uložení skořápek do papírových obálek byly vzorky umístěny do mrazáků – roztoky kutikul a bílky do - 20 °C, kutikuly do - 80 °C.

Před samotnými analýzami byly takto uchovávané bílky rozmrazeny (3 – 4 h), důkladně zvortexovány a poté z nich bylo odebráno pipetou se špičkou na vazké tekutiny 4 x 200 μ l do 4 eppendorfek (1,5 – 2 ml). Všechny bílky byly pak opět uloženy do - 20 °C. Obdobně jako u bílků byly i roztoky kutikul nejprve rozmrazeny (2 – 3 h). Následně byl změřen jejich přesný objem v odměrném válci (50 ml) a odděleno 4 x 200 μ l do 4 eppendorfek (1,5 ml) pro samotné analýzy. Vše bylo znovu zamrazeno. Pro experimenty byly použity, znovu rozmrazeny pouze vzorky v eppendorfkách; bílky a roztoky kutikul v 50 ml šroubovacích zkumavkách sloužily jako zásobní.

3.3 Analýza koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku

Před vlastní analýzou koncentrace proteinů ve vzorcích bílku bylo nutné ověřit, zda během zpracování vajec (luhování) nedošlo k průniku roztoku EDTA/Mercaptoethanol póry ve skořápce do bílku. Důležitým bodem bylo zjistit, jak přítomná EDTA a Mercaptoethanol ovlivňují detekci obou sledovaných proteinů zvolenými metodami - metodou radiální difúze (pro lysozym) a kolorimetrickou metodou (pro ovotransferin).

3.3.1 Určení inhibiční konstanty EDTA/Mercaptoethanolu pro lysozym a ovotransferin

V případě lysozymu byl nejdříve připraven Britton - Robinsonův pufr. Na analytických vahách bylo postupně naváženo 1,476 g H_3BO_3 , 2,346 g H_3PO_4 a 1,440 g CH_3COOH , které byly rozmíchány v 915 ml dH_2O . Nakonec bylo do roztoku přisypáno 2,520 g NaOH. Poté bylo přidáním CH_3COOH či NaOH upraveno pH roztoku na 7,0. Do 600 ml tohoto pufru bylo dáno 6 g agaru. Co nejlépe rozmíchaný agar byl povařen v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění (4 - 6 min). Po zchlazení agaru na 60 - 70 °C bylo přidáno ještě 300 mg lyofilizovaných buněk bakterie *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma – Aldrich) rozpuštěných v malém množství Britton – Robinsonova pufru. Takto připravený agar byl po důkladném promíchání nalit do Petriho misek. Po zatuhnutí agaru bylo do každé misky vysekáno pomocí trubičky (biopsy punch) 12 jamek. Poté byly připraveny 2 sady standardů, které se od sebe lišily pouze použitým mediem. Pro každou sadu bylo do 6 jednotlivých eppendorfek naváženo 0,02, 0,015, 0,007, 0,004, 0,002 a 0,0005 g krystalického lysozymu (hen egg – white lysozyme, Sigma - Aldrich) a přidáno buď 1 ml Britton – Robinsonova pufru (1. sada), nebo 1 ml roztoku EDTA/Mercaptoethanol (2. sada). Standardy byly dobře zvortexovány, následně pipetou s filtrem nanесeny v objemu 10 μ l/jamka do 20 připravených Petriho misek. Po 23 h inkubace při pokojové teplotě byly misky naskenovány a následně v programu ImageJ (freeware) změřeny nejdelší horizontální a vertikální úsečky vytvořených lyzačních zón sloužící k výpočtu jejich obsahu. Z naměřených hodnot pak byla spočítána inhibiční konstanta roztoku EDTA/Mercaptoethanol pro lysozym.

Prvním krokem testování kolorimetrické metody pro stanovení inhibiční konstanty roztoku EDTA/Mercaptoethanol na ovotransferin byla příprava 3 roztoků. Roztok 1 byl namíchán navážením 7,3 g Tris, 6,4 g Na₂CO₃ a 0,84 g Triton – X rozpuštěných v 200 ml ddH₂O. Do 150 ml tohoto roztoku bylo ještě přidáno 600 µl Iron standard solution. Zbýlých 50 ml roztoku 1 (bez Iron standard solution) bylo použito k ředění standardů. Roztok 2 byl připraven rozpuštěním 0,49 g Ferrozinu, 0,6 g Tris a 0,574 g L – kyseliny askorbové v 100 ml ddH₂O. Roztok 3 vznikl přidáním 25,2 g kyseliny citronové a 0,38 g Thiourea do 200 ml ddH₂O. Při zjišťování inhibiční konstanty roztoku EDTA/Mercaptoethanol, jeho vlivu na reálnou koncentraci ovotransferinu v bílku se vycházelo z 2 typů standardů rozpuštěných v různých pufrch. První standard (standard A) byl připraven rozpuštěním 40 mg čistého ovotransferinu (conalbumin, Sigma – Aldrich) v 1 ml roztoku 1 – bez Iron standard solution. Druhý standard (standard B) byl namíchán obdobně – k 40 mg ovotransferinu bylo přidáno 1 ml roztoku EDTA/Mercaptoethanol. Po intenzivním a dlouhém vortexování byly oba roztoky rozpipetovány po 200 µl do 5 eppendorfek (1,5 ml). Všechny eppendorfky byly zamrazeny v – 20 °C, opětovně rozmrazeny těsně před analýzou dle aktuální potřeby. Dále byly připraveny postupným ředěním obou standardů 2 diluční řady každá s 11 roztoky o koncentracích 30, 20, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,15 a 0,1 mg/ml. Přesný postup ředění viz Příloha 1 (Tabulka 2 a 3).

Po nachystání obou ředících řad standardu bylo z každé zkumavky nanášeno 25 µl roztoku každého standardu do jedné jamky ve čtyřech opakováních pod sebe na mikrotitrační destičku (pureGrade™ | BRAND, 96 jamek). Jako první byly do sloupce 1 napipetovány oba standardy. Do dalších sloupců pak byly aplikovány po řadě vzorky ze zkumavek 1 – 11. Konkrétně do jamek 1 – 12 v řádcích A, B, C, D byly umístěny vzorky z 12 zkumavek řady standardu A. Druhá polovina destičky (jamky 1 - 12 řádků E, F, G, H) byla zaplněna vzorky roztoků z 12 zkumavek ředící řady standardu B. Do každé jamky bylo následně přidáno automatickým dávkovačem 120 µl roztoku 1. Táhlým, krouživým pohybem byla destička opatrně, ale důkladně promíchána a zbavena bublin. Poté byla vložena do spektrofotometru (Tecan), kde byla ihned změřena absorbance vzorků při vlnových délkách 570 a 660 nm. Takto získané hodnoty sloužily jako „blank“ pro každou měřenou jamku. Po vyhřátí přístroje na 37 °C byla destička 5 min inkubována. V dalším kroku bylo do každé jamky nanášeno 25 µl roztoku 2. Po důkladném promíchání byla opět inkubována ve spektrofotometru

po dobu 5 min při 37 °C. Po skončení inkubace bylo do všech jamek aplikováno ještě 100 µl roztoku 3. Destička byla už jen krátce promíchána, poté okamžitě proměřena při obou vlnových délkách (570 a 660 nm). Poslední měření absorbance při stejných vlnových délkách proběhlo po 6 minutách inkubace.

Na základě těchto pre-experimentů nebyl ani pro jeden analyzovaný protein zjištěn žádný inhibiční efekt roztoku EDTA/Mercaptoethanol. Mohli jsme tedy vyloučit negativní vliv případného proniknutí roztoku EDTA/Mercaptoethanol při namáčení vejce k získání jeho kutikuly na námi následně studované bílkové proteiny.

3.3.2 Stanovení lysozymu pomocí radiální difúze

Koncentrace lysozymu v bílku byla určena pomocí metody radiální difúze (podrobněji viz 3.2.1). Nejprve byla rozmražena vždy 1 eppendorfka s 200 µl bílku. Po důkladném zvortexování bylo odebráno do nové eppendorfky 20 µl bílku pro analýzu. Tyto vzorky byly následně naředěny Britton – Robinsonovým roztokem v poměru 1:1 (20 µl bílku + 20 µl Britton – Robinson), stočeny na centrifuze (90 s, 5,9 ref) a znovu dobře zvortexovány. Poté byly nanесeny v množství 10 µl/jamka v duplikacích vedle sebe do jamek v agaru s příměsí lyofilizované bakterie *Micrococcus lysodeikticus*, která je obzvláště citlivá na působení lysozymu. Na každou Petriho misku bylo kromě 3 vzorků bílku v duplikacích umístěno také 6 standardů s koncentracemi lysozymu 0,02, 0,015, 0,007, 0,004, 0,002 a 0,0005 g/ml. Během inkubace (23 h) se v okolí jamek vytvořily tzv. lyzační zóny signalizující, že v daném prostoru došlo v důsledku přítomnosti lysozymu k lýze buněk bakterií. Po uplynutí inkubační doby byly misky naskenovány barevně i černobíle a poté změřeny plochy všech lyzačních zón v programu ImageJ. Absolutní koncentrace lysozymu ve vzorku byla vypočítána podle kalibrační křivky standardů sestavené pro každou misku zvlášť.

3.3.3 Stanovení ovotransferinu pomocí kolorimetrické metody

V analýze koncentrace ovotransferinu ve vzorcích bílku pomocí kolorimetrické metody bylo využito schopnosti ovotransferinu vázat železo. Metoda byla založena na principu zjištění maximálního množství železa potřebného k navázání ovotransferinu

ve vzorku ve 3 krocích. Podrobný postup přípravy potřebných roztoků a standardu A viz 3.3.1 a postup ředění přehledně Příloha 1 (Tabulka 4).

Poté bylo z každého vzorku nanášeno 25 μ l/jamka na mikrotitrační destičku, vždy ve 4 opakováních vedle sebe. Do posledních 2 řádků (G, H) bylo u každé destičky aplikováno v duplikacích pod sebou 25 μ l z 12 roztoků ředící řady (standard A - zkumavka 11). Posléze byla destička podrobena opakovanému měření absorbance ve spektrofotometru po aplikaci 3 klíčových roztoků (detaily viz 3.3.1). Koncentrace ovotransferinu ve vzorcích bílku byla spočítána interpolací hodnot absorbance pro standard a vzorky, která odpovídala rozdílu hodnot absorbance při 570 a 660 nm naměřených na začátku a na konci šestiminutové periody.

3.4 Analýza koncentrace antimikrobiálních proteinů v kutikule

Dříve, než se přistoupilo k pre – analýzám kutikul, byly provedeny analýzy roztoků, ve kterých byla vejce luhována pro případ, že během luhování došlo k vyloučení sledovaných proteinů z kutikuly do roztoku.

3.4.1 Pre - analýza roztoků kutikul

Stanovení inhibiční konstanty EDTA/Mercaptoethanolu pro roztoky kutikul bylo provedeno podle stejných protokolů jako v případě bílků. Testování roztoků na přítomnost antimikrobiálních proteinů lysozymu a ovotransferinu proběhlo výše popsány (viz 3.3.1) metodami radiální difúze a kolorimetrické reakce. Koncentrace obou proteinů byly nejprve stanoveny pro zkušební vzorek 21 (pro lysozym), 18 (pro ovotransferin) vzorků. Ukázalo se, že lysozym ani ovotransferin se v roztocích kutikul nevyskytují v detekovatelném množství. Proto byly roztoky kutikul z dalších analýz vynechány.

3.4.2 Pre – analýza kutikul

V rámci pilotní studie bylo nejprve 77 kutikul zlyofilizováno, u 15 z nich byla změřena jejich přesná hmotnost. Poté byl vybrán jeden zkušební vzorek kutikuly, ze kterého byla na analytických vahách odvážena polovina do nové eppendorfky

(1,5 ml). Následně k ní bylo přidáno 1 ml Britton – Robinsonova pufru. Vzorek byl asi 10 min vortexován, avšak pelet zůstal kompaktní. Přistoupilo se tedy k mechanickému rozrušení kutikuly pomocí špičky. Kutikulu se podařilo rozdělit na jednotlivé, nestejně velké cáry, nicméně úplné homogenizace vzorku kutikuly se touto cestou docílit nepovedlo. Z takto připraveného vzorku byla udělána ředící řada. Do 11 eppendorfek bylo dáno 500 µl Britton – Robinsonova pufru. Poté bylo odebráno 500 µl připraveného vzorku a umístěno do 1 eppendorfky s 500 µl Britton – Robinsonova pufru (zkumavka 1). Po důkladném zvortexování bylo z této zkumavky přeneseno 500 µl do jiné eppendorfky s Britton – Robinsonovým roztokem (zkumavka 2). Stejným způsobem bylo připraveno všech 11 zkumavek. Dále se postupovalo stejně jako u analýzy lysozymu v bílku s tím rozdílem, že roztoky z 12 zkumavek (původní vzorek + ředící řada) už dále nebyly ředěny Britton – Robinsonovým puffrem v poměru 1 : 1, ale naneseny rovnou v objemu 10 µl, v duplikacích vedle sebe do jamek v agaru. K vytvoření lyzačních zón však ani v jednom případě nedošlo. Nabízela se 3 možná vysvětlení tohoto jevu: 1. z důvodu nedokonalé homogenizace se nepodařilo do jamky aplikovat dostatečné množství vzorku kutikuly, 2. EDTA pocházející z roztoku, ve kterém byla vejce kvůli oddělení kutikuly luhována, inhibovala natolik působení přítomného lysozymu ve vzorku, že reakce nemohla proběhnout, 3. koncentrace lysozymu ve vzorku byla touto metodou nedetekovatelná. Proto bylo přistoupeno k pozměnění metodiky.

Aby se vyloučil vliv 1 a 2, byl vybrán nový vzorek kutikuly, ze kterého bylo odděleno 5 mg do nové eppendorfky (2 ml). Po přidání 500 µl ddH₂O byla provedena homogenizace pomocí sonikátoru (Hielscher UP50). Na začátku byla kutikula po dobu 10 min vystavena dlouhým pulzům při amplitudě 80 %. Poté byla amplituda navýšena na 100 %. Homogenizace pokračovala přerušovaně v desetiminutových intervalech. Po zhruba 1 h 45 min byla kutikula převedena do homogenní suspenze. Vzorek byl po celou dobu chlazen v ledové lázni, aby nedošlo k degradaci proteinů a pigmentů v důsledku zahřívání sonikačního trnu. Samotná dlouhodobá sonikace by neměla mít na kvalitu vzorku vliv.

Následně byla homogenizovaná kutikula otestována na přítomnost Ca²⁺ iontů uvolněných ze skořápky při škrabání kutikuly. Konkrétně bylo zjišťováno, kolik 10% EDTA roztoku se bude muset přidat ke kutikule, aby se vyvázal všechny přítomný vápník. Stanovení bylo založeno na zachycení barevné změny přidaného indikátoru

z červené na modrou při dosažení equilibria, tj. vyvážení volných iontů na EDTU. Nejdříve byl namíchán barevný indikátor rozpuštěním 0,1 g Eriochromové černi v 10 ml 96% ethanolu. K 100 μ l suspenze kutikuly bylo přidáno ještě 500 μ l ddH₂O a roztok byl přenesen do malé kádinky. Pomocí skleněné pipety byl do roztoku kutikuly postupně přikapáván indikátor. Oproti původnímu předpokladu se však roztok po přidání 1 kapky (40 μ l) barevného indikátoru nezbarvil do červena, ale do modra. Proto byl celý experiment zopakován s jiným dávkováním indikátoru. Po aplikaci 2 μ l Eriochromové černi roztok kutikuly opět slabě zmodral. Jediným nalezeným vysvětlením pozorovaného efektu bylo, že ve vzorku kutikuly bylo přítomno tolik EDTA z luhovacího roztoku EDTA/Mercaptoethanol, že vyvázala všechny volné Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, samovolně bylo dosaženo equilibria. Od dodávání dalšího roztoku EDTA ke vzorkům bylo upuštěno.

Koncentrace lysozymu v kutikule byla ještě jednou ověřena na homogenizovaném vzorku. Pro tento účel byl odebrán 1 mg lyofilizované kutikuly, ke kterému bylo přidáno 300 μ l ddH₂O. Toto množství bylo během 35 min zhomogenizováno. Následně byl vzorek kutikuly nanesen neředěný i ředěný v poměru 1 : 1 a 2 : 1 s Britton – Robinsonovým puforem v duplikacích do jamek v agaru v objemu 10 μ l/jamka. Stejně jako v prvním pokusu s homogenizací kutikuly se kolem jamek nevytvořily žádné lyzační zóny, což potvrdilo, že koncentrace lysozymu v kutikule jsou velmi pravděpodobně pod limitem detekce námi zvolenou metodou radiální difúze.

3.5 Analýza pigmentů v kutikule

Analýza obsahu pigmentů byla provedena u 50 vybraných vzorků servisně na oddělení Analýzy fyziologicky aktivních látek ve Fyziologickém ústavu Akademie věd pomocí HPLC. Zvolených 50 vzorků lyofilizovaných kutikul zahrnovalo 19 plemen a jednotlivé barevné kategorie skořápky a byly vybrány na základě předchozích analýz lysozymu a ovotransferinu v bílku tak, aby pokrývaly průměry a celkovou variabilitu zjištěných koncentrací pro oba proteiny. Pro standardizaci analyzovaného množství kutikuly, ve které byly pigmenty následně analyzovány, bylo u každého vzorku použito 20% z celkové váhy lyofilizované kutikuly. Protoporfyrin IX a biliverdin byly stanoveny ve formě dimethylesterů. Postup byl založen na dříve publikované metodě pro určení porfyrinů ve vaječných skořápkách (Mikšík et al., 1996). Vzorky byly

extrahovány (a esterifikovány) 5 ml absolutního methanolu (LiChrosolv, gradient grade pro chromatografii, Merck, Darmstadt, Germany), obsahujícího 5% koncentrovanou kyselinu sírovou, při pokojové teplotě, v temnu pod atmosférou N₂ po dobu 2 dnů. Extrakty byly nejprve odfiltrovány a poté byly přidány 4 ml chloroformu (Merck, chloroform GR, ISO) a 4 ml destilované vody, vše bylo následně protřepáno. Nižší (chloroformová) fáze byla sesbírána, vyšší (vodná) fáze byla opět extrahována chloroformem (chloroformové fáze z obou extrakcí byly shromážděny). Tyto fáze byly promyty nejdříve 2 ml 10% roztoku chloridu sodného, následně destilovanou vodou, dokud nebylo promývací rozpouštědlo neutrální. Extrakty byly odpařeny dosucha a rekonstituovány v 0,5 ml chloroformu s použitím vnitřního standardu (5, 10, 15, 20 - tetra (4 - pyridyl) - 21H, 23H - porfin, Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 0,01 mg / ml). Standardy pro kvantifikaci (protoporfyrin IX a biliverdin, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Německo) byly ošetřeny stejným postupem.

Pigmenty byly stanoveny (a kvantifikovány) reverzní fází vysoce účinné chromatografie s použitím Agilent 1100 LC systému (Agilent, Palo Alto, CA, USA), sestávajícího se z odplyňovače, binární pumpy, autosampleru, kolony s termostatem a diodového detektoru. HPLC bylo také spojeno s ion-trap hmotnostním spektrometrem (Agilent LC-MSD Trap XCT-Ultra, Agilent, Palo Alto, CA, USA). Chromatografická separace byla provedena v Gemini 5u C18 110A koloně (250 x 2,0 mm ID, Phenomenex, Torrence, CA, USA). Vzorek (10 µl) byl injikován do kolony a eluován s gradientem tvořeným z lineárního gradientu (A = voda s 0,1% kyseliny mravenčí, a B = acetonitril s 0,085% kyselinou mravenčí) při průtokové rychlosti 0,35 ml / min a teplotě 55 ° C. Gradient začal na poměru A / B 80:20, po 15 minutách dosahoval poměru 10:90 a po 5 minutách dosáhl 100% B. Po dalších 10 min byla eluce isokratická. Eluce byla monitorována absorbancí při 375 a 410 nm. Byla použita atmosférická tlaková ionizace-ionizace elektrosprej (API-ESI) v pozitivním modu ion-trap hmotnostní spektrometrie v MRM (vícenásobné monitorování reakce), kdy prekurzorové ionty byly 619 (vnitřní standard), 611 (biliverdin) a 591 (protoporfyrin IX). Provozní podmínky: plyn k vysušení (N₂), 11 l / min; teplota plynu 350 ° C; tlak nebulizeru 30 psi (207 kPa). Kvantifikace byla provedena dvěma způsoby: pro vysokou koncentraci protoporfyrinu (15000-15 ng / ml) a biliverdinu (15000 – 500 ng/ml) byla použita absorbance při 410 nm (pro protoporfyrin) a 375 nm (pro biliverdin), kdy kalibrační křivka byla lineární v tomto rozsahu s regresními

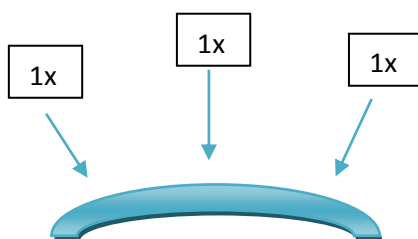
koeficienty $R^2 = 0,9979$, resp. $0,9947$. Pro nízkou koncentraci biliverdinu (50 - 0,5 ng / ml) byla použita metoda MRM MS, kdy kalibrační křivka byla lineární v tomto rozmezí s regresním koeficientem $R^2 = 0,9865$. Limit detekce byl 0,15 ng / ml. Bohužel se v kutikulách podařilo zanalyzovat pouze koncentrace protoporfyrinu IX. V žádném z analyzovaných vzorků kutikul se nepodařilo změřit koncentrace biliverdinu a to nejspíše z důvodu použití pouze 20% celkového vzorku kutikuly.

3.6 Analýza hormonů v bílku

Stanovení koncentrace steroidních hormonů (androstendionu, kortikosteronu, progesteronu, testosteronu, pregnenolonu, 17 hydroxypregnenolonu) u 50 vybraných vzorků bílků proběhlo servisně na Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu v Praze. Měření bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC – MS/MS) dle protokolu Sosvorová et al., 2015. Konkrétně do všech zkumavek byly nadávkovány potřebné deuterované interní standardy (ISTD), souběžně s tím byla připravena kalibrační řada. Následovalo odpaření na vakuové odparce. Vzorky bílků v 50 ml šroubovacích zkumavkách byly homogenizovány pomalým protřepáním. Poté z nich bylo pomocí odběrové zkumavky na moč odebráno 2 ml bílku. Toto množství bylo naředěno 3 ml vody na HPLC a promícháno (1200 otáček). Do extrakčních zkumavek s ISTD bylo přidáno 1250 ml naředěného bílku. V dalším kroku byla provedena extrakce 2 ml diethyletheru a vzorky slity do extrakčních skleněných zkumavek. Poté proběhla inkubace vzorků s derivatizačním roztokem po dobu 15 min při 60 °C. Po inkubaci bylo rozpouštědlo odpařeno proudem dusíku. Sušina byla rozpuštěna v 100 µl 10 mM roztoku mravenčanu amonného v 50% metanolu. Vzorky byly intenzivně promíchány, odstředěny (2000 otáček, 4 min, 22 °C), přeneseny do vložek pro vialky a vstříknuty do UPLC. Posléze byla uskutečněna LC – MS/MS. Analyty byly kvantifikovány pomocí kalibračních křivek vytvořených na základě známých koncentrací ve směsích analyzovaných standardů s konstantními hladinami ISTD. Z analyzovaných steroidů se podařily zachytit všechny s výjimkou kortikosteronu, který byl stanoven pouze u 8 analyzovaných vzorků bílku. U ostatních byl pod limitem detekce.

3.7 Spektrofotometrické charakteristiky skořápek u jednotlivých plemen

Pro dodatečné vyjádření zbarvení skořáčky na základě spektrofotometrických charakteristik bylo na subsetu 8 studovaných plemen (araukana, barneveldka, bantamka, češka, holokrčka, rousná zakrslá, sebritka a vyandotka) provedeno měření reflektance skořápek těchto plemen pomocí přenosného spektrofotometru Avantes na Katedře ekologie České zemědělské univerzity. Nejprve byly vybrány co možná nejcelistvější skořáčky, ze kterých nebyla před tím odebrána kutikula, v počtu 10 ks/plemeno, pocházející od 2 – 3 chovatelů (tj. 3 – 5 ks/chovatel/plemeno). Následně byla každá skořápka proměřena na 3 místech (viz obrázek 3) spektrofotometrem (Avantes) dle příslušného protokolu. Celkově tak bylo k dispozici 30 měření na plemeno. Kvůli nedostatku vhodného materiálu (skořápek s kutikulou) a času se podařilo zanalyzovat pouze 8 plemen z celkového počtu 21 zahrnutých do této studie.



Obr. 3: Měření reflektance skořáčky.

Každou skořáčku měříme na 3 místech – na vrcholu, na levém okraji, na pravém okraji. Sondu spektrofotometru přikládáme těsně ke skořápce pod úhlem 90 °.

Po načtení bílého (REF) a černého (DRK) standardu v modu S bylo provedeno samotné měření reflektance v modu T (transmittance)/R (reflektance) s nastavenými parametry no. of flashes 1, smoothing 3, spline off, average 15. Měření reflektance probíhalo v rozsahu 250 – 750 nm po 1 nm. Po převedení výstupních souborů programu AvaSoft (software spektrofotometru Avantes) do přijatelnějšího formátu byl v Excelu spočítán celkový jas podkladové barvy (brightness), vyjádřený jako celková reflektance (R) mezi vlnovou délkou 300 - 700 nm, modro – zelené spektrum (BGC) počítané jako $R_{400 - 575 \text{ nm}}/R_{300 - 700 \text{ nm}}$, červené spektrum $R_{595 - 655 \text{ nm}}/R_{300 - 700 \text{ nm}}$ a UV spektrum $R_{320 - 400 \text{ nm}}/R_{300 - 700 \text{ nm}}$. Jednotlivé hodnoty reflektance v daných 4 kategoriích byly vyjádřeny jako průměr dané kategorie reflektance na studované plemeno.

3.8 Statistické zpracování dat

3.8.1 Výpočty koncentrací lysozymu a ovotransferinu v bílku

Koncentrace lysozymu (mg/ml) ve vzorcích bílku byly vyjádřeny jako průměr ze 2 opakovaných měření (duplikátů) interpolovaných z kalibrační křivky vykazující lineární závislost měřené absorbance na množství proteinu ve vzorcích standardu (konkrétní hodnoty standardu lysozymu viz 3.3.2). Podobně koncentrace ovotransferinu (mg/ml) ve vzorcích bílku byly vyjádřeny jako průměr ze 4 opakovaných měření (kvadruplikátů) interpolovaných z kalibrační křivky vykazující nelineární sigmoidální závislost měřené absorbance na množství proteinu ve vzorcích standardu (konkrétní hodnoty standardu ovotransferinu viz 3.3.3). Pro každou analyzovanou mikrotitrační destičku u analýz ovotransferinu a Petriho misku u lysozymu byla vytvořena samostatná kalibrační křivka. Koeficienty determinace R^2 pro jednotlivé kalibrační křivky byly v rozmezí 0,95 - 0,99. Repeatabilita duplikátů u lysozymu a kvadruplikátů u ovotransferinu byla vysoká, $R^2_{\text{lysozym}} = 0,96$; $R^2_{\text{ovotransferin}} = 0,89$. Veškeré interpolované hodnoty koncentrace ovotransferinu a lysozymu ve vzorcích bílku byly vyjádřeny s 95% CI. U ovotransferinu byly interpolované hodnoty koncentrace zpětně transformovány z logaritmických hodnot na přirozené. Celkový intra-assay koeficient variance byl 15%. Inter-assay koeficient variance pro ovotransferin byl CV = 19%) a pro lysozym (CV = 12%). Veškeré výpočty koncentrací probíhaly s využitím programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

3.8.2 Analýzy efektu barevnosti skořápky na koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku

Jelikož průměrné koncentrace lysozymu a ovotransferinu v bílých spolu navzájem nekorelovaly (Pearson's product moment correlation: $r = 0,20$, $t = 3,3596$, $df = 255$, $p\text{-value} < 0,12$, $R^2 = 0,03$), byl každý testovaný protein zahrnut jako vysvětlovaná proměnná v samostatném modelu. Před zařazením ovotransferinu a lysozymu do jednotlivých modelů byly hodnoty jejich koncentrace zlogaritmovány ($X = \log_{10}X$). A hodnoty objemu vejce byly vyškálovány. Pro zjištění závislosti všech vysvětlujících proměnných (barva skořápky, objem vejce, chovatel, rok, plemeno) na koncentrace ovotransferinu a lysozymu bylo využito zobecněných lineárních modelů

(lm). Ty u lysozymu prokázaly vysoce signifikantní efekt barvy skořápky, roku, chovatele a plemene (Příloha 2) a u ovotransferinu průkazný efekt barvy skořápky, roku a plemene (Příloha 6). Aby byl zohledněn efekt vysoce průkazných vysvětlujících proměnných, bylo využito zobecněných lineárních modelů se smíšenými efekty (lme, library:nlme) a u modelů pro lysozym byly zařazeny nejprve rok a chovatele jako hierarchicky uspořádané náhodné vysvětlující proměnné a poté také rok, chovatele a plemeno jako hierarchicky uspořádané náhodné proměnné (viz Příloha 3 a Příloha 4 – plné modely s různě definovanými náhodnými efekty). U modelů pro ovotransferin jsme pak jako náhodnou proměnnou zařadili rok (Příloha 7) a následně také rok a plemeno (Příloha 8) jako hierarchicky uspořádané náhodné proměnné. Barva skořápky a objem vejce byly u obou GLMM pro ovotransferin i lysozym zařazeny jako pevné vysvětlující proměnné. Postupnou zpětnou (backward) eliminací nesignifikantních proměnných bylo dosaženo minimálních adekvátních modelů (MAM). V těch pak byla také odhadnuta variabilita jednotlivých náhodných efektů na celkové vysvětlené variabilitě pomocí funkce VarCorr (library:nlme).

Pro analýzy vztahu mezi spektrofotometrickými parametry skořápky a koncentracemi lysozymu a ovotransferinu, bylo nejprve využito zobecněných lineárních modelů (Příloha 10, Příloha 11) pro každý studovaný protein samostatně. V každém modelu byly koncentrace lysozymu a ovotransferinu vysvětlované proměnné a chovatel, rok, celková reflektance ve viditelném spektru, blue-green chroma, red chroma a UV chroma jako vysvětlující proměnné. Stejně jako v přechozích analýzách, byl nalezen pro lysozym průkazný efekt chovatele i roku a pro ovotransferin pouze vliv roku. Z toho důvodu bylo pro ošetření vlivu těchto proměnných použito zobecněných lineárních modelů se smíšenými efekty (lme, library:nlme) a tyto proměnné byly zařazeny jako náhodné proměnné. Jelikož jednotlivé hodnoty reflektance vystupující jako spojité vysvětlující proměnné byly navzájem silně korelované a hrozilo riziko multikolinearity při použití GLMM s těmito vzájemně korelovanými vysvětlujícími proměnnými (viz Příloha 17), bylo pro analýzy vztahu mezi jednotlivými hodnotami reflektance a barvou skořápky využito samostatných GLMM pro každou kategorii reflektance zvlášť, kde koncentrace lysozymu či ovotransferinu byly vysvětlovanými proměnnými a daná kategorie reflektance a barva skořápky vysvětlujícími proměnnými. Náhodnými efekty pak byly u modelů pro ovotransferin rok a u modelů pro lysozym rok a chovatel.

3.8.3 Analýzy vzájemných vztahů mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky, antimikrobiálními proteiny v bílku a androgenními hormony v bílku

Při těchto analýzách bylo použito rovnou zobecněných lineárních modelů se smíšenými efekty (lme, library:nlme). Pro dosažení normality vysvětlovaných proměnných byly koncentrace protoporfyrinu, lysozymu a ovotransferinu zlogaritmovány ($y = \log_{10} X$).

Pro model testující vztah mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikule a antimikrobiálními proteiny v bílku byly pevnými spojitými vysvětlujícími proměnnými koncentrace lysozymu a ovotransferinu a objem vejce a kategorickými proměnnými pak barva skořápky. Do modelu byly zařazeny také dvojné interakce barva skořápky : koncentrace lysozymu a barva skořápky : koncentrace ovotransferinu. Náhodnou proměnnou bylo plemeno (viz Příloha 13 – plný model).

Pro modely testující vztahy mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikule, koncentracemi lysozymu a ovotransferinu v bílku a androgenními hormony pak byly vysvětlujícími proměnnými koncentrace pregnenolonu, progesteronu, testosteronu a 17 hydroxypregnenolonu a jejich dvojné interakce. Jednotlivé vysvětlující proměnné mezi sebou nebyly nijak významně korelovány (Příloha 18). Náhodnou proměnnou bylo u všech tří modelů plemeno (viz Příloha 14, 15, 16 – plné modely).

Minimálních adekvátních modelů (MAM) bylo dosaženo zpětnou (backward) eliminací nesignifikantních proměnných. Veškeré analýzy probíhaly v programu R 3.2.1 (R Development Core Team 2015).

4. Výsledky

4.1 Vztah mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů v bílku v závislosti na barvě skořápky

4.1.1 Koncentrace lysozymu v závislosti na barvě skořápky

Analýza vztahu mezi koncentrací lysozymu v bílku vajec s různě barevnou skořápkou prokázala průkazný vliv barevnosti skořápky (Tabulka 5). Průkazné rozdíly byly v koncentraci lysozymu ve vejcích s krémovými a tmavě hnědými a bílými skořápkami, kdy průkazně nejvyšší koncentrace lysozymu byly ve vejcích tmavě hnědých a krémových oproti vejcím bílým, která měla lysozymu nejméně (Tabulka 5, Graf 1). Nicméně, po odfiltrování vlivu plemene, tedy zařazení plemene do modelu jako náhodné vysvětlující proměnné, zůstal průkazný vliv pouze mezi rozdíly v koncentracích lysozymu u vajec s tmavě hnědou a bílou skořápkou, zatímco pro krémové skořápky byl efekt marginálně nesignifikantní (Tabulka 6). Analýzou komponent rozptylu pro náhodné a pevnou vysvětlující proměnnou bylo prokázáno, že barva skořápky vysvětluje 51% z celkové variability v průměrné koncentraci lysozymu v bílku. Podíl jednotlivých náhodných efektů na celkově vysvětlené variabilitě byl pak nejvyšší pro efekt roku (23%), dále pro efekt chovatele (17%) a nejnižší podíl činil efekt plemene (10%). Hodnoty průměrné koncentrace lysozymu u všech analyzovaných plemen jsou znázorněny v Příloze 5.

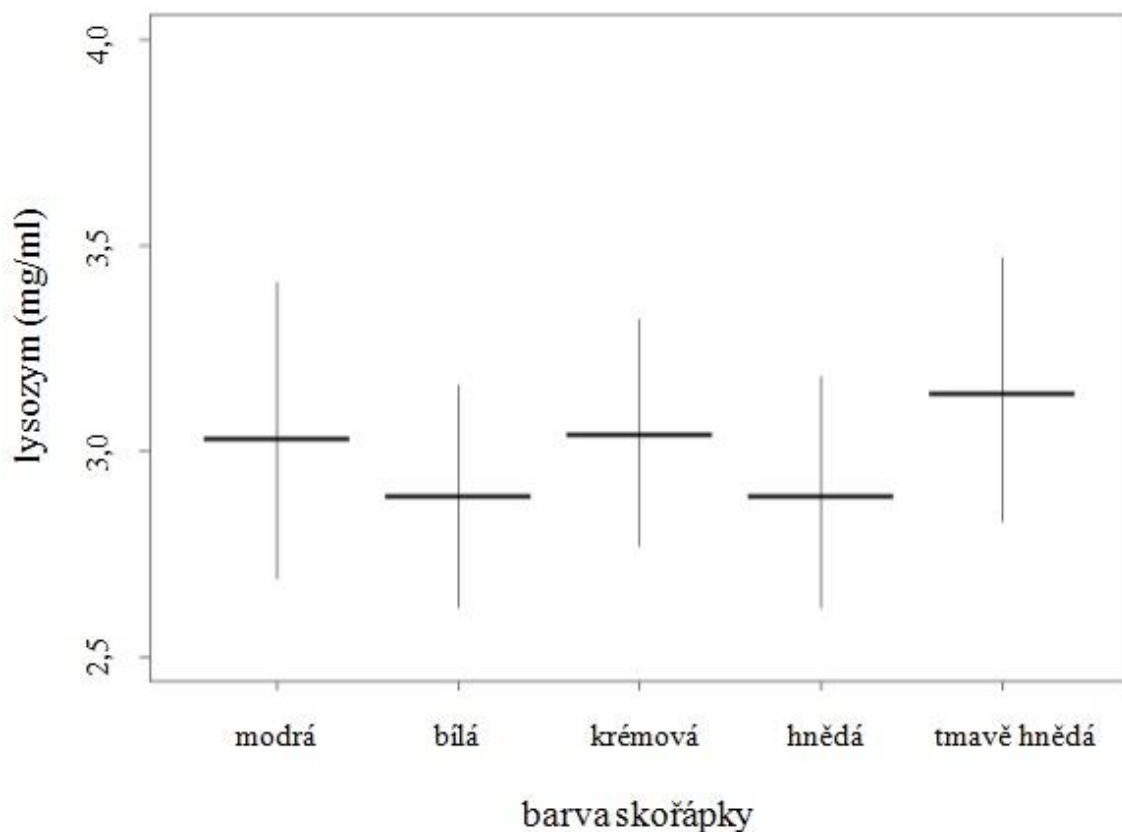
Tabulka 5: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) u vajec s různě barevnou skořápkou (N=359, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel). Signifikantní proměnné jsou vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0620845	0,03471705	30,592591	0,0000
barva skořápky hnědá	0,0024325	0,01955255	0,124411	0,9011
barva skořápky krémová	0,0491179	0,02163446	2,270357	0,0239
barva skořápky modrá	0,0415947	0,03226222	1,289268	0,1983
barva skořápky tmavě hnědá	0,0740582	0,02537080	2,919033	0,0038

Tabulka 6: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) u vajec s různě barevnou skořápkou po zohlednění efektu plemene (N=359, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel/plemeno). Signifikantní proměnné jsou vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0558798	0,03631902	29,072364	0,0000
barva skořáčky hnědá	0,0044399	0,02423361	0,183213	0,8618
barva skořáčky krémová	0,0550700	0,02339142	2,354281	0,0652
barva skořáčky modrá	0,0516104	0,03995014	1,291869	0,2529
barva skořáčky tmavě hnědá	0,0872065	0,02934338	2,971932	0,0311

Graf 1: Průměrné koncentrace lysozymu (mg/ml) v bílku (+ 95% CI) v závislosti na barevnosti skořáčky. Hodnoty koncentrace lysozymu jsou na logaritmické škále



4.1.2 Koncentrace ovotransferinu v závislosti na barvě skořápky

Analýza vztahu mezi koncentrací ovotransferinu v bílku vajec s různě barevnou skořápkou prokázala průkazný vliv barevnosti skořápky (Tabulka 7). Statisticky průkazný rozdíl byl však pouze v koncentraci ovotransferinu ve vejcích s krémovými a modrými skořápkami, kdy průkazně nejvyšší koncentrace ovotransferinu byly ve vejcích krémových oproti vejcům modrým, která měla lysozymu nejméně (Tabulka 7, Graf 2). Nicméně, po odfiltrování vlivu plemene, tedy zařazení plemene do modelu jako náhodné vysvětlující proměnné, nezůstal efekt barevnosti skořápky průkazný a byl mírně za hranicí signifikance ($p = 0,063$; Tabulka 8). Analýzou komponent rozptylu bylo prokázáno, že barva skořápky vysvětluje 68% z celkové variability v průměrné koncentraci ovotransferinu v bílku. Podíl jednotlivých náhodných efektů na celkově vysvětlené variabilitě byl pak nejvyšší pro efekt roku (28%) a nejnižší podíl činil efekt plemene (3,5%). Hodnoty průměrné koncentrace ovotransferinu u všech analyzovaných plemen jsou znázorněny v Příloze 9.

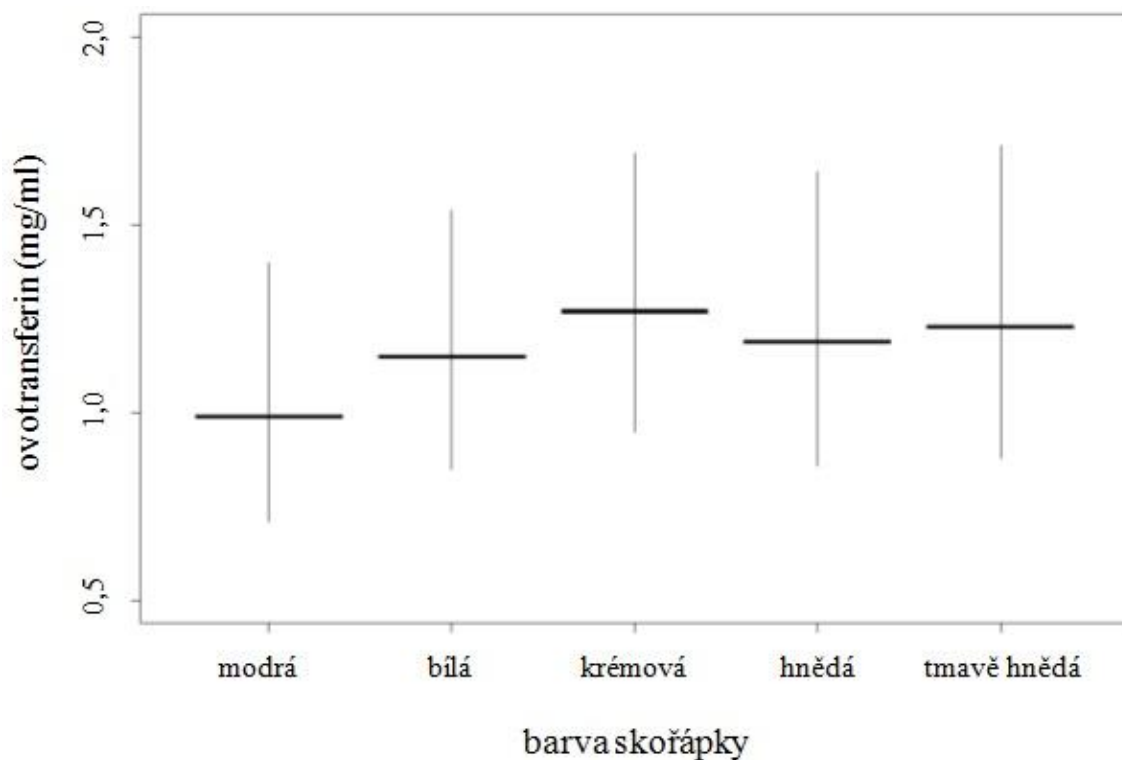
Tabulka 7: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) u vajec s různě barevnou skořápkou (N = 256, náhodný efekt = ~1|rok). Signifikantní proměnné jsou vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,13991205	0,14765381	0,9475682	0,3443
barva skořápky hnědá	0,03433417	0,05686188	0,6038170	0,5465
barva skořápky krémová	0,10239126	0,04950065	2,0684832	0,0396
barva skořápky modrá	-0,14112559	0,09789300	-1,4416311	0,1507
barva skořápky tmavě hnědá	0,06780065	0,07590067	0,8932813	0,3726
objem vejce	-0,00000371	0,00000203	-1,8291380	0,0686

Tabulka 8: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) u vajec s různě barevnou skořápkou po zohlednění efektu plemene (N=256, náhodný efekt = ~1|rok/plemeno).

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,13943666	0,15277357	0,9127015	0,3624
barva skořáčky hnědá	0,03419083	0,06733305	0,5077867	0,6157
barva skořáčky krémová	0,11129533	0,05740182	1,9388815	0,0630
barva skořáčky modrá	-0,14108462	0,10941913	-1,2893963	0,2082
barva skořáčky tmavě hnědá	0,07508162	0,08788113	0,8543543	0,4004
objem vejce	-0,00000380	0,00000227	-1,6729875	0,0957

Graf 2: Průměrné koncentrace ovotransferinu (mg/ml) v bílku (+ 95% CI) v závislosti na barevnosti skořáčky. Hodnoty koncentrace ovotransferinu jsou na logaritmické škále



4.1.3 Koncentrace lysozymu a ovotransferinu v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky

Analýza vztahu mezi koncentrací lysozymu v bílku a spektrofotometrickými parametry skořápky neprokázala žádný vztah mezi měřenými parametry reflektance skořápky na průměrnou koncentraci lysozymu v bílku (Tabulka 9, 10, 11, 12). U ovotransferinu byl prokázán pozitivní vztah mezi celkovou reflektancí ve viditelné části spektra a koncentrací ovotransferinu v bílku (Tabulka 13, Graf 3). Tento prokázáný vztah korespondoval s hodnotami celkové reflektance ve viditelné části spektra a rozdíly v koncentracích ovotransferinu v různých barevných vejcích (Graf 4, 2), kdy nejvyšší hodnoty reflektance ve viditelné části spektra i ovotransferinu měla vejce s krémově zbarvenou skořápkou. Nutno však podotknout, že vejce modrá, která vykazovala nejnižší koncentrace ovotransferinu (Graf 2) měla hodnoty celkové reflektance ve viditelném spektru totožné jako vejce krémová. Tento výsledek je velmi pravděpodobně způsoben velmi malým počtem vajec, pro analýzu spektrofotometrických parametrů modrých vajec araukan ($N = 12$). Vztah mezi hodnotami reflektance v modro-zelené a červené části spektra a koncentracemi ovotransferinu v bílku nebyl prokázán (Tabulka 14, 15) a vztah mezi UV reflektancí a koncentracemi ovotransferinu v bílku byl marginálně nesignifikantní ($p = 0,07$; Tabulka 16).

Tabulka 9: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci ve viditelné části spektra ($N = 148$, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,117333	0,03482664	32,08270	0,0000
total reflectance (R)	0,000000	0,00000003	-0,48959	0,6253

Tabulka 10: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v modro - zelené části spektra (N = 148, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,180174	0,07168267	16,463862	0,0000
blue - green chroma (BGC)	-0,192601	0,16718960	-1,151992	0,2516

Tabulka 11: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v červené části spektra (N = 148, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0336511	0,0806454	12,817229	0,000
red chroma (RC)	0,3282674	0,3405924	0,963813	0,337

Tabulka 12: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v UV části spektra (N = 148, náhodný efekt = ~1|rok/chovatel)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,1523050	0,0549204	20,981368	0,0000
UV chroma	-0,4199131	0,4267604	-0,983955	0,3271

Tabulka 13: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci ve viditelné části spektra (N = 148, náhodný efekt = ~1|rok). Signifikantní proměnné jsou vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,06328516	0,12134356	-0,521537	0,6032
total reflectance (R)	0,00000016	0,00000007	2,190102	0,0310

Tabulka 14: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v modro-zelené části spektra (N = 148, náhodný efekt = $\sim 1|\text{rok}$)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,1582708	0,2322900	-0,68135	0,4973
blue - green chroma (BGC)	0,5785692	0,5449307	1,06173	0,2911

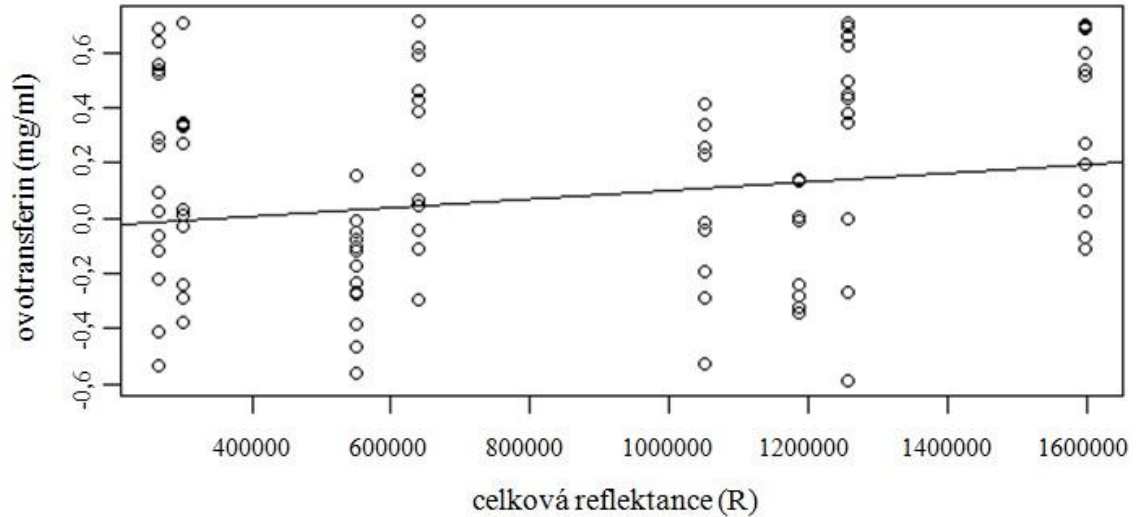
Tabulka 15: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v červené části spektra (N = 148, náhodný efekt = $\sim 1|\text{rok}$)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,3567049	0,2422559	1,472430	0,1443
red chroma (RC)	-1,2951248	0,9611285	-1,347504	0,1811

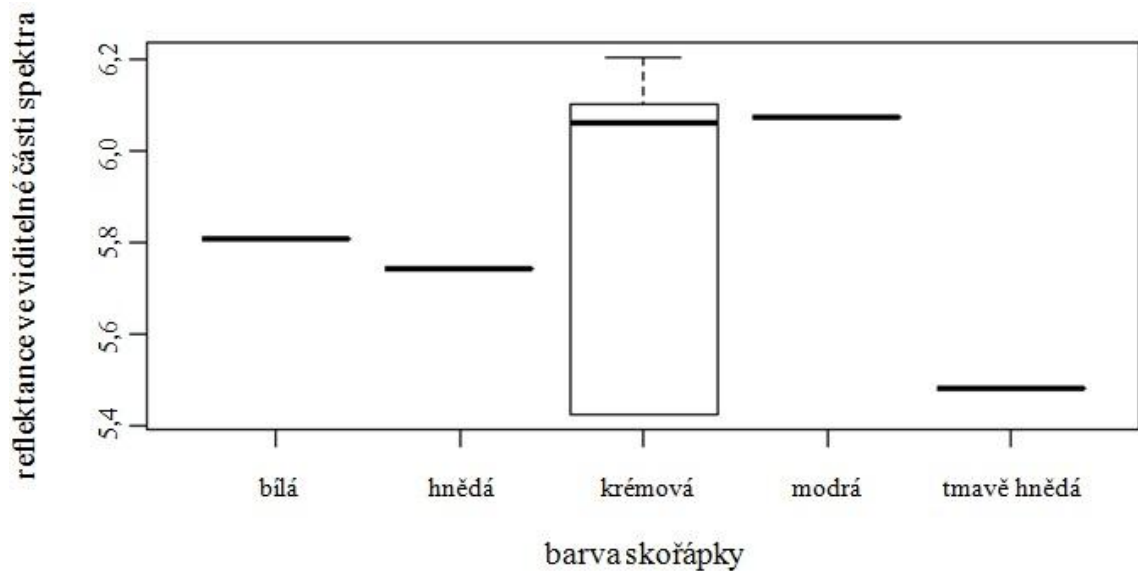
Tabulka 16: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na celkové reflektanci v UV části spektra (N = 148, náhodný efekt = $\sim 1|\text{rok}$)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,1613883	0,1602196	-1,007295	0,3164
UV chroma	2,1572857	1,1853698	1,819926	0,0720

Graf 3: Závislost mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku (mg/ml) na hodnotách celkové reflektance ve viditelné části spektra ($r = 0,20$, $p = 0,03$). Hodnoty koncentrace ovotransferinu jsou na logaritmické škále



Graf 4: Průměrné hodnoty celkové reflektance v oblasti viditelného spektra ($R_{300 - 700 \text{ nm}}$) pro vejce s různě barevnou skořápkou. Hodnoty reflektance jsou na logaritmické škále



4.2 Analýza pigmentů v kutikule

Při analýze pigmentů v kutikule z 50 vajec byly naměřeny pouze koncentrace protoporfyrinu (max = 961,6; min = 0,1923; průměrná = 55,97 $\mu\text{g}/20\%$ celkové váhy kutikuly). U žádného ze vzorků nebyla detekovaná přítomnost biliverdinu.

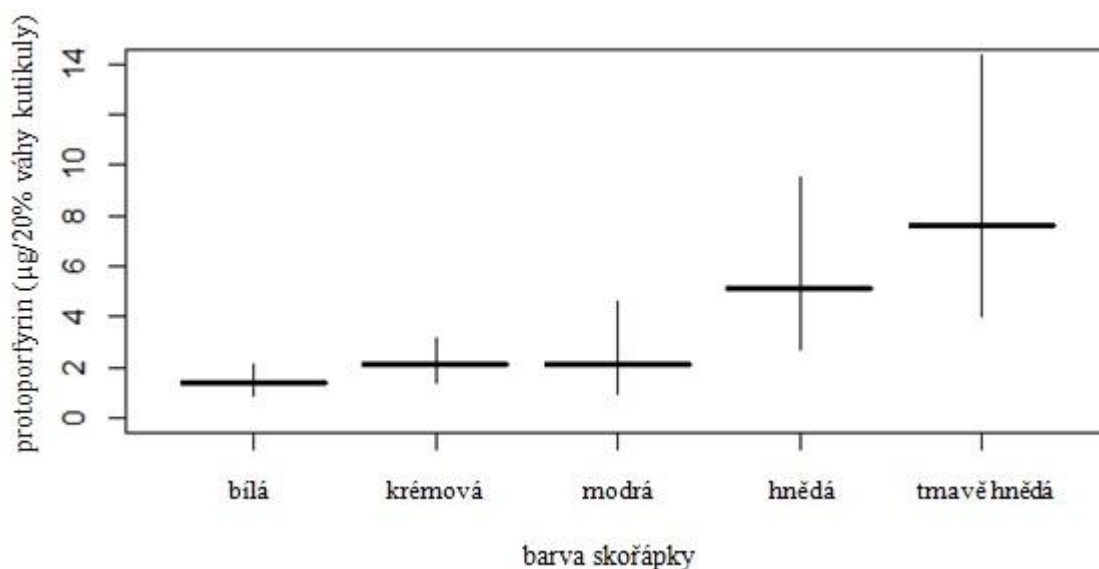
4.2.1 Vztah mezi množstvím protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky a antimikrobiálními proteiny v bílku

V experimentálních vejcích, která sloužila pro analýzy vztahu mezi deponovanými proteiny v bílku a koncentracemi protoporfyrinu v kutikule nebyla prokázána žádná korelace mezi koncentracemi ovotransferinu a lysozymu (Pearson's correlation, $N=43$, $t=0,042147$, $df=41$, $r=0,0065$, $p\text{-value}=0,9666$). Průměrná koncentrace protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ celk. hmotnosti kutikuly) v kutikulární vrstvě skořápky významně souvisela s barvou skořápky ($p < 0,001$; Tabulka 17). Tmavě hnědá vejce vykazovala signifikantně vyšší koncentrace protoporfyrinu v porovnání s vejci bílými a krémovými (Graf 5). Nejnižší koncentrace protoporfyrinu obsahovala vejce bílá, nejvyšší pak vejce s tmavě hnědou skořápkou (Graf 5). Koncentrace protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ celk. hmotnosti kutikuly) v kutikulární vrstvě skořápky se nijak neměnila v závislosti na koncentracích ovotransferinu v bílku, nicméně byl prokázán marginálně signifikantní vztah ($p=0,047$) mezi koncentrací lysozymu v bílku a koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky (Tabulka 17). S tímto vztahem souvisela také prokázaná signifikantní interakce ($p < 0,01$) mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikule skořápky a lysozymu v bílku u vajec s různě barevnou skořápkou. Zatímco u krémových a tmavě hnědých vajec koncentrace protoporfyrinu v kutikule rostla spolu s koncentracemi lysozymu v bílku, bílá vejce, která měla více lysozymu v bílku, vykazovala menší koncentrace protoporfyrinu v kutikule (Graf 6). Pro hnědá a modrá vejce nebyl tento interakční vztah průkazný ($p=0,51$) a u modrých vajec byl mírně za hranicí signifikance ($p=0,087$; Tabulka 17).

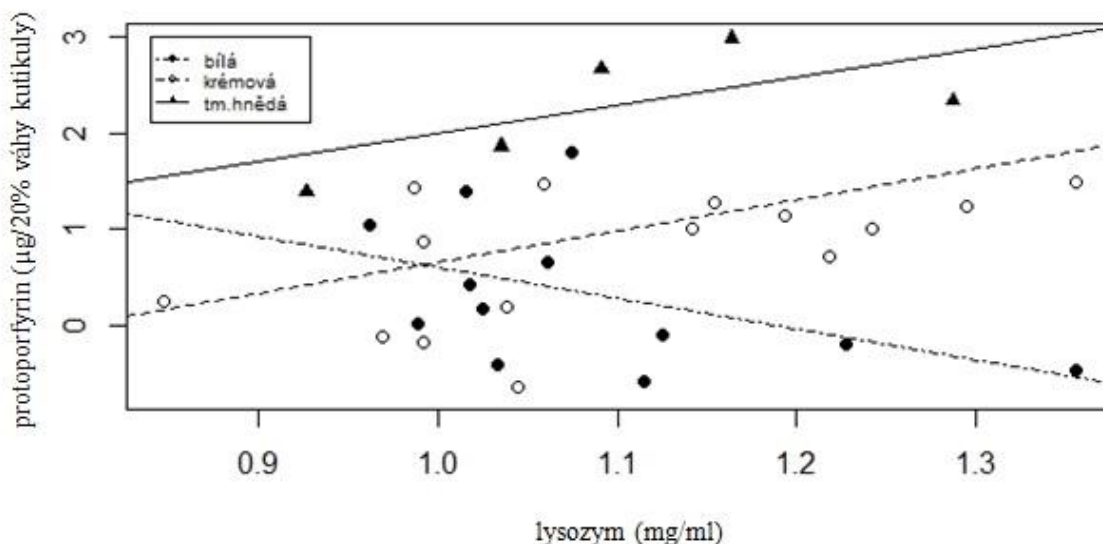
Tabulka 17: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky, koncentrací lysozymu, ovotransferinu a barvou skořápky (N=43; náhodný efekt = ~1|plemeno). Signifikantní proměnné jsou vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	3,816476	1,659295	2,300059	0,0336
lysozym	-3,223515	1,513591	-2,129713	0,0473
barva skořápky hnědá	-1,380654	3,833513	-0,360154	0,7241
barva skořápky krémová	-6,664353	2,080389	-3,203417	0,0064
barva skořápky modrá	8,029046	4,013012	2,000753	0,0652
barva skořápky tmavě hnědá	-4,723361	2,726263	-1,732540	0,1051
lysozym : barva skořápky hnědá	2,445066	3,632143	0,673175	0,5094
lysozym : barva skořápky krémová	6,454841	1,881499	3,430691	0,0030
lysozym : barva skořápky modrá	-6,212126	3,438739	-1,806512	0,0876
lysozym : barva skořápky tm. hnědá	6,124252	2,460298	2,489232	0,0228

Graf 5: Vztah mezi koncentrací protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ váhy kutikuly) v závislosti na barvě skořápky. Hodnoty koncentrace protoporfyrinu jsou na logaritmické škále



Graf 6: Vztah mezi koncentrací protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ váhy kutikuly) v závislosti na koncentraci lysozymu v bílku (mg/ml) u vajec s různě barevnou skořápkou. Hodnoty koncentrace protoporfyrinu i lysozymu jsou na logaritmické škále



4.3 Analýza hormonů v bílku

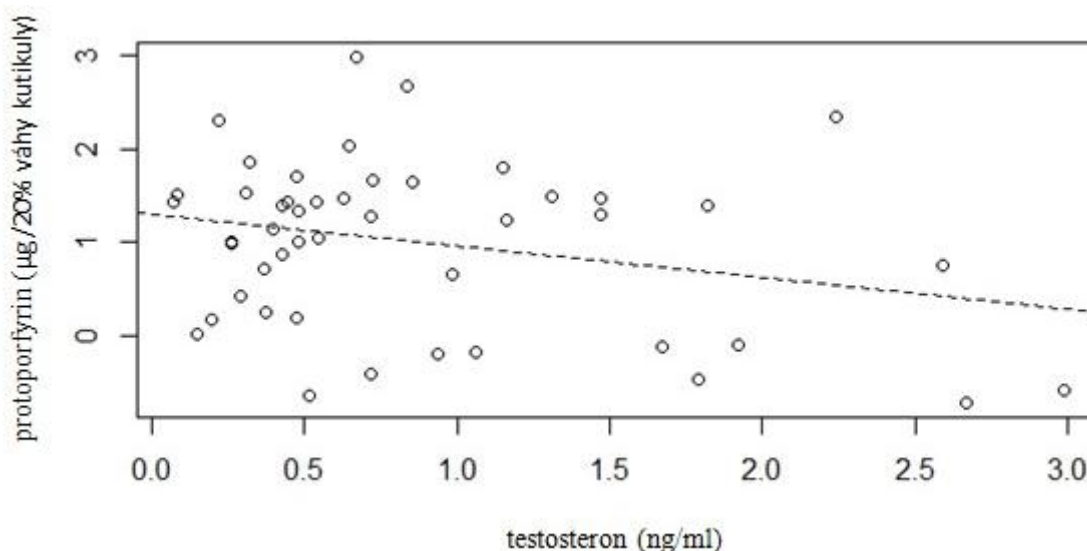
4.3.1 Vztah mezi množstvím protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořáčky a hormonálním statusem samice

Z testovaných hormonů, které by mohly mít vliv na deponaci protoporfyrinu do kutikulární vrstvy skořáčky se podařil prokázat pouze vliv testosteronu ($p = 0,039$; Tabulka 18). S rostoucí koncentrací testosteronu v bílku se snižovala koncentrace protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořáčky (Graf 7). Ostatní hormony, ani jejich interakce neměly na deponované množství protoporfyrinu do kutikuly skořáčky vliv (Tabulka 18).

Tabulka 18: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ váhy kutikuly) v kutikulární vrstvě skořápky a koncentrací hormonů v bílku (N=47; náhodný efekt = $\sim 1|\text{plemeno}$)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,307783	0,2248611	5,815959	0,0000
testosteron	-0,340945	0,1579531	-2,158520	0,0399

Graf 7: Vztah mezi koncentrací protoporfyrinu ($\mu\text{g}/20\%$ váhy kutikuly) v závislosti na koncentraci testosteronu (ng/ml) v bílku ($r = -0,28$, $p = 0,039$). Hodnoty koncentrace protoporfyrinu jsou na logaritmické škále



4.3.2 Vztah mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů v bílku a hormonálním statutem samice

Při studiu vztahu mezi koncentracemi hormonů v bílku samice bylo zjištěno, že s výjimkou progesteronu, u kterého nebyl prokázán žádný efekt, měly na koncentraci lysozymu v bílku průkazný vliv všechny studované hormony (Tabulka 19). Nejsilnější efekt byl prokázán u pregnenolonu a testosteronu ($p < 0,002$) avšak s protichůdnými efekty. Zatímco se stoupající koncentrací pregnenolonu se koncentrace lysozymu

snižovala (Graf 8), s narůstající koncentrací testosteronu se zvyšovala také koncentrace lysozymu (Graf 9). Pro 17 hydroxypregnenolon byla prokázána stejná, avšak méně významná pozitivní korelace ($p = 0,040$; Graf 10). Pro ovotransferin se nepodařilo prokázat vliv žádného z testovaných hormonů na jeho koncentraci v bílku (Tabulka 20).

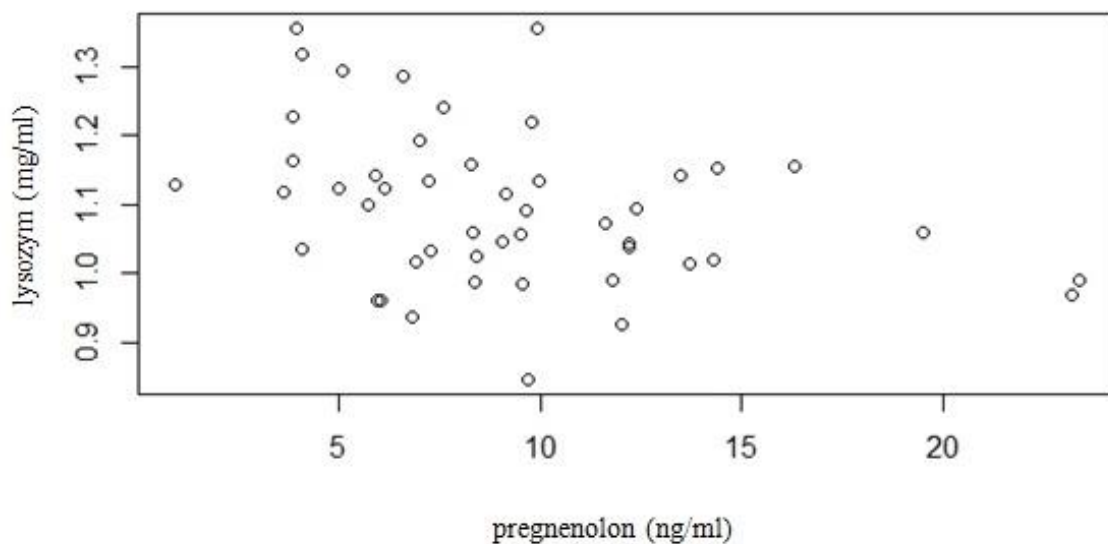
Tabulka 19: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentracemi hormonů a lysozymu v bílku (N=42; náhodný efekt = ~1|plemeno). Signifikantní proměnné vyznačeny tučně

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0951726	0,01482034	73,89658	0,0000
17 hydroxypregnenolon	0,0341624	0,01551122	2,20243	0,0402
pregnenolon	-0,0593815	0,01600685	-3,70975	0,0015
testosteron	0,0563960	0,01516786	3,71813	0,0015
progesteron	0,0117665	0,01546534	0,76083	0,4561

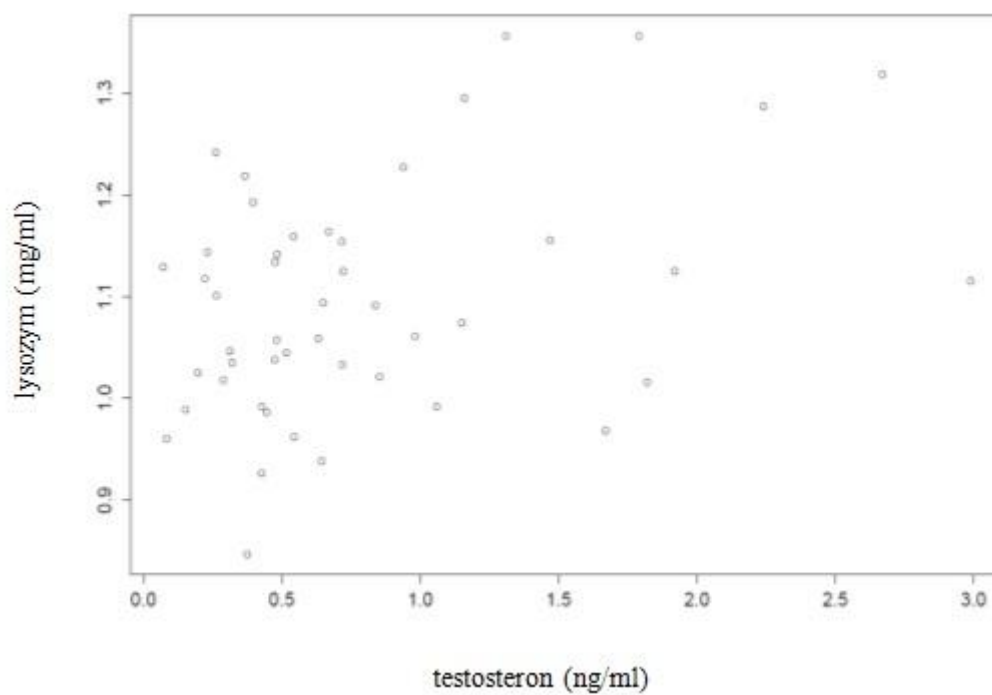
Tabulka 20: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu v bílku koncentrací hormonů v bílku. Plemeno = random efekt (N=43)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,03542681	0,05331805	-0,664443	0,5133
17 hydroxypregnenolon	-0,08593124	0,05396436	-1,592370	0,1256

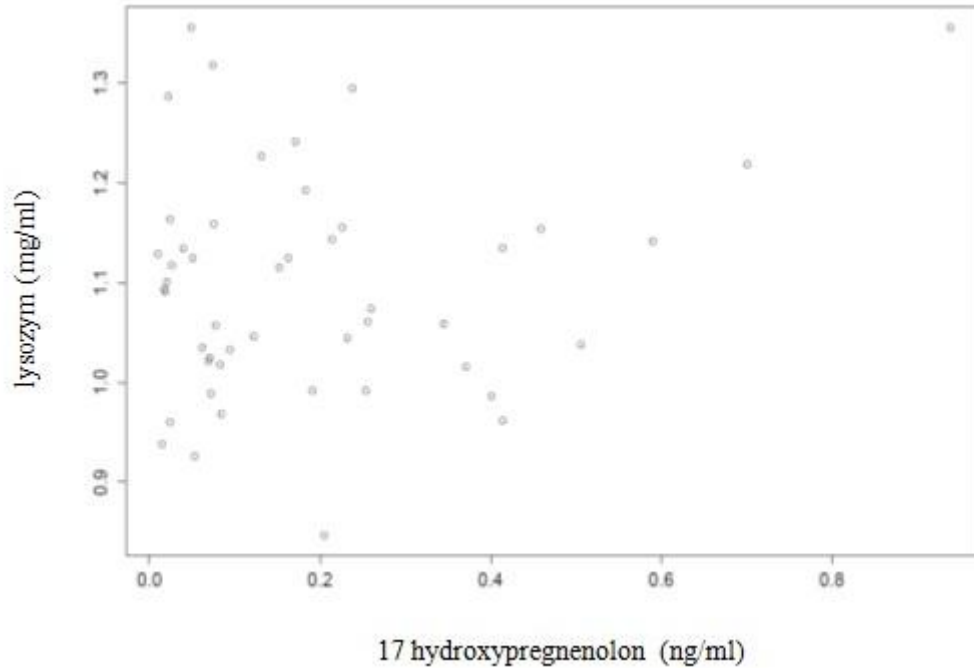
Graf 8: Vztah mezi koncentrací lysozymu (mg/ml) v závislosti na koncentraci pregnenolonu (ng/ml) v bílku ($r = -0,34$, $p < 0,002$). Hodnoty koncentrace lysozymu jsou na logaritmické škále



Graf 9: Vztah mezi koncentrací lysozymu (mg/ml) v závislosti na koncentraci testosteronu (ng/ml) v bílku ($r = 0,40$, $p < 0,002$). Hodnoty koncentrace lysozymu jsou na logaritmické škále



Graf 10: Vztah mezi koncentrací lysozymu (mg/ml) v závislosti na koncentraci 17 hydroxypregnenolonu (ng/ml) v bílku ($r = 0,19$, $p = 0,040$). Hodnoty koncentrace lysozymu jsou na logaritmické škále



4.3.3 Vliv stresu na deponaci antimikrobiálních proteinů do bílku a protoporfyrinu do kutikulární vrstvy skořápky

Analýza vztahu mezi koncentracemi kortikosteronu v bílku, který by měl odrážet míru stresu samice v době tvorby vejce, a koncentracemi lysozymu, ovotransferinu či protoporfyrinu, nepřinesla důkaz o jeho existenci (Tabulka 21, 22, 23).

Tabulka 21: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací protoporfyrinu a koncentrací kortikosteronu v bílku ($N=7$; náhodný efekt = ~1|plemeno)

	Estimate	Std. error	t – value	p - value	Signif. code
intercept	1,719	0,798	2,154	0,0747	.
kortikosteron	1,441	1,157	1,245	0,2597	

F – statistic: 1,549; multiple R – squared: 0,2052; adjusted R – squared: 0,07275; p – value:0,2597

Tabulka 22: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací lysozymu a koncentrací kortikosteronu v bílku (N=8; náhodný efekt = ~1|plemeno)

	Estimate	Std. error	t - value	p - value	Signif. code
intercept	1,11758	0,16711	6,688	0,00113	**
kortikosteron	-0,05548	0,23609	-0,235	0,82352	

F – statistic: 0,05523; residual standard error: 0,1603; multiple R – squared: 0,01093;
adjusted R – squared: - 0,1869; p – value: 0,8235

Tabulka 23: Minimální adekvátní model pro vztah mezi koncentrací ovotransferinu a koncentrací kortikosteronu v bílku (N=7; náhodný efekt = ~1|plemeno)

	Estimate	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,1096	0,4105	-0,267	0,8000
kortikosteron	-0,3446	0,5799	-0,594	0,5782

F – statistic: 0,3532; residual standard error: 0,3937; multiple R – squared: 0,06598;
adjusted R – squared: - 0,1208; p – value: 0,5782

5. Diskuze

Vejde je nezbytné pro ptačí reprodukci, a mikrobiální kontaminace jeho obsahu vede ke sníženému reprodukčnímu úspěchu (Cook et al., 2003, 2005), schopnosti přežít či změnám fenotypu mlád'at. Donedávna převládal názor, že antimikrobiální obrana ptačího vejce se skládá ze dvou hlavních částí, fyzické bariéry, poskytované intaktní skořápkou, a chemické obrany, vyplývající z alkalického pH bílku a přítomnosti různých proteinových komponent bílku s antimikrobiálními vlastnostmi (Board a Tranter, 1986). V posledních letech se ukazuje, že skořápka neplní pouze roli fyzické bariéry, ale též disponuje vlastním arzenálem účinných „chemických zbraní“ proti bakteriím či houbám na jejím povrchu, ať už se jedná o specifické proteiny skořápkové matrix, či proteiny s dobře prokázanými antimikrobiálními účinky, přítomnými také v bílku (Mann et al., 2006, 2008; Wellman-Labadie et al., 2008 a, b; Rose a Hincke, 2009; Mikšík et al., 2010, 2014; Rose-Martel et al., 2012)

Existuje velké množství interpretací, proč jsou ptačí vejce barevná. Dnes převládá názor, že první ptačí vejce byla pouze bílá, bez viditelné pigmentace v podobě skvrn, nicméně mohla obsahovat i určité množství pigmentů. Výrazná ornamentace se u nich objevila až později a dosáhla nebývalé vnitrodruhové i mezidruhové variability (Kilner, 2006). Již od 19. st. bývá kladen důraz zejména na hypotézu, že pigmentace ptačích skořápek se vyvinula z důvodu potřeby skrýt vejce před potenciálními predátory (Wallace, 1890). Často uváděnými impulsy bývá též ochrana před hnízdním parazitismem (unikátní podpis pro rozpoznání vlastních vajec), termoregulace či konstrukční vyztužení (viz Kilner, 2006). Nemalé množství prací se zabývá také hypotézou, že zbarvení vejce je signálem samci o kondici samice, tedy indukuje zvýšení investic samce do péče o potomky (Moreno a Osorno, 2003). Konečně je také možné, že intenzita pigmentace odráží míru bakteriální zátěže vajec (Poláčiková et al., 2009). Většina dutinových ptáků klade bílá vejce (Hewiston, 1846), avšak s protoporfyrinovým skvrněním, jehož funkce není dosud zcela objasněna, naproti tomu ptáci hnízdící na zemi, v otevřeném prostoru mají vejce barevná, výrazně skvrnitá. V některých současných pracích bývá zpochybňována signální funkce ptačí pigmentace. Hanley et al. (2015) zjistili, že zbarvení skořáčky pigmenty zabírá jen 0,08 – 0,10% toho, co je ptačí oko schopno vnímat. Zdá se, že pigmentace skořápek se vyvinula v důsledku působení několika selekčních tlaků zároveň. Ishikawa et al. (2010) zjistili, že

v přítomnosti zelené a hnědé skořápky, které obsahují vysoké koncentrace biliverdinu či protoporfyrinu (Wang et al, 2009), dochází k omezení bakteriálního růstu, což naznačuje, že pigmenty obsažené ve skořápce pravděpodobně mají antimikrobiální potenciál. Nicméně zatím nikdo nestudoval, zda existuje nějaká souvislost mezi různě zbarvenými vejci a jejich celkovým antimikrobiálním potenciálem. Na základě dostupných studií, které prokazují antimikrobiální potenciál protoporfyrinu a biliverdinu, jejichž depozice do skořápky je pro samici velmi nákladná, by se dalo předpokládat, že u vajec lépe vybavených antimikrobiálním potenciálem ve skořápce, která je první bariérou před mikroorganismy, samice už nebudou tolik investovat do vnitřních vrstev vejce.

5.1 Variabilita v koncentracích antimikrobiálních proteinů v bílku u plemen s různě zbarvenou skořápkou

Procentuální zastoupení bílku a žloutku ve vejci se liší v závislosti na vyspělosti mláďat v době líhnutí (Sotherland a Rahn, 1987). Druhy s bezbrannými, altriciálními mláďaty mají ve svých vejcích 68 - 79% bílku a jen 12 - 27 % žloutku. Naopak druhy s plně vyvinutými, prekociálními mláďaty mají vyšší podíl žloutku 32 – 41% na úkor bílku 51 - 56%. Podobně se může lišit i zastoupení antimikrobiálních proteinů v bílku mezi altriciálními a prekociálními druhy (Saino, 2007). Nicméně rozdíly v koncentraci bílkových proteinů byly zaznamenány i v rámci druhu.

Lysozym zaujímá 1 – 4% proteinové složky bílku v závislosti na ptačím druhu (Smolelis a Hartsell, 1951). Na základě našich výsledků se zdá, že u kura domácího velikost vejce, resp. objem bílku na podíl lysozymu nemá významný vliv. Naproti tomu barva skořápky zřejmě hraje jistou roli v deponaci lysozymu do bílku. Nicméně tento efekt se projevuje jinak, než jsme očekávali. Největší množství lysozymu bylo zjištěno ve vejcích s tmavě hnědými a krémovými skořápkami, nejmenší koncentrace pak byly zaznamenány v bíle zbarvených vejcích. Ukázalo se, že množství deponovaného lysozymu do bílku je též velmi ovlivněno okolními podmínkami. Nalezli jsme silný efekt roku (23%), ve kterém byla vejce odebrána. Podobný vliv byl prokázán i pro chovatele (17%), od kterého vzorky pocházely. Nejmenší, avšak nezanedbatelný podíl na variabilitě koncentrací lysozymu v bílku měl efekt plemene (10%).

To koresponduje s dřívějšími studiemi, které naznačili, že deponace lysozymu do bílku je odrazem investic samice (např. Saino et al., 2002).

Ovotransferin reprezentuje 13% všech proteinů obsažených v bílku (Guerin-Dubiard et al., 2005). Objem vejce na koncentraci ovotransferinu v bílku dle našich výsledků nemá vliv. Podobně jako u lysozymu i u ovotransferinu byl prokázán významný efekt barvy skořápky na jeho ukládání do bílku. Nejméně ovotransferinu obsahují vejce s modrou skořápkou, následují bílá a hnědá vejce. Nepatrně více ovotransferinu než v hnědých vejcích bylo naměřeno v bílých vaječ s tmavě hnědou skořápkou. Nejvíce ovotransferinu je pak jednoznačně deponováno do bílků krémově zbarvených vaječ. Na rozdíl od lysozymu se koncentrace ovotransferinu v bílku jeví být více pod vlivem efektu plemene a genetiky než dalších faktorů prostředí (roku a chovatele). A to i přesto, že efekt plemene byl ještě nižší (3,5%) než u lysozymu. Souvisí to s faktem, že efekt roku sběru byl relativně menší (28%) než v případě lysozymu, vliv chovatele se neprokázal vůbec.

Již dříve bylo prokázáno, že lysozym a ovotransferin v bílku mohou na sebe působit, ovlivňovat navzájem svou antimikrobiální aktivitu. Díky tomu pak vejce s vyšším obsahem lysozymu mohou mít nižší obsah ovotransferinu a naopak. Cook et al. (2003) zjistili, že míra bakteriální zátěže vaječ se může lišit. Stejně tak i druhové složení mikrobiálních společenstev není totožné (Shawkey et al., 2009). V takovém případě může být výhodnější mít vyšší koncentrace toho či onoho proteinu podle jeho efektivity vůči konkrétní skladbě mikrobiálních společenstev. Lysozym má převážně baktericidní účinky, působí na buňky přímo, zatímco ovotransferin působí primárně bakteriostaticky, i když existují nově prokázané efekty způsobující apoptózu. Nám se žádný podobný vztah zaznamenat nepodařilo. Naopak se zdá, že deponace obou proteinů do bílku jsou na sobě navzájem nezávislé. Ukládání lysozymu se jeví v naší studii být modulováno spíše faktory prostředí, naopak deponace ovotransferinu je řízena zejména genetickým pozadím konkrétního plemene, což podporuje i studie Wellman-Labadie et al. (2008a). Ačkoliv pozorovaný efekt barvy byl průkazný pro oba proteiny, výsledky je třeba ověřit u volně žijících ptáků. Kur domácí je dobrým modelovým druhem pro variabilitu barvy skořápky, nicméně podléhá již tisíce let šlechtění. Jedním ze sledovaných znaků je právě barva skořápky, kdy nejžádanější je krémová a bílá skořápka. Tento tlak ze strany spotřebitelů na vzhled vejce je určující zvláště v komerčních chovech. Nicméně svou stopu zanechal i u drobných chovatelů.

5.2 Variabilita v koncentracích antimikrobiálních proteinů v kutikule

Kutikula je důležitým prvkem antimikrobiální ochrany vejce. U vajec s neúplnou kutikulou byla pozorována výrazně vyšší bakteriální kontaminace obsahu vajec než u těch s celistvou kutikulou (Sparks a Board, 1984). Pohyb vody a vzduchu přes skořápku prostřednictvím sítě jednoduchých pórů umožňuje vývoj embrya, zároveň ale poskytuje cestu pro bakteriální kontaminaci obsahu vajec (Board a Tranter, 1986). Tenká (10 μm) vrstva kutikuly pokrývá nerovnoměrně celý povrch skořápky včetně nálevkovitého ústí pórů (do hloubky 50 μm) (Ruiz et al., 2000) a tím zabraňuje částečně přebytkovému odpařování vody z vejce a chrání jej tak před průnikem mikroorganismů a nečistot z vnějšího prostředí (Hincke et al., 2008; Příloha 19, obrázek 6). Kutikula je tvořena tenkou, vnitřní vrstvou z hydroxyapatitu (Dennis et al., 1996) a vnější vrstvou, složenou z glykoproteinů, polysacharidů a lipidů. V posledních letech bylo identifikováno kolem 50 proteinů, z nichž některé jsou součástí kalcifikované skořápky a bílku (např. lysozym c, ovotransferin, cystatin, ovoinhibitor), kde prokazatelně hrají roli v antimikrobiální obraně vejce (Rose-Martel et al., 2012).

Prokázané antimikrobiální účinky lysozymu proti gram-pozitivním bakteriím se jeví být nesmírně důležité zejména pro primární obranu vejce proti kolonizaci vaječného obsahu mikroorganismy na úrovni kutikuly a skořápky (Wellman-Labadie et al., 2008b). Navzdory výsledkům studií Wellman-Labadie et al. (2008b) či Mikšík et al. (2014), kteří jednoznačně našli lysozym typu c v extraktech z vnějších vrstev skořápky a kutikuly husích, kachních i slepičích vajec, nám se přítomnost lysozymu v kutikule metodou radiální difúze v agaru potvrdit nepodařilo. Příčinou může být použití jiné metody než u výše zmíněných prací; zachycené množství zřejmě bylo pak natolik nízké, že nemohlo být zvolenou metodou radiální difúze v agaru detekováno. Proto jedinou ověřenou metodou určení koncentrace lysozymu v kutikule zůstává analýza pomocí HPLC, ke které jsme ovšem nepřistoupili z důvodu složité interpretace při komparaci koncentrací lysozymu v kutikule a bílku na základě rozdílných metodických přístupů.

Wellman-Labadie et al. (2008b) naznačili, že ovotransferin koncentrovaný v tenké vrstvě nebo ve specifických zónách (např. v okolí pórů) by mohl přispět k antimikrobiální obraně skořápky a kutikuly. Ačkoliv Mikšík et al. (2014) našli při analýze kutikulární vrstvy skořápky sekvence odpovídající ovotransferinu, jeho

skutečná koncentrace v kutikule zatím nebyla stanovena. Z důvodu komplikací při extrakci proteinů z kutikuly a analýzy obsahu lysozymu z extraktů bylo nakonec od testování koncentrací ovotransferinu v kutikule kolorimetrickou metodou upuštěno.

Vzhledem k prokázané přítomnosti ovotransferinu i lysozymu v kalcifikovaných vrstvách skořápky i přímo na povrchu pórů skořápky (Wellman-Labadie et al., 2008b), lze předpokládat, že pro stanovení koncentrace těchto proteinů ve skořápce bychom museli analyzovat jednotlivé vrstvy skořápky, včetně přilehlých podskořápečných blán, kde jsou oba proteiny hojně zastoupeny (Gautron et al, 2001; Nys et al, 2004). Detailnější popis mikrostuktur skořápky viz Příloha 19.

5.3 Koncentrace antimikrobiálních proteinů v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky

Celková reflektance neboli jas podkladové barvy odráží míru toho, co vidí člověk pouhým okem. Dalšími analyzovanými parametry byly blue – green chroma, které odpovídá míře krémové a bílé pigmentace, red chroma, které naopak souvisí s hnědou pigmentací. Posledním měřeným parametrem bylo UV chroma pro porovnání, jak zbarvení skořápky vnímá ptačí oko. Tento parametr sice nenahrazuje ptačí vizuální model (Hanley et al, 2015), nicméně nám umožnil zkoušet zjistit, za předpokladu platnosti signální funkce pigmentace, zda UV reflektance sděluje ptákům něco o kvalitě vejce z hlediska antimikrobiálního potenciálu. Studie totiž Fecheyr – Lippens et al. (2015) totiž ukázala, že UV reflektance se mění v závislosti na kutikulární vrstvě skořápky. U lysozymu analýza spektrofotometrických parametrů skořápky neprokázala žádný vztah mezi měřenými parametry reflektance skořápky a průměrnou koncentrací lysozymu v bílku u vajec s různě zbarvenou skořápkou. Naopak u ovotransferinu byl nalezen pozitivní vztah mezi celkovou reflektancí ve viditelné části spektra a koncentrací ovotransferinu v bílku u krémově zbarvených vajec. Nicméně je třeba podotknout, že z důvodu nedostatku času a vhodného materiálu (tj. skořápek se zachovanou kutikulou) byla každá barevná skupina reprezentována vzorky pouze od 1 plemene, vyjma krémové barvy, pro kterou byly k dispozici vzorky od 3 plemen, což není dostatečné zastoupení. Z tohoto důvodu lze tyto neprokázané vztahy mezi spektrofotometrickými charakteristikami různě barevných skořápek a koncentracemi

lysozymu brát jako artefakt nedostatečného počtu měření. Lze předpokládat, že při vyšším počtu změřených skořápek od více plemen, reprezentujících danou barevnou kategorii, bychom dosáhli hodnot reflektance, které by korespondovaly s barevnými kategoriemi, které jsme vytvořili dle vnímání barevnosti skořáčky lidským okem.

5.4 Variabilita v koncentracích pigmentů v kutikule u plemen s různě zbarvenou skořápkou vejce

Barva vajec u nosnic z komerčních chovů je primárně dána genotypem slepice. Svou roli ve výsledném zbarvení může hrát zejména u drobných chovatelů ale i složení potravy, doba snesení vejce a jiné (viz Charlton et al., 2005). Campo et al. (2007) zjistili u nosnic s hnědě zbarvenými vejci, že vejce snesená dopoledne jsou tmavší než vejce snesená odpoledne. Morales et al. (2011) pak ve své studii na tereji modronohém (*Sula nebouxi*) zaznamenali zvýšení depozice nákladného biliverdinu do druhého vejce ve snůšce, nezávisle na alokaci pigmentu do prvního vejce, po obohacení potravy o karotenoidy.

Protoporfyrin je původcem hnědého zbarvení skořápek (Mikšík et al., 1996; Gorchein et al., 2009). Tomu odpovídají i naše výsledky měření koncentrací protoporfyrinu v kutikule u plemen s různě zbarvenou skořápkou. Nejvyšší koncentrace protoporfyrinu IX byly naměřeny ve vzorcích kutikul odebraných z tmavě hnědých skořápek. Nejméně protoporfyrinu IX bylo naopak zaznamenáno v bíle zbarvených vejcích. V nedávné studii Samiullah a Roberts (2013) zjistili, že u komerčního plemene kura domácího s hnědě zbarvenými skořápkami je převážná část protoporfyrinu deponována do kalcifikované skořáčky. To je v rozporu s dřívějšími studii (např. Mikšík et al., 2007), které označily jako hlavní místo deponace tohoto pigmentu proteinovou kutikulu. Některé studie uvádí, že protoporfyrin může také ve skořápce plnit funkci náhradního vyztužení při nedostatku vápníku pro tvorbu skořáčky (Gosler et al., 2011). Je tedy otázkou, zda výsledek studie Samiullah a Roberts (2013) nesouvisí se šlechtěním plemen, komerčně využívaných na produkci vajec pro potravinářský průmysl, s cílem dosáhnout co nejpevnějších vaječných skořápek, a tak minimalizovat ztráty při transportu vajec. V další studii by bylo zajímavé se zaměřit na ověření, zda stejný trend zaznamenaný v deponaci protoporfyrinu v kutikule u různě zbarvených vajec vykazují i podíly protoporfyrinu deponovaného do kalcifikované skořáčky.

Na základě našich dat byla dále prokázána interakce mezi koncentracemi protoporfyrinu v kutikule a lysozymu v bílku. Zatímco u krémových a tmavě hnědých vajec koncentrace protoporfyrinu v kutikule rostla spolu s koncentracemi lysozymu v bílku, bílá vejce, která měla více lysozymu v bílku, vykazovala menší koncentrace protoporfyrinu v kutikule. Vzhledem k faktu, že kutikula ovlivňuje UV reflektanci ptačích skořápek (Fecheyr – Lippens et al., 2015), pozorovaný vztah mezi lysozymem a protoporfyrinem u bílých vajec by mohl být zejména důležitý u dutinových ptáků, kteří primárně kladou vejce s bílými skořápkami, avšak zároveň mají ve svých skořápkách vyšší podíl protoporfyrinu. Protoporfyrin zásadně snižuje UV reflektanci skořáčky, jak ukazují i naše měření UV reflektance různě barevných skořápek (viz Příloha 12), kterou však dutinová ptáci hojně využívají při orientaci v hníždě, kde je UV reflektance sama o sobě zhoršená špatnými světelnými podmínkami uvnitř dutiny. Pak by tedy snižování koncentrace protoporfyrinu ve skořápce bílých vajec mohlo být adaptací dutinových ptáků, ve snaze nesnižovat už tak prostředím způsobenou minimální UV reflektanci vajec v dutinových hnízdech. Tento pokles antimikrobiální ochrany na úrovni skořáčky by pak mohl být kompenzován právě zjištěnou zvýšenou deponací lysozymu do bílku. Obdobně zaznamenaný trend pro krémová a tmavě hnědá vejce by mohl odpovídat požadavkům ptáků s otevřenými, pozemními hnízdy. Tento předpoklad je však nutno ověřit a dále studovat u volně žijících druhů ptáků. Kromě efektu barvy skořáčky a interakce koncentrací lysozymu v bílku a protoporfyrinu v kutikule nebyl žádný další efekt, který by ovlivňoval výsledné množství deponovaného pigmentu do kutikuly prokázán.

Výsledné zbarvení ptačí vaječné skořáčky je většinou dáno poměrem dvou pigmentů – protoporfyrinu IX a biliverdinu (případně i zinkového chelátu biliverdinu) (Gorchein et al., 2009; Mikšík et al., 1996). U tmavě zbarvených či skvrnitých skořápek výrazně převládá koncentrace protoporfyrinu nad koncentrací biliverdinu, u světle zbarvených skořápek naopak dominuje přítomnost biliverdinu nad protoporfyrinem (Wang et al., 2009). Biliverdin také průkazně způsobuje modré a modrozelené zbarvení skořáčky (Mikšík et al., 1996; Gorchein et al., 2009). Navzdory těmto dobře známým vztahům obou pigmentů, které pochází z jednoho společného prekursoru hemu, tudíž jsou jejich koncentrace spolu pevně provázané, se nám nepodařilo ani u jednoho z 50 vzorků dodaných na analýzu koncentrace pigmentů v kutikule identifikovat přítomnost biliverdinu. Nejvíce zarážející je tento výsledek zejména pro vzorky kutikuly

pocházející z modrozeleně zbarvených vajec plemene araukana. Vysvětlením tohoto překvapivého zjištění může být odběr příliš malého množství vzorku kutikuly pro analýzu pigmentů (20 % z celkové váhy kutikuly na místo obvyklých 100 %) z důvodu plánovaného provedení analýz koncentrací antimikrobiálních proteinů ovotransferinu a lysozymu v kutikulách, ke kterému nakonec z metodických důvodů nedošlo (viz 3.4.2). O přesném místu a době syntézy pigmentů panují pochyby (viz Sparks, 2011). Tedy je možné, že biliverdin je deponován dříve než při tvorbě kutikuly, již v závěrečných fázích tvorby skořápky. Jinými slovy za nenalezením biliverdinu v odebraných vzorcích kutikul by mohla být skutečnost, že biliverdin je deponován ještě hlouběji než protoporfyrin. A tak množství biliverdinu ve vzorku kutikuly bylo natolik nízké, že jej nebylo možné HPLC detekovat.

5.5 Vliv hormonů na deponaci antimikrobiálních proteinů do bílku

Ptačí vejce obsahuje celou řadu hormonů, které jsou považovány za nástroj samice, jak ovlivnit stávající a budoucí podmínky potomka s cílem maximalizovat jeho fitness (Groothuis et al., 2005). Většina studií se zaměřuje zejména na androgeny a další steroidní hormony produkované v gonádách. V poslední době jsou ve velké míře studovány ale také glukokortikoidy jako signály stresu. Hladiny těchto hormonů ve vejci se liší jak v rámci jedné snůšky, tak i mezi snůškami a mají krátkodobé i dlouhodobé účinky na vývoj potomků. Svůj podíl na tom může mít celá řada faktorů – pořadí snášení, dostupnost potravy, sezóna, kvalita samce nebo hustota a sociální interakce (Groothuis et al, 2005).

Naše studie koncentrací hormonů v bílku potvrdila, že deponace lysozymu do bílku je ovlivněna hormonálně. U lysozymu byl zaznamenán efekt zejména dvou hormonů – pregnenolonu a testosteronu, avšak i ostatní studované hormony měly vliv na jeho koncentraci. Zatímco se stoupající koncentrací pregnenolonu se koncentrace lysozymu snižovala, s narůstající koncentrací testosteronu se zvyšovala také koncentrace lysozymu. Podobný vztah byl zjištěn i pro 17 hydroxypregnenolon. Androgenní hormony ovlivňují fyziologii samice a její připravenost na reprodukci. Pozorovaný vztah mezi koncentracemi hormonů a lysozymu v bílku by mohl být maternálním efektem. Koncentrace testosteronu ve žloutku ovlivňuje kvalitu mláďat (Schwabl, 1996; Schwabl et al., 2012). Tedy zaznamenaný vliv testosteronu

na deponaci lysozymu do bílku by mohl odrážet kvalitu investice samice do potomka. Zvýšená hladina lysozymu embrya chrání proti bakteriální infekci, zároveň testosteron by mohl později zvýhodňovat mládě (méně bojácné, rychlejší orientace v prostoru). Pregnenolon byl již dříve zaznamenán v ptačím žloutku jako prekurzor progesteronu (Retenbacher et al., 2009). Obdobně Quillfeldt et al. (2011) potvrdili, že pregnenolon spolu s progesteronem jsou přítomny ve vysokých koncentracích v žloutku vajec mořských ptáků. Nicméně role pregnenolonu v bílku je zatím nedostatečně studována.

Na rozdíl od lysozymu pro ovotransferin se nepodařilo prokázat vliv žádného z testovaných hormonů na jeho koncentraci v bílku. Ve studii na tkáňových kulturách *in vitro* však byl pozorován efekt přidávání hormonů na sekreci ovotransferinu (Palmiter et al., 1981). Nicméně my jsme studovali efekty hormonů na deponaci proteinů *in vivo*. Naměřené koncentrace hormonů také nemusí nutně odpovídat koncentracím hormonů v době ovogeneze. Většina hormonů je alokována spíše do žloutku. Avšak hormony obsažené v bílku jsou běžně používané jako ukazatel hormonálního vyladění samice v době ovogeneze, protože lépe odráží účinky akutního stresu (von Engelhardt a Groothuis, 2005; Downing a Bryden, 2008; Royo et al., 2008). Obecně lze říci, že naměřené koncentrace hormonů jsou fyziologickým obrazem změn prostředí, ve kterém samice žije. Zaznamenané efekty téměř všech hormonů na koncentraci lysozymu tedy korespondují s výše prokázaným vlivem okolních podmínek na deponaci lysozymu do bílku.

Stres prožitý samicí v raných fázích rozmnožování je důležitým zdrojem epigenetických modifikací u potomků. Kortikosteron je považován za hlavní indikátor stresu u ptáků. Vystavení různým stresorům spouští aktivaci osy hypotalamus – hypofýza, což vede ke zvýšení hladiny glukokortikoidů cirkulujících v plazmě. U ptáků je hlavním glukokortikoidem uvolněným z kůry nadledvin právě kortikosteron. Jak bylo prokázáno, kortikosteron může být přenášen ze samice do vejce (von Engelhardt a Groothuis, 2005; Downing a Bryden, 2008). Studie na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*) a sýkoře koňadře (*Parus major*) pak zjistily, že akutní stres prožitý samicí během ovogeneze zvyšuje koncentraci kortikosteronu v bílku (Saino et al., 2005; Pitk et al., 2012). Děje se tak difuzí kortikosteronu během tvorby bílku v magnu až do zahájení sekrece skořápky (Pitk et al., 2012). Navaro a Pinson (2010) zdokumentovali na plemenech kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), že vystavení slepic dlouhodobému stresu vede k rozdílnému efektu akumulace kortikosteronu v žloutku.

Vejce plemene bílá leghornka obsahovala dvakrát vyšší koncentrace kortikosteronu v žloutku než vejce druhého studovaného komerčního plemene slepic. Nicméně koncentrace kortikosteronu v bílku a plazmě byly u obou plemen podobné. Ericsson et al. (2014) ukázali na kuru bankivském (*Gallus gallus*) a plemenu bílá leghornka, že hormonální odpověď na stres a rychlost zotavení mohou být změněny procesem domestikace, pravděpodobně jako součást procesu adaptace na životní podmínky v blízkosti lidí, také selekce na vyšší rychlost reprodukce. Ve vzorcích bílků vybraných na analýzu hormonů však byla koncentrace kortikosteronu naměřena pouze u 8 z nich. To by naznačovalo, že slepice, od kterých pocházela vejce v našem výzkumu, nejsou nijak stresované. Ačkoliv existuje řada prací, které potvrzují efekt kortikosteronu na různé parametry vejce (např. syntézu ovotransferinu; Le Bouc et al., 1985; Giansanti et al., 2012; Kim a Choi, 2014), též na kvalitu mláďat (např. rychlost růstu; Saino et al., 2005; imunitu či chování; Rubolini et al., 2005), nepodařilo se nám prokázat vztah mezi koncentracemi kortikosteronu, antimikrobiálních proteinů a deponovaných pigmentů. Nicméně tento výsledek je nejspíše artefaktem malého počtu pozorování. Na druhou stranu u ptáků je zřejmě možná syntéza kortikosteronu z pregnenolonu jako přímého prekursoru, bez meziprojektu progesteronu (Sandor, 1972; Assenmacher, 1973), tedy zaznamenaný efekt pregnenolonu na koncentraci lysozymu by mohl také odrážet míru stresu.

Naše data naznačují, že různé proteiny mohou být různě regulovány hormony. Toto podporuje nedávná studie, která zjistila, že exprese genů pro různé proteiny bílku je ovlivněna glukokortikoidy rozdílně dle typu proteinů, koncentrace hormonů a závažnosti stresu (Kim a Choi, 2014). Zdá se, že lysozym reaguje velmi citlivě na hladiny androgenních hormonů, přeneseně tedy na změny v prostředí, naopak koncentrace ovotransferinu je více pod vlivem genetického pozadí. Kur domácí reprezentuje ptačí druh s vysokou hladinou lysozymu v bílku (Saino, 2007). Studie na jiných druzích s odlišným poměrem lysozymu a ovotransferinu by mohly pomoci lépe pochopit tuto hormonální regulaci.

5.6 Vliv hormonů na deponaci pigmentů do kutikuly

Soh a Koga (1997) poukázali, že pigmentace je primárně ovlivněna steroidním hormonem progesteronem. Navzdory tomuto původnímu předpokladu se nám nepodařilo potvrdit vliv hladiny progesteronu na deponaci pigmentu do skořápky. Nicméně jak se ukazuje, změny v intenzitě a způsobu pigmentace souvisí také s dostupností vápníku během kladení vejce. Nedostatek vápníku způsobuje zeslabení skořápky. To bývá kompenzováno právě zvýšenou deponací protoporfyrinu do kutikuly a vnější vrstvy palisád (Gosler et al., 2011). Snížená dostupnost vápníku ovlivňuje Ca^{2+} transport do žlázy sekretující pigmenty, který je řízen hladinou progesteronu v krevní plazmě. Tedy prokázaný efekt progesteronu v jiných studiích nemusí být až tak jednoznačný.

Jako možný kandidát, který by mohl ovlivňovat deponaci pigmentu, se jeví testosteron. Naše analýza ukázala, že s rostoucí koncentrací testosteronu v bílku se snižuje koncentrace protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky. Obecně se předpokládá, že testosteron je klíčovým nástrojem samice pro ovlivnění kvality mláďat (Grothuis et al., 2005). Zároveň v experimentech na křepelce japonské (*Coturnix japonica*) bylo prokázáno, že vlivem stresu dochází ke zvýšení koncentrace kortikosteronu a snížení koncentrace testosteronu ve vaječném žloutku (Okuliarová et al., 2010). Tedy míra vlivu testosteronu na deponaci protoporfyrinu nejspíše závisí na interakci s dalšími hormony. Vejce zahrnutá do naší studie pocházela od slepic, které nebyly experimentálně vystaveny žádnému stresu. Lze předpokládat, že zaznamenaný efekt testosteronu na koncentraci protoporfyrinu tedy odpovídá hormonálnímu vyladění slepic v ideálních podmínkách.

Je nutné zmínit, že androgenní hormony soupeří s glukokortikoidy o vazbu na globuliny vázající hormony v krevní plazmě. Pouze nevázané hormony jsou fyziologicky aktivní (Hammond, 1995; Andersen, 2002). Progesteron s kortikosteronem pak vykazují podobnou afinitu ke globulinům (Malish a Breuner, 2010). Tedy jen malé množství těchto hormonů je volně přítomno v krevní plazmě, většina je vyvázána na globulinech. Námi změřené hladiny hormonů v bílku odpovídají spíše koncentracím volných hormonů, což ale neodráží koncentrace reverzibilně vázaných hormonů na globulinech.

6. Závěr

- Koncentrace antimikrobiálních proteinů lysozymu a ovotransferinu v bílku souvisí s barvou skořápky. Dle našich výsledků nejvyšší koncentrace obou proteinů obsahují vejce s krémově zbarvenou skořápkou, nejnižší koncentrace lysozymu a ovotransferinu pak byly zaznamenány u bílých a modrých vajec.
- Deponace lysozymu a ovotransferinu do bílku probíhá nezávisle na sobě. Zdá se, že deponace lysozymu do bílku je více ovlivněna vnějšími stimuly, zejména faktory prostředí, ve kterém samice žije. Naopak koncentrace ovotransferinu v bílku se jeví být více pod vlivem genetického pozadí plemene.
- Steroidní hormony hrají významnou roli v deponaci antimikrobiálních látek do vnějších i vnitřních struktur vejce. Koncentrace lysozymu negativně koreluje s hladinou pregnenolonu v bílku, pozitivně pak s hladinami testosteronu a 17 hydroxypregnenolonu v bílku. Zvýšená hladina testosteronu v bílku také dále snižuje množství deponovaného protoporfyrinu do kutikulární vrstvy.
- Koncentrace protoporfyrinu IX koreluje se zbarvením skořápky. Nejméně protoporfyrinu bylo naměřeno ve světle zbarvených vejcích (bílých), největší koncentrace pak byly zaznamenány v tmavě hnědých vejcích. To potvrzuje roli protoporfyrinu jako původce hnědého zbarvení skořápky.
- Dále byl prokázán na barvě vejce závislý vztah mezi koncentrací lysozymu v bílku a koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky. Zatímco u krémových a tmavě hnědých vajec koncentrace lysozymu v bílku rostla spolu s koncentrací protoporfyrinu v kutikule, u bílých vajec se s klesající koncentrací protoporfyrinu v kutikule koncentrace lysozymu v bílku zvyšovala. Tato prokázaná interakce by mohla podporovat hypotézu o existenci trade-off, kdy samice volí mezi investicí do nákladných pigmentů či proteinů v závislosti na efektivitě daných komponent v prostředí, ve kterém bude vejce inkubováno, tzn. typu hnízdění.

7. Literatura

- Ahmed, A. M., Rodriguez-Navarro, A. B., Vidal, M. L., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., Nys, Y.: Changes in eggshell mechanical properties, crystallographic texture and in matrix proteins induced by moult in hens.
Br. Poult. Sci., 46, 268–279, 2005
- Andersen, C.: Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis.
J. Endocrin., 173(2), 211-217, 2002
- Arias, J. L., Fink, D. J., Xiao, S. Q., Heuer, A. H., Caplan, A. I.: Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix.
Int. Rev. Cytol., 45, 217–250, 1993
- Assenmacher, I.: The peripheral endocrine glands.
Avian biology 3, 183-286, 1973
- Avilés, J. M., Parejo, D.: Nest defense by Iberian azure-winged magpies (*Cyanopica cyanus*): do they recognize the threat of brood parasitism?
Etho. Eco. Evo., 18 (4), 321 -333, 2006
- Avilés, J. M., Stokke, B. G., Moksnes, A., Røskaft, E., Møller, A. P.: Environmental conditions influence egg color of reed warblers *Acrocephalus scirpaceus* and their parasite, the common cuckoo *Cuculus canorus*.
Behav. Eco. Sociobiol., 61(3), 475-485, 2007
- Baron, F., Jan, S., Gonnet, F., Pasco, M., Jardin, J., Giudici, B., Gautier, M., Guérin-Dubiard, C., Nau, F.: Ovotransferrin plays a major role in the strong bactericidal effect of egg white against the *Bacillus cereus* group.
J. of Food Protect., 77 (6), 955–962, 2014
- Berry, W. D.: The physiology of induced molting.
Poult. Sci., 82, 971–980, 2003
- Board, R. G.: Microstructure, water resistance and water repellency of the pigeon eggshell.
Br. Poul. Sci., 15, 415-419, 1974
- Board, R. G., Tranter, H. S.: The microbiology of eggs.
Egg Science and Technology, 3rd ed., 75—96, 1986
- Bonisolì-Alquati, D. R.: Egg antimicrobials, embryo sex and chick phenotype in the yellow-legged gull.
Behav. Ecol. Sociobiol., 64, 845–855, 2010
- Bruce, J., Drysdale, E. M.: Trans-shell transmission.
In Microbiology of the Avian Egg. Boston, MA: Springer US, 63, 1994
- Burley, R. W., Vadehra, D. V.: The Avian Egg: Chemistry and Biology
New York, John Wiley, 1989
- Callewaert, L., Michiels, C. W.: Lysozymes in the animal kingdom.
J. Biosci., 35(1), 127–160, 2010
- Campo, J. L., Gil, M. G., Davila, S. G.: Differences among white, tinted and brown egg

- laying hens for incidence of eggs laid on the floor and for oviposition time.
Arch. Geflügelkd., 71, 105–109, 2007
- Cassey, P., Thomas, G. H., Portugal, S. J., Maurer, G., Hauber, M. E., Grim, T., Lovell, P. G., Mikšík, I.: Why are birds' eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds.
Bio. J. Lin. Soc., 106 (3), 657-672, 2012
- Cook, M. I., Beissinger, S. R., Toranzos, G. A., Rodriguez, G. A., Arendt, W. J.:
Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation?
Proceed. Royal Soc. London B, 270, 2233 - 2240, 2003
- Cook, M. I., Beissinger, S. R., Toranzos, G. A., Arendt, W. J.: Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection.
Ecol. Lett, 85, 532–537, 2005
- D'Alba, L., Shawkey, M. D., Korsten, P., Vedder, O., Kingma, S. A., Komdeur, J., Beissinger S.: Differential deposition of antimicrobial proteins in blue tit (*Cyanistes caeruleus*) clutches by laying order and male attractiveness.
Behav. Ecol. Sociobiol., 64, 1037–1045, 2010
- Dean, D. M., Jones, P. S., Sanders, M. M.: Regulation of the chicken ovalbumin gene by estrogen and corticosterone requires a novel DNA element that binds a labile protein, Chirp-1.
Mol. Cell. Biol., 16, 2015–2024, 31, 1996
- Deeming, D. C.: Avian Incubation: Behaviour, Environment and Evolution.
New York, Oxford University Press, 2002
- Dennis, J. E., Xiao, S.- Q., Agarwal, M., Fink, D. J., Heuer, A. H., Caplan, A. I.:
Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn chickens (*Gallus gallus*).
J. Morphol., 228, 287-306, 1996
- Deviche, P., Breuner, C., Orchinik, M.: Testosterone, Corticosterone, and Photoperiod Interact to Regulate Plasma Levels of Binding Globulin and Free Steroid Hormone in Dark-Eyed Juncos, *Junco hyemalis*.
General and Comparative Endocrinology, 122(1), 67-77, 2001
- Dougherty, D. C., Sanders, M. M.: Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model.
Trends Endocrinol. Metab., 16, 414– 419, 2005
- Downing, J. A., Bryden, W. L.: Determination of corticosterone concentrations in egg albumen: A non-invasive test of stress in laying hens.
Physiol. Behav., 95, 381–387, 2008
- Duval, C., Cassey, P., Mikšík, I., Reynolds, S. J., Spencer, K. A.: Condition-dependent strategies of eggshell pigmentation: an experimental study of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Exper. Bio., 216 (4), 700-708, 2013
- Ericsson, M., Fallahsharoudi, A., Bergquist, J., Kushnir, M. M., Jensen, P.:
Domestication effects on behavioural and hormonal responses to acute stress

- in chickens.
Physiol. Behav., 133, 161–169, 2014
- Fargallo, J. A., López-Rull, I., Mikšik, I., Eckhardt, A., Peralta-Sánchez, J. M.: Eggshell pigmentation has no evident effects on offspring viability in common kestrels.
Evol. Eco., 28 (4), 627-637, 2014
- Fecheyr – Lippens, D. C., Igić, B.D'Alba, L., Hanley, D., Verdes, A., Holford, M., Waterhouse, G. I. N., Grim, T., Hauber, M. E., Shawkey, M. D.: The cuticle modulates ultraviolet reflectance of avian eggshells.
Bio. Open (2015) 4, 753-759, 2015
- Feister, U., Jäkel, E., Gericke, K.: Parameterization of Daily Solar Global Ultraviolet Irradiation.
Photochem. Photobiol., 76(3), 281-293, 2002
- Frankenberg, N., Moser, J., Jahn, D.: Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application
App. Microbio. Biotech., 63(2), 115-127, 2003
- Gautron, J., Hincke, M. T., Panhéleux, M., García-Ruiz, J. M., Boldicke, T., Nys, Y.: Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer.
Connect. Tissue Res. 42, 255–267, 2001
- Gautron, J., Murayama, E., Vignal, A., Morisson, M., McKee, M. D., Rehault, S., Labas, V., Belghazi, M., Vidal, M.-L., Nys, Y., Hincke, M. T.: Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins.
J. Biol. Chemistry, 282(8), 5273-5286, 2007
- Giansanti, F., Leboffe, L., Pitari, G., Ippoliti, R., Antonini, G.: Physiological roles of ovotransferrin.
Biochim. Biophys. Acta, 1820, 218–225, 2012
- Gill, F. B.: Ornithology.
 3rd ed. New York: W. H. Freeman, 2007, ISBN 978-0-7167-4983-7
- Gorchein, A., Lim, C. K., Cassey, P.: Extraction and analysis of colourful eggshell pigments using HPLC and HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry.
Biomed. Chromatogr., 23, 602-606, 2009
- Gosler, A. G., Barnett, P. R., Reynolds, S. J.: Inheritance and variation in eggshell patterning in the great tit *Parus major*.
Proceed. Royal Soc. B: Biol. Sci., 267, 2469–2473, 2000
- Gosler, A. G., Higham, J. P., Reynolds, S. J.: Why are birds' eggs speckled?
Ecol. Lett., 8(10), 1105-1113, 2005
- Gosler, A. G., Connor, O. R., Bonser, R. H. C.: Protoporphyrin and eggshell strength: preliminary findings from a passerine bird.
Avian Bio. Res., 4(4), 214-223, 2011
- Groothuis, T. G., Muller, W., von Engelhardt, N., Carere, C., Eising, C.: Maternal

- hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 329–352, 2005
- Guerin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F., Croguennec, T.: Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr., A*, 1090, 58–67, 2005
- Hanley, D., Grim, T., Cassey, P., Hauber, M. E.: Not so colourful after all: eggshell pigments constrain avian eggshell colour space. *Biol. Lett.*, 11 (5), 20150087, 2015
- Hammond, G.L.: Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends Endocrin. Metab.*, 6(9-10), 298-304, 1995
- Henriksen, R., Groothuis, T. G., Rettenbacher, S.: Elevated plasma corticosterone decreases yolk testosterone and progesterone in chickens: linking maternal stress and hormone-mediated maternal effects. *PLoS One*, 6, e23824, 2011
- Henriksen, R., Rettenbacher, S., T, G. G. G.: Maternal corticosterone elevation during egg formation in chickens (*Gallus gallus domesticus*) influences offspring traits, partly via prenatal undernutrition. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 191C, 83–91, 2013
- Hewiston, W. C.: Eggs of British birds. John Van Voorst, 1846
- Higham, J. P., Gosler, A. G.: Speckled eggs: water-loss and incubation behaviour in the great tit *Parus major*. *Oecologia*, 149(4), 561-570, 2006
- Hincke, M. T.: Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. *Connect. Tissue Res.*, 31, 227–233, 1995
- Hincke, M. T., Gautron, J., Panhéleux, M., García-Ruiz, J. M., McKee, M. D., Nys, Y.: Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix. *Mater. Biol.* 19, 443–453, 2000
- Hincke, M. T., Wellman-Labadie, O., McKee, M. D., Gautron, J., Nys, Y., Mann, K.: Biosynthesis and structural assembly of eggshell components. *Egg Biosci. Biotechnol.*, Chapter 2, Wiley, Hoboken, 97–128, 2008
- Charlton, B. R., Tiwary, A. K., Bickford, A. A., Filigenzi, M.: Acute depigmentation of fertile brown eggs in a commercial layer operation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17, 286–288, 2005
- Ibrahim, H. R., Kato, A., Kobayashi, K.: Antimicrobial effects of lysozyme against Gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2077–2082, 1991
- Ishikawa, S., Suzuki, K., Fukuda, E., Arihara, K., Yamato, Y., Mukai, T., Itoh, M.: Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Lett.*, 584(4), 770-774, 2010

- Jagannath, A., Shore, R. F., Walker, L. A., Ferns, P. N., Gosler, A. G.: Eggshell pigmentation indicates pesticide contamination.
J. Appl. Ecol., 45, 133-140, 2008
- Javůrková, V., Albrecht, T., Mrázek, J., Kreisinger, J.: Effect of intermittent incubation and clutch covering on the probability of bacterial trans-shell infection.
IBIS, 156 (2), 374-386, 2014
- Kilner, R. M.: The evolution of egg colour and patterning in birds.
Biol. Rev., 81(3), 383-406, 2006
- Kim, J., Choi, Y. - H.: Differential abundance of egg white proteins in laying hens treated with corticosterone.
J. Agric. Food Chem., 62, 12346–12359, 2014
- Lahti, D. C.: Population differentiation and rapid evolution of egg colour in accordance with solar radiation.
The Auk, 125 (4), 796-802, 2008
- Le Bouc, Y., Groyer, A., Cadepond, F., Groyer-Schweizer, G., Robel, P., Baulieu, E. E.: Effects of progesterone and tamoxifen on glucocorticosteroid-induced egg-white protein synthesis in the chick oviduct.
Endocrinology, 116, 2384–2392, 1985
- Lock, J. L., Board, R. G.: Persistence of contamination of hen's egg albumen in vitro with *Salmonella* serotypes.
Epidemiol. Infect., 108, 389–396, 1992
- Mahler, B., Confalonieri, V. A., Lovette, I. J., Reboreda, J. C.: Eggshell spotting in brood parasitic shiny cowbirds (*Molothrus bonariensis*) is not linked to the female sex chromosome.
Behav. Ecol. Sociobiol., 62(7), 2008
- Malisch, J. L., Breuner, C. W.: Steroid-binding proteins and free steroids in birds.
Mol. Cell, Endocrin., 316(1), 42-52, 2010
- Mann, K., Maček, B., Olsen, J. V.: Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer.
Proteomics, 6, 3801–3810, 2006
- Mann, K., Olsen, J. V., Maček, B., Gnad, F., Mann M.: Identification of new chicken egg proteins by mass spectrometry-based proteomic analysis.
World's Poul. Sci. J., 64, 209–218, 2008
- Mann, K., Mann, M.: In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos.
Proteome Sci., 9, 7, 2011
- Martínez de la Puente, J., Merino, S., Moreno, J., Tomas, G., Morales, J., Lobato, E., García- Fraile, S., Martínez, J.: Are eggshell spottiness and colour indicators of health and condition in blue tits *Cyanistes caeruleus*?
J. Avian Biol., 38(3), 377-384, 2007
- Miguel, M. A. M.: Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods.
Eur. Food Res. Technol., 221, 542–546, 2005

- Miyagawa, S., Matsumoto, K., Kamata, R., Okamura, R., Maeda, H.: Spreading of *Serratia marcescens* in experimental keratitis and growth suppression by chicken egg white ovomacroglobulin.
Japan. J. Ophthal., 35, 402–410, 1991
- Mikšík, I., Holán, V., Deyl, Z.: Avian eggshell pigments and their variability.
Comp. Biochem. Physiol., 113B, 607-612, 1996
- Mikšík, I., Sedláková, P., Mikulíková, K., Eckhardt, A.: Proteins of insoluble matrix of avian (*Gallus gallus*) eggshell.
Connect. Tissue Res., 48, 1–8, 2007
- Mikšík, I., Sedláková, P., Lacinová, K., Pataridis, S., Eckhardt, A.: Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins.
Anal Bioanal Chem, 397, 205-214, 2010
- Mikšík, I., Ergang, P., Pácha, J.: Proteomic analysis of chicken eggshell chicken membrane layer.
Anal. Bioanal. Chem., 406, 7633-7640, 2014
- Morales, J., Velando, A., Torres, R.: Biliverdin-based egg coloration is enhanced by carotenoid supplementation.
Behav. Ecol. Sociobiol., 65, 197-203, 2011
- Moreno, J., Osorno, J. L.: Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality?
Ecol. Lett., 6, 803–806, 2003
- Navara, K. J., Pinson, S. E.: Yolk and albumen corticosterone concentrations in eggs laid by white versus brown caged laying hens.
Poul. Sci., 89, 1509–1513, 2010
- Nys, Y., Hincke, M. T., Arias, J. L., Garcia-Ruiz, J. M., Solomon, S. E.: Avian eggshell mineralization.
Poul. Avian. Biol. Rev., 10, 143–166, 1999
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., Hincke, M. T.: Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins.
C. R. Palevol., 3, 549–562, 2004
- Okuliarová, M., Šarníková, B., Rettenbacher, S., Škrobanek, P., Zeman, M.: Yolk testosterone and corticosterone in hierarchical follicles and laid eggs of Japanese quail exposed to long-term restraint stress.
Gener. Comp. Endocrinol., 165, 91–96, 2010
- Österström, O., Lilja, C.: Evolution of Avian Eggshell Structure.
J. Morphol., 273, 241–247, 2012
- Palmiter, R. D., Mulvihill, E. R., Shepherd, J. H., McKnight, G. S.: Steroid hormone regulation of ovalbumin and conalbumin gene transcription. A model based upon multiple regulatory sites and intermediary proteins.
Biol. Chem., 10, 256(15), 7910-6, 1981
- Pitk, M., Tilgar, V., Kilgas, P., Mänd, R.: Acute stress affects the corticosterone level in bird eggs: A case study with great tits (*Parus major*)
Hormon. Behav., 62, 475–479, 2012

- Polačiková, L., Procházka, P., Cherry, M. I., Honza, M.: Choosing suitable hosts: common cuckoos *Cuculus canorus* parasitize great reed warblers *Acrocephalus arundinaceus* of high quality.
Evol. Eco., 23(6), 879-891, 2009
- Quillfeldt, P., Poisbleau, M., Parenteau, C., Trouvé, C., Demongin, L., van Noordwijk, H. J., Möstl, E.: Measuring corticosterone in seabird egg yolk and the presence of high yolk gestagen concentrations.
Gener. Compar. Endocrinol., 173, 11–14, 2011
- Rehault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Herve-Grepinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M. C., Brionne, A., Poirier, J. C., Gautron, J., Coste, F., Nys, Y.: Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities.
J. Biol. Chem., 288, 17285–17295, 2013
- Rettenbacher, S., Möstl, E., Groothuis, T. G. G.: Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs.
Gener. Compar. Endocrinol., 164, 125–129, 2009
- Rose, M. L. H., Hincke, M. T.: Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins.
Cell. Mol. Life Sci., 66, 2707–2719, 2009
- Rose-Martel, M., Du, J., Hincke, M. T.: Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle.
J. Proteom., 75, 2697-2706, 2012
- Royo, F., Mayo, S., Carlsson, H. - E., Hau, J.: Egg Corticosterone: A Noninvasive Measure of Stress in Egg-laying Birds.
J. Avian Med. Surg., 22(4), 310-314, 2008
- Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Ferrari, R. P., Martinelli, R., Galeotti, P., Fasola, M., Saino, N.: Effects of elevated egg corticosterone levels on behaviour, growth and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks.
Horm. Behav., 47, 592–605, 2005
- Ruiz, J., Lunam, C. A.: Ultra structural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders.
Br. Poul. Sci., 41, 584–92, 2000
- Saino, N., Dall'ara, P., Martinelli, R., Moller, A. P.: Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow.
J. Evol. Biol., 15, 735–743, 2002
- Saino, N., Romano, M., Ferrari, R. P., Martinelli, R., Møller, A. P.: Stressed mothers lay eggs with high corticosterone levels which produce low-quality offspring.
J. Exp. Zool., Part A, 303, 998– 1006, 2005

- Saino, R. M.: Maternal immune factors and the evolution of secondary sexual characters.
Behav. Ecol., 18, 513–520, 2007
- Samiullah, S., Roberts, J. R.: The location of protoporphyrin in the eggshell of brown-shelled eggs.
Poul. Sci., 92, 2783–2788, 2013
- Sandor, T.: Corticosteroids in Amphibia, Reptilia and Aves.
In Steroids in Nonmammalian Vertebrates, Elsevier, 253, 1972
- Scott, T. A., Silversides, F. G.: The effect of storage and strain of hen on egg quality.
Poul. Sci., 79, 1725–1729, 2000
- Shafey, T. M.: Effect of lighted incubation on embryonic growth and hatchability performance of two strains of layer breeder eggs.
Br. Poul. Sci., 45(2), 223-229, 2004
- Shawkey, M. D., Kosciuch, K. L., Liu, M., Rohwer, F. C., Loos, E. R., Wang, J. M., Beissinger, S. R.: Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs?
Behav. Ecol., 19, 920–927, 2008
- Shawkey, M. D., Firestone, M. K., Brodie, E. L., Beissinger, S. R.: Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs.
PLoS One, 4, 2009
- Schwabl, H.: Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth.
Compar. Biochem. Physiol. Part A: Physiology, 114 (3), 271-276, 1996
- Schwabl, H., Holmes, D., Strasser, R., Scheuerlein, A.: Embryonic exposure to maternal testosterone influences age-specific mortality patterns in a captive passerine bird.
Age (Dordr.), 34(1), 87–94, 2012
- Smolelis, A. N., Hartsell, S. E.: Occurrence of lysozyme in bird egg albumins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76, 455, 1951
- Soh, T., Koga, O.: The effect of progesterone and estradiol-17 beta on the pigment accumulation of the shell gland in Japanese quail pretreated with aminoglutethimide.
J. Faculty Agricul. Kyushu University, 42, 147-150, 1997
- Sosvorova, L., Vitku, J., Chlupacova, T., Mohapl, M., Hampl, R.: Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS.
Steroids, 98, 1-8, 2015
- Sotherland, P. R., Rahn, H.: On the Composition of Bird Eggs.
The Condor, 89, 48–65, 1987
- Sparks, N. H. C., Board, R. G.: Cuticle, shell porosity and water intake through hen's eggshells.
Br. Poul. Sci., 25, 267–276, 1984
- Sparks, N. H. C.: Eggshell pigments - from formation to deposition.
Avian Biol. Res., 4 (4), 162–167, 2011

- Stevens, L.: Mini - review, eggwhite proteins.
Comp. Biochem. Physiol., 100, 1–9, 1991
- Verhoef-Verhallen, E., Rijs, A.: Slepice: praktická encyklopedie
Praha: Rebo Production, 2013, ISBN: 9788025507223 2. vyd. 20130226
- Von Engelhardt, N., Groothuis, T. G. G.: Measuring steroid hormones in avian eggs.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1046, 181–192, 2005
- Wallace, A. R.: Darwinism: an Exposition on the Theory of Natural Selection.
London, UK: Macmillan, 1890
- Wang, X. T., Zhao, C. J., Li, J. Y., Xu, G. Y., Lian, L. S., Wu, C. X., Deng, X. M.:
Comparison of the total amount of eggshell pigments in Dongxiang
brownshelled eggs and Dongxiang blue-shelled eggs.
Poul. Sci., 88, 1735-1739, 2009
- Wang, Z., Qu, L., Yao, J., Yang, X., Li, G., Zhang, Y., Li, J., Wang, X., Bai, J., Xu, G.,
Deng, X., Yang, N., Wu, C., Barsh, G. S.: An EAV-HP Insertion in 5' Flanking
Region of SLC01B3 Causes Blue Eggshell in the Chicken.
PLoS Genetics, 9(1), 1003183-1-24
- Wellman-Labadie O., Picman J., Hincke M. T.: Comparative antibacterial activity of
avian egg white protein extracts.
Br. Poul. Sci., 49, 125-132, 2008a
- Wellman-Labadie, O., Picman, J., Hincke, M. T.: Antimicrobial activity of cuticle and
outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds.
Br. Poul. Sci., 49 (2), 133—143, 2008b
- Wesierska, E., Saleh, Y., Trziszka, T., Kopec, W., Siewinski, M., Korzekwa, K.:
Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin.
World J. Microbiol. Biotech., 21, 59–64, 2005
- Xing, J., Wellman-Labadie, O., Gautron, J., Hincke, M. T.: Recombinant eggshell
ovocalyxin-32.
Comp. Biochem. Physiol. B, 147, 172–177, 2007
- Zheng, Ch., Li, Z., Yang, N., Ning, Z.: Quantitative expression of candidate genes
affecting eggshell color.
Animal Sci. J., 85, 506-510, 2014

Elektronické zdroje

<http://www.poultryhub.org/physiology/the-avian-egg/>

http://www.chovsedlak.estranky.cz/fotoalbum/ko-shamo_ko-samo/Dokumenty/bojovnice-ko-samo-stribrne-psenicna.jpg.html

<http://www.zoofarma.cz/drubez/ceska-slepice-v-zahranici.htm>

<http://www.faranda.websnadno.cz/--Lysa-nad-Labem.html>

<http://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/7472/japonky-cabo/>

Přílohy

Příloha 1: Tabulky ředění.....	79
Příloha 2: Plný zobecněný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku v závislosti na barvě skořápky, plemenu a objemu vejce, roku sběru data a chovateli	81
Příloha 3: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku v závislosti na barvě skořápky.....	81
Příloha 4: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku v závislosti na barvě skořápky.....	81
Příloha 5: Box plot koncentrací lysozymu v bílcích u všech testovaných plemen.	82
Příloha 6: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku v závislosti na barvě skořápky, plemenu a objemu vejce, roku sběru dat a chovateli.....	83
Příloha 7: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku v závislosti na barvě skořápky a objemu vejce ..	83
Příloha 8: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku v závislosti na barvě skořápky a objemu vejce ..	83
Příloha 9: Box plot koncentrací ovotransferinu v bílcích u všech testovaných plemen.	84
Příloha 10: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky, roku sběru dat a chovateli.....	85
Příloha 11: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky, roku sběru dat a chovateli.....	85
Příloha 12: Průměrné hodnoty reflektance v oblasti UV spektra v závislosti na barvě skořápky.....	86
Příloha 13: Plný model testující vztah mezi koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky, koncentrací bílkových proteinů, barvy skořápky a objemu vejce.....	86

Příloha 14: Plný model testující vztah mezi koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky a koncentrací hormonů obsažených v bílku	87
Příloha 15: Plný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku a koncentracemi hormonů obsažených v bílku.....	87
Příloha 16: Plný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku a koncentracemi hormonů obsažených v bílku.....	88
Příloha 17: Pairs grafy znázorňující korelační vztahy mezi vysvětlovanou proměnnou (koncentrací ovotransferinu a vysvětlujícími proměnnými	88
Příloha 18: Pairs grafy znázorňující korelační vztahy mezi vysvětlovanou proměnnou	89
Příloha 19: Struktura skořápky.....	90
Příloha 20: Přehled studovaných plemen kura domácího a barvy jejich vajec.....	92

Příloha 1: Tabulky ředění

Tabulka 2: Diluční řada pro standard A

číslo zkumavky	výsledná koncentrace (mg/ml)	postup ředění
1	30	165 µl standardu A + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
2	20	110 µl standardu A + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
3	15	110 µl ze zkumavky 1 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
4	10	110 µl ze zkumavky 2 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
5	5	110 µl ze zkumavky 4 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
6	2,5	110 µl ze zkumavky 5 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
7	1	88 µl ze zkumavky 6 + 132 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
8	0,5	110 µl ze zkumavky 7 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
9	0,25	110 µl ze zkumavky 8 + 110 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
10	0,15	66 µl ze zkumavky 9 + 44 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
11	0,1	2 µl ze zkumavky 3 + 298 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution

Tabulka 3: Diluční řada pro standard B

číslo zkumavky	výsledná koncentrace (mg/ml)	postup ředění
1	30	165 µl standardu A + 55 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
2	20	110 µl standardu A + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
3	15	110 µl ze zkumavky 1 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
4	10	110 µl ze zkumavky 2 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
5	5	110 µl ze zkumavky 4 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
6	2,5	110 µl ze zkumavky 5 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
7	1	88 µl ze zkumavky 6 + 132 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
8	0,5	110 µl ze zkumavky 7 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
9	0,25	110 µl ze zkumavky 8 + 110 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
10	0,15	66 µl ze zkumavky 9 + 44 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol
11	0,1	2 µl ze zkumavky 3 + 298 µl ROZTOKU EDTA/Mercaptoethanol

Tabulka 4: Diluční řada pro analýzu ovotransferinu

číslo zkumavky	výsledná koncentrace (mg/ml)	postup ředění
1	30	82,5 µl standardu A + 27,5 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
2	20	55 µl standardu A + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
3	15	55 µl ze zkumavky 1 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
4	10	55 µl ze zkumavky 2 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
5	5	55 µl ze zkumavky 4 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
6	2,5	55 µl ze zkumavky 5 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
7	1	44 µl ze zkumavky 6 + 66 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
8	0,5	55 µl ze zkumavky 7 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
9	0,25	55 µl ze zkumavky 8 + 55 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
10	0,15	66 µl ze zkumavky 9 + 44 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution
11	0,1	2 µl ze zkumavky 3 + 298 µl ROZTOKU 1 - bez Iron standard solution

Příloha 2: Plný zobecněný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky, plemenu a objemu vejce, roku sběru data a chovateli (GLM; N = 380)

	Sum. sq.	Mean sq.	F - value	p - value	Signif. code
barva skořápky	0,44182	0,110455	18,2387	1,572e-13	***
plemeno	0,95393	0,050207	8,2903	< 2,2e-16	***
objem vejce	0,00457	0,004571	0,7548	0,3856	
rok	0,12940	0,064700	10,6834	3,209e-05	***
chovatel	0,45068	0,016096	2,6578	2,100e-05	***

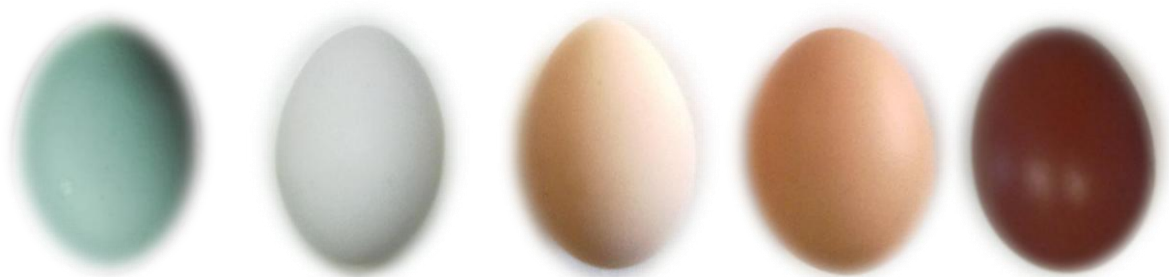
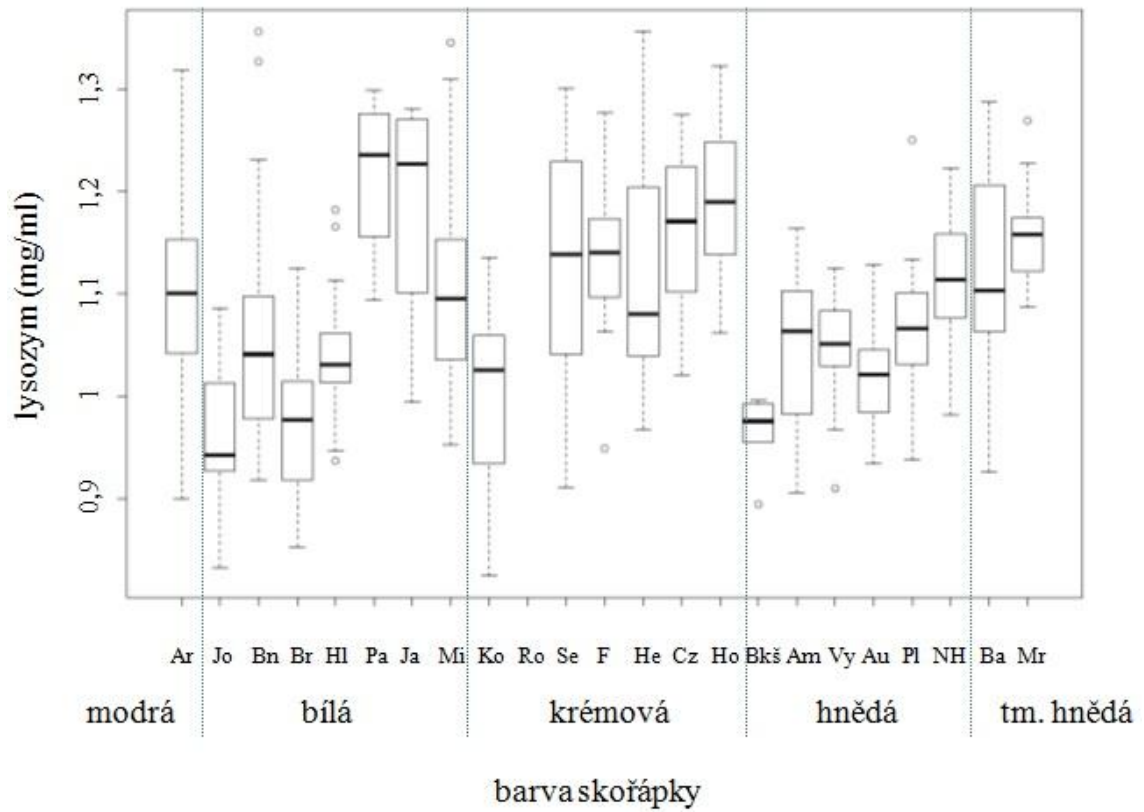
Příloha 3: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky (GLMM; N = 359, random efekt= ~1|rok/chovatel)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0620845	0,03471705	30,592591	0,0000
barva skořápky hnědá	0,0024325	0,01955255	0,124411	0,9011
barva skořápky krémová	0,0491179	0,02163446	2,270357	0,0239
barva skořápky modrá	0,0415947	0,03226222	1,289268	0,1983
barva skořápky tmavě hnědá	0,0740582	0,02537080	2,919033	0,0038

Příloha 4: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky (GLMM; N = 359, random efekt= ~1|rok/chovatel/plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0558798	0,03631902	29,072364	0,0000
barva skořápky hnědá	0,0044399	0,02423361	0,183213	0,8618
barva skořápky krémová	0,0550700	0,02339142	2,354281	0,0652
barva skořápky modrá	0,0516104	0,03995014	1,291869	0,2529
barva skořápky tmavě hnědá	0,0872065	0,02934338	2,971932	0,0311

Příloha 5: Box plot (medián + 25% a 75% kvantil) koncentrací lysozymu (mg/ml) v bílcích u všech testovaných plemen. Hodnoty koncentrace lysozymu jsou zobrazeny na logaritmické škále



Příloha 6: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky, plemenu a objemu vejce, roku sběru dat a chovateli (GLM; N = 256)

	Sum. sq.	Mean sq.	F - value	p - value	Signif. code
barva skořápky	3,4792	0,86979	10,8183	5,760e-08	***
plemeno	4,8897	0,25736	3,2009	2,065e-05	***
objem vejce	0,3931	0,39315	4,8899	0,028136	*
rok	0,9138	0,45688	5,6826	0,003972	**
chovatel	1,7248	0,06388	0,7945	0,756172	

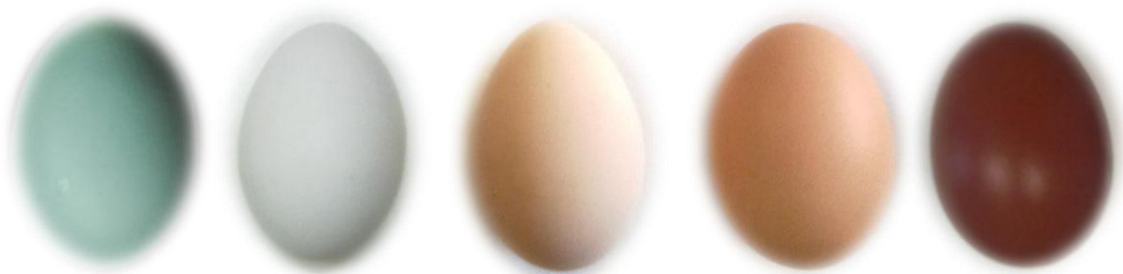
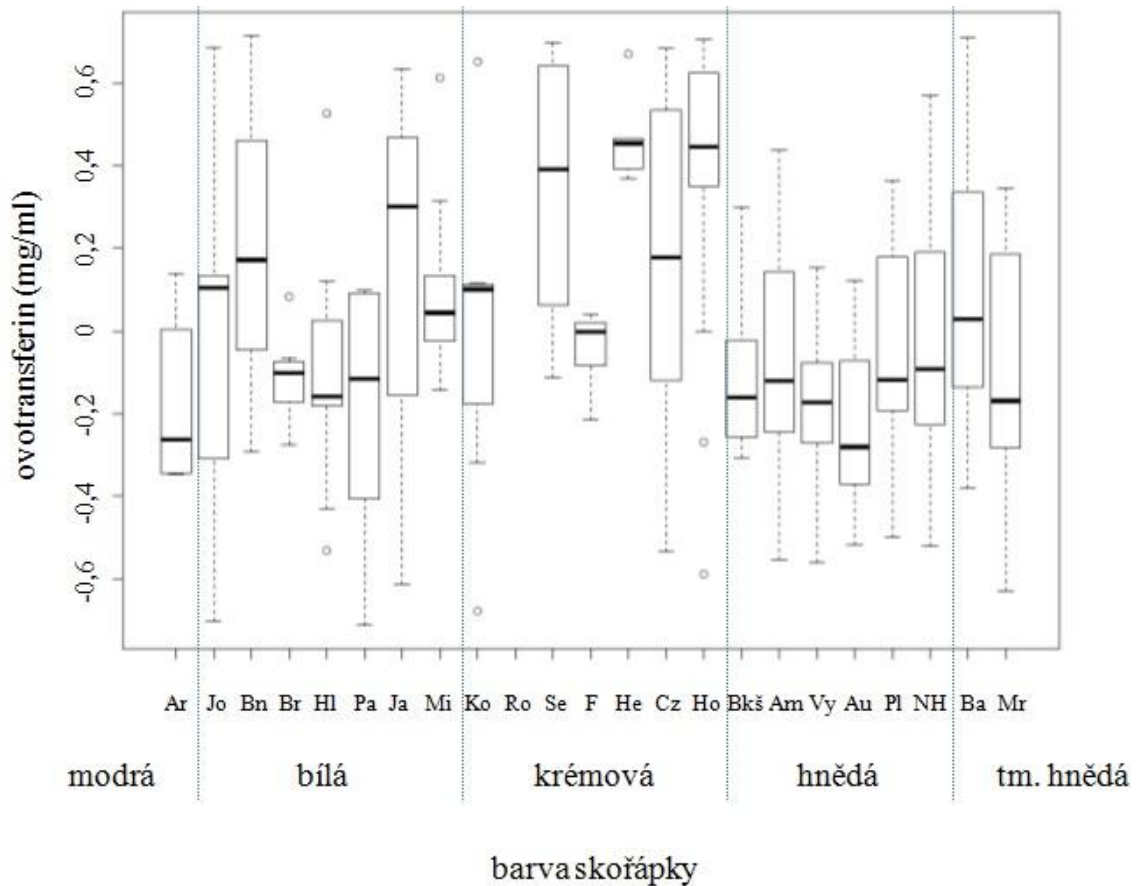
Příloha 7: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky a objemu vejce (GLMM; N = 256, random efekt = ~1|rok)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,13991205	0,14765381	0,9475682	0,3443
barva skořápky hnědá	0,03433417	0,05686188	0,6038170	0,5465
barva skořápky krémová	0,10239126	0,04950065	2,0684832	0,0396
barva skořápky modrá	-0,14112559	0,09789300	-1,4416311	0,1507
barva skořápky tmavě hnědá	0,06780065	0,07590067	0,8932813	0,3726
objem vejce	-0,00000371	0,00000203	-1,8291380	0,0686

Příloha 8: Plný zobecněný lineární model se smíšenými efekty testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na barvě skořápky a objemu vejce (GLMN; N = 256, random efekt = ~1|rok/plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,13943666	0,15277357	0,9127015	0,3624
barva skořápky hnědá	0,03419083	0,06733305	0,5077867	0,6157
barva skořápky krémová	0,11129533	0,05740182	1,9388815	0,0630
barva skořápky modrá	-0,14108462	0,10941913	-1,2893963	0,2082
barva skořápky tmavě hnědá	0,07508162	0,08788113	0,8543543	0,4004
objem vejce	-0,00000380	0,00000227	-1,6729875	0,0957

Příloha 9: Box plot (medián + 25% a 75% kvantil) koncentrací ovotransferinu (mg/ml) v bílích u všech testovaných plemen. Hodnoty koncentrace ovotransferinu jsou zobrazeny na logaritmické škále



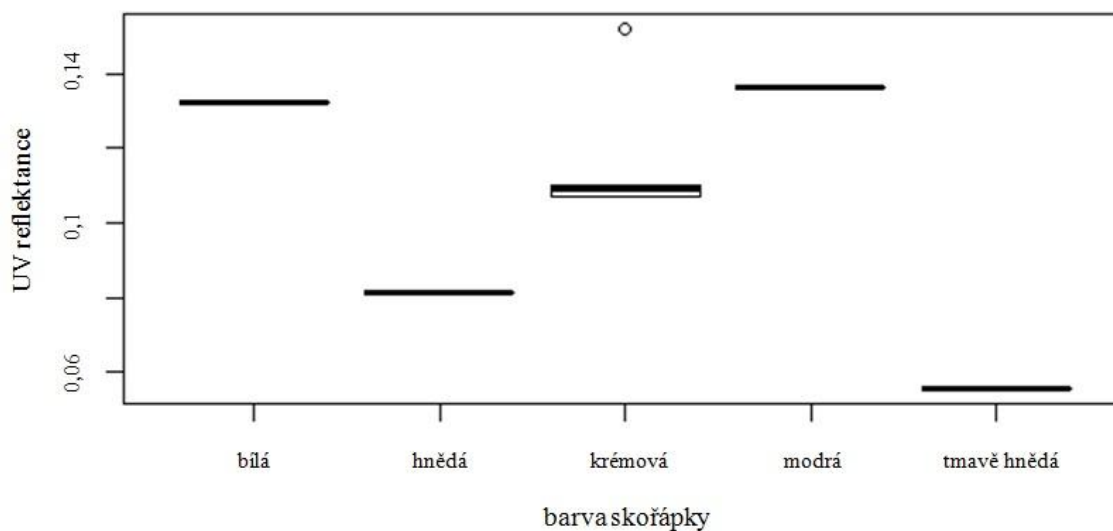
Příloha 10: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku (mg/ml) v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky, roku sběru dat a chovateli (GLM; N = 148)

	Sum. sq.	Mean sq.	F - value	p - value	Signif. code
total reflectance (R)	0,00704	0,007045	0,9436	0,333292	
blue - green chroma (BGC)	0,01883	0,018827	2,5217	0,114902	
red chroma (RC)	0,01165	0,011651	1,5606	0,213990	
UV chroma	0,00044	0,000443	0,0593	0,807950	
rok	0,18852	0,094260	12,6251	1,048e-05	***
chovatel	0,44862	0,022431	3,0044	0,000105	***

Příloha 11: Plný lineární zobecněný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku (mg/ml) v závislosti na spektrofotometrických parametrech skořápky, roku sběru dat a chovateli (GLM; N = 148)

	Sum. sq.	Mean sq.	F - value	p - value	Signif. code
total reflectance (R)	0,4107	0,41074	3,9524	0,050609	.
blue - green chroma (BGC)	0,0055	0,00549	0,0528	0,818941	
red chroma (RC)	0,0154	0,01545	0,1486	0,700967	
UV chroma	0,8823	0,88229	8,4898	0,004755	**
rok	2,7597	1,37987	13,2778	1,234e-05	***
chovatel	1,7464	0,09702	0,9336	0,542586	

Příloha 12: Průměrné hodnoty reflektance v oblasti UV spektra v závislosti na barvě skořápky. Hodnoty reflektance jsou zobrazeny na logaritmické škále



Příloha 13: Plný model testující vztah mezi koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky, koncentrací bílkových proteinů, barvy skořápky a objemu vejce (GLMM; N = 43, random efekt = ~1|plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	4,162296	1,987434	2,0943061	0,0549
lysozym	-3,641414	1,875494	-1,9415755	0,0742
ovotransferin	-0,160539	0,503381	-0,3189226	0,7549
barva skořápky hnědá	-0,372350	4,539940	-0,0820164	0,9358
barva skořápky krémová	-6,555054	2,598066	-2,5230515	0,0244
barva skořápky modrá	12,742073	9,603455	1,3268218	0,2058
barva skořápky tmavě hnědá	-11,299374	5,692869	-1,9848292	0,0671
objem vejce	-0,099497	0,205416	-0,4843677	0,6362
lysozym : barva skořápky hnědá	1,755432	4,267069	0,4113905	0,6875
lysozym : barva skořápky krémová	6,471991	2,405881	2,6900709	0,0185
lysozym : barva skořápky modrá	-9,864568	7,907362	-1,2475168	0,2342
lysozym : barva skořápky tmavě hnědá	12,223801	5,330711	2,2930903	0,0392
ovotransferin : barva skořápky hnědá	0,826196	1,256139	0,6577268	0,5222
ovotransferin : barva skořápky krémová	-0,277738	0,742168	-0,3742253	0,7143
ovotransferin : barva skořápky modrá	2,289787	3,445402	0,6645923	0,5179
ovotransferin : barva skořápky tmavě hnědá	-1,894688	1,547709	-1,2241884	0,2426

Příloha 14: Plný model testující vztah mezi koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky a koncentrací hormonů obsažených v bílku (GLMM; N = 47, random efekt = ~ 1 |plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	0,9399860	0,2089871	4,497817	0,0003
progesteron	0,0365515	0,1861417	0,196364	0,8471
testosteron	0,0543835	0,2050847	0,265176	0,7947
17 hydroxypregnenolon	-0,0751108	0,1561449	-0,481033	0,6379
pregnenolon	-0,0166941	0,1501390	-0,111191	0,9130
progesteron : testosteron	0,5510911	0,4594399	1,199485	0,2502
progesteron : 17 hydroxypregnenolon	0,1189879	0,2828417	0,420687	0,6804
progesteron : pregnenolon	-0,0495416	0,1486156	-0,333354	0,7438
testosteron : 17 hydroxypregnenolon	-0,0839576	0,1655785	-0,507056	0,6200
testosteron : pregnenolon	0,2112264	0,2322874	0,909332	0,3786
17 hydroxypregnenolon : pregnenolon	0,3517975	0,2441316	1,441016	0,1716

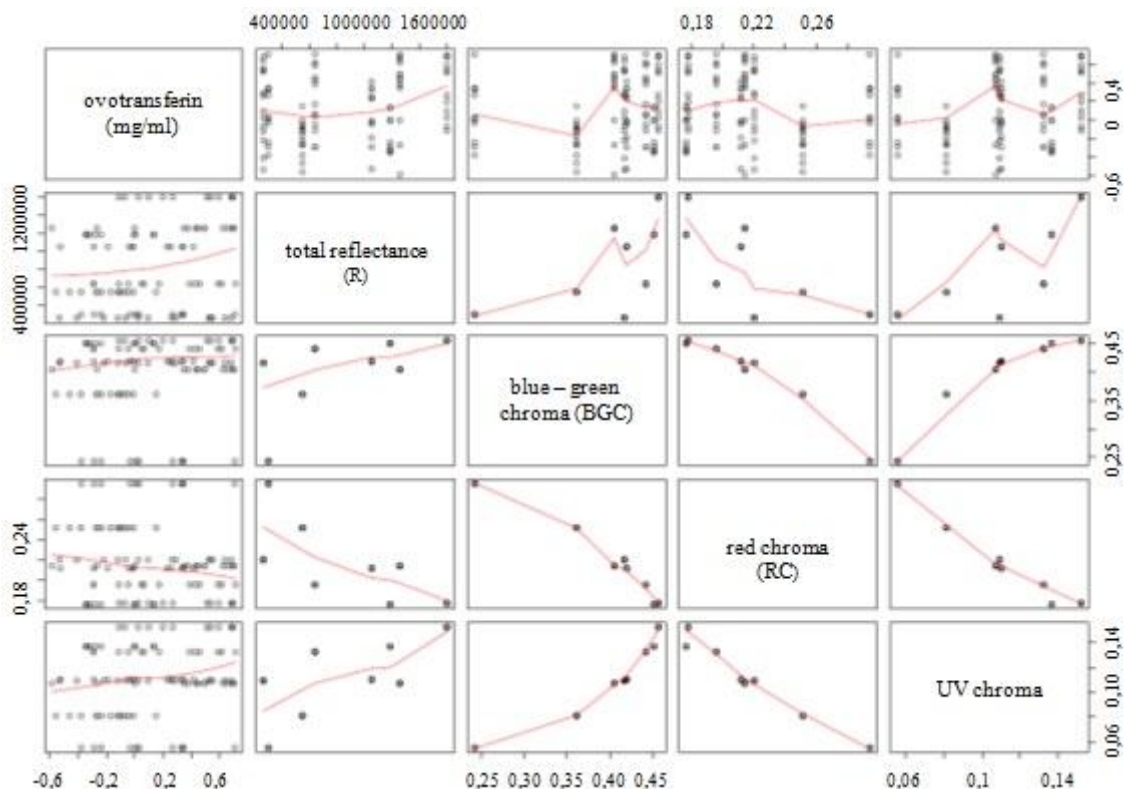
Příloha 15: Plný model testující vztah mezi koncentracemi ovotransferinu v bílku a koncentracemi hormonů obsažených v bílku (GLMM; N = 43, random efekt = ~ 1 |plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	-0,03542681	0,05265430	-0,6728189	0,5092
17 hydroxypregnenolon	-0,10747440	0,05510889	-1,9502189	0,0661
pregnenolon	0,06109600	0,05686978	1,0743140	0,2961
testosteron	0,06445776	0,05388897	1,1961216	0,2464
progesteron	0,04663472	0,05494586	0,8487396	0,4066

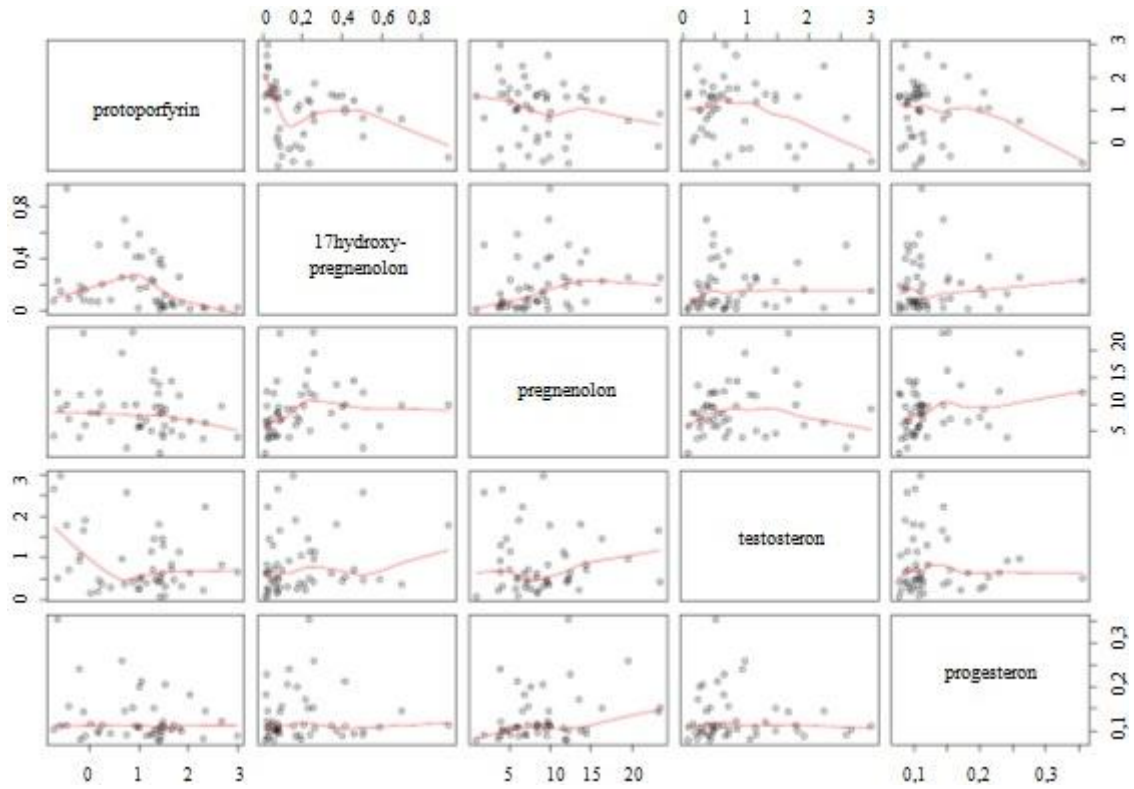
Příloha 16: Plný model testující vztah mezi koncentracemi lysozymu v bílku a koncentracemi hormonů obsažených v bílku (GLMM; N = 43, random efekt = ~1|plemeno)

	Value	Std. error	t - value	p - value
intercept	1,0951726	0,01482034	73,89658	0,0000
17 hydroxypregnenolon	0,0341624	0,01551122	2,20243	0,0402
pregnenolon	-0,0593815	0,01600685	-3,70975	0,0015
testosteron	0,0563960	0,01516786	3,71813	0,0015
progesteron	0,0117665	0,01546534	0,76083	0,4561

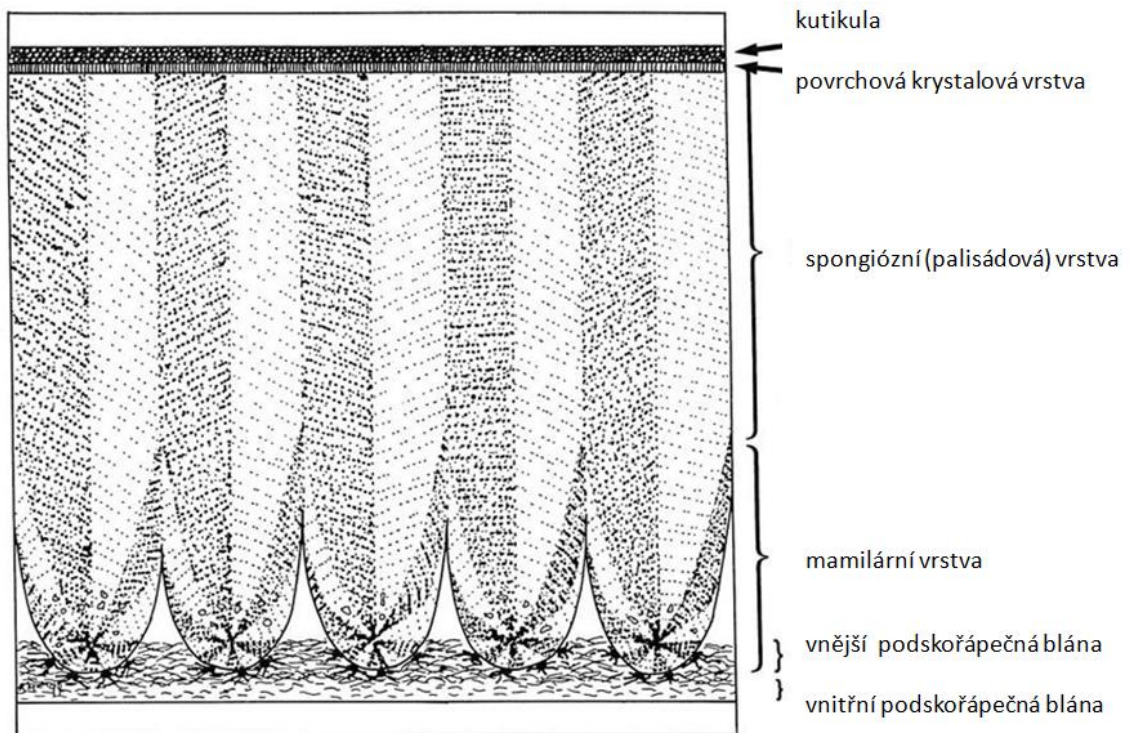
Příloha 17: Pairs grafy znázorňující korelační vztahy mezi vysvětlovanou proměnnou (koncentrací ovotransferinu a vysvětlujícími proměnnými (hodnotami reflektance skořápky)



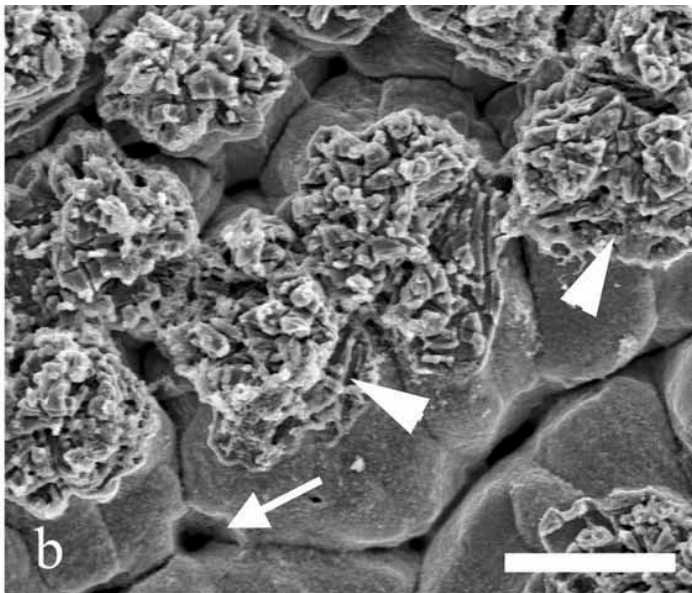
Příloha 18: Pairs grafy znázorňující korelační vztahy mezi vysvětlovanou proměnnou (koncentrací protoporfyrinu v kutikulární vrstvě skořápky) a vysvětlujícími proměnnými (androgenními hormony)



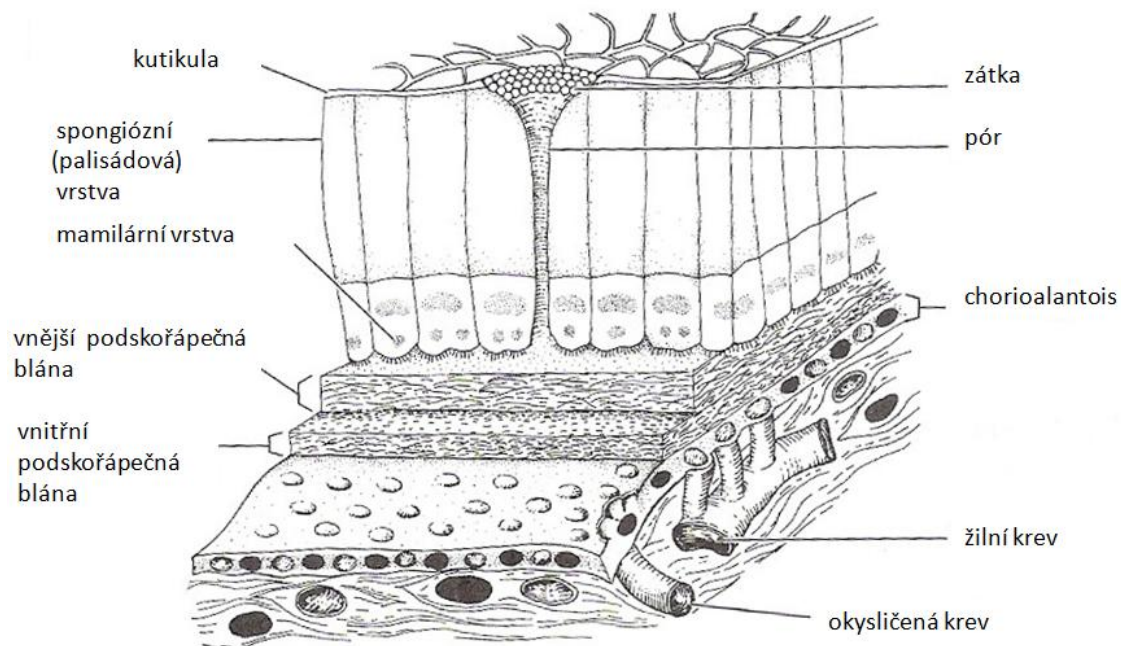
Příloha 19: Struktura skořápky



Obr. 4: Struktura ptačí skořápky. (<http://www.poultryhub.org/physiology/the-avian-egg/>)



Obr. 5: Mamilární vrstva skořápky s mamilárními špičkami (Δ), mezimamilárním prostorem a póry (\rightarrow). Převzato z Österström a Lilja, 2012.









Obr. 6: Kanály póru umožňují výměnu plynu přes skořápku. Kyslík vstupuje do vejce přes póry v kutikule a prochází přes sloupce krystalů do propustných podskořápečných blan. Oxid uhličitý a vodní pára unikají do vnějšího prostředí skrze ty samé póry. Cévy kapilárního řečiště chorioalantoinu spojují vyvíjející se embryo s touto cestou výměny plynu. Převzato a upraveno podle Gill, 2007.

Příloha 20: Přehled studovaných plemen kura domácího a barvy jejich vajec
Obrázky plemen byly většinou převzaty a upraveny dle Verhoef-Verhallen a Rijs (2013). Výjimky uvedeny u dílčích tabulek níže. Fotografie vajec pochází z vlastní dokumentace sběru materiálu. Průměrné rozměry vajec jednotlivých plemen reprezentují průměrné hodnoty vzorků zapojených do výzkumu








Tabulka 24: Přehled studovaných plemen I

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
<p>araukana - ocasatá v.</p> 	<p>modrozelená</p> 	<p>39,75</p>	<p>54,2</p>
<p>amrokska</p> 	<p>hnědá</p> 	<p>42,63</p>	<p>56,95</p>
<p>australka</p> 	<p>hnědá</p> 	<p>43,72</p>	<p>59,01</p>







Tabulka 25: Přehled studovaných plemen II

Fotografie vejce bojovnice šamo a jeho průměrné rozměry nejsou k dispozici.

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
bantamka - černé z. 	bílá 	33,63	45,27
barneveldka - dvojjemované z. 	tmavě hnědá 	42,47	56,25
bojovnice šamo - bílé z. 	hnědá	-	-







Tabulka 26: Přehled studovaných plemen III

Obrázek bojovnice ko šamo byl převzat a upraven dle http://www.chovsedlak.estranky.cz/fotoalbum/ko-shamo_ko-samo/Dokumenty/bojovnice-ko-samo-stribrne-psenicna.jpg.html. Obrázek české zlaté kropenky převzat z <http://www.zoofarma.cz/drubez/ceska-slepice-v-zahranici.htm>.

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
bojovnice ko šamo - stříbrně pšeničné z. 	světle hnědá 	35,57	48,79
brabantka - černé z. 	bílá 	40,93	53,41
česká slepice - zlatá kropenatá v. 	krémová až světle hnědá 	41,87	56,34

Tabulka 27: Přehled studovaných plemen IV







Obrázek fénixky zdrobnělé oranžovokrké převzat a upraven z <http://www.faranda.websnadno.cz/--Lysa-nad-Labem.html>.

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
fénixka - zdrobnělá oranžovokrká v. 	krémová až světle hnědá 	37,12	50,03
hedvábníčka - v. s vousem, bílé z. 	světle hnědá 	37,29	50,14
hempširka 	hnědá 	42,73	57,55







Tabulka 28: Přehled studovaných plemen V

Obrázek japonky čabo byl převzat a upraven z







<http://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/7472/japonky-cabo/>

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
holand'anka - zdrobnělá v. 	bílá 	36,47	50,59
holokrčka - zdrobnělá v. 	krémová až téměř bílá 	37,98	51,61
japonka čabo - hladká žlutá v. s černým ocasem 	bílá 	34,01	44,64



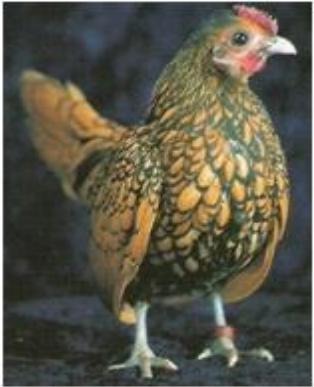



Tabulka 29: Přehled studovaných plemen VI

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
<p>jokohamka</p> 	<p>slonovinová kost</p> 	36,81	49,35
<p>kočinka - bílé z.</p> 	<p>krémová až světle hnědá</p> 	37,26	49,22
<p>maranska - měděně černé z.</p> 	<p>tmavě hnědá až čokoládová</p> 	43,07	57,29

Tabulka 30: Přehled studovaných plemen VII

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
<p>mínorka - zdrobnělá v.</p> 	<p>bílá</p> 	43,93	59,74
<p>paduánka - zdrobnělá v., žlutobílé z.</p> 	<p>bílá</p> 	37,71	50,63
<p>plymutka - černé z.</p> 	<p>hnědá</p> 	42,02	60,18

Tabulka 31: Přehled studovaných plemen VIII

plemeno - konkrétní varieta / zbarvení	barva skořápky podle plemenných standardů	Δ šířka vejce (mm)	Δ délka vejce (mm)
rousná zakrslá - trojbarevné z. 	bílá až krémová 	35,34	46,95
sebritka - zlatočerně lemované z. 	bílá až krémová 	35,1	44,26
vyandotka - zdobnělá v., žíhané z. 	hnědá 	42,48	58,2