

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Funkce antimikrobiálních proteinů v bílku u prekociálních ptáků

Function of antimicrobial proteins in albumen of precocial birds

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Eva Krkavcová

Katedra zoologie, Laboratoř pro výzkum biodiverzity
vedoucí diplomové práce: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph. D.

konzultant: Mgr. Veronika Javůrková, Ph. D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Funkce antimikrobiálních proteinů v bílku u prekociálních ptáků* vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 27.8.2012

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli, Jakobovi Kreisingerovi, za vedení diplomové práce, pomoc při zpracování statistických dat a za vstřícnost a trpělivost, Veronice Javůrkové za konzultace a pomoc v laboratoři a dále paní Ludmile Hyánkové a Pavlu Hyršlovi, bez jejichž spolupráce by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat GAUK za finanční dotaci v rámci projektu č. 147610. Mé díky patří v neposlední řadě také mojí rodině a přátelům za podporu během celé doby studia a v neposlední řadě i studentskému klubu Mrtvá Ryba, jelikož ne vše se člověk dozví ve škole.

„Seženu trochu lnu a bílek na jeho ránu. Pomáhej mu bůh!“

William Shakespear (Král Lear, dějství III, scéna 7)

Abstrakt

Antimikrobiální proteiny obsažené v bílku jsou součástí tzv. maternálních efektů zahrnujících negenetickou složku vkládanou do ptačího vejce během oogeneze. Především u druhů, jejichž snůšky zůstávají až do doby kompletace vystaveny vlivům okolního prostředí, mohou tyto proteiny hrát zásadní roli v udržení životaschopnosti embrya díky jejich potenciálu ovlivňovat riziko mikrobiální infekce, jež je považována za jednu z hlavních příčin snížené líhivosti. Zároveň se předpokládá, že tyto proteiny mohou svým specifickým způsobem ovlivňovat výsledný fenotyp mláděte, především jeho velikost a imunitu v rané postembryonální fázi.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na tři antimikrobiální proteiny ptačího bílku – avidin, lysozym a ovotransferin, které se svou antimikrobiální aktivitou liší. Pro lepší porozumění kauzálním vztahům mezi koncentracemi těchto proteinů v bílku a jejich vlivem na úspěšnost líhnutí, případně fenotyp mlád'at, byly provedeny série manipulativních experimentů i korelativních měření na vejcích dvou prekociálních druhů ptáků – křepelce japonské (*Coturnix japonica*) a kachně divoké (*Anas platyrhynchos*).

Naše výsledky naznačují zásadní roli antimikrobiálních proteinů v redukci rizika bakteriální infekce ve vejci a zároveň jejich přirozené koncentrace zvyšují úspěšnost líhnutí. Přímý vliv experimentálně zvýšených koncentrací v případě avidinu a lysozymu v bílku na morfometrické parametry mlád'at nebyl zaznamenán. Avšak z výsledků vyplývá, že především avidin pravděpodobně způsobuje změny v embryogenezi, které se dále projevují rozdílnou délkou inkubace a změnami v nesespecifické imunitní odpovědi mlád'at.

Klíčová slova

maternální efekty, antimikrobiální proteiny, avidin, lysozym, ovotransferin, ptáci, líhivost, fenotyp, imunitní systém

Abstract

Antimicrobial proteins contained in the albumen represent maternal effects, including the non-genetic component allocated into the egg during its oogenesis. Especially for species, whose broods are exposed to environmental influences until completion, these proteins play a crucial role in the viability of embryos due to their potential to influence the risk of microbial infection, which is considered one of the main causes of reduced hatchability. Also, it is assumed that these proteins, because of their specific traits, may influence phenotype of chicks, especially its size and immunity in the early postembryonal stage.

In my thesis I focused on three antimicrobial proteins of avian egg white - avidin, lysozyme and ovotransferrin, which vary in their antimicrobial activity. For a better understanding of causal relationships between the concentrations of these proteins in the albumen and their effect on hatching success or offspring phenotype, a series of manipulation experiments and correlative measurements were performed. These experiments were held on the eggs of two precocial species - Japanese Quail (*Coturnix japonica*) and Mallard (*Anas platyrhynchos*).

Our results indicate a crucial role of antimicrobial proteins in reducing the risk of bacterial infection and their natural concentration also increased hatching success. Direct effect of experimentally increased concentrations of avidin and lysozyme in egg white on morphometric parameters of chicks was not observed. However, the results indicate that especially avidin may cause changes in embryogenesis, reflected by a different time period of hatching and changes in non-specific immune response.

Keywords

maternal effects, antimicrobial proteins, avidin, lysozyme, ovotransferrin, birds, hatchability, phenotype, immune system

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1. Antimikrobiální proteiny ptačího bílku.....	8
1.1.1. Avidin.....	8
1.1.2. Lysozym.....	9
1.1.3. Ovotransferin.....	10
1.2. Předpokládané funkce antimikrobiálních proteinů v bílku.....	11
1.3. Depozice antimikrobiálních proteinů do bílku.....	13
1.4. Mezery v současných znalostech o funkci antimikrobiálních proteinů.....	15
2. Hypotézy a cíle práce.....	17
3. Metodika.....	18
3.1. Modelové druhy.....	18
3.2. Korelativní analýza antimikrobiálního potenciálu bílkových proteinů – kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>).....	18
3.3. Manipulativní experimenty – křepelka japonská (<i>Coturnix japonica</i>).....	21
3.3.1 Manipulace s koncentrací avidinu v bílku.....	21
3.3.2. Manipulace s koncentrací lysozymu v bílku.....	25
3.4. Statistické zpracování dat.....	25
4. Výsledky	26
4.1. Korelativní analýza antimikrobiálního potenciálu bílkových proteinů – kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>).....	26
4.2. Manipulativní experimenty – křepelka japonská (<i>Coturnix japonica</i>).....	30
4.2.1. Manipulace s koncentrací avidinu v bílku.....	30
4.2.1.1. Koncentrace avidinu u modelového druhu.....	30
4.2.1.2. Úspěšnost líhnutí.....	30
4.2.1.3. Růstové parametry mlád'at.....	31
4.2.1.4. Imunologické parametry mlád'at.....	33
4.2.2. Manipulace s koncentrací lysozymu v bílku.....	36
4.2.2.1. Úspěšnost líhnutí.....	36
4.2.2.2. Růstové parametry mlád'at.....	37
4.2.2.3. Imunologické parametry mlád'at.....	39

5. Diskuze.....	41
5.1. Variabilita v koncentraci avidinu u tří linií křepelky japonské šlechtěných na různou rychlost růstu.....	41
5.2. Riziko mikrobiální infekce a úspěšnost líhnutí.....	42
5.3. Inkubace a růstové parametry mlád'at.....	44
5.4. Imunologické parametry mlád'at.....	45
6. Závěr.....	48
6. Literatura.....	50

1. Úvod

Kvalita a přežívání potomků jsou u ptáků považovány za hlavní ukazatele efektivity rodičovských investic (parental investments) a úspěšnosti daného reprodukčního pokusu. Pro rodiče to znamená zvýšení vlastního fitness, definovaného jako schopnost jedince předat vlastní geny do dalších generací, tedy dožít se reprodukčního věku a přivést na svět potomky schopné reprodukce (Hamilton, 1964). Rodičovské investice do reprodukce se u ptáků mohou projevovat na mnoha úrovních, přes výběr kvalitního sexuálního partnera (Burley, 1977; Parker, 2003) až po modifikace v inkubačním chování (Deeming & Wadland, 2002). Za základní předpoklady kvality snůšky a mláďat lze však považovat investice, jež jsou vkládány rodiči přímo do vejce, které kromě geneticky podmíněné složky obsahuje také tzv. „maternální efekty“ (Mousseau & Fox, 1998). Mezi tyto maternální efekty patří mimo jiné i fyziologicky významné látky (hormony, vitamíny, antimikrobiální proteiny), jež jsou samicí distribuovány do jednotlivých vnitřních struktur vejce během oogeneze, a mohou tak svým specifickým působením zárodek i mládě ovlivňovat v jeho vývoji a následném přežívání (Mousseau & Fox, 1998). S tímto typem maternálních efektů se můžeme setkat u bezobratlých (LaMontagne & McCauley, 2001), nižších obratlovců (McCormick, 1999), ptáků (Gil, 2003) i savců (Fligny et al., 2009). Předpokládá se, že samice je schopna pomocí těchto efektů do určité míry adaptivně manipulovat s fenotypem potomstva na základě charakteru prostředí, jemuž je vystavena a kterému bude vystaveno i její potomstvo (např. Schwabl, 1997). Depozice těchto látek v závislosti na podmínkách prostředí však může mít i negativní dopad. Jednoduchým příkladem může být samice vystavená stresovým podmínkám snášející vejce s vyšším obsahem stresového hormonu – kortikosteronu, který může například snižovat úspěšnost líhnutí i kondiční parametry mláďat (Saino et al., 2005).

Většina studií zabývajících se maternálními efekty se zaměřuje především na prekuzory imunity, růstu a dále na látky s primárně antioxidantní funkcí (např. imunoglobuliny, steroidní hormony a karotenoidy) obsažené ve žloutku a na jejich následný vliv na prosperitu mláďat v postembryonálním vývoji (Schwabl, 1993; Gil, 2003). Bílkové proteiny však také mohou hrát významnou roli v histogenezi během zárodečného vývoje a zároveň byla prokázána jejich rozdílná distribuce jak na interspecifické (Wellman-Labadie et al., 2008b) tak na intraspecifické úrovni (Shawkey et al., 2009). Zmíněná variabilita v distribuci sledovaných proteinů může naznačovat jejich adaptivní

význam, avšak bez znalosti funkce, kterou mohou tyto proteiny plnit v průběhu embryogeneze či v postembryonální fázi, lze tento jejich význam pouze předpokládat.

1.1. Antimikrobiální proteiny ptačího bílku

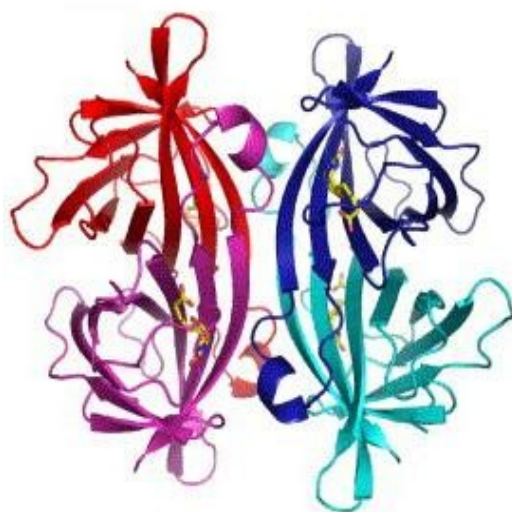
Ptačí vejce slouží jako mikrohabitat, v němž se embryo vyvíjí a připravuje na další fázi života ve vnějším prostředí. Podíl jednotlivých nutričních složek se liší mezi druhy i v rámci druhu (Romanoff & Romanoff, 1949; Ricklefs, 1977; Sotherland & Rahn, 1987), přičemž mezidruhové rozdíly souvisí především s rozdílným stupněm vývoje při líhnutí. Prekociální druhy, zejména vodní ptáci, mají menší bílky ve srovnání s druhy altriciálními (Sotherland & Rahn, 1987). Bílek tvořený vodou, v níž jsou rozpuštěny proteiny (poměr zhruba 8:1), má důležitou funkci během zárodečného vývoje (Burley & Vadhera, 1989) jako termální a mechanická obrana embrya, zdroj vody i zprostředkovatel výživy. Množství bílku může také přímo ovlivňovat fenotyp mláděte, což bylo u prekociálních ptáků prokázáno experimentálním odebráním bílku, které se projevovalo redukcí velikosti mláděte a výraznými vývojovými asymetriemi (Finkler et al., 1998). Kromě výživy a mechanické ochrany poskytuje bílek i obranu proti infekci z vnějšího prostředí. Zásadité pH a přítomnost specifických antimikrobiálních proteinů významně snižuje růst mikroorganismů (Deeming & Wadland, 2002; Brogden, 2005), které jsou schopny pronikat z povrchu vejce do jeho vnitřních struktur a zásadně ovlivňovat líhivost či fenotyp mláděte (např. Pinowski et al., 1994; Javůrková et al., submitted). Mezi hlavní antimikrobiální proteiny, zaujímající okolo 16% veškerých proteinů v bílku, patří avidin, ovotransferin a lysozym (Board & Fuller 1974; Wellman-Labadie et al., 2008a), které se svým zastoupením i antimikrobiální aktivitou liší (Feeney et al., 1960).

1.1.1. Avidin

Avidin je tetramerní protein, který se vyskytuje u vejcorodých obratlovců (Korpela et al., 1981). U ptáků je produkován ve vejcovodech a ukládán do vaječného bílku, kde např. u kura domácího (*Gallus gallus*) zaujímá zhruba 0,05 % všech proteinů (Green, 1975). Obsahuje čtyři identické podjednotky, tvořené osmi antiparalelními β -barely (Obr. 1). Každý monomer může s vysokou afinitou a specifitou vázat ve vodě rozpustný biotin (Board & Fuller, 1974), díky stabilizované síti polárních a hydrofobních vazeb. Biotin, nebo-li vitamin H, je protein účastnící se mnoha metabolických procesů, jako je výroba mastných kyselin, metabolismus tuků a aminokyselin. Působí i na úrovni genové

exprese a je nezbytný pro diferenciaci a proliferaci buněk (Dakshinamurti, 2005; Zemleni et al., 2009). Navázání biotinu na avidin v bílku způsobí jeho nedostupnost pro mikroorganismy a zabrání tak jejich růstu a šíření. Efekt avidinu je v tomto případě spíše bakteriostatický (Wellman-Labadie et al., 2008a). Antimikrobiální aktivita avidinu může být však zprostředkována i jeho schopností vázat se na povrchové receptory některých druhů G+ i G- bakterií jako *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* (Korpela et al., 1984; Banks et al., 1986).

Obr. 1: Schématické znázornění tetramerní struktury avidinu (Wilchek et al., 2006).



1.1.2. Lysozym

Lysozym, patří do skupiny enzymů glykosid hydroláz, je v živočišné říši velmi rozšířeným proteinem. Byl poprvé popsán sirem Alexandrem Flemingem již v roce 1922. Můžeme ho najít v krevní plazmě, v mateřském mléce, ve slinách nebo slzách. Také je další složkou vaječného bílku tvořící 0,1-4% veškerých bílkových proteinů v závislosti na druhu (Smolelis & Hartsell, 1951). Antimikrobiální funkce lysozymu spočívá v jeho schopnosti narušit peptidoglykanovou stěnu (štěpením β -vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-glukosaminem) především G+ bakterií, např. *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. (Ibrahim et al., 1991; Wellman-Labadie et al., 2008a; Callewaert & Michiels, 2010). Tato jeho baktericidní aktivita ho tak řadí mezi nejúčinnější antimikrobiální proteiny, i vzhledem k tomu, že G+ bakterie jsou primárními patogeny

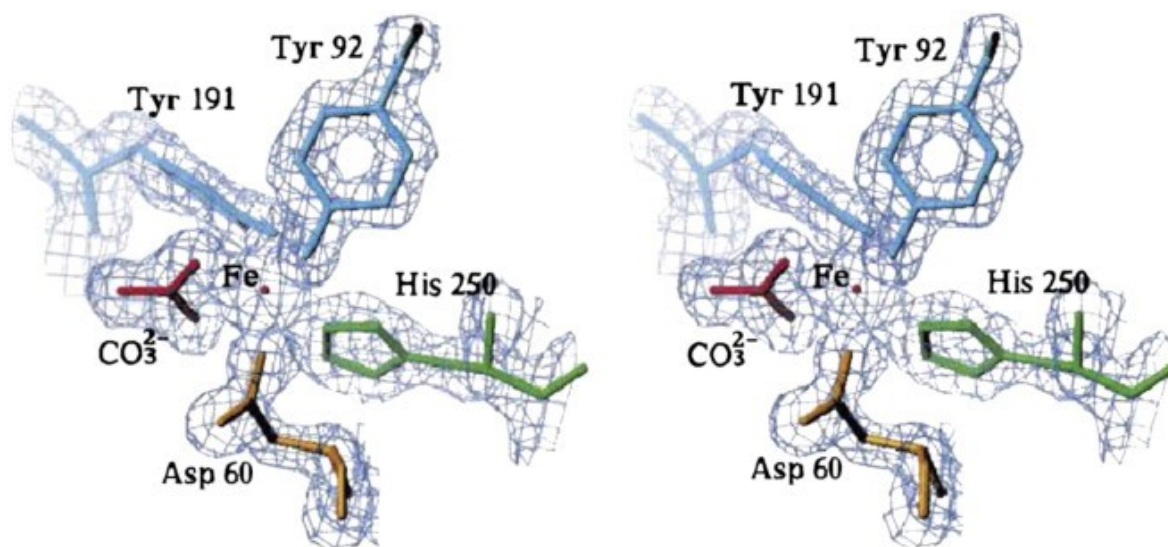
a původci infekcí, které u většiny druhů ptáků způsobují mortalitu embrya (Deeming 2002; Bruce & Drysdale, 1994).

1.1.3. Ovotransferin

Ovotransferin je neutrální glykoprotein patřící do rodiny transferinů, u něhož lze nalézt 50 % homologii se savčím transferinem a lactoferinem (Mazurier et al., 1983) a jehož hlavní funkcí je přenos iontů železa do vyvíjejícího se embrya. Tento protein je syntetizován ve vejcovodech ptáků pod kontrolou steroidních hormonů a ukládán do vejce, kde tvoří přibližně 12–13 % všech proteinů bílku v závislosti na druhu (Superti et al., 2007; Wu & Acero-Lopez, 2011). Kromě toho se však vyskytuje i v krevní plazmě. Struktura polypeptidového řetězce ovotransferinu se skládá ze dvou laloků, z nichž na každém se nalézá jedno vazebné místo pro iont Fe^{3+} v molekule spolu se dvěma ionty CO_3^{2-} nebo HCO_3^- (Obr. 2). Každý z laloků je dále tvořen dvěma odlišnými doménami (α / β), které jsou spojeny antiparalelními vlákny, jež umožňují otevírání a zavírání vazebného místa pro železo (např. Kurokawa et al., 1999).

Obranná funkce ovotransferinu se uplatňuje na třech úrovních. Antimikrobiální potenciál ovotransferinu je závislý na jeho schopnosti vázat reverzibilně železo, které je nepostradatelné pro růst bakterií. Mezi druhy nejvíce citlivé na přítomnost ovotransferinu patří například *Pseudomonas sp.*, *E. coli* a *Streptococcus mutans* (Valenti et al., 1983), naopak rezistentní se ukázaly být druhy *Proteus spp.* a *Klebsiella spp.*. Další studie naznačují, že antimikrobiální aktivita ovotransferinu nemusí souviset jen s jeho schopností vyvazovat železo, ale zahrnuje i složitější mechanismy. Kationtové sekvence OTAP-92 (Ibrahim et al., 1998) na povrchu jednoho z laloků struktury ovotransferinu jsou schopny projít vnější vrstvou G- bakterií a poškodit biologickou funkci jejich cytoplasmatické membrány (Ibrahim et al., 2000; Superti et al., 2007). Jako člen skupiny transferinů je i ovotransferin součástí vrozené imunity, kde plní signální funkci a je proteinem akutní fáze – tzv. APP (acute phase protein) (Xie et al., 2002). Jeho koncentrace v plazmě tak dokáže regulovat zánětlivou reakci organismu. Zvýšená koncentrace ovotransferinu během indukované zánětlivé reakce (např. po aplikaci lipopolysacharidu) byla pozorována jak *in vivo*, tak *in vitro* (např. Hallquist & Klasing, 1994; Xie et al., 2003; Horrocks et al., 2011), což poukazuje na jeho zásadní roli v imunitním systému jedince.

Obr. 2: Prostorové schéma ovotransferinu znázorňující vazebné místo pro železo (Mizutani et al., 2001).



1.2. Předpokládané funkce antimikrobiálních proteinů v bílku

Životaschopnost vejce výrazně klesá s dobou vystavení vnějším podmínkám prostředí před nástupem plné inkubace (např. Cook et al., 2003; Godard et al., 2007). U neinkubovaných vajec dochází mimo jiné k většímu růstu mikroorganismů na povrchu vejce než u vajec inkubovaných, a jsou tedy náchylnější k riziku mikrobiální infekce (Cook et al., 2005; Shawkey et al., 2009). Především u druhů se synchronním líhnutím, kde inkubace začíná až po snesení posledního vejce snůšky, jsou první snesená vejce vystavena nepříznivým podmínkám prostředí po dobu několika dní, a antimikrobiální proteiny mohou tedy u těchto druhů hrát významnou roli.

Jak již bylo zmíněno, v množství antimikrobiálních proteinů v bílku existují interspecifické i intraspecifické rozdíly. Přestože přímé mechanismy podmiňující tuto variabilitu nejsou zcela objasněny, obecně se usuzuje, že vnitrodruhová variabilita v distribuci maternálních efektů je adaptivní odpovědí samice na různou intenzitu působení exogenních a endogenních faktorů (Schwabl, 1996b; Schwabl et al., 1997; Saino et al., 2004). To může poukazovat i na potenciální efekt antimikrobiálních proteinů na fenotyp mláďete, který byl např. u androgenních hormonů jasně prokázán (např. Pilz et al. 2003; Groothuis et al., 2005b). Tedy kromě faktu, že antimikrobiální proteiny pravděpodobně chrání embryo před vlivem patogenů z prostředí, mohou se zřejmě účastnit i procesů projevujících se přímo na fenotypu mláďete, ať už přímo prostřednictvím svých

specifických vlastností nebo nepřímo vlivem na mikrobiální infekci ve vejci, která také může ovlivňovat fenotyp mlád'at (Javůrková et al., submitted).

Podporu pro hypotézu o aditivní funkci antimikrobiálních proteinů lze částečně nalézt ve studiích, které naznačují, že konkrétně lysozym je schopen pronikat do plazmy čerstvě vylíhlých mlád'at, kde může pozitivně ovlivňovat jejich rezistenci vůči patogenním mikroorganismům v rané postembryonální fázi (Board & Fuller, 1974; Prusinowska et al., 2000; Saino et al., 2002). Na tento fakt poukazuje studie provedená na vlaštovce obecné (*Hirundo rustice*) prokazující vyšší hladiny lysozymu v plazmě mlád'at vylíhlých samicím s rovněž vysokými koncentracemi tohoto proteinu v plazmě. To by však mohlo být způsobeno i dědivostí exprese nebo stejnou bakteriální zátěží v prostředí, kterému jsou samice i mlád'ata vystaveny a které mohou ovlivnit syntézu, depozici a následnou aktivitu lysozymu. V paternální linii však korelace mezi aktivitou lysozymu u samce a jeho mlád'at nebyla nalezena. Množství lysozymu v plazmě samice také pozitivně ovlivnilo líhnivost snůšky (Saino et al., 2002). Rozsáhlá studie věnující se 85 druhům ptáků (Saino et al., 2007) srovnávala rozdíly v koncentraci lysozymu v bílku jednotlivých druhů a prokázala pozitivní vztah mezi množstvím lysozymu vloženého do vejce a následnou intenzitou zbarvení peří samce (plumage brightness) v dospělosti, čímž naznačuje zásadní roli tohoto proteinu v evoluci sekundárních pohlavních znaků. Všechny doposud publikované práce zabývající se touto problematikou mají však korelativní charakter. To znamená, že na základě jejich výsledků lze získat jen velmi omezený náhled do kauzálních vlivů antimikrobiálních proteinů v bílku.

Zbylé proteiny však mimo primární antimikrobiální funkce mohou způsobovat také změny na úrovni fenotypu. Jejich zvýšená koncentrace sice může favorizovat vyvíjející se embryo díky zvýšení jeho rezistence vůči patogenům, avšak jejich schopnost vyvazovat prekursory růstu (biotin v případě avidinu a železo v případě ovotransferinu), které jsou podstatou jejich bakteriostatického účinku, mohou mít negativní vliv na vývoj a fitness mlád'at. Předpokládá se, že tento negativní efekt zvýšené koncentrace v bílku se může projevit u avidinu, jelikož biotin (vitamin H), který avidin silně specificky vyvazuje (Board & Fuller 1974), plní zásadní roli během proliferace buněk a to i na úrovni genové exprese (viz review Dakshinamurti, 2005). Např. nedostatek biotinu způsobený přidáním avidinu do potravy se u fertálních samic hlodavců projevuje velmi výraznými morfologickými anomáliemi a embryonální smrtí (Watanabe, 1993). Přestože by koncentrace avidinu (a tedy dostupného biotinu) v bílku ptáků ve fyziologickém rozmezí

neměla mít na embryo tento letální efekt, lze předpokládat, že se zvýšená koncentrace avidinu může projevit na redukci velikosti mláďete a jeho růstových asymetriích, které tak mohou ovlivňovat jeho další prosperitu a přežívání. Tento efekt byl částečně prokázán v korelativní studii na racku středomořském (*Larus michahellis*), kde mláďata vylíhlá z vajec s přirozeně vyšší hladinou avidinu vykazovala menší růstové parametry, resp. délky tarzů. Tento efekt byl pozorován u mláďat obou pohlaví, zatímco vliv avidinu na imunitní odpověď mláďat po aplikaci PHA (phytohemagglutinin) byl nalezen pouze u samic (Bonisoli-Alquati et al., 2010). Názory na vliv silně specifické vazby avidin – biotin na průběh embryogeneze se však různí. Analýzou obsahu vejce u kura domácího (*Gallus domesticus*) bylo zjištěno, že více než 85 % biotinu se nachází ve vaječném žloutku a tedy avidin obsažený v bílku nemůže tento růstový prekurzor zásadně vyvazovat a je po většinu času mimo kontakt s embryem až do doby vylíhnutí (White et al., 1992). Naproti tomu u vajec stejného druhu bylo jasně prokázáno, že biotin difunduje ze žloutku do bílku přes periviteliní membránu a může být tedy vyvazován avidinem a stát se nedostupným pro embryo během embryogeneze (Bush & White, 1988).

Vliv ovotransferinu na fenotyp mláďat by mohl být založen na jeho funkci v nespecifické imunitní odpovědi jako hlavního proteinu akutní fáze (viz. 1.2.3.). Zatím však rovněž neexistují studie, které by sledovaly vztah mezi koncentrací ovotransferinu ve vejci a jeho množstvím v plazmě mláďat ani studie zkoumající vliv množství ovotransferinu v bílku na intenzitu imunitní reakce (měřitelné právě jeho koncentrací v plazmě mláďete).

1.3. Depozice antimikrobiálních proteinů do bílku

Samotná tvorba ptačího vejce je pro samici energeticky nákladná (Williams, 2005). Navíc produkce vajec bohatých na proteiny může být limitována dostupností těchto látek samici (Reynolds et al., 2003), případně samotným procesem ovogeneze, která může být omezena různými faktory (např. Williams & Ames, 2004). Přesto není stále jasné, zda je depozice antimikrobiálních proteinů do vejce pro samici nákladná ve smyslu energetickém a výživovém a zda množství antimikrobiálních proteinů v těle samice koreluje s množstvím těchto látek v bílku (Saino et al., 2002; Shawkey et al., 2008), nebo zda jsou tyto proteiny do vejce ukládány nezávisle na jejich koncentraci v těle samice jako je tomu například u androgenů (viz Groothuis & Schwabl, 2007). Depozice antimikrobiálních proteinů navíc může snižovat biologickou dostupnost vitamínů (např. avidin vyvazuje

biotin, vitamín H) a dalších složek, které jsou uloženy v bílku. Antimikrobiální obrana vejce v podobě specifických proteinů by tedy měla být optimalizována ve vztahu k výživové funkci bílku.

Vysoká vlhkost i optimální teplota jsou základní faktory zvyšující růst bakterií na povrchu ptačí skořápky, čímž potažmo zvyšují úspěšnost vniknutí skrz skořápku a riziko vzniku infekce ve vejci (Cook et al., 2003; Beissinger et al., 2005). Vyšší teplota může mít však vliv nejen na mikrobiální infekci, ale i na zvýšenou aktivitu antimikrobiálních proteinů, pro něž je optimem fyziologická teplota (Tranter & Board, 1984). Dalším faktorem zvyšujícím potenciál antimikrobiálních proteinů je i jejich koncentrace (Salton, 1957). Pokud se antimikrobiální ochrana vejce vyvinula jako odpověď na riziko mikrobiální infekce (Wellman-Labadie et al., 2008a), koncentrace antimikrobiálních proteinů by se měla lišit podle podmínek prostředí. Studie věnující se této problematice se však v některých výsledcích rozcházejí. Pozitivní výsledky byly zaznamenány u ovotransferinu v souvislosti s gradientem vlhkosti (Horrocks et al., 2012) jako hlavním prediktorem mikrobiální infekce. Vejce snůšek z oblastí s vysokou vlhkostí měla vyšší koncentrace ovotransferinu, než vejce z oblastí aridních. Opačný trend v této studii věnující se čeledi skřivanovitých (*Alaudidae*) byl zaznamenán u lysozymu, což může být vysvětleno i dalšími funkcemi lysozymu v bílku, kdy kromě antimikrobiální funkce zajišťuje lysozym i udržení viskozity bílku pomocí vazby na další proteiny (Trziska & Clostermann, 1993), což by mohlo vést k jeho rostoucí koncentraci v suchých a horkých oblastech. Naproti tomu další studie zaměřené na vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*) a koroptev polní (*Perdix perdix*) vliv mezi teplotou a množstvím lysozymu ve vaječném bílku neprokázaly (Saino et al., 2004; Cucco et al., 2009). U koroptve polní však byla dále zjištěna pozitivní korelace mezi zvýšenou teplotou prostředí den před snesením vejce, tedy v době zahrnující formování vaječného bílku (Ricklefs, 1974), a koncentrací avidinu v bílku (Cucco et al., 2009).

Různá distribuce antimikrobiálních proteinů do jednotlivých vajec ve snůšce by mohla být adaptací na zvýšené riziko mikrobiální infekce, resp. na sníženou životaschopnost vajec, která klesá s dobou expozice vnějším podmínkám prostředí před nástupem plné inkubace. Zatímco studie na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*) zaznamenala pokles koncentrace lysozymu u později snesených vajec (Saino et al., 2002), novější studie provedena na celkem osmi druzích ptáků ze tří čeledí prokázala jen velmi slabou podporu pro rozdílné koncentrace lysozymu, avidinu a ovotransferinu ve vejcích vzhledem k jejich

pořadí ve snůšce (Shawkey et al., 2008). V některých studiích lze nalézt konkrétně pro lysozym i trend zcela opačný (Bonisoli-Alquati et al., 2010). Přestože změna v koncentraci antimikrobiálních proteinů (např. lysozymu) byla zaznamenána u všech zkoumaných druhů, v rozsahu šesti řádů (např. Saino et al., 2007; Shawkey et al., 2008), nemají tyto rozdíly v distribuci antimikrobiálních proteinů v rámci snůšky dosud přímé vysvětlení.

Dalším faktorem ovlivňujícím koncentraci antimikrobiálních proteinů ve snůšce by mohla být atraktivita partnera. Samice sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) pářící se se samci s vyšší UV reflektancí, která je indikátorem fyzické kvality (např. Johnsen et al., 2003), snášely vejce s vyšším obsahem lysozymu – ne však avidinu a ovotransferinu (D'Alba et al., 2010). Tyto výsledky poukazují na adaptivní alokaci antimikrobiálních proteinů a zvýhodňování potomstva zplozeného s „kvalitnějším“ partnerem.

Vlivu endogenních faktorů jako je kondice samice na množství antimikrobiálních proteinů ve snůšce se věnovaly studie prováděné na koroptvi polní (*Perdix perdix*). V prvním případě byla samicím podávána potrava obohacená o β -karoten, který mimo pigmentace plní u ptáků důležitou funkci v mnoha fyziologických a imunologických procesech (Møller et al., 2000). Vejce samic krmených obohacenou potravou obsahovala vyšší koncentrace lysozymu (ne však samotného karotenoidu) a zároveň u nich byla pozorována vyšší úspěšnost líhnutí než u vajec kontrolních samic (Cucco et al., 2007). Metabolický mechanismus vedoucí ke zvýšené akumulaci lysozymu ve vejci prostřednictvím obohacené potravy však není zatím objasněn. V druhém experimentu bylo manipulováno s kondicí samice v opačném duchu. Samice koroptve polní byly očkovány virem Newcastleké nemoci (NDV), jež představuje imunitní zátěž a lze tedy u očkových samic předpokládat snížení investic do reprodukce. V souladu s hypotézou byla vejce očkových samic menší (v hmotnosti, délce i šířce), avšak koncentrace antimikrobiálních proteinů (avidinu a lysozymu) se oproti kontrolním samicím nelišila (Cucco et al., 2010). Z dosavadních studií tedy nelze vyvodit jednoznačný efekt kondice samice na depozici antimikrobiálních proteinů do vaječného bílku.

1.4. Mezery v současných znalostech o funkci antimikrobiálních proteinů

Obecně studie věnující se antimikrobiálním proteinům v bílku ptáků mají většinou korelativní charakter. Uspořádání experimentů je často založeno na manipulaci s některým

z vnějších faktorů prostředí, např. vlhkostí, teplotou. Následně je zjišťována koncentrace proteinů ve vejcích a z této informace se usuzuje o možných funkcích proteinů v závislosti na změně prostředí. Koncentrace proteinů v těchto případech však zdaleka nemusí být adaptivní funkcí (jak je často předkládáno), ale může být spíše dána fyziologickými mechanismy přenosu proteinů do vejce. Další typ korelativních studií se zaměřuje na různou distribuci antimikrobiálních proteinů v bílku v rámci snůšky (vzhledem k pořadí snášení jednotlivých vajec) i mezi snůškami (vzhledem k hnízdní sezóně). Je třeba poznamenat, že druhy, u nichž jsou údaje o korelaci mezi koncentrací antimikrobiálních proteinů a pořadím vajec ve snůšce k dispozici, se značně liší v typu vývoje, inkubačním chování, velikosti snůšky, reprodukční strategii a zároveň v typu obývaného stanoviště a geografickém rozšíření. Souvislost mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů ve vztahu k pořadí ve snůšce se tedy zdá být spíše univerzálním fenoménem, pro nějž lze těžko najít adaptivní funkci.

Manipulativní studie, které by se věnovaly problematice antimikrobiálních proteinů v bílku, zatím většinou nebyly provedeny a nebo jsou primárně zaměřené na manipulaci s jinými faktory než jsou antimikrobiální proteiny (kvalita potravy, atraktivita partnera), které však ovlivňují množství antimikrobiálních proteinů ukládaných do bílku. Takovýto typ studií však neumožňuje jednoznačně oddělit přímý efekt těchto proteinů od dalších efektů, které jsou důsledkem experimentálního zásahu. Překvapivě neexistují ani studie, které by věnovaly pozornost přímému vlivu těchto proteinů na riziko mikrobiální infekce ve vejci, jež pravděpodobně může ovlivňovat jak líhnivost, tak i fenotyp mláďat (Javůrková et al., submitted).

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce bylo pomocí korelativních měření i manipulativních experimentů s množstvím jednotlivých antimikrobiálních proteinů v bílku zodpovědět otázky týkající se jejich vlivu na riziko a intenzitu mikrobiální infekce uvnitř vejce, na líhivost a dále pak posoudit vliv těchto proteinů na fenotyp mláděte. Cílem této práce bylo zejména testování následujících hypotéz:

1. Vliv na riziko bakteriální infekce a úspěšnost líhnutí:

- Vejce s vyššími koncentracemi antimikrobiálních proteinů budou mít nižší míru mikrobiální infekce.
- Vejce s vyššími koncentracemi antimikrobiálních proteinů budou vykazovat vyšší líhivost.
- Přítomnost mikrobiální infekce bude ovlivňovat líhivost vajec.

2. Vliv na růstové a kondiční parametry:

- Mláďata vylíhlá z vajec s experimentálně zvýšenou koncentrací antimikrobiálních proteinů budou vykazovat odlišné kondiční a růstové parametry a rychlost ontogeneze oproti mláďatům z nemanipulovaných vajec.

(Vzhledem k pleiotopnímu efektu některých antimikrobiálních proteinů lze však směr těchto vztahů apriori odhadnout jen obtížně. Například avidin může na jednu stranu nepřímo zvyšovat rychlost růstu vzhledem k pravděpodobnému vlivu na imunokompetenci embrya, naproti tomu jeho schopnost vyvazovat biotin predikuje opačný efekt.)

3. Vliv na imunologické parametry mláďat:

- Avidin, jako protein akutní fáze, bude u manipulovaných mláďat zlepšovat imunitní reakci na lipopolysacharid (LPS) představující stěnu G- bakterií, případně bude imunitu mláďat snižovat pod vlivem kompenzačního zvýšení investice do růstu.
- Lysozym, jako hlavní baktericidní protein bílku, bude u mláďat z manipulovaných vajec zlepšovat imunitní reakci na LPS.
- Plazma mláďat vylíhlých z vajec s experimentálně zvýšenou hladinou lysozymu a avidinu bude vykazovat intenzivnější antimikrobiální aktivitu oproti plazmě kontrolních mláďat.

3. Metodika

3.1. Modelové druhy

Jako modelové druhy pro studium antimikrobiálních proteinů v bílku ptáků byly vybrány v zajetí běžně chované prekociální druhy – kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) a křepelka japonská (*Coturnix japonica*). Pro tyto druhy je charakteristické synchronní líhnutí snůšek, kde plná inkubace snůšky začíná až ke konci období snášení vajec. Snůšky těchto druhů obsahují větší množství vajec, které tak zůstávají téměř neinkubované po dlouhou dobu a tedy vystavené vyššímu riziku infekce (Godard et al., 2007). Vejce těchto druhů jsou zároveň větší a mají tedy i větší objemy bílku oproti ptákům altriciálním (Ricklefs, 1977), což umožňuje snazší manipulaci s koncentrací antimikrobiálních proteinů a sledování vlivu jejich koncentrace na úspěšnost líhnutí a další fenotypové znaky (např. Finkler et al., 1998).

Pro manipulativní experimenty byla využita fertilní vejce křepelky japonské (*Coturnix japonica*) poskytnuté za účelem této práce paní RNDr. Hyánkovou, CSc. z Ústavu živočišné výroby v Praze – Uhřetěvesi. Korelativní studie testující antimikrobiální potenciál bílku proběhla v lokalitě Jižních Čech (Dívčice: 49°6'N, 14°18'E) a byla provedena na vejcích kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) získaných z komerčního chovu (Kachní farma Mokřiny – Rybářství Třeboň, a. s.). Sběr a analýza dat proběhly během let 2010 až 2012.

3.2. Korelativní analýza antimikrobiálního potenciálu bílkových proteinů – kachna divoká (*Anas platyrhynchos*)

Fertilní vejce kachny divoké ($n = 160$) byla bezprostředně po vylíhnutí zbavena primární mikrocenózy na povrchu skořápky jejím otřením 70 % ethanolem. Poté byla vejce umístěna po čtyřech do jednotlivých experimentálních hnízd ($n = 40$), která byla náhodně rozmístěna na zemi v přirozeném hnízdním prostředí studovaného druhu. Materiál pro tvorbu experimentálních hnízd byl získán z několika náhodně vybraných aktivních hnízd kachny divoké ($n = 30$). Vejce byla exponována po dobu devíti dnů, což odpovídá průměrné době vytváření snůšky u kachny divoké (Krapu et al., 2004). Aby bylo zabráněno riziku predace experimentálních snůšek, byla hnízda oplocená drátěným pletivem.

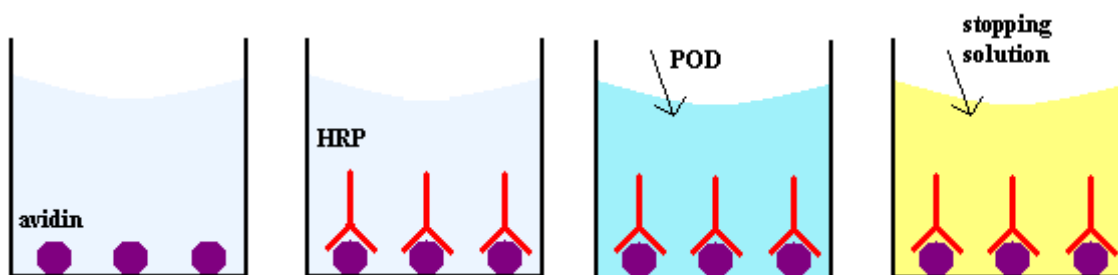
Po devítidenní exponaci snůšek byla vejce přesunuta do laboratoře, kde byla opět očištěna 70 % ethanolem a z každého vejce bylo sterilní stříkačkou (Braun) odebráno 300 ul bílku, vzorky byly následně skladovány v kryo-zkumavkách při teplotě -20 °C. Po odebrání vzorku bílku bylo místo perforace skořápky zakápnuto gelovým vteřinovým lepidlem (Loctite-Super Attack). Poté byla vejce vložena do inkubátoru (Ova Easy, Brinsea, USA) a inkubována v optimálních podmínkách pro stanovení vlivu antimikrobiálních proteinů a mikrobiální infekce na úspěšnosti líhnutí. Vzorky bílku sloužily pro následnou analýzu míry bakteriální infekce a koncentrace bílkových antimikrobiálních proteinů. Bakteriální DNA z vaječného bílku byla získána ve flow-boxu za pomoci EliGene MTB Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon s.r.o., ČR), což je velmi citlivá diagnostická sada pro izolaci G- i G+ bakterií. Vaječné bílky byly rozmrazeny, vortexovány po dobu jedné minuty, a poté bylo 50 ul odebráno do sterilní plastové trubičky s 200 ul roztoku M1 sady. Ředěné vzorky bílku byly deset minut centrifugovány při 17 000 × g, supernatant byl odstraněn pomocí sterilních špiček s filtrem a izolace byla provedena podle protokolu dodaného výrobcem.

Analýza bakteriální infekce byla založena na výskytu 16S rRNA ve vzorcích DNA získaných z vaječného bílku pomocí RT-PCR LightCycler® 480 systém (Roche, Mannheim, Německo). Pro amplifikaci byl použit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) a univerzální sada primerů zahrnující počáteční sekvenci Uni331 (5' - TCCTACGGGAGGCAGCAGT - 3') a reverzní primer Uni797 (5' GACTACCAGGGTATCTATCCTGTT - 3') (Nadkarni et al., 2002). Účinnost RT-PCR amplifikace byla ověřena pro různé koncentrace primerů a teploty pro *annealing* primerů. Optimální podmínky byly dosaženy při konečné koncentraci 0,5 uM každého primeru a při žíhací teplotě 58 °C, což je optimální teplota pro danou sadu primerů (Nadkarni et al., 2002). PCR reakce byla provedena v triplicátech. Pro amplifikaci proběhl jako první jeden cyklus při 94 °C po dobu 15 s a dále 45 cyklů, při nichž byly vzorky nejprve zahřáty na 94 °C po dobu 3 s, poté ochlazeny na 58 °C po dobu 10 s a opět zahřáty na 74 °C po dobu 35 s. Na závěr proběhl jeden cyklus při 74 °C po dobu 2 min a při 45 °C po dobu 2 s. Ke konstrukci kalibrační křivky pro kvantifikaci bakteriální DNA koncentrace, vyjádřené jako počet bakteriálních buněk na 1 ml vaječného bílku, bylo použito přečištěné genomické DNA z bakterií *Streptococcus bovis*.

Analýza koncentrace avidinu ve vzorcích bílku proběhla na základě přímé ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbents Assay) diagnostiky (detailní popis metodiky viz

Shawkey et al., 2008). Desetkrát ředěný vzorek bílku byl v duplikátu a seriálním ředění nanesen do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky s vysoce absorpčním povrchem (Nunclon Maxisorb 96 Flat transparent) a inkubován při 4 °C přes noc, aby mohlo dojít k navázání proteinu na pevnou fázi destičky (Tabulka 1). Po vyjmutí byla destička promývána, čímž byl odstraněn nenavázaný protein, poté byl přidán konjugovaný roztok horseradish peroxidázy (HRP). Konjugát avidin-HRP byl poté přidáním Blue peroxidase substrátu (POD) půl hodiny katalyzován za vzniku barevného signálu. Výsledný barevný signál byl fixován přidáním roztoku kyseliny sírové (tzv. „stopping solution“). Poté byla spektrofotometricky (spektrofotometr Tecan) měřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Kalibrační křivky byly sestaveny na základě měřených absorbancí ve vzorcích se známou koncentrací komerčně dostupného proteinu (Sigma-Aldrich) jako standardu.

Tabulka 1: Analýza koncentrace avidinu v bílku: základní princip ELISA testu.



Koncentrace lysozymu byla stanovena metodou radiální fúze (viz. Osserman & Lawlor, 1966). Konkrétně bylo v agaru rozpuštěno známé množství lyofilizovaných buněk *Micrococcus lysodeikticus* (M-3770, Sigma-Aldrich), které jsou zvláště citlivé na aktivitu lysozymu. Do jamek v agaru bylo aplikováno 10 ul bílku ředěného 1:1 s Britton-Robinsonovým pufrem, každý vzorek byl nanášen v duplikacích. Jako standard byl použit ředěný krystalický lysozym z kachního bílku (L-6876, Sigma-Aldrich), v koncentracích 7000, 6500, 6000, 5500, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000 ug/ml pro každou skupinu vzorků. Misky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 24 hodin, během nichž byla v okolí jamek vytvořena tzv. „lyzační zóna“. Poté byly misky skenovány a pomocí programu ImageJ (freeware) byly spočítány plochy lyzačních zón. Koncentrace lysozymu ve vzorku byla přepočítána podle kalibrační křivky standardu jednotlivě pro každou misku.

Stanovení koncentrace ovotransferinu v bílku bylo založeno na jeho schopnosti vázat železo (detailní popis v Horrocks et al., 2011). Principem bylo zjištění maximálního množství železa potřebného k navázání ovotransferinu ve vzorku. Toto množství železa

velmi dobře koreluje s koncentrací ovotransferinu, jak bylo stanoveno srovnáním s imunologickým testem sérového ovotransferinu (např. Yamanishi et al., 2002). Analýza se skládala ze tří kroků. Vzorky ovotransferinu v duplikátech byly umístěny do jamek (destičky Nunclon 96 Flat transparent) a v zásaditém prostředí nasyceny ionty Fe^{3+} (inkubace proběhla při 36 °C po dobu 5 minut). Poté byly nenavázané zbytky železa redukovány na Fe^{2+} přidáním kyseliny askorbové (opět inkubace 5 minut při 36 °C). Tento Fe^{2+} se stal neaktivní po vytvoření barevných komplexů s chromogenem Ferrozinem. Po přidání kyseliny citrónové byl komplex ovotransferinu s železem v kyselém prostředí disociován. Uvolněné ionty Fe^{3+} tak umožnily další tvorbu barevných Fe^{2+} a Ferrozin komplexů. S touto změnou v koncentraci barevných komplexů byl spojen i nárůst absorbance reakční směsi, který byl během analýzy monitorován. První měření absorbance (spektrofotometr Tecan) proběhlo ihned po přidání kyseliny citrónové při vlnových délkách 570 nm (primární vlnová délka) a 660 nm (referenční vlnová délka). Při stejných vlnových délkách byla absorbance opět zaznamenávána po inkubační době 6 minut, kdy docházelo k vývoji barevných komplexů. Každá destička obsahovala vzorky s komerčním standardem (Sigma-Aldrich) pro výpočet kalibrační křivky.

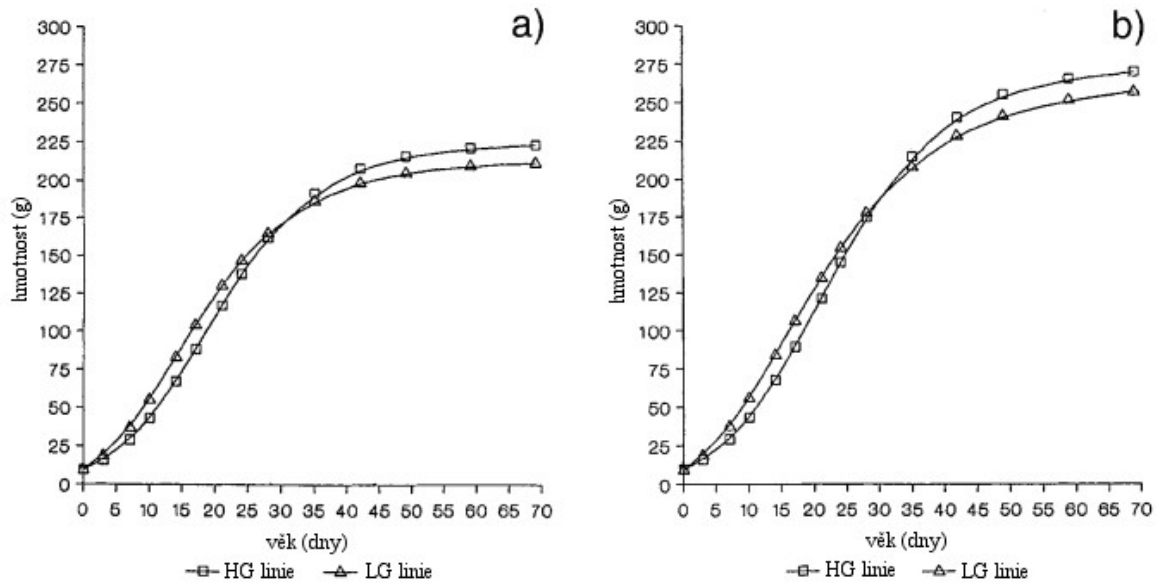
Opakovatelnost (repeatabilita) analýz koncentrací antimikrobiálních proteinů byla odhadována pomocí interclass correlation coefficient (ICC), který ve všech případech vyšel vysoce průkazný ($p \leq 0.001$). ICC pro avidin = 0.861, pro lysozym = 0.953 a pro ovotransferin = 0.282.

3.3. Manipulativní experimenty – křepelka japonská (*Coturnix japonica*)

3.3.1 Manipulace s koncentrací avidinu v bílku

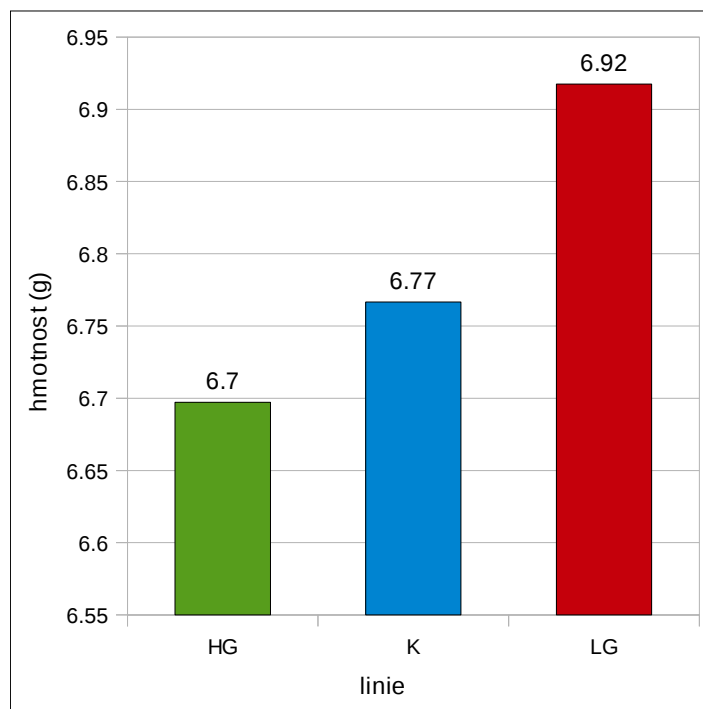
Manipulativní experiment s koncentracemi avidinu v bílku probíhal na třech liniích křepelky japonské šlechtěných na různou rychlost růstu. HG a LG linie jsou charakterizovány, navzdory podobnému růstovému potenciálu, různými tvary růstové křivky (Hyánková et al., 2001). Vysoká rychlost růstu bezprostředně po vylíhnutí, kratší akcelerační fáze a nižší růst před nástupem pohlavní dospělosti jsou typické pro LG linii, opačný trend lze nalézt u linie HG (Graf 1). Nejvýznamnější růstové rozdíly mezi liniemi jsou během prvního týdne po vylíhnutí, což je způsobeno i rozdílnou rychlostí jejich embryogeneze (Hyánková et al., 2004).

Graf 1: Růstové křivky křepelky japonské (*Coturnix japonica*): a) samci b) samice (Hyánková et al., 2001).

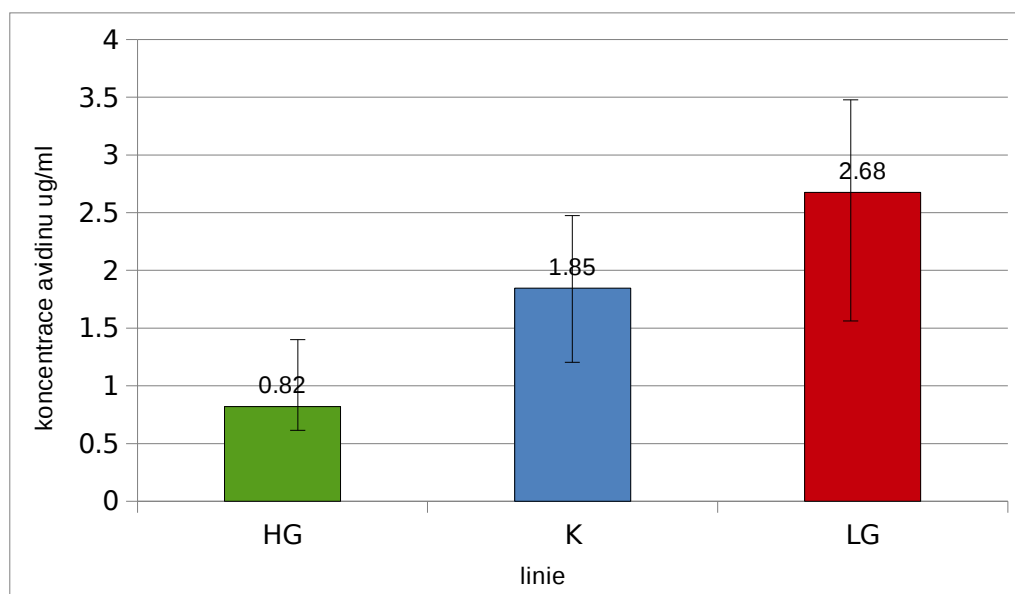


Vstupními pre-analýzami na vejcích linií HG, K (kontrolní) a LG byla zjištěna průměrná hmotnost bílku (Graf 2) a průměrná koncentrace avidinu v bílku (Graf 3) jednotlivých linií. Koncentrace avidinu byla stanovena na základě stejné metody jako u kachny divoké (metodika viz 3.2.). K příslušným pre-analýzám bylo použito $n = 24$ vajec pro každou linii.

Graf 2: Průměrná hmotnost bílku vejce křepelky japonské (*Coturnix japonica*) pro jednotlivé linie.



Graf 3: Průměrné koncentrace avidinu v bílku jednotlivých linií se směrodatnou odchylkou (SD).



Pro avidinovou manipulaci byla použita vejce ze stejného chovu a stejných linií, na kterém byly provedeny pilotní experimenty. Manipulace proběhla ve třech časových opakováních v množství 50 vajec pro každou linii, celkové $n = 450$ vajec. U poloviny vajec náhodně vybraných v rámci každého opakování a linie bylo provedeno manipulativní zvýšení koncentrace avidinu, zatímco druhá polovina sloužila jako kontrola. Množství avidinu bylo zvyšováno o 1 SD (směrodatnou odchylku) od průměrného obsahu avidinu v bílku u dané linie (vypočteno na základě zjištěných koncentrací avidinu a objemů bílku pro jednotlivé linie, Graf 3). Do bílku bylo vpraveno dané množství avidinu (HG = 4,3 g; K = 7,2 g; LG = 8,6 g) rozpuštěného v 50 ul sterilního PBS. Do zbylé poloviny kontrolních vajec od každé linie bylo obdobným způsobem aplikováno 50 ul pouze sterilního PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným, phosphate buffered saline). Aby bylo zabráněno zavlečení infekce dovnitř vejce, byla pro aplikaci použita vždy nová sterilní jehla i stříkačka (Micro-Fine Plus 0.33×12.7 mm). Před manipulací byl povrch vejce očištěn 70 % ethanolem. Vzniklý otvor byl po perforaci skořápky jehlou (Terumo) a vpravení roztoku zakápnut malým množstvím gelového vteřinového lepidla. Podobný typ manipulace je běžně používán a nebyl u něj zjištěn výrazný vliv na líhivost (např. Andersson & Åhlund, 2001).

Označená a zvážená vejce byla vložena do inkubátorů nastavených na teplotu 37,5 °C a vlhkost 60 %. Po dvou týdnech byla vejce vložena do síťových pytlíků kvůli jejich identifikaci po vylíhnutí (Hořák & Albrecht, 2006) a přemístěna do líhně (průběh

experimentu viz Tabulka 2). Líhnutí proběhlo mezi 16. a 19.dnem po umístění vajec do inkubátorů. Pro všechna mláďata byl stanoven čas líhnutí v intervalu tří hodin, který byl pro další analýzy převeden na index líhnutí. Následně byla mláďata označena kroužky s číselným kódem. Ihned po vylíhnutí byla provedena první měření mláďat, kdy byla zjišťována hmotnost (váha Kern CM s přesností na 0,01 g) a délky tarzů (digitální šuplera). Celkem byla mláďata v průběhu celého experimentu (15 dní) měřena šestkrát v tří denních intervalech. Pátý den (vždy po druhém měření) byl polovině mláďat aplikován lipopolysacharid (LPS), tvořící hlavní komponentu stěny G- bakterií (Salton & Kim, 1996). Lipopolysacharid je schopen vazbou na MHC receptory aktivace T-lymfocytů (Licastro et al., 1993), zároveň může být rozpoznán makrofágy a spustit tím produkci cytokinů, jež aktivují B-lymfocyty (Bucala, 1992). Aplikace LPS je standardním imunologickým testem bez letálních následků, reakcí na aplikaci LPS je však u mláďat snížení rychlosti růstu (Koutsos & Klasing, 2001). Mláďatům bylo aplikováno 80 ul v koncentraci 8 mg LPS na kg zvířete. Toto množství bylo dále ošetřeno na průměrné hmotnosti mláďat jednotlivých linií.

Tabulka 2: Průběh manipulativního experimentu – avidin.

INKUBACE VAJEC	PO VYLÍHNUTÍ						
15.-17.den před líhnutím	0.den	3.den	4.den	6.den	9.den	12.den	15.den
manipulace avidinem	1.měření	2.měření	aplikace LPS	3.měření, odběr plazmy	4.měření	5.měření	6.měření

Dva dny po aplikaci LPS byla mláďatům odebrána krev pro zjištění aktivity komplementu. Krev byla odebrána z brachiální žíly vždy novou sterilní jehlou a stříkačkou, místo odběru bylo ošetřeno 70 % ethanolem. Poté byla krev v kapilárách centrifugována pro získání plazmy. Analýza komplementu byla provedena pracovníky Ústavu experimentální biologie, PřF MUNI, Brno pod vedením pana RNDr. Pavla Hyršla, Ph. D. Tato metoda je založena na bioluminiscenci geneticky modifikované bakterie *Escherichia coli* K12 (Buchtíková et al., 2011). Bioluminiscenční reakce je zprostředkovaná bakteriálním enzymem luciferázou, která katalyzuje emisi světla. Tuto emisi je možné okamžitě měřit luminometrem. Bioluminescence je přímo spojena s kinetikou růstu bakterií (tzn. více živých bakterií odpovídá většímu luminiscenčnímu signálu). Po přidání vzorku plazmy klesala životaschopnost bakterií a aktivita komplementu jednotlivých vzorků plazmy odpovídala času nutnému pro usmrcení 50 % bakterií v reakční směsi.

3.3.2. Manipulace s koncentrací lysozymu v bílku

Manipulativní experiment s koncentrací lysozymu proběhl z technických důvodů pouze na linii LG (rychlejší růst v rané postnatální fázi, viz Graf 1) křepelky japonské (*Coturnix japonica*). V pilotních experimentech byla na setu vajec (n = 48 vajec) zjištěna stejně jako v experimentu na kachně divoké (metodika viz 3.2.) průměrná koncentrace lysozymu a její směrodatná odchylka od průměru pro studovanou LG linii křepelky japonské. Vlastní manipulace probíhala v množství 11 mg lysozymu rozpuštěného v 50 ul sterilního PBS (phosphate buffered saline) na vejce.

Následný průběh experimentu byl stejný jako v předchozím případě (viz 2.2.1.), morfometrické parametry však byly z technických důvodů zjišťovány pouze do devátého dne, resp. byla provedena pouze čtyři měření (Tabulka 3). Aplikace lipopolysacharidu proběhla opět v množství 8 mg LPS na kg zvířete rozpuštěného v 80 ul sterilního PBS.

Tabulka 3: Průběh manipulativního experimentu – lysozym.

INKUBACE VAJEC	PO VYLÍHNUTÍ				
15.-17.den před líhnutím	0.den	3.den	4.den	6.den	9.den
manipulace lysozymem	1.měření	2.měření	aplikace LPS	3.měření, odběr plazmy	4.měření

3.4. Statistické zpracování dat

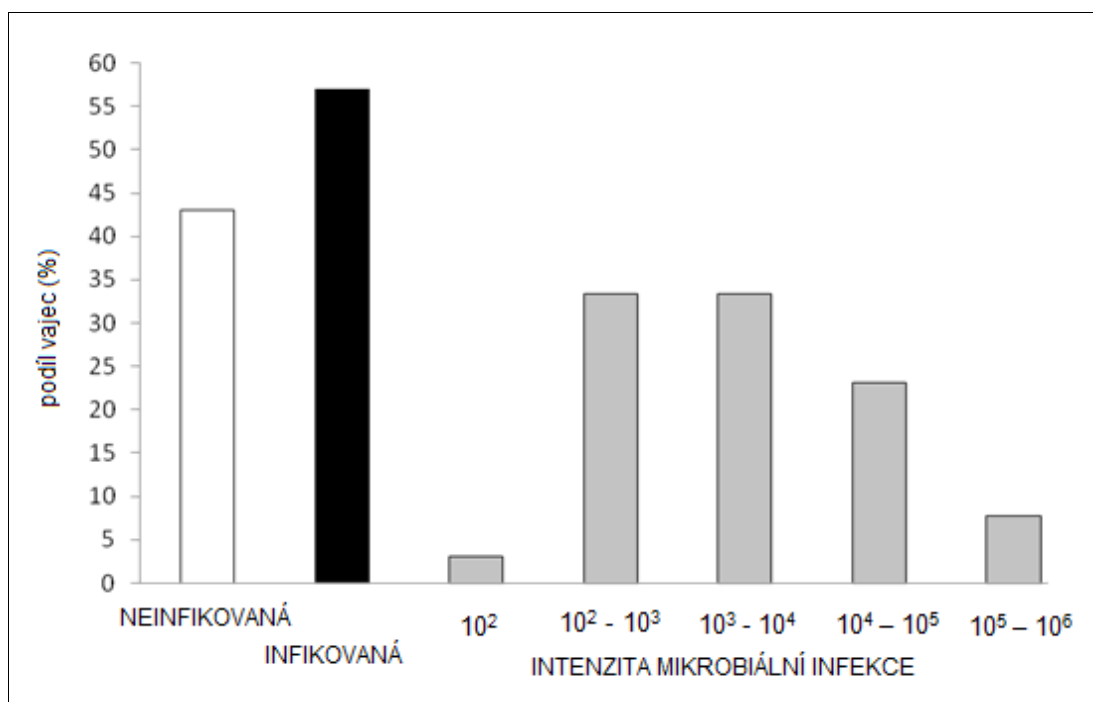
Pro zpracování statistických dat byl použit software R (14.1.1). V některých případech data nesplňovala podmínky normálního rozložení, proto musela být logaritmicky transformována. Analýza dat v R začala vždy vystavěním plného modelu (tj. modelu, který obsahoval všechny vysvětlované proměnné plus jejich dvojnásobné interakce), ze kterého byly zpětně odstraňovány nesignifikantní proměnné pro získání minimálního adekvátního modelu (Crawley, 2007). Z modelu byly postupně odstraňovány nevýznamné interakce a následně nevýznamné hlavní efekty. Signifikance jednotlivých vysvětlovaných proměnných byla odhadnuta porovnáním deviance redukovaného modelu a modelu, který tuto proměnnou obsahoval pomocí likelihood ratio testu, za předpokladu χ^2 rozložení rozdílů deviancí. Tak vznikl minimální adekvátní model se všemi členy průkaznými (Crawley, 2007). Opodstatněnost odstranění proměnné bylo ověřeno standardním testem. Pro všechny analýzy byly za signifikantní považovány výsledky s $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Korelativní analýza antimikrobiálního potenciálu bílkových proteinů – kachna divoká (*Anas platyrhynchos*)

V případě korelativního měření prováděného na vejcích kachny divoké byla pozornost věnována vlivu koncentrace antimikrobiálních proteinů na riziko mikrobiální infekce uvnitř vejce a úspěšnost líhnutí. Pro analýzy bylo k dispozici celkem 137 experimentálních vajec, pro něž byly získány údaje o koncentracích antimikrobiálních proteinů v bílku, z toho bylo 79 vajec infikovaných a 58 neinfikovaných. V rámci infikovaných vajec byla prokázána různá distribuce intenzit bakteriální infekce, vyjádřené jako počet bakteriálních buněk na 1 ml bílku (Graf 4).

Graf 4: Podíl (%) infikovaných a neinfikovaných experimentálních vajec kachny divoké a distribuce různých intenzit bakteriální infekce u vajec pozitivních na bakteriální infekci (intenzita bakteriální infekce vyjádřena jako počet bakteriálních buněk na 1 ml bílku).



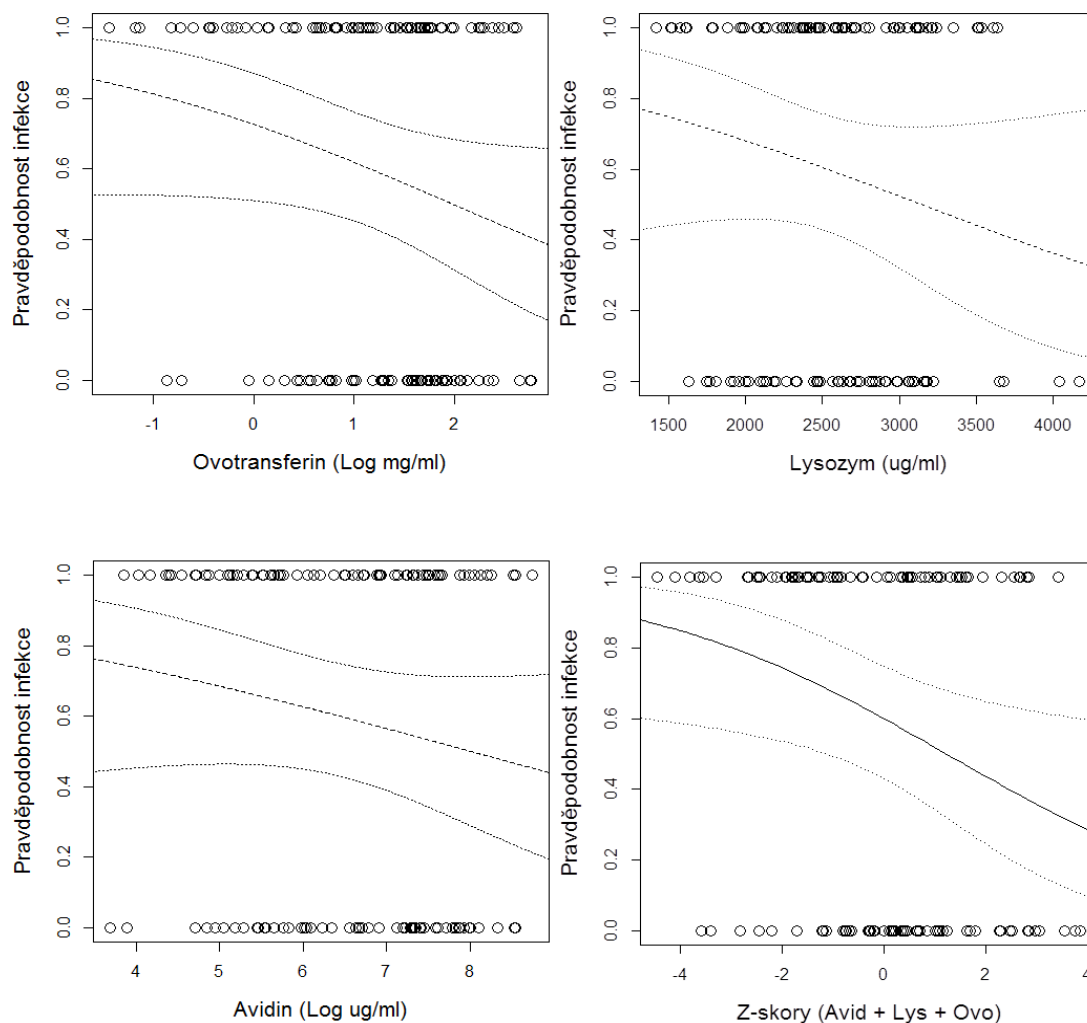
V analýzách koncentrace bílkových antimikrobiálních proteinů jsem pomocí lineární regrese testovala vzájemnou korelaci jednotlivých proteinů a prokázala slabou pozitivní korelaci mezi avidinem a ovotransferinem ($F_{(1,127)} = 5.562$, $p = 0.01988$). Další korelace mezi bílkovými proteiny nebyla nalezena (avidin \times lysozym: $F_{(1,127)} = 1.39$, $p = 0.2406$; ovotransferin \times lysozym: $F_{(1,127)} = 0.2748$, $p = 0.60104$).

V dalším kroku jsem použila mixované zobecněné lineární modely (GLMM, binomické rozdělení chyb, logit link funkce, balíček lme4) s identitou hnízda jako náhodným interceptem, abych otestovala vliv koncentrace jednotlivých antimikrobiálních proteinů na pravděpodobnost bakteriální infekce uvnitř vejce. Binární vysvětlovanou proměnnou byla přítomnost infekce, přičemž koncentrace jednotlivých proteinů byly použity jako kontinuální vysvětlovaná proměnná (logaritmická transformace v případě avidinu i lysozymu). Na základě těchto modelů nebyla prokázána signifikantní závislost mezi rizikem bakteriální infekce a koncentrací antimikrobiálních proteinů v bílku, kromě marginálně nesignifikantního vlivu ovotransferinu (Tabulka 4). Z predikcí modelů však vyplývá, že vejce s vyššími koncentracemi antimikrobiálních proteinů měly až o 40 % nižší riziko infekce (Graf 5). Na závěr jsem standardizovala koncentrace antimikrobiálních proteinů jako Z-skóry a provedla analýzu vlivu součtu Z-skór všech tří proteinů pro jednotlivá vejce na riziko infekce. Identita hnízda byla opět zahrnuta jako náhodná proměnná. Společné působení antimikrobiálních proteinů prokazatelně snižovalo riziko bakteriální infekce ve vejci (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 5.160$, $p = 0.0231$).

Tabulka 4: Mixovaný zobecněný lineární model vlivu koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku na riziko infekce (binární vysvětlovaná proměnná) ve vejci.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
ovotransferin	1	3.125	0.0771
avidin	1	1.508	0.2194
lysozym	1	1.018	0.3131

Graf 5: Predikce vlivu antimikrobiálních proteinů na riziko infekce na základě GLMM s přibližnými 95 % konfidenčními intervaly.



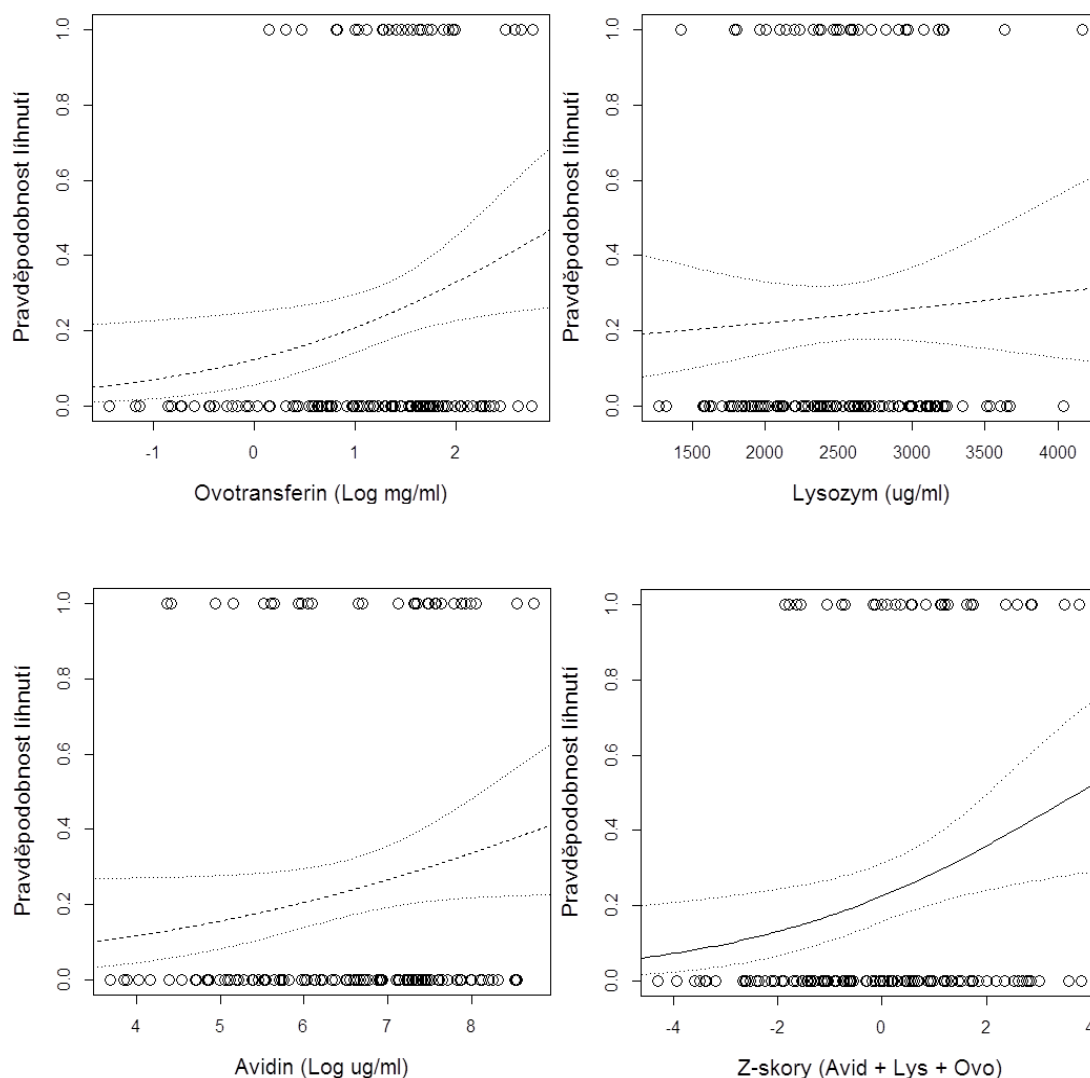
V následujícím kroku jsem obdobným způsobem pomocí GLMM testovala zda je pravděpodobnost líhnutí ovlivněna koncentrací jednotlivých proteinů v bílku a přítomností bakteriální infekce. Identita hnízda, ze kterého jednotlivá vejce pocházela, byla opět zahrnuta jako náhodný efekt a přítomnost nebo nepřítomnost bakteriální infekce jako binární vysvětlující proměnná. Pouze u ovotransferinu byla prokázána hraniční nevýznamnost vlivu koncentrace tohoto proteinu na úspěšnost líhnutí, u ostatních proteinů byl tento vztah nesignifikantní (Tabulka 5, Graf 6). Stejně jako v případě vlivu na riziko infekce jsem analyzovala vliv Z-skóre antimikrobiálních proteinů na líhivost. I v tomto případě společné působení antimikrobiálních proteinů pozitivně ovlivňovalo úspěšnost líhnutí (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 4.055$, $p = 0.0441$). Překvapivě však nebyl pomocí GLMM dále

nalezen žádný vliv mikrobiální infekce na úspěšnost líhnutí (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 0.001$, $p = 0.9718$).

Tabulka 5: Mixovaný zobecněný lineární model vlivu antimikrobiálních proteinů v bílku na úspěšnost líhnutí (binární vysvětlovaná proměnná) ve vejci.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
ovotransferin	1	3.734	0.0533
avidin	1	2.079	0.1493
lysozym	1	0.003	0.9547

Graf 6: Predikce vlivu antimikrobiálních proteinů na úspěšnost líhnutí na základě GLMM s přibližnými 95 % konfidenčními intervaly.



4.2. Manipulativní experimenty – křepelka japonská (*Coturnix japonica*)

4.2.1. Manipulace s koncentrací avidinu v bílku

4.2.1.1. Koncentrace avidinu u modelového druhu

Manipulativní experiment s koncentracemi avidinu v bílku probíhal na třech liniích křepelky japonské šlechtěných na různou rychlost růstu. HG a LG linie jsou charakterizovány, navzdory podobnému růstovému potenciálu, různými tvary růstové křivky (podrobněji viz 3.2.1.). Zároveň byly pro tyto linie zjištěny prokazatelně rozdílné koncentrace avidinu v bílku ($F_{(2,58)} = 19.47$, $p \leq 0.0001$), pro HG = 0,82 ug/ml, K = 1,85 ug/ml, LG = 2,68 ug/ml (Graf 3).

4.2.1.2. Úspěšnost líhnutí

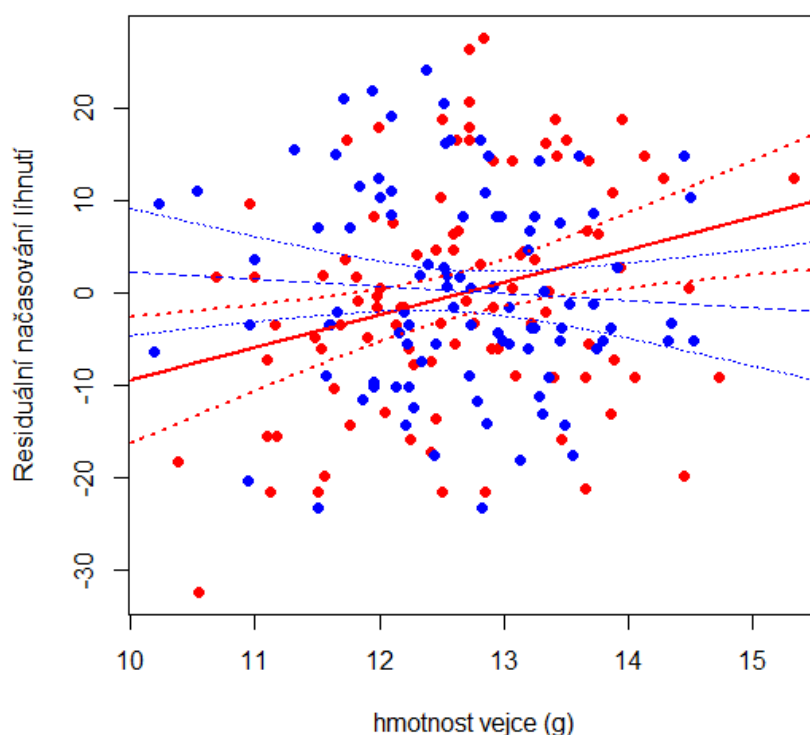
Pomocí lineárních mixovaných modelů jsem testovala vztah mezi pravděpodobností líhnutí a experimentálním zvýšením koncentrace avidinu v bílku ve vejcích jednotlivých linií křepelky japonské. Replikace daného pokusu, ze kterého jednotlivá vejce pocházela, byla zahrnuta jako náhodný efekt. Manipulace s koncentrací avidinu byla použita jako binární vysvětlující proměnná. Do plného modelu byl zahrnut i efekt linie a váha vejce. Přímý vliv manipulace avidinem na úspěšnost líhnutí se nepodařilo prokázat stejně jako jeho vliv v interakci s dalšími vysvětlujícími proměnnými, které byly do modelu zahrnuty. (Tabulka 6). Průkazný byl pouze efekt linie s průměrnou pravděpodobností líhnutí LG = 55 %, K = 48 %, HG = 34 %.

Tabulka 6: Význam jednotlivých efektů na úspěšnost líhnutí v GLMM modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
linie	2	14.371	0.0008
váha vejce	1	0.838	0.3601
manipulace	1	1.166	0.2802
váha vejce \times linie	2	5.801	0.0550
váha vejce \times manipulace	1	0.884	0.3472
linie \times manipulace	2	1.660	0.4362

Pomocí GLMM jsem dále analyzovala vliv avidinu na délku inkubace, replikace daného pokusu byla opět zahrnuta jako náhodný efekt. Průkazný vliv avidinu na čas líhnutí byl pozorován v interakci s váhou vejce (Graf 7), kdy zvýšená koncentrace avidinu v bílku prodlužovala dobu inkubace u těžších vajec ($F_{(5,195)} = 10.46$, $p = 0.0398$). Toto testování dále proběhlo nezávisle pouze pro vejce se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 8.215$, $p = 0.0442$) a pro vejce kontrolní (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 0.397$, $p = 0.5288$), stejně průkazné výsledky interakce manipulace avidinem s váhou vejce byly dále zjištěny i po odstranění odlehlých hodnot.

Graf 7: Vliv avidinu v interakci s hmotností vejce na délku inkubace u manipulovaných vajec (červeně) a kontrolních vajec (modře) s 95 % konfidenčními intervaly pro regrese fitované samostatně pro manipulovaná a nemanipulovaná vejce.



4.2.1.3. Růstové parametry mláďat

Fenotyp mláďat byl pozorován u manipulativního experimentu s koncentrací avidinu ve vejcích křepelky japonské (*Coturnix japonica*), mláďata byla morfometricky měřena po dobu 16ti dnů (6 měření, Tabulka 2).

V prvním kroku jsem pomocí lineární mixovaného modelu sledovala růstové parametry (hmotnost, délka tarzu) mláďat při vylíhnutí, manipulace byla opět použita jako kategoriální vysvětlující proměnná. Hmotnost mláďete a průměrná délka tarzu v prvním měření byly poměrně slabě korelované ($R^2 = 0.08$, $p \leq 0.0001$), a proto byly použity jako

dvě vysvětlované proměnné ve dvou nezávislých skupinách modelů. Do plného modelu byly opět zahrnuty typ linie a váha vejce. Signifikantní efekt na hmotnost mláďat a délku tarzu byl prokázán pouze pro proměnnou linie a váhu vejce (Tabulka 7), vliv manipulativně zvýšené koncentrace avidinu nebyl průkazný ani jako hlavní efekt ani v interakci s dalšími proměnnými.

Tabulka 7: Význam jednotlivých efektů na růstové parametry při vylíhnutí v GLMM modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	hmotnost		tarzus	
		χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
linie	1	110.480	< 0.0001	50.997	< 0.0001
váha vejce	2	2.363	0.3068	13.767	0.0010
manipulace	1	1.067	0.3015	0.756	0.3845
linie × manipulace	2	3.721	1.1556	4.260	0.1189
váha vejce × linie	2	2.857	0.2397	2.675	0.4445
váha vejce × manipulace	1	0.009	0.9250	2.632	0.1047
váha vejce × linie × manipulace	3	3.237	0.1982	3.215	0.3597

V dalším kroku jsem hledala vhodný model pro analýzu růstové křivky. Vzhledem k silné korelaci mezi délkou tarzu a hmotností jsou prezentovány výsledky pouze pro analýzu hmotnosti. Analýza růstových křivek na základě délky tarzu však ukazuje konzistentní výsledky. Použila jsem nelineární mixované modely (balíček nlme), s identitou zvířete jako náhodným efektem ovlivňujícím všechny parametry daného modelu. Jako kritérium byla využita hodnota AIC (Akaike's information criterion, zahrnující komplexnost a vysvětlující hodnotu modelu). Jako nejvhodnější model z kandidátních, které byly brány v úvahu vzhledem k počtu měření pro jednotlivá zvířata (maximální počet odhadovaných parametrů = 3), byl vybrán Gompertzův model. Ani analýza růstové křivky pomocí Gompertzova modelu (Tabulka 8) neprokázala efekt manipulace s koncentrací avidinu v bílku na růstové parametry mláďat (Tabulky 9).

Tabulka 8: Porovnání modelů růstové křivky pro hmotnost mláďat pomocí AIC, nejvhodnější model je zobrazen tučně.

název modelu	rovnice	d.f.	AIC
lineární model	hmotnost = $a + b \cdot \text{čas}$	2	7980.806
kvadratický model	hmotnost = $a + b_1 \cdot \text{cas} + b_2 \cdot \text{čas}^2$	3	7889.508
logistický model	hmotnost = $a / (1 + \exp((b_1 - \text{čas}) / b_2))$	3	6423.09
Gompertzův model	hmotnost = $a \cdot \exp(-b_2 \cdot b_3^{\text{čas}})$	3	5987.705
exponenciální model	hmotnost = $a_0 \cdot \exp(r \cdot \text{čas})$	2	7465.159

Tabulka 9: Význam jednotlivých efektů na hmotnost mláďat v Gompertzově modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

parametr	proměnná	P
a	linie	< 0.0001
a	manipulace	0.891
a	LPS	0.1033
a	manipulace × linie	0.685
a	manipulace × LPS	0.1818
a	LPS × Linie	0.0953
b²	linie	< 0.0001
b ²	manipulace	0.769
b ²	LPS	0.9766
b ²	manipulace × linie	0.1279
b ²	manipulace × LPS	0.2152
b ²	LPS × linie	0.4961
b³	linie	< 0.0001
b ³	manipulace	0.9288
b ³	LPS	0.0568
b ³	manipulace × linie	0.7817
b ³	manipulace × LPS	0.856
b ³	LPS × linie	0.868

4.2.1.4. Imunologické parametry mláďat

V experimentu se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku byla mezi třetím a šestým dnem sledována reakce mláďat na LPS (lipopolysacharid) a aktivita komplementu jejich plazmy. Průměrná délka tarzů a hmotnost mláďate byly jak ve třetím ($R^2 = 0.246$,

$p \leq 0.0001$) tak i druhém ($R^2 = 0.321$, $p \leq 0.0001$) měření silně korelované. Z tohoto důvodu není vhodné pracovat s nimi ve statistickém hodnocení jako se dvěma nezávislými proměnnými. Pro testování vlivu lipopolisacharidu (LPS) na fenotyp mláďat jsem proto nejprve převedla jejich hmotnosti a délky tarzu na Z-skóry (data byla transformovaná samostatně pro 2. a 3. měření). Pro tato Z-skóre, hmotnost a délku tarzu byl dále dosazen lineární regresní model. Fitované hodnoty tohoto modelu byly použity jako proměnná popisující tělesnou velikost jednotlivých mláďat a reziduály jako proměnná popisující relativní hmotnost kontrolovanou na strukturální velikost. Rozdíly mezi tělesnou velikostí a reziduální hmotností pro měření před a po aplikaci LPS byly použity jako vysvětlované proměnné v modelu popisující efekt LPS. Pomocí lineárního mixovaného modelu jsem tedy testovala vliv LPS na velikost těla (Tabulka 10) a dále na reziduální hmotnost (Tabulka 11). Vliv lipopolisacharidu byl průkazný v obou případech, velikost těla byla dále průkazně ovlivněna i linií, efekt manipulace s koncentrací avidinu (testovaný jako interakce manipulace \times LPS) nebyl prokázán.

Tabulka 10: Význam jednotlivých efektů na velikost těla po aplikaci LPS v GLMM modelu v experimentu se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
LPS	1	20.522	< 0.0001
linie	2	6.223	0.0445
manipulace	1	0.869	0.3513
manipulace \times linie	2	1.054	0.5904
manipulace \times LPS	1	1.000	0.3173
LPS \times linie	2	0.469	0.7911

Tabulka 11: Význam jednotlivých efektů na reziduální hmotnost po aplikaci LPS v GLMM modelu v experimentu se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu.

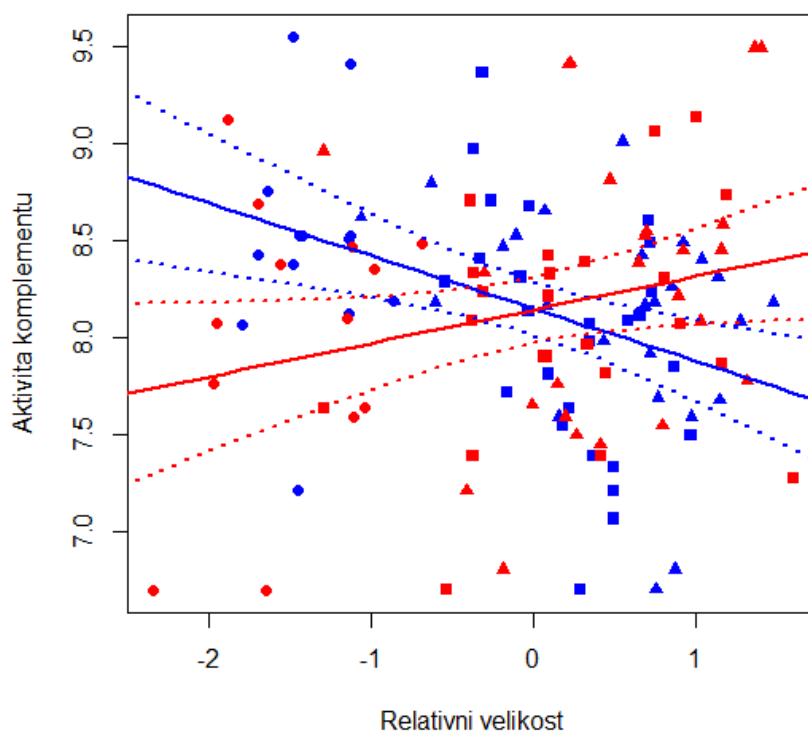
proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
LPS	1	18.637	< 0.0001
linie	2	1.240	0.5381
manipulace	1	0.017	0.8957
manipulace \times linie	2	1.893	0.3882
manipulace \times LPS	1	2.038	0.1534

Pomocí lineárních mixovaných modelů jsem sledovala aktivitu komplementu plazmy mláďat. Pro statistické výpočty byly hodnoty aktivity komplementu, tedy času potřebného pro usmrcení poloviny luminiscenčních bakterií *E. Coli*, logaritmicky transformovány. Jako parametry velikosti mláďat byly použity, stejně jako v případě vlivu lipopolisacharidu, velikost těla a reziduální hmotnost. Zpětným odstraňováním nevýznamných parametrů z modelu byl získán minimální adekvátní model (Tabulka 12). Aktivita komplementu krevní plazmy byla v dalším kroku sledována nezávisle u mláďat z vajec se zvyšovanou koncentrací avidinu v bílku (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 8.612$, $p = 0.0033$), kde aktivita komplementu průkazně klesala s rostoucí hmotností. U kontrolních mláďat byl sice neprůkazný (Δ d.f. = 1, $\chi^2 = 2.751$, $p = 0.0972$), přesto opačný trend – s rostoucí hmotností rostla i aktivita komplementu (Graf 8).

Tabulka 12: Význam jednotlivých efektů na aktivitu komplementu v GLMM modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací avidinu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
velikost	1	2.418	0.12
manipulace	1	0.777	0.3780
manipulace × velikost	1	8.538	0.0035
linie	2	0.516	0.7752
manipulace × linie	2	3.167	0.2052
reziduální hmotnost	1	2.382	0.1227
manipulace × reziduální hmotnost	1	2.427	0.1193
linie × velikost	2	1.807	0.4052
linie × reziduální hmotnost	2	0.558	0.7566

Graf 8: Vliv avidinu na aktivitu komplementu (čas potřebný pro usmrcení poloviny bakterií ve vzorku) u manipulovaných (červeně) a kontrolních (modře) mláďat v interakci s velikostí mláďete. Tečkovaně vyznačené 95 % konfidenční intervaly.



4.2.2. Manipulace s koncentrací lysozymu v bílku

4.2.2.1. Úspěšnost líhnutí

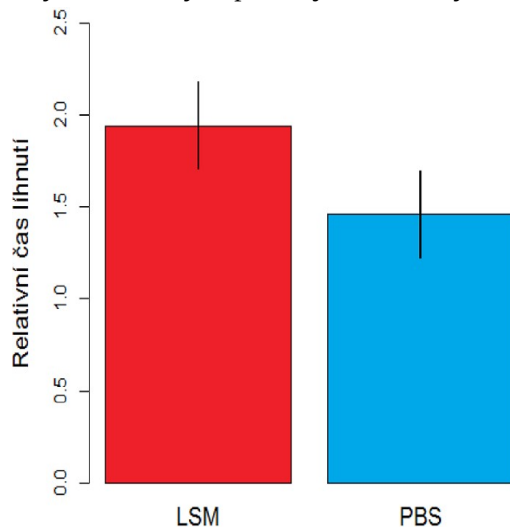
Pomocí GLMM jsem testovala, zda je pravděpodobnost líhnutí ovlivněna zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku vajec LG linie křepelky japonské. Do plného modelu byla zahrnuta také váha vejce. Replikace daného pokusu, ze kterého jednotlivá vejce pocházela, byla v modelu zahrnuta jako náhodný efekt. Přímý vliv manipulace lysozymem (Tabulka 13) na úspěšnost líhnutí nebyl signifikantně prokázán. Vliv manipulativního zvyšování koncentrace proteinu nebyl průkazný ani v interakci s dalšími vysvětlujícími proměnnými zahrnutými do modelu.

Tabulka 13: Význam jednotlivých efektů na úspěšnost líhnutí v GLMM modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
váha vejce	1	2.1747	0.1403
manipulace	1	0.6787	0.4101
váha vejce \times manipulace	1	0.5891	0.4428

V dalším kroku jsem pomocí lineárních modelů analyzovala vliv manipulace s koncentrací lysozymu v bílku na délku inkubace. Index líhnutí v experimentu se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku byla získán pouze pro jeden manipulativní set vajec. Do modelu byla kromě efektu manipulace zařazena opět i váha vejce, průkazný vliv na délku inkubace byl však nalezen pouze pro efekt manipulace s koncentrací lysozymu ($F_{(1,42)} = 4.158$, $p = 0.0478$) (Graf 9). Hmotnost vejce ($F_{(1,41)} = 0.135$, $p = 0.715$), ani v interakci s lysozymovou manipulací ($F_{(1,40)} = 0.01$, $p = 0.9224$) průkazná nebyla.

Graf 9: Relativní čas líhnutí (délka inkubace) pro vejce s experimentálně zvýšenou koncentrací lysozymu (sloupec LSM) a pro kontrolní vejce (sloupec PBS). Chybové úsečky odpovídají střední chybě rozdílu.



4.2.2.2. Růstové parametry mláďat

Fenotyp mláďat byl pozorován i u manipulativního experimentu s koncentrací lysozymu ve vejcích křepelky japonské (*Coturnix japonica*), mláďata byla morfometricky měřena z technických důvodů pouze deset dnů (4 měření, Tabulka 3).

V prvním kroku jsem pomocí lineárního mixovaného modelu sledovala růstové parametry mláďat při vylíhnutí, manipulace byla opět použita jako kategoriální vysvětlující

proměnná. Hmotnost mláděte a průměrná délka tarzu v prvním měření byly poměrně slabě korelované ($R^2 = 0.081$, $p = 0.0061$), a proto byly použity jako dvě vysvětlované proměnné ve dvou nezávislých skupinách modelů. Signifikantní efekt na hmotnost mlád'at a délku tarzu byl prokázán pouze pro váhu vejce (Tabulka 14), vliv manipulativně zvýšené koncentrace lysozymu na morfometrické parametry mlád'at při vylíhnutí nebyl prokázán.

Tabulka 14: Význam jednotlivých efektů na růstové parametry při vylíhnutí v GLMM modelu pro experiment se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	hmotnost		tarzus	
		χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
váha vejce	1	80.736	< 0.0001	11.105	0.0009
manipulace	1	0.071	0.7899	0.709	0.3997
váha vejce × manipulace	1	0.061	0.8054	0.280	0.5965

Na rozdíl od avidinové manipulace jsem pro analýzu růstové křivky u mlád'at v experimentu, kde bylo manipulováno s koncentrací lysozymu v bílku, vzhledem k malému počtu opakovaných měření jednotlivých mlád'at (4) použila jednoduchý exponenciální model ($\text{hmotnost} / \text{tarzus} = a_0 \cdot \exp(r \cdot \text{čas})$), který byl lepší než dvě testované alternativy (Tabulka 15) pro oba sledované parametry – hmotnost i délku tarzu. Stejně jako u avidinu nebyl efekt manipulace na růst mlád'at prokázán (Tabulka 16).

Tabulka 15: Porovnání modelů růstové křivky pro hmotnost mlád'at pomocí AIC, nejvhodnější model je zobrazen tučně.

název modelu	rovnice	d.f.	AIC
lineární model	$\text{hmotnost} / \text{tarzus} = a + b \cdot \text{čas}$	2	2397.512
kvadratický model	$\text{hmotnost} / \text{tarzus} = a + b_1 \cdot \text{čas} + b_2 \cdot \text{čas}^2$	3	2323.862
exponenciální model	$\text{hmotnost} / \text{tarzus} = a_0 \cdot \exp(r \cdot \text{čas})$	2	2187.902

Tabulka 16: Efekt jednotlivých proměnných na hmotnost mlád'at v exponenciálním modelu. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání min. adekvátního, resp. nulového modelu.

parametr	proměnná	<i>P</i>
a_0	manipulace	0.3073
a_0	LPS	0.5641
a_0	manipulace × LPS	0.8528
r	manipulace	0.8618
r	LPS	0.4192
r	manipulace × LPS	0.4520

4.2.2.3. Imunologické parametry mláďat

V experimentu se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku byla opět mezi třetím a šestým dnem sledována reakce mláďat na LPS (lipopolysacharid) a aktivita komplementu jejich plazmy. Testování vlivu lipopolysacharidu (LPS) na velikost mláďat bylo provedeno obdobně jako v případě manipulace avidinem vzhledem k silné korelaci hmotnosti a délky tarzu pro druhé ($R^2 = 0.518$, $p \leq 0.0001$) i třetí měření ($R^2 = 0.662$, $p \leq 0.0001$). Nejprve jsem převedla velikost mláďat, resp. jejich hmotnosti a délky tarzu na Z-skóre pro každého jedince. Pro tato Z-skóre, hmotnost a délku tarzu byl dále dosazen lineární regresní model, jehož fitované hodnoty byly použity jako vysvětlovaná proměnná popisující tělesnou velikost a reziduály jako proměnná popisující relativní hmotnost kontrolovanou na strukturální velikost. Rozdíly mezi tělesnou velikostí (Tabulka 17) a reziduální hmotností (Tabulka 18) pro měření před a po aplikaci LPS byly použity jako vysvětlované proměnné v lineárním mixovaném modelu popisující efekt LPS. Replikace daného pokusu, ze kterého jednotlivá vejce pocházela, byla zahrnuta jako náhodný efekt. Vliv aplikace lipopolysacharidu byl průkazný pouze v případě velikosti těla, ne však pro reziduální hmotnost. Efekt zvýšené koncentrace lysozymu v bílku nebyl prokázán v žádném z testovaných modelů.

Tabulka 17: Význam jednotlivých efektů na velikost těla po aplikaci LPS v GLMM modelu v experimentu se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu. Statisticky významné faktory ($\alpha = 0.05$) zahrnuté v minimálním adekvátním modelu jsou zobrazeny tučně.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
LPS	1	17.553	< 0.0001
manipulace	1	1.693	0.1932
Manipulace \times LPS	1	2.377	0.1692

Tabulka 18: Význam jednotlivých efektů na velikost těla po aplikaci LPS v GLMM modelu v experimentu se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu, resp. nulového modelu.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
LPS	1	0.723	0.3951
manipulace	1	0.013	0.9093
Manipulace \times LPS	1	0.681	0.4092

Pomocí lineárního mixovaného modelu jsem testovala aktivitu komplementu plazmy mláďat den po aplikaci LPS. Pro statistické výpočty byly hodnoty aktivity komplementu,

tedy času potřebného pro usmrcení poloviny luminiscenčních bakterií *E. Coli*, logaritmicky transformovány. Zpětným odstraňováním nevýznamných parametrů z modelu byl získán minimální adekvátní model. Vliv zvýšené koncentrace lysozymu ve vejci ani další parametry zahrnuté do modelu neměly průkazný vliv na aktivitu komplementu mláďat křepelky japonské (Tabulka 19).

Tabulka 19: Lineární mixovaný model pro vliv na aktivitu komplementu. Nevýznamné parametry byly odstraňovány pro získání minimálního adekvátního modelu, resp. nulového modelu.

proměnná	Δ d.f.	χ^2	P
manipulace	1	0.199	0.6554
hmotnost	1	0.728	0.3935
tarzus	1	0.145	0.7029
manipulace × velikost	1	0.189	0.6639
manipulace × reziduální hmotnost	1	2.664	0.1026

5. Diskuze

5.1. Variabilita v koncentraci avidinu u tří linií křepelky japonské šlechtěných na různou rychlost růstu

Průměrné koncentrace avidinu v bílku vajec křepelky japonské se prokazatelně lišily pro jednotlivé linie, které byly používány v experimentu s manipulativním zvyšováním tohoto proteinu v bílku. HG, K a LG linie jsou charakterizovány různými tvary růstové křivky (viz Hyánková et al., 2001). Rozdílná rychlost embryogeneze těchto linií vede zejména k růstovým rozdílům mezi liniemi během prvního týdne po vylíhnutí (Hyánková et al., 2004), kde LG linie roste nejrychleji a HG nejpomaleji. Ačkoliv typ linie nebyl v této práci hlavním faktorem testovaným ohledně vlivu na růstové parametry mlád'at při vylíhnutí a v průběhu experimentu, byl tento faktor zahrnut do většiny modelů a výsledky vykazují konzistentní charakter pro vliv jednotlivých linií – HG, K a LG (Tabulky 7, 9 a 10). Předpoklad, že vejce mlád'at s nižší rychlostí růstu (linie HG) budou obsahovat vyšší koncentrace avidinu, který by vzhledem k jeho schopnosti vázat růstový prekurzor biotin (Board & Fuller, 1974) mohl ovlivňovat průběh embryogeneze a případně vysvětlovat menší růstové parametry při vylíhnutí u těchto mlád'at (Dakshinamurti, 2005), však nebyl potvrzen. Pro koncentrace avidinu byl nalezen přesně opačný trend, než jsou predikce této hypotézy: HG linie obsahovala nejnižší průměrné koncentrace tohoto proteinu, zatímco LG linie obsahovala průměrně až třikrát vyšší koncentrace (Graf 3). Tyto výsledky proto nepotvrzují závěry některých předchozích studií, které naznačují, že rychlost růstu mlád'at může být na mezidruhové/mezipopulační úrovni ovlivněna rozdílnou depozicí některých maternálních efektů, jako třeba androgenů (např. Schwabl, 1996a; Eising et al., 2001; Pilz et al., 2004; Groothuis et al., 2005b). Urychlení růstu způsobené těmito maternálními efekty však může přinášet i jisté nevýhody především v podobě nedostatečného dozrání některých funkcí jako je imunitní systém (Andersson et al., 2004). Průměrně vyšší koncentrace avidinu v bílku linie LG (zvýšená rychlost růstu) by mohla být vysvětlena potenciálně kompenzačním efektem avidinu na imunitu LG jedince, která mohla být z důvodu rychlého růstu potlačována (Lochmiller & Deerenberg, 2000). Vzhledem k manipulativnímu charakteru experimentů popsaných v této práci však nelze zjistit, zda mají přirozené koncentrace avidinu v bílku jednotlivých linií skutečně vliv na imunitu mlád'at případně na další fenotypové znaky.

5.2. Riziko mikrobiální infekce a úspěšnost líhnutí

Riziko mikrobiální infekce bývá považováno vedle predace za hlavní faktor ovlivňující úspěšnost líhnutí u ptáků (Pinowski et al., 1994, Godard et al., 2007). Z tohoto důvodu se u ptáků vyvinula celá řada fyziologických, morfologických a behaviorálních mechanismů, které mají za úkol chránit embryo před infekcí – například optimalizace velikosti snůšky (Cooper et al., 2005) nebo inkubační chování (Godard et al., 2007). Jedním z těchto mechanismů je i přenos maternálních antimikrobiálních proteinů do vaječného bílku, které pravděpodobně mohou chránit vyvíjející se embryo před bakteriální infekcí (Wellman-Labadie et al., 2008). Dosavadní empirická podpora pro tuto hypotézu je však překvapivě poměrně chabá. Většina prací, které se touto problematikou zabývaly, se zaměřovala především na korelativní vztah mezi koncentracemi těchto proteinů v bílku a exogenními faktory prostředí, o kterých se předpokládá, že mají vliv i na riziko bakteriální infekce (Horrock, 2011). Těmito faktory jsou například vzdušná vlhkost nebo teplota (Beissinger et al., 2005). Naproti tomu mně není (kromě této práce) známa žádná studie, která by přímo testovala vztah mezi koncentracemi antimikrobiálních proteinů ve vejci a prevalencí bakteriální infekce, potažmo vlivem těchto dvou faktorů na líhivost.

Samostatný vliv koncentrace v této práci sledovaných antimikrobiálních proteinů (avidinu, lysozymu a ovotransferinu) ve vejci kachny divoké na riziko mikrobiální infekce ve vejci nebyl signifikantně průkazný, avšak přirozené koncentrace všech tří druhů antimikrobiálních proteinů vykazovaly výraznou negativní korelaci s pravděpodobností přítomnosti bakteriální infekce ve vejcích (Graf 5). Pravděpodobnost bakteriální infekce byla u jedinců s nejnižšími koncentracemi antimikrobiálních proteinů zhruba dvojnásobná v porovnání s jedinci s nejvyššími koncentracemi. Navíc, pokud předpokládáme, že jednotlivé proteiny mají aditivní efekt na riziko bakteriální infekce, potom vztah mezi rizikem bakteriální infekce a antimikrobiálním potenciálem bílku (definovaným jako suma normalizovaných koncentrací jednotlivých proteinů v daném vejci) vyjde signifikantně. Vzhledem k podobnému sklonu regresních křivek pro jednotlivé proteiny se zdá tento předpoklad aditivity jako opodstatněný. Antimikrobiální obrana v tomto případě se tedy zdá být komplexním mechanismem, zejména vzhledem k odlišné antimikrobiální aktivitě jednotlivých sledovaných proteinů. Avidin a ovotransferin svými vlastnostmi vázat biotin, resp. železo, které jsou nezbytné pro proliferaci mikroorganismů, působí spíše bakteriostaticky (Wellman-Labadie et al., 2008). Společně s lysozymem, který je schopný

přímé lytické aktivity především na stěnu G+ bakterií (Callewaert & Michiels, 2010), mají tyto proteiny přímý vliv na pravděpodobnost mikrobiální infekce ve vejci. Vzhledem k naprosto odlišným mechanismům, kterými jednotlivé proteiny ovlivňují proliferaci bakterií by bylo vhodné v dalším kroku studovat vztah mezi koncentracemi jednotlivých proteinů a taxonomickým složením mikrobiální komunity ve vejcích.

Stejně jako v případě rizika mikrobiální infekce byl pozorován pozitivní efekt společného působení avidinu, lysozymu a ovotransferinu na úspěšnost líhnutí u kachny divoké (Graf 6). To naznačuje, že koncentrace antimikrobiálních proteinů ovlivňuje úspěšnost líhnutí prostřednictvím redukce bakteriální infekce. Avšak vzhledem k nečekaně neprůkaznému vlivu mikrobiální infekce na úspěšnost líhnutí nelze s jistotou předpokládat, že vliv koncentrace antimikrobiálních proteinů na líhivost byl způsoben pouze jejich antimikrobiální aktivitou. Vzhledem k pleiotropním vlastnostem například avidinu či ovotransferinu je možné, že vyšší líhivost byla ovlivněna nezávisle na schopnostech těchto proteinů snižovat riziko infekce a mohla být způsobena jinými mechanismy. Co se týče samostatného vlivu antimikrobiálních proteinů na úspěšnost líhnutí byl zaznamenán slabý efekt pouze pro koncentraci ovotransferinu. Podobná pozitivní korelace byla pozorována i v případě lysozymu u samic koroptve polní krmených potravou obohacenou o karotenoidy. Tato dieta zvyšovala koncentraci lysozymu v bílku vajec, jež se projevila vyšší úspěšností líhnutí (Cucco et al., 2007), ačkoliv v tomto případě lze těžko poukazovat na jednoznačný efekt lysozymu a může se spíše jednat o vedlejší efekt karotenoidové diety. V jiných studiích nebyl přímý vztah mezi přirozenými koncentracemi antimikrobiálních proteinů v bílku a úspěšností líhnutí doposud pozorován. Na rozdíl od ostatních studií věnující se nezávisle těmto proteinům a faktorům ovlivňujícím líhivost (např. Horrock, 2011), byly v mé diplomové práci získány informace o koncentracích antimikrobiálních proteinů i úspěšnosti líhnutí pro každé jednotlivé vejce.

Určitou výpovědní hodnotu o vlivu antimikrobiálních proteinů na líhivost (ať už prostřednictvím redukce bakteriální infekce, nebo prostřednictvím jiného mechanismu) by mohla mít i experimentální část diplomové práce, ve které byla experimentálně zvyšována koncentrace avidinu a lysozymu v bílku křepelky japonské. Žádný přímý efekt na líhivost ale tyto pokusy nenaznačují (Tabulka 6). Negativní výsledek však může být způsobený částečně i designem experimentu, který neprobíhal v přirozeném prostředí, a vejce tedy nebyla vystavena příliš velkému riziku infekce ani další typům stresových faktorů jako například vystavení snůšky nepříznivým podmínkám

vnějšího prostředí. Na druhou stranu i v prostředí chovů, kde experiment probíhal, se mikroorganismy přirozeně vyskytují a experimentální vejce nebyla proti infekci nijak ošetřována. V dalších experimentech by bylo proto vhodné manipulovat jak s koncentracemi jednotlivých antimikrobiálních proteinů, tak i s mírou rizika bakteriální infekce.

5.3. Inkubace a růstové parametry mlád'at

Vzhledem k možnému pleiotropnímu působení avidinu zprostředkovanému silně specifickou vazbou na biotin, může mít tento protein vliv i na průběh embryogeneze a výsledný fenotyp mlád'at. Vyvazování volného biotinu může mít jednak bakteriostatický účinek, ale nedostatek tohoto významného růstového prekurzoru by mohl ovlivňovat i vyvíjející se embryo. Oproti těmto predikcím nebyl zaznamenán žádný jednoznačný efekt avidinové manipulace na délku inkubace vajec. Avšak mlád'ata z těžších vajec po manipulativním zvýšení koncentrace avidinu v bílku měla tendenci líhnout se později než mlád'ata z vajec lehčích, zatímco pro nemanipulovaná vejce neměla jejich váha na délku inkubace vliv (Graf 7). Vliv avidinu na embryogenezi prostřednictvím jeho schopnosti vyvazovat biotin byl pozorován především u savců (Watanabe, 1993), kde deficiencie biotinu způsobovala u embryí výrazné narušení vývoje, často končící smrtí embrya. V našem experimentu nebyl zaznamenán letální vliv zvýšené koncentrace avidinu ve vejci, čemuž bylo zabráněno manipulací ve fyziologickém rozmezí koncentrace tohoto proteinu zjištěného pro náš modelový druh. Není však jisté, zda prodloužená doba embryogeneze nebyla více ovlivněna hmotností vejce, jež je u mnoha druhů faktorem ovlivňujícím délku inkubace (např. Magrath, 1992; Meathrel et al., 1993; Deeming, 2002; Adamou et al., 2009).

Efekt přirozeně vyšší koncentrace avidinu v bílku na fenotyp mlád'at byl zatím částečně pozorován pouze u racka středomořského, kde v časně postembryonální fázi snižoval délku tarzu (Bonisoli-Alquati et al., 2010). Námi experimentálně zvýšená koncentrace avidinu v bílku vajec křepelky japonské však neměla na růstové parametry vliv v žádném z prováděných měření po dobu dvou týdnů.

Délka inkubace byla prodloužena i manipulativně zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku vajec křepelky japonské (Graf 9). Přestože tento efekt nebyl způsobený například přítomností odlehlých bodů, velikost vzorku (ve smyslu „effect size“) byla poměrně malá. Mechanismus působení lysozymu na délku inkubace lze však jen těžko odhadovat

vzhledem k nedostatku studií věnujících se této problematice. Na rozdíl od avidinu také není pro tento protein známa jiná než antimikrobiální funkce (Callewaert & Michiels, 2010), což naznačuje jediné možný vliv lysozymu na průběh embryogeneze skrze bakteriální infekci ve vejci. Bohužel existují jen studie, které prokazují pozitivní efekt lysozymové diety na rychlost růstu u dospělých ptáků, který je pravděpodobně dán zefektivněním trávicího traktu prostřednictvím antimikrobiálních vlastností tohoto proteinu (Humphrey et al., 2002). Pokud by byla manipulací překročena limitní koncentrace tohoto proteinu ve vejci, mohl by mít letální efekt, jelikož by docházelo k odstraňování bakterií výhodných pro trávení, například rodu *Lactobacillus* nebo *Lactococcus*, což jsou na aktivitu lysozymu citlivé G+ bakterie (Callewaert & Michiels, 2010). Potlačování těchto bakterií v trávicím traktu v pozdní fázi embryogeneze by mohlo hrát roli v metabolismu a využití živin ze žloutku u vyvíjejícího se embrya, což mohlo vést ke zpomalenému vývoji v podobě prodloužené doby inkubace. Nicméně tato domněnka je ryze spekulativní, není totiž jisté, zda-li jsou bakterie přítomny v trávicím traktu v průběhu embryogeneze a jestli je lysozym schopen pronikat do embrya a působit na jeho metabolismus. Hypotetickou schopnost lysozymu ovlivňovat délku inkubace prostřednictvím svého baktericidního účinku, by bylo vhodné testovat například pomocí manipulativních experimentů s koncentrací tohoto proteinu v bílku a analýzy složení mikrobiální komunity v trávicím traktu čerstvě vylíhlých mlád'at.

V experimentu se zvýšenou koncentrací lysozymu v bílku nebyl *apriori* efekt koncentrace tohoto proteinu na morfometrické parametry mlád'at předpokládán, ani zde tedy experimentální zvýšení tohoto proteinu ve vejci nemělo na fenotyp mlád'at efekt. Výše zmíněná studie u racka středomořského (Bonisoli-Alquati et al., 2010) však poukazuje i na pozitivní korelaci mezi koncentrací lysozymu v plazmě mlád'at a délkou tarzu. Jestli je ovšem tento vztah odrazem koncentrace lysozymu v bílku, či se jedná pouze o efekt dobrého výživového stavu, který má vliv na morfometrické parametry i na koncentraci lysozymu v plazmě není doloženo.

5.4. Imunologické parametry mlád'at

Dlouhodobý vliv maternálních efektů na imunitu mlád'at byl prokázán například u androgenů (viz Groothuis et al., 2005a), kde je tento efekt způsoben pozitivním vlivem hormonů na růst a rychlost metabolismu. Růst ptáků i vývoj imunity jsou energeticky velmi náročné fáze ontogeneze (Lochmiller a Deerenberg, 2000), což může vzhledem

k výše naznačeným výsledkům vlivu avidinu a lysozymu na průběh embryogeneze (nikoli však přímo na růst), kdy je utvářen imunitní systém jedince, zřejmě způsobovat i dlouhodobý efekt zvýšené koncentrace těchto proteinů v bílku na imunitu mlád'at. Experimentálně zvýšená koncentrace avidinu v bílku neměla obecně vliv na aktivitu komplementu vylíhlých mlád'at. Ovšem v interakci s velikostí vykazovala mlád'ata z manipulovaných vajec s rostoucí hmotností nižší aktivitu komplementu, zatímco u mlád'at z kontrolních vajec byl pozorován opačný trend (Graf 8).

Nepříznivé podmínky během embryonálního vývoje, například suboptimální inkubační teplota, přítomnost patogenů nebo nutriční stres mají u mnoha druhů negativní vliv na fyziologii, přežívání a reprodukční úspěch v dospělosti (např. Lindström, 1999). Zároveň bylo zjištěno, že dlouhodobé důsledky nepříznivých podmínek v časném vývoji se mění v závislosti na kvalitě prostředí, jemuž je vystaven dospělý jedinec (viz review Monaghan, 2008). V prvním případě bylo prokázáno, že mlád'ata vylíhlá za špatných podmínek trpěla suboptimálním vývojem i v dospělosti, bez ohledu na kvalitu životního prostředí (Grafen, 1988; Monaghan, 2008). Na druhou stranu některé studie zjistily, že dlouhodobé účinky vývojového stresu zůstávají za příznivých podmínek v dospělosti skryty a fyziologická reakce tedy není důsledkem kvality jedince. Pokud ale dojde ke zhoršení životních podmínek, rozdíly v kvalitě jedinců se na jejich fyziologické reakci odrazí a nakonec mohou vést až k rozdílné úspěšnosti přežití (Lens et al., 2002; Talloen et al., 2010). Ve třetím případě se dospělí jedinci, kteří byli vystaveni nepříznivým podmínkám během časného vývoje, vyrovnávají s podobně stresovými podmínkami lépe vzhledem k předchozí zkušenosti (Monaghan, 2008).

Je možné, že vyvíjející se mlád'ata ošetřená avidinem přizpůsobovala a potlačovala svůj imunitní systém na úkor kompenzačních investic do růstu, který vzhledem k nedostupnosti biotinu mohl probíhat suboptimálně, ačkoliv efekt tohoto proteinu na růstové parametry při vylíhnutí nebyl zaznamenán. Takto znevýhodněný imunitní systém by se u rostoucího jedince za příznivých podmínek neprojevil. Pokud však byly navozeny nepříznivé podmínky, v našem případě vyvolané aplikací lipopolysacharidu (LPS), která u všech jedinců vedla ke snížení hmotnosti (u mlád'at z manipulovaných vajec i u kontrolních), mohlo se znevýhodnění imunitního systému během embryogeneze projevit. Imunitní systém jedinců z kontrolních vajec, který nebyl vystaven vývojovému stresu, reagoval pružně a byl v rovnováze s hmotností (těžší jedinci si mohou dovolit nákladný imunitní systém). Avšak mlád'ata z manipulovaných vajec vykazovala opačný

trend. Zhoršené podmínky (v tomto případě snížená hmotnost) vedly u mlád'at z manipulovaných vajec k lepší reakci imunitního systému. Naopak imunitní systém těžších jedinců zůstal na stejné (tedy již od embryonálního stresu „nízko“ nastavené) úrovni. S těmito výsledky koresponduje i dříve zmíněný efekt zvýšené koncentrace avidinu v bílku vejce křepelky japonské, jež v interakci s váhou prodlužovala délku inkubace. Tato hypotéza je však pouze jedním z možných vysvětlení i vzhledem k měřené imunitní reakci. Aktivita komplementu je sama o sobě imunitní kaskádou, jež vede ke zničení nescifického patogenu (v našem případě luminescenční bakterie *E. Coli*) a není zřejmý mechanismus vlivu zvýšené koncentrace avidinu v bílku na tuto komplexní imunitní reakci.

Dlouhodobý efekt zvýšené koncentrace lysozymu na fenotyp mlád'at, jehož předpokladem by byl i přenos tohoto proteinu do těla vylíhlých mlád'at (Saino et al., 2002) nebyl potvrzen. Přestože stejně jako u avidinu byl zaznamenán vliv na průběh embryogeneze, resp. prodlouženou dobu inkubace, vliv zvýšené koncentrace lysozymu na nescifickou imunitu mlád'at nebyl prokázán.

6. Závěr

V této práci jsem se za pomoci korelativních přístupů i manipulativních experimentů pokusila zjistit jaký vliv mají maternální antimikrobiální proteiny v bílku prekociálních ptáků na riziko mikrobiální infekce a úspěšnost líhnutí. Vzhledem k některým specifickým vlastnostem těchto proteinů jsem se dále zaměřila i na jejich účinek na výsledný fenotyp mlád'at. Pozornost jsem věnovala třem hlavním antimikrobiálním proteinům bílku – avidinu, lysozymu a ovotransferinu.

Vejce s vyšší koncentrací jednotlivých antimikrobiálních proteinů měla výrazně nižší riziko mikrobiální infekce, tento efekt ale nebyl statisticky průkazný. Efekt antimikrobiálních proteinů je však průkazný pokud předpokládáme jejich aditivní efekt, jejich společné působení prokazatelně snižovalo pravděpodobnost bakteriální infekce ve vejci. Stejně výsledky byly získány i pro vliv na líhivost, kde antimikrobiální proteiny společně zvyšovaly úspěšnost líhnutí. Vzhledem k neprůkaznému vlivu bakteriální infekce na líhivost však nelze s jistotou říci, zda byla vyšší úspěšnost líhnutí ovlivněna antimikrobiálními vlastnostmi sledovaných proteinů, nebo jinými mechanismy jejich účinku.

Přímý dopad experimentálně zvýšené koncentrace avidinu a lysozymu na morfometrické parametry mlád'at (hmotnost, délka tarzu) nebyl prokázán. Avšak výsledky naznačují, že avidin pravděpodobně může způsobovat změny v embryogenezi, které mají vliv na délku inkubace a nespecifickou imunitní odpověď.

Mlád'ata z těžších vajec se po manipulativním zvýšení avidinu v bílku líhla později, na rozdíl od nemanipulovaných, kde váha vejce neměla vliv. Stejně tak mlád'ata vylíhlá z vajec se zvýšenou koncentrací avidinu vykazovala nižší aktivitu komplementu s rostoucí hmotností. U mlád'at z kontrolních vajec byl pozorován opačný trend. V obou případech bude pravděpodobně hrát roli vlastnost avidinu vázat biotin, který je významným růstovým prekurzorem. Zvýšená koncentrace lysozymu v bílku také vedla k prodloužené době inkubace, mechanismus působení tohoto proteinu na průběh embryogeneze však lze jen těžko odhadovat. V dalším průběhu experimentu pak manipulace s koncentrací lysozymu neměla na fenotyp mlád'at průkazný vliv.

Z výsledků této práce vyplývá, že sledované proteiny ptačího bílku mají primárně antimikrobiální funkci a mohou ovlivňovat i nespecifickou imunitu mlád'at. Vliv na růstové parametry mlád'at se nepodařilo prokázat, což může být způsobeno i dalšími faktory, které nebylo možné s ohledem na uspořádání experimentů sledovat. Vzhledem

k výsledkům této práce by další manipulativní experimenty s koncentracemi těchto proteinů a infekční zátěží měly být zaměřeny především na detailní popis jejich mechanismů působení, které nejsou zatím příliš známy. Větší pozornost by měla být věnována i faktorům prostředí ovlivňujícím jejich přirozené koncentrace v bílku.

6. Literatura

- Adamou A., Kouidri M., Chabi Y., Skwarska J., Bańbura J., 2009; Egg Size Variation and Breeding Characteristics of the Black-Winged Stilt *Himantopus himantopus* in a Saharan Oasis. *Acta Ornithologica* 44:(1):1-7
- Andersson M., Åhlund M., 2001; Protein fingerprinting: a new technique reveals extensive conspecific brood parasitism. *Ecology* 82:1433-1442
- Andersson S., Uller T., Löhmus M., Sundström F., 2004; Effects of yolk testosterone on growth and immunity in a precocial bird. *Journal of Evolutionary Biology* 17:501-505
- Banks J. G., Board R. G., Sparks N. H. C., 1986; Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotech. Appl. Biochem.* 8:103-147
- Beissinger S. R., Cook M. I., Arendt W. J., 2005; The shelf life of bird eggs: testing egg viability using a tropical climate gradient. *Ecology* 86:2164-2175
- Board R. G., Fuller R., 1974; Non-specific antimicrobial defences of avian egg, embryo and neonate. *Biological Reviews* 49(1):15-49
- Bonisoli-Alquati A., Rubolini D., Romano M., Cucco M., Fasola M., Caprioli M., Saino N., 2010; Egg antimicrobials, embryo sex and chick phenotype in the yellow-legged gull. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64:845-855
- Brogden K. A., 2005; Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3(3):238-250
- Bruce J., Drysdale E. M., 1994; Trans-shell transmission. In: *Microbiology of the avian egg*. In: Board R. G., Fuller R., (eds). London: Chapman and Hall pp. 63-91
- Bucala R., 1992; Polyclonal Activation of Lymphocytes-B by Lipopolysaccharide Requires Macrophage-Derived Interleukin-1. *Immunology* 77:477-482
- Buchtíková S., Šimková A., Rohlenová K., Flajšhans M., Lojek A., Lilius E.-M., Hyršl P., 2011; The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*) *Aquaculture* 318:169-175
- Burley N., 1977; Parental investment, mate choice, and mate quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 74:3476-3479
- Burley R. W., Vadehra D. V., 1989; *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. New York, NY: John Wiley & Sons
- Bush L., White H. B., 1989; Avidin traps biotin diffusing out of chicken egg yolk. *Comp Biochem Physiol B* 93:543-547
- Callewaert L., Michiels C. W., 2010; Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci* 35(1):127-160
- Cook M. I., Beissinger S. R., Toranzos G. A., Rodriguez R. A., Arendt W. J., 2003; Trans-shell infection by pathogenic microorganisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 270:2233-2240
- Cook M. I., Beissinger S. R., Toranzos G. A., Arendt W. J., 2005; Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecol Lett* 85:532-537
- Cooper C. B., Hochachka W. M., Butcher G., Dhondt A. A., 2005; Seasonal and latitudinal trends in clutch size: thermal constraints during laying and incubation. *Ecology* 86:2018-2031
- Correa S. M., Adkins-Regan E., Johnson P. A., 2005; High progesterone during avian meiosis biases sex ratios towards females.

- Biol Lett 1:215–218
- Crawley M. J., 2007; *The R Book*.
John Willey & Sons, Chichester
- Cucco M., Guasco B., Malacarne G., Ottonelli R., 2007; Effects of β -carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, *Perdix perdix*.
Comparative Biochemistry and Physiology (A) 147:1038-1046
- Cucco M., Guasco B., Ottonelli R., Balbo V., Malacarne G., 2009; The influence of temperature on egg composition in the grey partridge *Perdix perdix*.
Ethol Ecol Evol 21:63–77
- Cucco M., Pellegrino I., Malacarne G., 2010; Immune challenge affects female condition and egg size in the Grey Partridge.
J. Exp. Zool. A 313:597-604
- D'Alba L., Shawkey M., Korsten P., Vedder O., Kingma S., Komdeur J., Beissinger S., 2010; Differential deposition of antimicrobial proteins in Blue Tit (*Cyanistes caeruleus*) clutches by laying order and male attractiveness.
Behavioral Ecology and Sociobiology 64:1037–1045
- Dakshinamurti K., 2005; Biotin – a regulator of gene expression.
Journal of Nutritional Biochemistry 16:419–423
- Deeming D. C., 2002; *Avian Incubation*.
Oxford: Oxford University Press.
- Deeming D.C., Wadland D., 2002; Influence of mating sex ratio in commercial pheasant flocks on bird health and the production, fertility, and hatchability of eggs.
British poultry science 43(1):16-23
- Eising C. M., Eikenaar C., Schwabl H., Groothuis T. G. G., 2001; Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development.
Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268: 839-846
- Feeney R. E., Anderson J. S., Azari P. R., Bennett N., Rhodes M. B., 1960; The Comparative Biochemistry of Avian Egg White Proteins.
The journal of biological chemistry 235 (8):2307
- Finkler M. S., Van Orman J. B., Sotherland P. R., 1998; Experimental manipulation of egg quality in chickens: influence of albumen and yolk on size and body composition of near-term embryos in a precocial bird.
J. Comp. Physiol. B 168:17–24
- Fligny C., Hatia S., Amireault P., Mallet J., Côté, 2009; Mammalian prenatal development: the influence of maternally derived molecules.
BioEssays 31:935-943
- Gil D., 2003; Golden eggs: Maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds.
Ardeola 50:281-294
- Godard R. D., Wilson C.M., Frick J.W., Siegel, P. B., Bowers B. B., 2007; The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests.
Journal of Avian Biology 38:709-716
- Green N. M., 1975; Avidin.
Adv Prot Chem 29:85-133
- Groothuis T. G. G., Eising C. M., Dijkstra C., Müller W., 2005a; Balancing between costs and benefits of maternal hormone deposition in avian eggs.
Biology Letters 1: 78-81
- Groothuis T. G. G., Müller W., von Engelhardt N., Carere C., Eising C., 2005b; Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species.
Neuroscience and Biobehavioral Reviews 29:329-352
- Groothuis T. G. G., Schwabl H., 2007; Hormone-mediated maternal effect in birds: mechanisms matter but what do we know of them?
Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 363:1647-1661

- Hallquist N. A., Klasing K. C., 1994; Serotransferrin, ovotransferrin and metallothionein levels during ail response in chickens.
Comp. Biochem. Physiol. 108:375-384
- Hamilton W. D., 1964; The evolution of social behavior.
Journal of Theoretical Biology 7:1-52
- Horrocks N. P. C., Tieleman B. I., Matson K. D., 2011; A simple assay for measurement of ovotransferrin – a marker of inflammation and infection in birds.
Methods in Ecology and Evolution 2: 518-526
- Horrocks N. P. C., Hine K., Hegemann A., Ndithia H., Shobrak M., Ostrowski S., Williams J. B., Matson K. D., Tieleman B. I., 2012; Antimicrobial proteins in avian eggs: ovotransferrin increases but lysozyme decreases with environmental correlates of trans-shell infection. In thesis: The role of disease risk and life history in the immune function of larks in different environments. Part II. Chapter 4:53-64
- Hořák D., Albrecht T., 2007; Using net sacks to examine the relationship between egg size and young size in Common Pochards.
Journal of Field Ornithology 78:334–339
- Humphrey B. D., Huang N., Klasing K. C., 2002; Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks.
J. Nutr. 132:1214–1218
- Hyánková L., Knížetová H., Dědková L., Hort J., 2001; Divergent selection for shape of growth curve in Japanese quail. 1. Responses in growth parameters and food conversion.
British Poultry Science 42:594-600
- Hyánková L., Novotná B., Knížetová H., Horáčková Š., 2004; Divergent selection for shape of growth curve in Japanese quail. 2. Embryonic development and growth.
British Poultry Science 45:594–600
- Ibrahim H.R., Kato A., Kobayashi K., 1991; Antimicrobial effects of lysozyme against Gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid.
J. Agric. Food Chem. 39:2077–2082
- Ibrahim H. R., Iwamori E., Sugimoto Y., Aoki T., 1998; Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin.
Biochim. Biophys. Acta 1401:289–303
- Ibrahim H. R., Sugimoto Y., Aoki T., 2000; Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism.
Biochim. Biophys. Acta 1523:196–205
- Javůrková V., Albrecht T., Mrázek J., Kreisinger J., Do intermittent incubation and covering of clutch by nest lining feathers affect trans-shell infection in a ground nesting precocial bird? Submitted.
- Johnsen A., Delhey K., Andersson S., Kempenaers B., 2003; Plumage colour in nestling blue tits: sexual dichromatism, condition dependence and genetic effects.
Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270:1263–1270
- Kohler P. O., Grimley P. M., O'Malley B. W., 1968; Protein synthesis: differential stimulation of cell-specific proteins in epithelial cells of chick oviduct.
Science 160:86–87
- Korpela J. K., Kulomaa M. S., Elo H.A., Tuohimaa P. J., 1981; Biotin-binding proteins in eggs of oviparous vertebrates.
Experientia 37:1065-1066
- Korpela J., Salonen E. M., Kuuslela P., Sarvas M., Vaheri A., 1984; Binding of avidin to bacteria and to the outer membrane porin of *Escherichia coli*.
FEMS Microbiology Letters 22(1):3-10
- Koutsos E. A., Klasing K. C., 2001; The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).
Comp. Biochem. Physiol. C. 128:255–263
- Krapu G. L., Reynolds R. E., Sargeant G. A., Renner R. W., 2004; Patterns of variation in clutch sizes in a guild of temperate-nesting dabbling ducks.

- Auk 121(3):695-706
- Kurokawa H., Dewan J. C., Mikami B., Sacchettini J. C., Hirose M., 1999; Crystal structure of hen apo-ovo transferrin: both lobes adopt an open conformation upon loss of iron.
J. Biol. Chem. 274(40):28445–28452
- Kushner I., Rzewnicki D., 1999; Acute Phase response.
In: Gallin J. I., Snyderman R., (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Lippincot-Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 317–330
- LaMontagne J. M., McCauley E., 2001; Maternal effects in *Daphnia*: what mothers are telling their offspring and do they listen?
Ecol. Lett. 4:64–71
- Lens L., Van Dongen S., Matthysen E., 2002; Fluctuating asymmetry as an early warning system in the critically endangered Taita thrush.
Conserv Biol 16:479–487
- Licastro F., Davis L. J., Morini M. C., 1993; Lectins and Superantigens - Membrane Interactions of These Compounds with T-Lymphocytes Affect Immune-Responses.
International Journal of Biochemistry 25:845-852
- Lindström J., 1999; Early development and fitness in birds and mammals.
Trends Ecol Evol 14:343–348
- Lochmiller R. L., Deerenberg C., 2000; Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?
Oikos 88: 87–98
- Magrath R. D., 1992; Roles of egg mass and incubation pattern in establishment of hatching hierarchies in the blackbird (*Turdus merula*).
Auk 109:474-487
- Mazurier J., Metz-Boutigue M. H., Jolles J., Spik G., Montreuil J., Jolles P., 1983; Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin.
Experientia 39:135–141
- McCormick M. I., 1999; Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish.
Oecologia 118:412–422
- Meathrel C. E., Skira I. J., Bradley J. S., Wooller R. D., 1993; The influence of egg-size, mass and composition upon hatching success in the short-tailed shearwater *Puffinus tenuirostris* (Aves, Procellariiformes).
Journal of Zoology 230:679–686
- Mizutani K., Mikami B., Hirose M., 2001; Domain closure mechanism in transferrins: new viewpoints about the hinge structure and motion as deduced from high resolution crystal structures of ovotransferrin N-lobe.
Journal of Molecular Biology 309:937–947
- Møller A. P., Biard C., Blount J. D., Houston D. C., Ninni P., Saino N., Surai P. F., 2000; Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?
Avian Poult. Biol. Rev. 11:137–159
- Monaghan P., 2008; Early growth conditions, phenotypic development and environmental change.
Philos Trans R Soc B Biol Sci 363:1635–1645
- Mousseau T. A., Fox C. W., 1998; *Maternal effects as adaptation*.
Oxford, UK: Oxford University Press
- Nadkarni A. M., Martin F. E., Jacques A. N., Hunter N., 2002; Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set.
Microbiology 148:257– 266
- Osserman E. F., Lawlor D.P., 1966; Serum and urinary lysozyme (mura-minidase) in monocytic and monomyelocytic leukaemia.
J ExpMed. 124:921–951
- Parker P.G., 2003; Recent insights into sexual selection in bird mating systems: What Bateman

- couldn't have known.
 Integrative and comparative biology 43(6):914-914
- Pilz K. M., Smith H. G., Sandell M. I., Schwabl H., 2003; Interfemale variation in egg yolk androgen allocation in the European starling: do high-quality females invest more?
 Animal Behaviour 65:841-850
- Pilz K. M., Quiroga M., Schwabl H., Adkins-Regan E., 2004; European starling chicks benefit from high yolk testosterone levels during a drought year.
 Hormones and Behavior 46: 179-92
- Pinowski J., Barkowska M., Kruszewicz A. H., Kruszewica A. G., 1994; The causes of the mortality of eggs and nestlings of Passer spp.
 J Bioscience 19:441-451
- Prusinowska I., Jankowski J., Sowinski G., Wawro K., 2000; An evaluation of lysozyme usability in turkey improvement.
 Zivocisna Vyroba 45:225-228
- Reynolds S. J., Schoech S. J., Bowman R., 2003; Nutritional quality of prebreeding diet influences breeding performance of the Florida scrub-jay.
 Oecologia 134:308-316
- Ricklefs R. E., 1974; Energetics of reproduction in birds. Edit. Avian energetics.
 Cambridge, Massachusetts: Publications of the Nuttall Ornithological Club. pp. 152-292.
 In: Paynter R.A.,
- Ricklefs R. E., 1977; Composition of eggs of several bird species.
 Auk 94:350-356
- Romanoff A. L., Romanoff, A. J., 1949; The avian egg.
 John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 61
- Saino N., Martinelli R., Møller A. P., 2001; Immunoglobulin plasma concentration in relation to egg laying and mate ornamentation of female barn swallows (*Hirundo rustica*).
 J. Evol. Biol. 14:110-119
- Saino N., Dall'ara P., Martinelli R., Moller A .P., 2002; Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow.
 J Evol Biol. 15:735-743
- Saino N., Romano M., Ambrosini R., Ferrari R. P., Moller A. P., 2004; Timing of reproduction and egg quality covary with temperature in the insectivorous. Barn Swallow, *Hirundo rustica*.
 Funct Ecol. 18:50-57
- Saino N., Romano M., Ferrari R. P., Martinelli R., Møller A. P., 2005; Stressed mothers lay eggs with high corticosterone levels which produce low-quality offspring.
 J. Comp. Zoo. A: Comp. Exp. Bio., 303:998-1006
- Saino N., Martinelli R., Biard C., Gil D., Spottiswoode C. N., Rubolini D., Surai P. F., Moller A. P., 2007; Maternal immune factors and the evolution of secondary sexual characters.
 Behav Ecol. 18:513-520.
- Salton M. R. J., 1957; The properties of lysozyme and its action on microorganisms.
 Bacteriol Rev. 21:82-100
- Salton M. R. J. , Kim K. S., 1996; Structure. In: Baron's Medical Microbiology (4th ed.).
 Univ of Texas Medical Branch.
- Schwabl H.,1993; Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds.
 Proceedings of the National Academy of Sciences 90:11446-11450
- Schwabl H., 1996a; Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth.
 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 114: 271-276
- Schwabl H., 1996b; Environment modifies the testosterone levels of a female bird and its eggs.
 Journal of Experimental Zoology 276:157-163
- Schwabl H., 1997; The contents of maternal testosterone in house sparrow *Passer domesticus* eggs vary with breeding conditions.
 Naturwissenschaften 84:406-408
- Shawkey M. D., Kosciuch K. L., Liu M., Rohwer F. C., Loos E. R., Wang J. M., Beissinger S. R., 2008; Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs?

- Behav Ecol 19:920–927
- Shawkey M. D., Firestone M. K., Brodie E. L., Beissinger S. R., 2009; Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs (ed RL Earley). PLoS ONE 4:4522
- Smolelis A. N., Hartsell S. E., 1951; Occurrence of Lysozyme in Bird Egg Albumins. Proc Soc Exp Biol Med 76:455
- Sotherland P. R., Rahn H., 1987; On the composition of bird eggs. Condor 89:48-65.
- Superti F., Ammendolia M. G., Berlutti F., Valenti P., 2007; Ovotransferrin. In: Huopalahti R., Lopez-Fandino R., Antonand M., Schade R.(Eds.), Bioactive Egg Compounds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 43–48
- Talloon W., Lens L., Van Dongen S., Adriaensen F., Matthysen E., 2010; Mild stress during development affects the phenotype of great tit *Parus major* nestlings: a challenge experiment. Biol J Linn Soc 100:103–110
- Tranter H. S., Board R. G., 1984; The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. J Appl Bacteriol. 56:53–61
- Trziska T., Clostermann G., 1993; Measuring the lysozyme-activity as method for estimating the egg quality. Archiv Fur Geflügelkunde 57:22–26
- Valenti P., Antonini G., Von Hunolstein C., Visca P., Orsi N., Antonini E., 1983; Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. Int. J. Tissue React., 5 (1):97–105
- Watanabe T., 1993; Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. J Nutr 123:2101–2108
- Wellman-Labadie O., Picman J., Hincke M.T., 2008a; Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. British Poultry Science, 49:125-132
- Wellman-Labadie O., Picman J., Hincke M.T., 2008b; Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. British Poultry Science 49(2):133-43
- White H. B., Orth W. H., Schreiber R. W., Whitehead C. C., 1992; Availability of avidin-bound biotin to the chicken embryo. Arch Biochem Bio-phys. 298:80–83
- Wilchek M., Bayer E. A., Livnah O., 2006 ; Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. Immunology Letters 103(1):27-32
- Williams T. D., Ames C. E., 2004; Top-down regression of the avian oviduct during late oviposition in a small passerine bird. J. Exp. Biol 207(2):263-8
- Williams T. D., 2005; Mechanisms underlying the costs of egg production. Bioscience 55:39–48
- Wu J., Acero-Lopez A., 2011; Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. Food Research International 46(2):480-8
- Xie H., Huff G. R., Huff W. E., Balog J. M., Holt P., Rath N. C., 2002; Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. Poultry Sci. 81:112-120
- Xie H., Huff G. R., Huff W. E., Balog J. M., Rath N. C., 2003; Effects of ovotransferrin oil macrophages and lieterophil-granulocytes. Dcv. Comp. Immunol. 26:805-815
- Yamanishi H., Iyama S., Yamaguchi Y., Kanakura Y., Iwatani Y., 2002; Modification of fully automated total iron-binding capacity (TIBC) assay in serum and comparison

with dimension TIBC method.
Clinical Chemistry 48:1565–1570
Zempleni J., Wijeratne S.S.K., Hassan Y.I., 2009; Biotin.
Biofactors 35(1):36-46