

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Metodické aspekty měření buněčné imunity
v evolučně ekologických studiích**

*Methodological Aspects of Cell Immunity Measurements
in Evolutionary Ecology Studies*

Hana Bainová

Školitel: Mgr. Michal Vinkler

Konzultanti: Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.
Mgr. Alena Klvaňová

Praha 2008

Prohlašuji tímto, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně s použitím veškeré citované literatury.

V Praze dne 13. 8. 2008

ABSTRAKT

Schopnost bránit se potenciálním parazitárním nákazám je z hlediska přežití organismu v reálném světě naprosto zásadní. Podstatná část současných evolučně ekologických studií se proto snaží popsat a vysvětlit rozdíly mezi jedinci a druhy spočívající právě ve schopnosti účinné imunitní odpovědi na patogenní podněty. Existuje mnoho metod měření imunitní reaktivity založených na různých principech. Především pro svou snadnou aplikovatelnost v terénu patří mezi nejčastěji používané fytohemagglutininový (PHA, *Phytohaemagglutinin*) test kožní hypersenzitivity. Pochopení imunologických mechanismů, na kterých je PHA test založen, je důležité jak pro správné naplánování pokusů, tak pro následnou korektní interpretaci výsledků. Panuje však stále mnoho nejasností týkajících se především funkční podstaty vyvolané otokové reakce. V této práci shrnuji dosavadní znalosti strukturních a biologických vlastností PHA a uvádím souhrnný přehled jeho využití jak *in vitro* tak *in vivo*, včetně rozboru metodologických aspektů PHA kožního testu. Výsledky experimentální části práce oproti očekávání naznačují, že se na aktivaci imunitní reakce vyvolané PHA a následném edému mohou podílet i jiné mechanismy, než pouhá stimulace lymfocytů. Zjistili jsme, že kožní hypersenzitivní reakce na PHA není závislá pouze na schopnosti L podjednotek stimulovat proliferaci lymfocytů. Aplikace PHA složeného pouze z podjednotek izomeru E způsobujících erytaglutinaci vyvolala u experimentálních zvířat obdobnou reakci, která však byla kvantitativně signifikantně silnější než při reakci na čisté L tetramery. Zdá se proto, že reakce na PHA-P je do jisté míry vyvolána podobnými mechanismy, které způsobují srážení krve při poranění organismu. Ačkoli tyto naše výsledky opět poněkud relativizují interpretační hodnotu PHA testu, věřím, že i přesto mohou být takováto data velice užitečná, a to především v pilotním screeningu rozdílů mezi jedinci v nespecifické kožní hypersenzitivitě.

Klíčová slova:

ekoimunologie, metodika, buněčná imunita, fytohemagglutinin, koevoluce, parazité, trade-off

ABSTRACT

The capability to defend oneself against parasitic infections is absolutely crucial for survival in the real world. Therefore the considerable part of current evolutionary-ecological studies try to describe and explain differences among individuals and species that are based in capability of mounting an effective immune reaction to pathogenic stimulation. There are many methods of measuring immune reaction based on different principles. Phytohaemagglutinin test (PHA, *Phytohaemagglutinin*) of skin hypersensitivity is the one which is used most frequently mainly because of its easy application in field. Understanding the immunological mechanisms, on which PHA test is based, is important for appropriate planning of experiments as well as for following correct interpretation of the data. However, the functional nature of induced swelling reaction still remains very unclear. In this work I have resumed the current knowledge on structural and biological features of PHA. I also present aggregate table of its usage both in *in vitro* and *in vivo* studies, including analysis of methodological aspects of PHA skin test. Unlike expectation settled for the experimental part of my work indicates that the activation of immune reaction to PHA and following swelling can be caused by other mechanisms than lymphocytes too. We have found that PHA skin hypersensitivity reaction depends not just on the ability of L subunits to stimulate lymphocyte proliferation. The application of PHA consisting only of isomer E subunits, which is conductive to erytagglutination, evoked similar, but quantitatively considerably significantly stronger reaction in the tested animals than pure L tetramers. It seems that the hypersensitivity reaction to PHA-P might therefore simulate state similar to immune response to injury connected with blood coagulation. Although our results relativize a bit the interpretation value of PHA test, I still believe that these data can be really useful, especially in the primary screening of differences in nonspecific skin hypersensitivity among various individuals.

Key words:

ecoimmunology, methodology, cell-mediated immunity, phytohaemagglutinin, coevolution, parasites, trade-off

OBSAH

ABSTRAKT	1
ABSTRACT	2
OBSAH	3
1 ÚVOD	4
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 IMUNITNÍ SYSTÉM	6
2.1.1 Buňky imunitního systému	7
2.1.2 Imunitní systém a podněty z okolí	9
2.2 METODY STANOVENÍ INTENZITY IMUNITNÍ ODPOVĚDI	12
2.2.1 Single-Time Point metody	13
2.2.2 Multiple-Time Points metody	14
2.3 FYTOHEMAGLUTININ (PHA)	14
2.3.1 Struktura PHA	14
2.3.2 Využití PHA	15
2.3.3 Používaná metodika PHA testu	17
2.3.4 Průběh hypersenzitivní reakce na PHA	19
2.4 VYUŽITÍ PHA TESTU V EVOLUČNĚ EKOLOGICKÝCH STUDIÍCH	20
2.5 APLIKACE A INTERPRETACE PHA TESTU	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 ÚVOD	26
3.2 METODIKA	27
3.3 VÝSLEDKY	28
3.4 DISKUZE	29
4 ZÁVĚR	30
PODĚKOVÁNÍ	31
SEZNAM ZKRATEK	31
POUŽITÁ LITERATURA	32
PŘÍLOHY	39

1 ÚVOD

V současnosti panuje mezi evolučními ekology značný zájem o charakterizaci vnitrodruhové i mezidruhové variability v aktivitě imunitního systému. Mnohé studie se například zabývají působením rozličných ekologických faktorů na funkci imunitního systému, významem imunity v evoluci life-history znaků nebo pohlavního výběru. Snahou výzkumných pracovníků často bývá popsat aktivitu imunitního systému jako jedinou veličinu – tzv. imunokompetenci. Schopnost organismu reagovat na patogenní vlivy okolí je potom popisována jedinou metodou, zaměřenou pouze na dílčí komponentu imunitního systému (např. Norris & Evans 2000; Nolan et al. 2006; Edly-Wright et al. 2007; Forsman et al. 2008; Mougeot 2008; Edler & Friedl 2008). Takovéto použití termínu imunokompetence je ovšem nanejvýš problematické (Adamo 2004). Imunokompetenci, tedy schopnost jedince vyvolat účinnou imunitní odpověď na určitý podnět, tj. v přirozeném systému zareagovat na atak konkrétního parazita či patogena, nelze zobecňovat na vlastnost celého imunitního systému (Westneat et al. 2003; Raberg & Stjernman 2003).

Na funkčnost imunitního systému působí celá řada faktorů vnějšího prostředí, např. dostupnost potravy (Brzek & Konarzewski 2007; Alonso-Alvarez et al. 2007), toxicita prostředí (Baos et al. 2006), sociální struktura populace (Tella et al. 2001), interakce s parazity (Johnsen & Zuk 1999; Christe et al. 2000b; Navarro et al. 2003; de Bellocq et al. 2006, aj.), sezonalita (Wilk et al. 2007; Hasselquist 2007), cirkadiánní rytmicita (Martinez-Padilla 2006), stres (Merino et al. 1999). Ačkoliv existují ekologické aspekty modulující aktivitu imunitního systému jako celku, např. počasí či nedostatek potravy (Lifjeld et al. 2002), velká většina faktorů však ovlivňuje různé komponenty imunitního systému různou měrou, např. rozdílní parazité mohou vyvolat odezvu jiné složky imunitního systému (de Bellocq et al. 2007b); stres může zvýšit rezistenci proti bakteriím, avšak snížit rezistenci proti virům (Siegel 1980); koncentrace testosteronu ovlivňuje buněčnou imunitu, zatímco karotenoidy spíše humorální (McGraw & Ardia 2005). Je tomu tak proto, že i v rámci imunitního systému samotného dochází současně k mnoha různým trade-offs. Pokles v některém imunitním parametru nemusí nutně znamenat sníženou rezistenci proti nemocem obecně. Mohl být totiž použit pouze jiný účinný mechanismus v obraně proti danému prarazitovi (např. antagonistická regulace T pomocných lymfocytů, Th1 a Th2, imunitní odezvy (Webster et al. 2002)). Limitace zdroji tedy nemusí vést jen k trade-off v alokaci zdrojů mezi reprodukcí a mechanismy zajišťujícími přežívání jedince. Další trade-off pak může spočívat v únosné míře imunitního zásahu proti parazitovi. Reakce imunitního systému musí být vyvážená tak, aby byla schopna úspěšně potlačit atak parazita a přitom neměla patogenní dopad na vlastní organismus (Robertson & Hasenkrug 2006).

Celkovou imunokompetenci jedince nelze popsat i kvůli genetické podstatě evoluční interakce parazit-hostitel. Parazité mají krátkou generační dobu, a tak prodělávají relativně rychlou evoluci. Interakce parazit-hostitel tedy vyvíjí silný tlak na evoluci imunitních genů hostitele (Flegr 2005a). Jako odpověď na evolučně nové genotypy parazitů proto rychle vznikají nové alely genů hostitele přispívající k nárůstu alelické variability, která má za následek funkční polymorfismus v imunitní reaktivnosti na

různé podněty. Evoluce parazitů spolu se střídavou adaptací imunitního systému na různé druhy parazitů mohou mít za následek rychlé změny ve frekvenci jednotlivých alel (Hamilton & Zuk 1982; Flegr 2005b). Právě to může být důvodem, proč je v imunologických znacích tak velká mezidruhová, ale i vnitrodruhová variabilita. Mezi molekuly s vysokým stupněm polymorfismu, které takto reagují na neustálou evoluci parazitů, patří například MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (Penn & Potts 1999; Zeh & Zeh 2001; Milinski 2006). Každý jedinec vlastní unikátní alelickou kombinaci těchto molekul, čímž je také do jisté míry dána odlišná schopnost různých jedinců rozpoznat určitého parazita a následně na něj účinně zareagovat. Avšak právě adaptibilita tohoto aparátu způsobuje, že z rezistence jedince vůči jednomu druhu parazita nemůžeme usuzovat na jeho lepší celkovou „imunokompetenci“. Tentýž jedinec totiž může být susceptibilní na parazity jiné, kterým naopak mohou ostatní jedinci odolávat (Saks et al. 2006; Horak et al. 2006). Snahou ekologické imunologie by proto mělo být popsat faktory, které ovlivňují reálné interakce mezi hostitelem a parazitem a jejich koevoluci včetně toho, jak daní paraziti, se kterými má hostitel možnost se setkat, evolučně působí na pohlavní výběr, fitness, kondici a přežívání jedince.

Pokud tedy chceme získat ucelenější náhled na zdravotní způsobilost jedince, může být vhodné zaměřit se na více složek imunitního systému, tzn. jak na humorální a buněčnou imunitu, tak i na fagocytózu (Cheng & Lamont 1988). Je však nutné si uvědomit, že takové výsledky mohou být navíc zkresleny například vzájemným působením prodělávaných infekcí, zapříčiněným antagonistickou regulací Th1 a Th2 odpovědí, čímž se pak může být omezena schopnost dané složky imunitního systému účinně zasáhnout v místě potřeby (Webster et al. 2002).

Imunokompetence je tedy pojem relativní, tudíž je jí nutno vždy vztáhnout ke konkrétnímu imunogennímu agens a hodnotit úspěšnost odezvy jen určité složky imunitního systému. Ne ve všech případech navíc musí silnější imunitní reakce na určitý podnět znamenat lepší stav a funkčnost imunitního systému. Neadekvátně silná imunitní reakce totiž může způsobit patologické porušení tkáně, aniž účinně potlačí parazitické organismy, proti kterým je namířena (Robertson & Hasenkrug 2006).

Funkce imunitního systému - včetně již zmíněných imunologických regulací - je velmi komplexní a naše znalosti jsou v mnohých směrech doposud omezené. Při plánování pokusů a následné interpretaci výsledků je bohužel v současnosti často situace v ekologické imunologii komplikována zároveň relativně malou zasvěceností badatelů do imunologie jako takové. Je zřejmé, že jako u každé mezioborové disciplíny, není v možnostech výzkumníků plně pokrýt současné poznatky všech souvisejících oborů, tedy imunologie, ekologie, evoluční biologie a parazitologie. I přesto je však zřejmé, že pro vývoj ekologické imunologie již není déle možné považovat imunitní systém za jakousi černou skříňku a nezajímat se o procesy v ní. Ačkoliv se určitého zjednodušení musíme nutně dopustit, je vždy potřeba pochopit strukturu zkoumaného systému alespoň o jednu úroveň níž, než leží ta, ve které se nachází námi řešený problém. Pokud se nebudeme držet tohoto pravidla, nemůžeme být schopni účelně odpovídat na položené otázky, ba ani si je správně klást. Tento problém je nejpatrnější na metodologickém aparátu současné ekologické imunologie. Například i přes (spíše ojedinělou (Goto et al. 1978; Martin et al. 2006)) snahu popsat alespoň na histologické úrovni principy, na nichž používány test pracuje, je nejběžněji

používaná metoda ke stanovení kvality buněčné imunity – fytohemaglutininový test – velice nekonkrétní a nedává nám tak ucelenou představu o funkční podstatě vyvolané reakce. Z pouhého přebírání této již dříve používané metody, bez snahy ji pochopit, pak může pramenit řada nepřesností v interpretaci výsledků (avizované zobecňování výsledků z jednoho testu na celou kvalitu imunity) a některé nesmyslně zvolené postupy (Johnsen et al. 2000; Kleven & Lifjeld 2004; Westneat et al. 2004; Granbom et al. 2005; Verhulst et al. 2005; Kennedy & Nager 2006). Naději v tomto směru představuje zejména recentní práce Milleta et al. (2007), která rozšiřuje v současnosti používaný metodologický aparát, avšak doposud zůstává bez praktické odezvy.

Ve své DP se budu zabývat rozdílem v kvalitě párových a mimopárových mláďat v rámci kolonie vrabce domácího (*Passer domesticus*). K určení kvality mláďat by mělo přispět i stanovování reakce buněčné imunity vyvolané fytohemaglutininem (PHA, *Phytohaemagglutinin*). Proto se ve své bakalářské práci zabývám tím, jak PHA na organismus působí a jak správně interpretovat výsledky tohoto testu. V rešeršní části práce jsem kromě výčtu různých použití tohoto testu v evolučně ekologických studiích a deskripce několika metodik shrnula také obecné imunologické aspekty působení PHA, popsala dosavadní znalosti týkající se jeho strukturální povahy a nastínila kritická místa metodického a interpretačního rámce testu. Ve druhé části své práce uvádím výsledky experimentů mapujících funkční podstatu PHA-indukované otokové reakce. Tyto pokusy byly prováděny ve spolupráci s Mgr. Michalem Vinklerem a Mgr. Tomášem Albrechtem, Ph.D.

2 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části své práce jsem se pokusila shrnout a prodiskutovat základní dostupné informace, které jsou podle mne nezbytné pro správné pochopení a stanovování míry buněčně zprostředkované imunitní odezvy a to včetně nastínění několika dalších alternativních metod. Z tohoto důvodu je zahrnuta i samostatná kapitola věnující se vybraným aspektům imunitního systému. Nejpoužívanější metoda v evolučně ekologických studiích k měření odezvy buněčné složky imunity je založena na aplikaci fytohemaglutininu. Právě PHA testu proto věnuji značnou část svého dalšího textu.

2.1 Imunitní systém

Funkce imunitního systému spočívá v obraně organismu před nežádoucími vlivy jak vnějšího tak vnitřního prostředí. Jeho hlavní funkce spočívá v likvidaci cizorodých agens, které poškozují hostitelského jedince (tzn. především parazitů). Neméně podstatnou roli však hraje správně fungující imunitní systém i při udržování homeostáze organismu. Imunitní systém je regulačně úzce spojen se systémem endokrinním a nervovým (Webster et al. 2002). Aktivitu imunitních buněk proto kromě cytokinů, nejdůležitějších signálních molekul imunitního systému, usměrňují i nejrůznější hormony a neurotransmitery. Imunitní systém však zajišťuje také odstraňování buněk starých, nemocných, tělu cizích, ale i nefunkčních složek organismu, například buněk, které prodělaly nekrózu. Různé komponenty

imunitního systému ovšem zasahují i do mnoha dalších fyziologických funkcí, včetně tkáňových přestaveb (Lorenzo et al. 2008), regenerace (Karadimitris et al. 2006; Dong et al. 2007) či reprodukce (Le Bouteiller & Piccinni 2008).

Z hlediska ekoimunologie se výzkum soustředí především na ptáky a savce, proto se v následujícím textu omezím právě na tyto dva taxony. Ptáci a savci vzešli před více než 200 milióny let ze společného plazího předka a jejich imunitní systémy se tedy jak morfologicky tak funkčně velmi podobají (Davison 2008). V případě ptáků, skupiny široce využívané v ekoimunologických studiích, se však ve srovnání se savci o funkci jednotlivých komponent imunity ví doposud mnohem méně (Kaiser 2007). Odlišnosti nacházíme především ve struktuře jednotlivých orgánů a v mechanismech imunologické regulace (Fletcher & Barnes 1998; Nieuwenhuis 1998). V následujícím textu se z praktických důvodů soustředím pouze na prvky imunity významné z hlediska dalšího výkladu, přičemž zmíním podstatné odlišnosti obou těchto skupin teplokrevných živočichů.

2.1.1 Buňky imunitního systému

Imunitní systém sestává z mnoha různých buněčných typů. Ačkoliv se jedná o značné zjednodušení, obvykle jsme v imunoekologických studiích odkázáni na detekci početního zastoupení pouze několika základních typů leukocytů v periferní krvi, která je z praktického hlediska nejsnáze přístupnou tkání. Jedná se o lymfocyty, monocyty, neutrofilní (u ptáků heterofilní), basofilní a eosinofilní granulocyty (Campbell & Ellis 2007). I přes významnou úlohu mnoha dalších buněčných typů (např. dendritických buněk, makrofágů, NK buněk, folikulárních dendritických buněk aj.) nejsme obvykle schopni, vzhledem k jejich pozici v různých jiných, bioticky špatně dostupných tkáních, jejich početnost či funkci hodnotit. U mnoha volně žijících druhů nám také chybí metodický aparát pro jejich spolehlivou detekci (zejm. specifické protilátky proti jejich markerům). Ze stejného důvodu nejsme v mnoha případech schopni detailní identifikace subtypů lymfocytů či stupně aktivovanosti buněk (Campbell & Ellis 2007).

Co do početnosti zaujímají obvykle jak u ptáků tak u savců dominantní postavení mezi leukocyty v periferní krvi lymfocyty (přičemž 80% z nich tvoří T buňky), následované neutrofilny/heterofily, které tvoří majoritní většinu všech granulocytů (Pastoret et al. 1998). Diferenciální počet krevních buněk se však značně liší jak mezi různými druhy tak i mezi jedinci v rámci jednoho druhu (Lucas & Jamroz 1961; Campbell & Ellis 2007). Podle procesu diferenciacie z kostní dřeně lze rozdělit buňky imunitního systému do dvou linií: myeloidní a lymfoidní (Campbell & Ellis 2007). Dále se zaměřím především na funkci různých leukocytárních typů, která je podstatná pro pochopení jejich role v imunitní reakci na určitý imunogenní podnět.

Myeloidní linie

Z prekurzorových buněk myeloidní linie se diferencují jednak erytroblasty, které dávají vznik erytrocytům (u ptáků jaderným), pak granulocyty (neutrofilní/heterofilní, basofilní a eosinofilní),

monocyty, z kterých vznikají makrofágy a dendritické buňky a konečně megakaryocyty dávající vznik trombocytům (Campbell & Ellis 2007).

Neutrofilní / heterofilní granulocyty

I přes určité strukturní a funkční odlišnosti odpovídají heterofily ptáků neutrofilům savců (Maxwell & Robertson 1998). U většiny ptáků jsou heterofily druhé nejpočetnější buňky v cirkulaci, krátce po vylíhnutí mláďat dokonce početně převyšují i lymfocyty (Maxwell & Robertson 1998). Pokud je jedinec vystaven stresu, jejich počet značně narůstá (Gross & Siegel 1983). Heterofily jsou (spolu s basofily a monocytami) patrně ve velkém množství v místě zánětu už během prvních 30 minut po jeho stimulaci (Carlson & Allen 1969). Patří k hlavním fagocytickým buňkám, přičemž ovšem heterofily ptáků fagocytují částice relativně hůře, než neutrofilové savců (Brooks et al. 1996). Zasahují v případě bakteriální či mikrobiální infekce (Harmon 1998). Na počet heterofilů cirkulujících v krvi má vliv mnoho faktorů, např. délka fotoperiody (Wang et al. 2008), potrava (Lee et al. 2002) či stres (Quillfeldt et al. 2008).

Basofilní granulocyty

Basofily jsou hojnější v ptačí, než v savčí krvi (Maxwell & Robertson 1995). V krvi cirkulující basofily jsou obdobou mastocytů (žírných buněk) vázaných spíše na pojiva. Oba tyto buněčné typy se vyvíjejí ze stejného prekursoru v kostní dřeni a mají tak řadu společného (mechanismy stimulace, receptorovou výbavu, obsah granul, aj. (Campbell & Ellis 2007)). U ptáků hrají basofily významnou roli v časně zánětlivé fázi, jako první totiž na chemotaktický podnět T buněk infiltrují do místa poranění (Stadecker & Leskowitz 1974b). Zde pak degranulací způsobí větší permeabilitu okolních cév, čímž usnadní infiltraci ostatních leukocytů (u ptáků i trombocytů) do místa poškození (Carlson & Allen 1969). Specificky reagují na virovou, či bakteriální infekci, jsou schopny slabé fagocytózy a zprostředkovávají (kožní) hypersenzitivní reakci, avšak na rozdíl od savců se téměř neúčastní opožděné hypersenzitivity (Maxwell & Robertson 1995). Mohou být zodpovědné za vznik anafylaktického šoku (Schiavino et al. 1992), který může být způsoben infiltrací basofilů ve větším množství do krevního řečiště sensibilizovaného jedince, kde degranulují (Maxwell & Robertson 1995) a mohou tak ohrozit i jeho život.

Eosinofilní granulocyty

Eosinofily představují v krvi menšinovou složku, většina buněk je přítomna v pojivech a kostní dřeni (Clark & Kaplan 1975). U ptáků je o jejich funkci zatím známo jen velmi málo. Zdá se však, že chrání organismus proti nákaze mnohobuněčnými parazity (Branton et al. 1997; Campbell & Ellis 2007). Jsou schopny degranulace a fagocytózy. Pokud je jedinec stresován, vytrácejí se eosinofily z cirkulace. Při dysregulaci vyvolávají alergické reakce (Olsson & Venge 1979).

Makrofágy

Makrofágy jsou obecně velmi heterogenní skupinou buněk, což může být dáno jejich specifikací v jednotlivých typech tkání (Gordon & Taylor 2005). Tkáňové makrofágy hrají hlavní roli při udržování homeostázy organismu, v odstraňování stárnoucích buněk či v přestavbě a opravě tkání po prodělaném zánětu. Makrofágy se účastní jak vrozené tak získané (humorální a buněčné) imunitní reakce (Klasing 1998). Imunitní odpověď způsobují rozpoznáváním, zachycením, pohlcením a transportem antigenů

(Gordon 1998). Patří mezi velké fagocytující buňky uplatňující se v antigenní prezentaci (Sharma & Tizard 1984). Navíc jsou tyto buňky schopny rozpoznat a zničit staré a poškozené komponenty těla vlastní, apoptické buňky i invadující mikroorganismy. Účinně likvidují intracelulární parazity produkcí oxidu dusnatého (Harmon & Glisson 1990; Qureshi 1998; Guillermo & DaMatta 2004). Vylučováním chemotaktických molekul atrahují do místa zánětu heterofily a lymfocyty (Lam 2002).

Trombocyty

Po celý svůj život se zdržují v krevním řečišti a patří zde hned za erytrocyty k nejpočetnějšímu buněčnému typu (Campbell & Ellis 2007). U ptáků jsou tyto buňky schopné fagocytovat bakterie (Grecchi et al. 1980; Wigley et al. 1999), produkují látky cytotoxické pro parazity (peroxid vodíku) a podílejí se na vrozené imunitní odpovědi. Hrají primární roli při hemostázi, shlukují se při poruše cévní výstelky a aktivují krevní aglutinaci (Campbell & Ellis 2007).

Lymfoidní linie

Majoritní populaci lymfocytů tvoří T a B buňky, které zajišťují specifickou imunitu. Do lymfoidní linie patří i NK buňky (*Natural Killers*), které představují cytotoxické buňky nespecifické imunity (Sharma & Tizard 1984). Po úspěšném potlačení infekce zůstávají v organismu paměťové (T i B) buňky, které jsou pak v případě opětovného ataku stejným patogenem schopné zareagovat mnohem rychleji.

Prekurzory T lymfocytů vznikají v kostní dřeni, avšak diferencují se v thymu (Sharma & Tizard 1984). Dochází zde k eliminaci buněk neschopných rozeznat tělu vlastní struktury od cizích. T buňky představují 80% lymfocytů cirkulujících v periferní krvi (Fletcher & Barnes 1998). Do místa zánětu se dostávají podle gradientu zvyšující se koncentrace cytokinů, které vysílají ostatní imunitní buňky z místa zánětu. T lymfocyty rozpoznávají svými T-receptory (TCR, *T-cell receptor*) antigenní peptidy vystavené na MHC exprimovaných na povrchu antigen prezentujících buněk (APC, *Antigen Presenting Cells*).

B lymfocyty patří mezi buňky antigenně specifické imunity produkující protilátky. Úzce spolupracují s Th2 (pomocnými) lymfocyty a APC. U ptáků putují B buňky krátce po vylíhnutí jedince z Fabriciovy bursy do krve a následně do sleziny, thymu a cekálních tonzil (Fletcher & Barnes 1998). U myši a člověka pocházejí B buňky z kostní dřene (Nieuwenhuis 1998), u jiných savců (králík, skot, ovce) z lymfatických struktur v oblasti střeva (Sinha et al. 2006).

2.1.2 Imunitní systém a podněty z okolí

Postupem času bylo navrženo několik hypotéz snažících se vysvětlit základní principy, na jejichž bázi detekuje imunitní systém potenciálně škodlivá agens (Janeway et al. 1996). Prvotní hypotéza tvrdila, že imunita rozpoznává mezi tělu vlastním a tělu cizím (*Self-non-self discrimination* (Hoffmann 1975)). Později přišel Matzinger (1994) s teorií, že imunitní systém nerozlišuje pouze vlastní a cizí, ale reaguje obecně na nebezpečné signály („*Danger theory*“). Další z hypotéz tvrdí, že imunitní systém reaguje spíše na poškození celistvosti tkání („*Integrity hypothesis*“ (Dembic 2000)). V současnosti se zdá, že imunitní systém využívá na různých úrovních všech těchto principů.

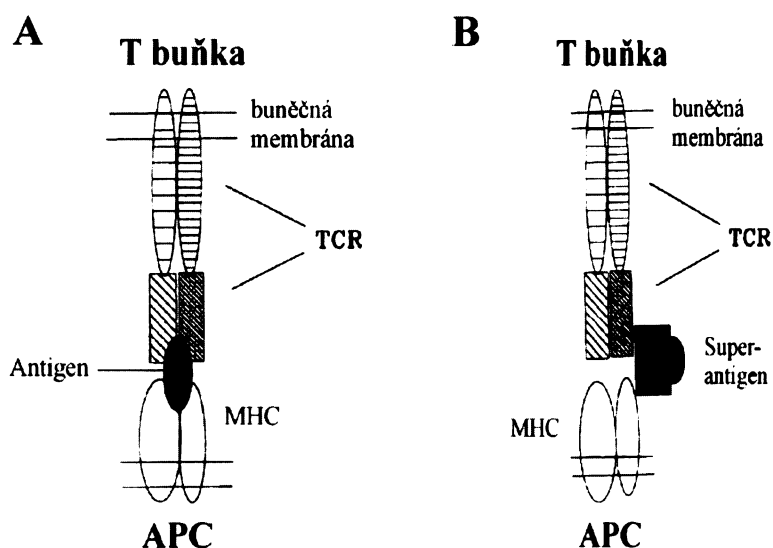
Je zřejmé, že látky různé povahy budou mít na organismus různý vliv (viz dále rozdíl mezi antigeny, superantigeny a mitogeny). Avšak ani stejné agens nemusí nutně vyvolat pokaždé identickou odezvu imunitního systému. Jak silná bude imunitní reakce totiž záleží například na dávce, či způsobu podání dané látky; na tom, jestli se jedinec s daným antigenem už dříve setkal a má tak větší šanci, že parazita včas rozpozná a potlačí tím úspěšněji vznikající infekci atp.. V neposlední řadě ovlivní míru reakce i fyziologický stav organismu (Ricklefs & Wikelski 2002).

Antigeny, superantigeny a mitogeny

Antigeny, superantigeny a mitogeny patří k odlišným skupinám makromolekul schopných interakce s buňkami imunitního systému. Jednotlivé skupiny se však podstatně liší mechanismem stimulace imunitních buněk (Licastro et al. 1993). Právě pochopení rozdílných funkčních principů je nezbytné pro správné stanovení metodiky pokusů a následnou přesnou interpretaci výsledků v ekoimunologických studiích. Proto jsou všechny tři základní kategorie těchto látek definovány v následujících odstavcích.

Antigeny

Za antigeny je považována jakákoli molekula nebo její část, na kterou se dokáží specificky navázat receptory buněk imunitního systému. Aby mohla být vyvolána specifická imunitní odpověď, musí být nejprve antigen fagocytován APC (nejčastěji monocytem, či makrofágem) a následně fragment původního proteinu vystaven navázáním na MHC na vnější straně buněčné membrány (Majumdar et al. 1990). Jelikož T lymfocyty nejsou schopny detekovat volně se pohybující antigeny ve svém okolí, zareagují teprve na antigen vystavený na MHC, na který se vážou svým TCR. Takto vytvořený komplex má za následek aktivaci T buněčných klonů specificky rozpoznávajících příslušný antigen. Mechanismus vazby mezi APC a T buňkou viz obr. 2.1/1 (A).



Obr. 2.1/1: Schématické znázornění propojení TCR T buňky a MHC na povrchu APC při prezentaci antigenu (A) a vazebně nespecifického propojení TCR T buňky a MHC pomocí superantigenu (B). Upraveno podle Licastro et al. (1993).

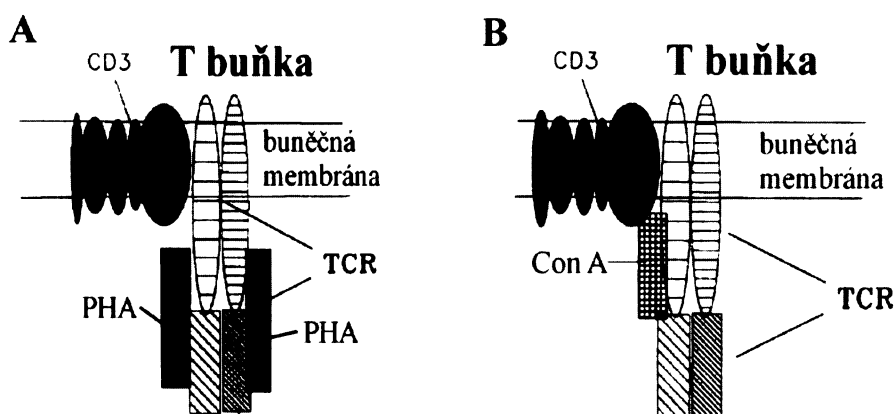
Superantigeny

Superantigeny stimulují imunitní buňky nespecificky, bez ohledu na vazebná místa jejich buněčných povrchových receptorů. Mezi látky superantigenní povahy patří velká skupina proteinů produkovaných různými bakteriemi, např. lipopolysacharidy (LPS) z vnější vrstvy buněčné membrány gram-negativních bakterií (Lukacova et al. 2008). Superantigen se nespecificky váže na MHC II. (Majumdar et al. 1990) a je tak schopen nespecifickou vazbou s TCR aktivovat více různých klonů T buněk, viz obr. 2.1/1 (B).

Mitogeny

Lektiny, které mají schopnost ovlivňovat imunitní systém, nazýváme mitogeny. Lektiny obecně patří mezi proteiny schopné navázat sacharidy (Licastro et al. 1993). Tvoří heterogenní molekuly široce rozšířené v přírodě, lze je izolovat z rostlin, hub, virů, bezobratlých i obratlovců. Jejich nejběžnější schopností je aglutinovat erytrocyty, ale dokáží aglutinovat i nádorové buňky, či leukocyty. Právě u posledně jmenovaných (především pak u lymfocytů) mohou lektiny stimulovat jejich proliferaci a diferenciaci (Nowell 1960). Mitogeny se váží na TCR nespecificky s velkou afinitou, čímž způsobují polyklonální aktivaci T lymfocytů. Při tomto mechanismu aktivace T buněk dojde k eliminaci MHC a žádný mitogen tudíž nepotřebuje k aktivaci T lymfocytů APC (Majumdar et al. 1990), čímž se značně urychlí průběh imunitní reakce.

Mezi lektiny s imunostimulačním účinkem patří např. fytohemaglutinin (PHA, *Phytohaemagglutinin*) izolovaný z fazolu *Phaseolus vulgaris*, mitogen z *Wistaria floribunda* PWM (*Pokeweed Mitogen*) a konkanavalin A (Con-A, *Concanavalin*) z *Canavalia ensiformis*, přičemž jako první byla pozorována mitogenní aktivita u PHA. V ekoimunologii patří právě tento mitogen mezi nejčastěji používané. Jednotlivé mitogeny se liší ve svých fyzikálněchemických i biologických vlastnostech (Douglas 1972). T a B lymfocyty reagují selektivně na rozdílné mitogeny, např. PHA a Con A stimulují především T lymfocyty a mají jen nepatrný vliv na B lymfocyty, zatímco PWM stimuluje jak T tak B lymfocyty (Nielsen & Pedersen 1997). Jednotlivé mitogeny odlišuje mechanismus aktivace T-lymfocytů, např. Con-A se váže na membránový protein CD3 asociovaný s TCR, zatímco PHA CD3 neváže a váže se přímo na domény TCR, viz obr. 2.1/2.



Obr. 2.1/2: Schéma vazebně nespecifické aktivace TCR T buňky pomocí PHA (A) a Con A (B). Upraveno podle Licastro et al. (1993).

Z výše uvedeného je tedy patrné, že jak antigeny, tak mitogeny a superantigeny patří do tří odlišných skupin makromolekul, které jsou schopné interagovat s buňkami imunitního systému. Zatímco antigeny stimulují buňky imunitního systému velice specificky, mitogeny a superantigeny způsobují nespecifickou polyklonální aktivaci. Jejich interakce s TCR je pro aktivaci T buněk podstatná. Superantigeny však vyžadují, kvůli své vazbě i na MHC, komplexnější interakce než lektiny. Při polyklonální aktivaci reagují T buňky jak na superantigeny tak na mitogeny velmi častěji, mitogenní lektiny však stimulují širší spektrum klonů T buněk (1 z 10 T buněk) než superantigeny (1 z 20 T buněk) (Licastro et al. 1993). Některé rozdíly v mechanismech aktivace T buněk mezi lektiny a superantigeny jsou shrnuty tabulce xxx (upravené z Licastro et al. (1993)).

Tab. 2.1/1: Rozdíly v mechanismech aktivace T buněk lektiny a superantigeny. Upraveno podle Licastro et al. (1993).

Schopnost	lektiny	superantigeny
vázat sacharidy	Ano	Ne
aglutinace	Ano	Ne
vázat se na MHC II.	Ne	Ano
vázat se s CD2, CD3	Ano, některé	Ne

Ačkoli je rozlišování výše uvedených skupin látek z hlediska ekoimunologického výzkumu klíčové, mnozí autoři nejen, že tyto termíny zaměňují, ale především následně volí neodůvodněné postupy při aplikaci těchto látek. Např. aplikování senzitivizační injekce mitogenu (PHA) několik dní před vlastní „měřicí“ injekcí (Johnsen et al. 2000; Kleven & Lifjeld 2004; Westneat et al. 2004; Kleven et al. 2006) nemůže sloužit k vyvolání klasické primární a sekundární imunitní odpovědi s. str.. Takovéto vybudění imunitního systému by mělo význam v případě odpovědi na klasický antigen, kdy tato senzitivizační injekce stimuluje aktivaci paměťových buněk a tím zapříčiní následnou silnější a rychlejší odezvu imunitního systému. Jelikož však látka mitogenní povahy vyvolává nespecifickou polyklonální aktivaci T buněk (Licastro et al. 1993), a tedy aktivuje T buňky momentálně přítomné v místě zánětu bez ohledu na jejich antigenní specifitu, nemá aplikace senzitivizační injekce na míru imunitní odezvy v případě aplikace mitogenu patrně žádný vliv a nanejvýš může působit na jedince jakožto nežádoucí stresor (Merino et al. 1999).

2.2 Metody stanovení intenzity imunitní odpovědi

V současnosti je v ekologické imunologii používáno jen několik základních metod, které jsou založené na odlišných principech a slouží tak ke stanovení stavu různých komponent imunitního systému. Jak již bylo řečeno v úvodu, je imunitní systém velmi komplexní a nelze proto měřit jeho aktivitu jako celku, nýbrž jsme nuceni vztáhnout naše hodnocení vždy pouze k určité jeho části. Jednotlivé komponenty však spolu spolupracují, každá má svou specifickou funkci v obraně organismu a jejich chod a údržba jsou odlišně nákladné (Raberg et al. 1998; Lochmiller & Deerenberg 2000; Adamo 2004).

Z hlediska stanovení rezistence jedince k určitému druhu parazita by samozřejmě byla nejlepším řešením pokusná infekce jedince definovanými parazity s následným zjištěním průběhu a intenzity

infekce. To by sice přineslo ve výzkumu interakce parazit-hostitel jasně definovaný a jednoznačný výsledek, avšak v mnoha ohledech není takovýto postup akceptovatelný. Pomineme-li etickou stránku věci, nemůže nám takovýto experimentální design pomoci zodpovědět otázky týkající se například imunologické podstaty příčin odlišnosti jedinců v rezistenci k danému parazitovi. V případě, že by jedinec infekci podlehl, nebyli bychom schopni zajistit opakovatelnost pokusu či provést více vyšetření. Navíc je nemyslitelné tento postup aplikovat u vzácných a ohrožených druhů. Interakce také nelze sledovat v přirozeném prostředí, protože nové parazity nelze záměrně vypouštět do volné přírody (nejsme schopni zabránit nekontrolovatelnému přenosu i na další, námi nezkoumané, jedince a druhy).

Výběr vhodné metody představuje jeden ze zásadních problémů ekoimunologického studia (především volně žijících druhů). Měřit lze buď momentální stav imunitního systému v době odběru vzorků („*Single-Time Point*“ metody), nebo je možno sledovat schopnost imunitního systému reagovat na stimulaci konkrétním agens („*Multiple-Time Points*“ metody) (Ardia & Schat 2008). Pro mnoho druhů je jediným možným přístupem měření v jediném čase. Nelze totiž zajistit zpětný odchyt jedince v námi určeném okamžiku, pokud jej nedržíme požadovanou dobu v zajetí. Umístění do zajetí není u volně žijících druhů ideálním řešením, protože vyšetřované jedince vystavujeme značnému stresu (Butler & Dufty 2007) a imunitní odezvu mohou ovlivnit i odlišné podmínky v chovech, např. skladba potravy.

2.2.1 Single-Time Point metody

Tyto metody jsou široce používány pro monitorování stavu imunitního systému jedince v době odběru vzorků. Mezi nejužívanější techniky patří stanovení počtu leukocytů či poměr heterofilů a lymfocytů (H/L) z krevních roztěrů (Norris & Evans 2000). Při stanovení proteinového složení krevní plasmy hodnotíme zdravotní stav jedince na základě poměru mezi sérovými proteiny, které jsou přítomné běžně i u zdravého jedince ve velkém množství (např. albumin A) a mezi proteiny akutní fáze imunitní reakce a imunoglobuliny, které se účastní obrany organismu proti infekci (Gustafsson et al. 1994; Ots & Horak 1998). Jako měřítko stavu imunitního systému lze použít i celkové zastoupení imunoglobulinů v krevním séru (Martinez et al. 2003) nebo množství přirozených protilátek (IgM) (Matson et al. 2005). Většina těchto metod je závislá na odběru krve. Velikost zkoumaných zvířat může být tedy limitující s ohledem na množství krve, které lze jedincům odebrat (z 10g jedince pouze 60 μ l krve (Koutsos & Klasing 2008)). Některé z metod (např. stanovování baktericidity, míry fagocytózy či proteinů akutní fáze) se snažil přizpůsobit menším druhům ptáků např. (Millet et al. 2007)), bohužel však zůstává tato ojedinelá snaha zatím téměř bez odezvy. Mezi „*Single-Time Point*“ metody lze zařadit i relativní velikost lymfoidních orgánů (slezina, u mladých ptáků i Fabriciova burza a thymus). K stanovení jejich velikosti je však nutné jedince usmrtit. Navíc je kvůli malé velikosti burzy a thymu problematické tyto orgány v terénu odebrat a všechna měření jsou tak patrně zatížena značnou chybou (Ardia 2005). Hodnocení zdravotního stavu jedince na základě výsledků získaných pomocí většiny „*Single-Time Point*“ metod však může být poněkud problematické, protože nevíme, jestli např. větší množství leukocytů cirkulujících v krvi resp. velikost lymfatických orgánů poukazuje na lepší imunitní stav jedince, nebo právě naopak na zrovna probíhající infekci.

2.2.2 Multiple-Time Points metody

Tato skupina zahrnuje metody stanovující schopnost imunitního systému zareagovat na nový antigen či mitogen, z čehož lze pak usuzovat na schopnost jedince vyrovnat se s některými patogeny. Výhoda těchto metod je v tom, že je každý jedinec vystaven shodnému podnětu (na cizí látku, s kterou se ještě nesetkal) a odpověď imunitního systému je tak možno stanovit standardizovaným postupem. Tyto metody se používají zejména k stanovování buněčné či humorální imunity (Ardia & Schat 2008). Humorální imunitní odezva je hodnocena na základě produkce protilátek proti novému antigenu. Často se jako antigen používají savčí erytrocyty (např. ovčí erytrocyty, SRBC, *Sheep Red Blood Cells* (Saks et al. 2003)), ale i jiné látky, např. hemocyanin z klíštěte (KHL, *Keyhole Limpet Haemocyanin* (Duffy & Ball 2002)), nebo neaktivní vakcíny (např. NDV, *Newcastle Disease Virus* či naočkování záškrty a tetanu (Raberg & Stjernman 2003)). Ne všechny patogeny však stimulují imunitní systém stejnou měrou (Raberg & Stjernman 2003; Westneat et al. 2003). Největší kritice se v současnosti podrobuje užití těchto agens k určení celkového stavu imunitního systému, protože celková rezistence proti nemocem je daleko komplexnější, než jak lze usuzovat z imunitní reakce na jediný antigen (Adamo 2004). Pro stimulaci buněčné odezvy imunitního systému se používají např. lipopolysacharidy (LPS) z buněčné stěny gram negativních bakterií, které působí na B buňky. Takto aktivované B buňky produkcí cytokinů zvýší koncentraci proteinů akutní fáze, fagocytózu a baktericidní aktivitu (Hawiger 2001). Naopak polyklonální aktivaci T lymfocytů způsobuje např. PHA (Licastro et al. 1993). Právě metoda založená na PHA patří k nejběžněji využívanějším v terénních ekoimunologických studiích (Kennedy & Nager 2006). Z tohoto důvodu se budu PHA testu věnovat po zbytek své práce.

2.3 Fytohemaglutinin (PHA)

Fytohemaglutinin (PHA) patří do skupiny lektinů, proteinů schopných vázat sacharidy. Je přítomen především v semenech mnoha druhů rostlin, zvláště pak bobovitých. Předpokládá se, že rostlinám slouží k obraně před herbivory (Mejia et al. 2005). U lidí a ostatních (především monogastrických) obratlovců může požití většího množství syrového či nedostatečně tepelně upraveného fazolu vyvolat nevolnost až zánět trávicího traktu (Kennedy & Nager 2006). Pro komerční účely je PHA získáván z fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) a dále upravována podle Rigas & Osgood (1955), či zjednodušeným způsobem Rena et al. (2008). Takto připravený PHA silně sráží krev a může být použit k separaci leukocytů od erytrocytů či ke stimulaci mitózy monocytů a lymfocytů (Nowell 1960). PHA dokonce dokáže např. zpomalit růst lymfoidních nádorů (D'Costa & Hurwitz 2003) či rozmach HIV infekce (Ye et al. 2001). Také kvůli těmto významným vlastnostem je PHA už dlouho věnována pozornost a je předmětem intenzivního výzkumu.

2.3.1 Struktura PHA

Jak ukázali pomocí chromatografie už Allen et al. (1969) a Yachnin & Svenson (1972), PHA tvoří směs pěti rozdílných proteinů, sestávajících vždy z izomerních tetramerů spojených nekovalentními

vazbami. Yachnin et al. (1972) rozdělili PHA na dvě základní složky a to na L-PHA, který má homogenní, symetrickou strukturu a je složen pouze z L podjednotek a H-PHA, který má strukturu heterogenní a obsahuje v každém tetrameru vždy alespoň jednu podjednotku E doplněnou do tetrameru podjednotkami L. Tito autoři dokazují, že hemaglutinace není podmínkou pro mitogenní vlastnosti, protože L-PHA (složený pouze z L podjednotek, které neumí vázat erytrocyty) vykazuje mitogenní vlastnosti, aniž vyvolává srážení erytrocytů. Stejně tak některé z H-PHA jsou schopné interagovat s lymfocyty (Allen et al. 1969), za což jsou opět zodpovědné L podjednotky přítomné ve struktuře H-PHA.

Jak už bylo naznačeno výše tvoří tyto tetramery dva typy podjednotek a to L a E (E podjednotka je některými autory označována jako R podjednotka (Yachnin & Svenson 1972; Miller et al. 1975)) v následných možných kombinacích L4, L3E1, L2E2, L1E3 a E4, přičemž L podjednotka má silné mitogenní vlastnosti a vysokou afinitu k receptorům na membráně leukocytů, zato však postrádá afinitu k povrchovým strukturám na erytrocytech. Naopak E podjednotka má vysokou afinitu k membráně erytrocytů avšak špatně váže receptory lymfocytů (E4 tetramer nepůsobí mitogenně na lymfocyty prakticky vůbec). Hybridní molekuly (L1E3, L2E2 a L3E1 tetramery) mají mitogenní vlastnosti způsobující aglutinaci jak erytrocytů tak lymfocytů a jsou schopné přivést lymfocyty k dělení i v přítomnosti erytrocytů (Miller et al. 1975). Hypotézu pěti tetramerických proteinů tvořících PHA, sestavených do všech možných kombinací dvou podjednotek, potvrdili i Felsted et al. (1977), když oddělili E a L podjednotky a znovu z nich nasyntetizovali jednotlivé isolektiny. Tyto rekombinované isolektiny následně vykazovaly stejné biologické vlastnosti jako isolektiny přirozené.

Obě podjednotky mají stejnou molekulární hmotnost (33000) i jiné fyzikochemické vlastnosti (Leavitt et al. 1977) a jsou rovněž identické ve velké části svého aminokyselinového složení. Liší se pouze v šesti z úvodních sedmi aminokyselinových zbytků (Miller et al. 1975). Právě z těchto relativně nepatrných rozdílů v primární struktuře pravděpodobně vyplývají velmi odlišné biologické vlastnosti L a E podjednotek PHA.

2.3.2 Využití PHA

PHA je vhodným prostředkem ke zkoumání reaktivity buněk imunitního systému jak v *in vitro* systémech, tak i v podmínkách *in vivo*. Poznatky ze studií *in vitro* vytvořily současný interpretační rámec následných *in vivo* studií. Většina principů fungování PHA byla studována na modelových, laboratorních či hospodářsky významných zvířatech. Následovala snaha aplikovat tyto ověřené metody z chovů na volně žijící druhy. Zde pro přehled uvádím příklady využití PHA v obou systémech.

In vitro

PHA byl nejdříve využíván pro svou schopnost srážet erytrocyty vazbou euglobulinové části mukoproteinu své molekuly s polysacharidem na jejich povrchu (Rigas & Osgood 1955) k oddělení těchto buněk od leukocytů. Navíc je PHA schopen přivést leukocyty do stavu, ve kterém jsou schopny proliferace (Hungerford et al. 1959; Nowell 1960). Běžně se monocyty a lymfocyty začínají dělit v *in vitro* podmínkách až po několika dnech; v přítomnosti PHA však nastane shlukování leukocytů téměř

okamžitě (Douglas 1972), po pár hodinách jsou pozorovatelné morfologické změny jader (Tokuyasu et al. 1968) a dělení nastane do 40 hodin od přidání PHA do kultury. Nowell (1960) se domníval, že tento lektin mění buněčnou membránu leukocytů tak, že se následně stanou propustnými pro jisté látky ze substrátu kultury, které pak postupně spouštějí proces mitózy. Běžně cirkulující buňky v periferní krvi nejsou mitoticky aktivní a dělit se (v těle) začnou až např. v místě zánětu. Bylo prokázáno, že PHA funguje jako stimulant proliferace T lymfocytů *in vitro* např. u myši (Schwarz & Rieke 1966; Rieke 1966). Pro tyto vlastnosti se PHA a ostatní mitogeny běžně využívají ke stanovování rychlosti nespecifické proliferace lymfocytů v *in vitro* systémech. Smith (1972) zjistil u myši, že stáří jedinců má vliv na *in vitro* odezvu jejich leukocytů při stimulaci mitogeny, přičemž reaktivita na PHA s věkem jedince klesá. Navíc je PHA jak *in vivo* tak *in vitro* využíván pro své vlastnosti v klinické medicíně, protože dokáže zpomalit růst lymfoidních nádorů (D'Costa & Hurwitz 2003) a přímo tlumit HIV-1 reverzní transkriptázu, enzym podstatný pro HIV replikaci (Ye et al. 2001), či je běžně užíván k stimulaci proliferace T lymfocytů (např. Meliska et al. (1995)).

In vivo

Na základě svých vlastností ověřených *in vitro* se PHA začal využívat v 70. letech ve veterinárním i humáním výzkumu také *in vivo* k podnícení kožní hypersenzitivní reakce, která se běžně využívá k stanovování míry buněčné odpovědi organismu. Nejprve byl PHA aplikován u modelových či ekonomicky významných domestikovaných druhů, např. opic (Harvey et al. 1974), psů (Knox & Shifrine 1979), prasat (Stadecker & Leskowitz 1974b; Ekkel et al. 1995), myši (Dukor & Dietrich 1967), z ptáků pak především u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) (Stadecker et al. 1977; Goto et al. 1978; Cheng & Lamont 1988; Mccorkle et al. 1980) a v klinické medicíně pak i u lidí (Blaese et al. 1973). V 90. letech se začal používat v ekologické imunologii, kde se brzy stal univerzální metodou pro stanovování míry buněčné imunity.

Už první *in vivo* studie právě na kuru (Goto et al. 1978) a stejně tak na myši domácí (Mus musculus) (Dukor & Dietrich 1967) prokázaly, že odpověď na PHA je závislá na přítomnosti thymu v ontogenezi jedince. Zvířata, kterým byl krátce po narození vyjmut brzlík, vykazovali slabší odezvu na aplikovaný PHA. To podporuje myšlenku, že PHA aktivuje T lymfocyty, které následně z velké části ovlivňují výsledný zánět a tím i mocnost edému. Cheng a Lamont (1988) dokázali relativní nezávislost v genetickém řízení tří hlavních komponent imunitního systému (fagocytózy, protilátkové a T buněčně zprostředkované imunitní reakce). Navíc zjistili rozdíly mezi pohlavími ve fagocytické aktivitě a v T buněčně zprostředkované imunitní odpovědi. Stimulací pouze jedné složky imunitního systému a následně z míry její odezvy tedy nelze usuzovat na celkovou úroveň imunitního systému.

Později na tento klíčový výzkum všeobecných imunologických konceptů navázaly snahy aplikovat metody běžně používané na laboratorních zvířatech i na volně žijící druhy (detailně viz kap. 2.4). Mnoho pozornosti je v současnosti věnováno vztahu parazit-hostitel. Jelikož však není jednoduché stanovit aktuální rezistenci proti parazitům obecně, výzkumníci často berou za náhražku imunokompetence organismu pouze míru imunitní odpovědi na konkrétní cizí agens a předpokládají pak, že jimi měřená veličina koreluje s individuální schopností jedince odolávat nemocem. Větší intenzita

infekce eimeriemi *Isospora lacazei* v trávicím traktu hostitele zvonka zeleného (*Carduelis chloris*) znamenala zesílení jeho buněčně zprostředkované imunity na injikovaný PHA (Saks et al. 2006). Při vyhodnocování PHA testu kožní hypersenzitivity je však potřeba si uvědomit, že vyšší intenzita odpovědi nemusí nutně poukazovat na lepší stav imunity zprostředkované T buňkami. Silnější reakce na PHA může nasvědčovat jak lepší připravenosti organismu na atak patogena, tak na právě probíhající infekci, která imunitní systém předem aktivovala a způsobila tak např. zvýšení množství leukocytů v krvi (tím i intenzivnější infiltrace do místa aplikace PHA). Při vyvozování závěrů z jednotlivých studií je proto nutné brát tuto možnost v potaz.

2.3.3 Používaná metodika PHA testu

PHA test je založený na odpovědi buněčné imunity na stimulaci mitogenem. U ptáků je PHA nejčastěji injikován do podkoží křídla v oblasti patagia, avšak u některých druhů byla injekce aplikována do membrány mezi prsty na noze (např. u tučňáků (Moreno et al. 1998; Tella et al. 2001; Nolan et al. 2006), čápů (Jovani et al. 2004), či dokonce u poštolky (Tella et al. 2000b)). V případě hlodavců se PHA injekuje do spodní strany chodidla (de Bellocq et al. 2006), zatímco u větších savců se aplikuje intradermálně do kožních řas (Stadecker & Leskowitz 1974a; Lopez-Olvera et al. 2006). Velká většina studií používající PHA test je však prováděna na ptácích, proto se dále budu v popisu metodiky věnovat především tomuto taxonu. PHA se aplikuje ve formě roztoku s isotonickým pufrům PBS (phosphate-buffered saline). Jednotlivé studie se liší zvolenou koncentrací a množstvím těchto látek. Na základě mitogenních vlastností PHA a buněčného složení infiltrátu po jeho subkutánní aplikaci (Goto et al. 1978) se předpokládá, že PHA způsobuje polyklonální aktivaci T lymfocytů, které začnou produkovat cytokiny, čímž způsobí infiltraci ostatních buněk imunitního systému a vyvolají tak v místě injekce lokální zánět.

Následný otok lze měřit buď pomocí mikrometru citlivého na tlak (př. digitální Mitutoyo), či pomocí posuvného měřítka. Značná výhoda mikrometru je ve větší ploše interagující s povrchem kůže, čímž jistě změříme otok v místě jeho největší mocnosti. Mikrometr měří mocnost dvojvrstvy kůže na základě samovolného sestupu měřicího ramene, které se zastaví při kontaktu s tkání. Přitlačná síla, byť minimální, tedy může kožní otok lehce deformovat, tato deformace by však měla být standardní. Ke zkreslení výsledků může docházet především tehdy, pokud v měřené vrstvě křídla zaujímají významnou část relativně mobilní pevnější složky (zejm. peří). Zkreslení bude tedy pravděpodobně přímo úměrné velikosti výsledného otoku, neboť při menším otoku je role pevných struktur relativně větší. Takovýmto chybám se lze vyhnout odstraněním péřových struktur před vlastní aplikací PHA nebo použitím posuvného měřítka, kde menší plocha měřicího ramene umožňuje přesnou lokalizaci měřeného místa (mimo péřové struktury). Měření probíhá na základě vizuální kontroly dotyku měřicího ramene s pokožkou. Výhodou tedy může být prakticky nulová deformace měřené tkáně. K náhodným chybám ovšem může dojít v důsledku subjektivního posuzování nejširšího místa otoku a stanovování kontaktu s pokožkou.

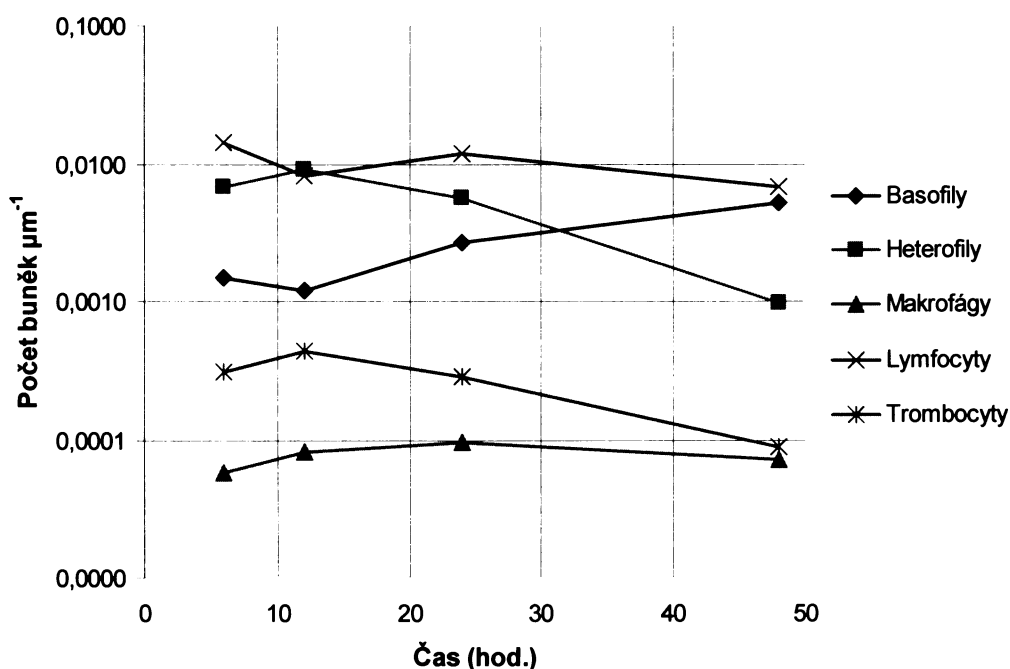
Za výsledný otok se považuje rozdíl mezi mocností tkáně v definovaném čase po injekci a před injekcí (Smits et al. 1999). Starší alternativou je souběžná injikace PHA do jednoho a čistého PBS do druhého křídla. V tomto případě pak za výslednou reakci imunitního systému počítáme rozdíl mocnosti křídla s injikovaným PHA a mocnosti křídla s PBS jako kontrolou, že tato látka neaktivuje T buňky a neovlivňuje tak výsledky měření (Goto et al. 1978). Zjednodušená Smitsova metoda s sebou nicméně přinesla hned několik výhod: (1) o polovinu se ušetří čas potřebný k provedení experimentu, (2) zmenší se stres, kterému je jedinec vystaven v důsledku manipulace (čímž se zpřesní měření, viz Merino et al. (1999), Berzins et al. (2008)), (3) sníží se pravděpodobnost pochybení při injekování (riziko kontaminace PBS), (4) ušetří se druhé křídlo pro případné další pokusy a (5) sníží se koeficient variace, který vzniká při nepřesném měření. Krom toho mocnost obou křídel nemusí být identická, což opět zvyšuje chybu v měření, jelikož z hlediska testu je směrodatná právě změna mocnosti křídla po aplikaci PHA. Skutečnost, že PBS je zcela vstřebán do 6 hodin po aplikaci PHA a že tedy nemá na mocnost křídla vliv byla již mnohokrát dokázána (všechny existující práce, shrnuto ve Smits et al. (1999)), takže je prakticky beze smyslu tuto skutečnost dále ověřovat. Injekce PBS tedy neplní faktickou funkci kontroly (Smits et al. 1999).

Konkrétní míru reakce jedince na PHA může podstatně ovlivnit mnoho vnějších faktorů. Síla odpovědi na PHA cirkadiálně kolísá, což Navarro et al. (2003) vysvětlují jednak neadaptivně větším množstvím využitelných zdrojů během doby, kdy zvířata neaktivují a pak adaptivně jako odpověď hostitele na zvýšený útok ektoparazitů, kteří mají povětšinou noční aktivitu a endoparazitů, kterým více vyhovuje snížená tělesná teplota hostitele během noci. Evidentní rozdíl mezi dnem a nocí v reakci jednotlivých jedinců na PHA našel i Martínez-Padilla (2006), který zaznamenal pokles imunitní odezvy na PHA u mláďat poštolky obecné (*Falco tinnunculus*) s přibývajícím hodinou měření v rámci dne. Vysvětluje to jako důsledek soupeření sourozenců z jednoho hnízda během dne. Z tohoto důvodu by bylo vhodné aplikovat PHA a následně měřit odezvu imunitního systému u všech zkoumaných jedinců alespoň přibližně ve stejnou dobu (např. v odpoledních hodinách (Marzal et al. 2005)).

Imunitní odezva na PHA se nyní standardně měří po 24 hodinách (Smits et al. 1999), avšak Goto et al. (1978) doporučoval u kura domácího měřit odezvu už po 12ti hodinách, kdy dosahovala mocnost otoku největších hodnot a (Zuk & Johnsen 1998; Moller et al. 2003a; Buchanan et al. 2003) měřili ve svém experimentu imunitní odezvu už po 6ti hodinách na základě předchozího zjištění Navarra et al. (2003) na vrabci domácím, že se mocnost otoku po 6ti hodinách už významně nezvyšuje. Buněčné složení otoku se však v průběhu reakce značně mění (viz následující kapitola). Čas měření vzniklého otoku je tedy podstatný při interpretaci a vzájemném srovnávání výsledků.

2.3.4 Průběh hypersenzitivní reakce na PHA

Předpokládá se, že působení PHA vychází z jeho mitogenní podstaty. Jak už bylo zmíněno výše (kap. 2.1.2), PHA se váže nespecificky na T buněčné receptory a způsobuje tak polyklonální aktivaci T lymfocytů (Licastro et al. 1993). T lymfocyty následně produkují cytokiny, které jsou zodpovědné za časnou (do 30 minut (Carlson & Allen 1969)) atrakci dalších imunitních buněk, zejména basofilů, do místa zánětu. Předpokládáme, že stimulací těchto buněk dochází k produkci dalších cytokinů, které regulují následný průběh reakce, včetně další infiltrace leukocytů. V časné fázi se tedy v místě zánětu začínají současně perivaskulárně kumulovat basofily, heterofily i lymfocyty (Carlson & Allen 1969; Stadecker & Leskowitz 1974a; Stadecker et al. 1977; Mccorkle et al. 1980; Martin et al. 2006), přičemž heterofily poměrně rychle degranulují. Početnosti jednotlivých buněčných typů v průběhu imunitní reakce se věnoval např. Martin et al. (2006) ve své histologické studii na vrabci domácím (viz souhrnný graf 2.3/1). Obecně se předpokládá, že je mocnost otoku úměrná počtu infiltrovaných imunitních buněk. Z tohoto grafu je dobře patrné, že se na otoku podílejí největší měrou lymfocyty, které hrají v době nejběžnějšího měření výsledného edému (24 hodin po aplikaci PHA) spolu s heterofily majoritní roli. Pozdější nárůst basofilů si autoři (Martin et al. 2006) vysvětlují tím, že buňky i po své degranulaci setrvávají a velkou měrou se tak podílejí na výsledném zánětu. Téměř zanedbatelnou měrou, alespoň co se počtu buněk týká, se na výsledné mocnosti otoku podílejí trombocyty a makrofágy. Po 48 hodinách od aplikace PHA buněčná infiltrace pozvolna klesá (Goto et al. 1978; Martin et al. 2006). V buněčné infiltraci existuje značná diverzita mezi taxony, např. u vrabce (Martin et al. 2006) došlo ve srovnání s kurem (Goto et al. 1978) velmi brzo po aplikaci PHA k infiltraci lymfocytů a heterofily u vrabce daleko rychleji degranulovaly než heterofily kura.



Graf 2.3/1: Souhrnný graf časového průběhu buněčné infiltrace v místě zánětu. Kompilováno z dat Martin et al. (2006).

2.4 Využití PHA testu v evolučně ekologických studiích

Snahou evolučních ekologů je pomocí environmentálních faktorů a life history znaků předpovědět rezistenci jedinců vůči parazitárním infekcím a zjistit dopad na jejich přežívání. Při limitaci zdroji řeší jedinci především trade-off mezi investicemi do rozmnožování a do přežívání. Je dokázáno, že krátkověcí ptáci investují více do reprodukce, zatímco dlouhověcí do imunitních funkcí a tím do přežívání (Apanius & Nisbet 2006). Jakou měrou je jedinec schopen zareagovat na atak parazita však ovlivňuje mnoho dalších faktorů. Na míře imunitní odpovědi se mohou negativně podílet např. migrace (Moller et al. 2004), přepeřování (Bonneaud et al. 2003) či stres (Merino et al. 1999). Faktory ovlivňující imunitní systém jsou velmi zajímavé, avšak jejich detailní rozbor by značně přesáhl rozsah této práce. Jedním z nejpoužívanějších testů na stanovování buněčně zprostředkované imunitní reakce je právě PHA test. Vybrané příklady jeho užití v evolučně ekologických studiích jsou shrnuty v dalším textu a v tabulce 2.4 přílohy. Jednotlivé vlastnosti závislé na imunitním systému jsou značně provázané a do jisté míry spolu souvisí. Následné rozdělení do podkapitol by tedy mělo sloužit spíše k lepší přehlednosti textu, než striktně vyčlenit probírající téma.

Věk

Stáří jedinců má vliv na odezvu imunitních buněk při setkání s mitogeny, jak dokázal už Smith (1972) *in vitro* a později potvrdili na mnoha druzích ptáků např. Tella et al. (2002) a Hausmann et al. (2005), reaktivnost na PHA klesá s přibývajícím věkem. To by mohlo být způsobeno např. tím, že se mláďata v nízkém věku setkají s větším množstvím nových patogenů (Moller et al. 2003b) a tak se jim vyplatí investovat více do mechanismů zajišťujících přežívání, než dospělcům, kteří investují větší podíl zdrojů do rozmnožování. Alternativní vysvětlení by mohlo spočívat v imunologické paměti, aneb mladí jedinci, kteří ještě nevládnou úplný arzenál paměťových buněk, reagují na PHA silněji; nebo naopak ve zvyšující se míře poškození organismu v důsledku uvolňujících se volných kyslíkových radikálů s přibývajícím věkem (Alonso-Alvarez et al. 2004). Imunitní odpověď na PHA je závislá na věku mláďat, do dosažení 12 dnů prudce roste a následně začíná pozvolna klesat (Tella et al. 2002). I měření v různém čase hnízdní periody (a tak v rozdílném stáří mláďat) může pak být jednou z příčin rozdílné reakce jedinců na PHA mezi jednotlivými studiemi.

Hmotnost & kondice jedince

Mezi hmotností (velikostí) jedince, kondicí a schopností zareagovat na PHA potvrdilo pozitivní korelaci mnoho studií, např. (Horak et al. 2000; Tella et al. 2000b; Cichon et al. 2006; Brzek & Konarzewski 2007; Bize et al. 2008). Všichni jedinci čelí v rámci populace obdobným tlakům parazitů nezávisle na tělesné velikosti. Nicméně množství imunologických jednotek (T buněk, makrofágů či protilátek) může být na velikosti těla závislé (čím větší organismus, tím mu při stejném nastavení podmínek koluje po těle více buněk schopných zasáhnout v místě ohrožení). Jiné možné vysvětlení klade vyšší hmotnost jedince naopak jako důsledek lepší imunitní odezvy. Jedinci, kteří mají lépe vyvinut funkční imunitní systém, jsou zároveň schopni udržet se v lepší zdravotní kondici, čímž si mohli dovolit více vyrůst a následně si tak i větší tělesnou hmotnost udržet. Horak et al. (2000) se domnívají, že imunitní systém je tak nákladný proto, že působí zároveň patologicky jak na parazity tak i na vlastní

organismus a tak si jen jedinci v lepší kondici mohou dovolit silnější imunitní reakci, protože se s následným poškozením dokáží lépe vyrovnat.

Indikátor kvality jedince

Samici mohou na kvalitu samce poukázat mj. samčí sekundární pohlavní znaky, jejichž exprese může být ovlivněna jednotlivými parametry imunitního systému. Jednotlivé znaky nelze považovat za stejnocenné indikátory, neboť je každý rozdílně nákladný. Obsahově by toto téma bohatě posloužilo na samostatnou práci, proto zde zmíním danou problematiku pouze okrajově a především ve vztahu k PHA. Zbarvení představuje jeden z nejnápadnějších sexuálních ornamentálních znaků mnoha ptačích druhů.

V případě znaků zapříčiněných karotenoidy je třeba získat z potravy dostatečné množství prekurzorů a tyto látky dále metabolizovat. Stimulace imunitního systému může u ptáků způsobit oxidativní stres a tím přesunout karotenoidy z ostatních tkání do volné cirkulace, kde vychytávají nebezpečné volné radikály (von Schantz et al. 1999; Costantini & Dell'Omo 2006). Z množství karotenoidů vázaných v nejrůznějších strukturách (zobák, peří, aj.) lze usuzovat na kvalitu jedince (Perez-Rodriguez et al. 2008). To potvrdil i (Mougeot 2008)), který manipulativními experimenty s barvou a velikostí hřebínku bělokura (*Lagopus lagopus scoticus*) dokázal, že barva koreluje s odezvou na PHA lépe než velikost hřebínku. Sociálně dominantní hýlové mexičtí (*Carpodacus mexicanus*) byli schopni silnější imunitní odpovědi na PHA (Hawley et al. 2007). Obdobně koreluje barva, avšak založena na pterinovém pigmentu, a velikost hrudní skvrny tučňáka patagonského (*Aptenodytes patagonicus*) s jeho schopností zareagovat na PHA (Nolan et al. 2006). Další ornamenty jsou založené na melaninech. Melaniny si organismus na rozdíl od karotenoidů musí syntetizovat převážně sám. Jako indikátor kvality je melaninový ornament hojně zkoumán např. u vrabce domácího (Gonzalez et al. 1999; Bonneaud et al. 2003; Buchanan et al. 2003). Dále lze na kvalitu jedince usuzovat i z rozličných morfologických struktur (hřebínků, ostruh, délky per) či symetrie těchto znaků.

Pohlaví jedince

Je poněkud komplikované určit, jak souvisí míra imunitní reakce s pohlavím jedince. Ve většině studií s patrným rozdílem v reaktivnosti imunitního systému na PHA byla zjištěna silnější odezva na PHA u samic (Fargallo et al. 2002; Tschirren et al. 2003; Muller et al. 2003; de Bellocq et al. 2007a), což by se dalo vysvětlit inhibičním účinkem testosteronu samců na výslednou reakci vyvolanou PHA (Grossman 1985). Imunosupresivní vliv testosteronu však není jistý, jak je vidět na příkladech mnoha studií, kde výzkumníci žádný rozdíl v reakci na PHA mezi pohlavími nezaznamenali (Tella et al. 2000a; Saino et al. 2002a; Jovani et al. 2004; Bize et al. 2005; Wilk et al. 2007). V některých případech však dokonce na PHA silněji zareagovali samci (Jovani et al. 2004; Dubiec et al. 2006), což mohlo být způsobeno spíše než samotným vlivem pohlaví větší hmotností samců (alespoň v případě (Dubiec et al. 2006)). Dokud však neznáme přesný mechanismus účinku PHA, můžeme se o hormonálních regulacích imunitního systému jen dohadovat.

Stres, vliv manipulace

Stresový hormon, kortikosteron, potlačuje reakci imunitního systému (Siegel 1980) a snižuje tím odpověď na aplikovaný PHA (Merino et al. 1999; Butler & Dufty 2007; Berzins et al. 2008).

Imunosuprese v důsledku stresu může jednak adaptivně snižovat riziko autoimunopatologické reakce, která se zvyšuje např. při těžkém fyzickém vyčerpání a jednak může být způsobena trade-offs v realokaci zdrojů pro jiné metabolické potřeby organismu (Raberg et al. 1998).

Berzins et al. (2008) prokázali na zebřičce (*Taeniopygia guttata*), že se čas manipulace projeví v PHA odezvě odlišně u obou pohlaví. Samci totiž reagovali na délku doby manipulace, která způsobila 50% variace v množství vzniklého otoku, u samic byl tento rozdíl zanedbatelný. Na míru reakce vyvolané PHA měla menší vliv každodenní krátká manipulace s mláďaty než držení jedince po dobu 24 hodin před aplikací PHA v zajetí, a to i v případě, že byla hmotnost jedinců během celého experimentu konstantní (Butler & Dufty 2007). V zajetí je především příslušník volně žijícího druhu vystaven permanentnímu stresu, který může mít větší celkový dopad na hladinu stresových hormonů v krvi a tím více ovlivnit míru reakce na PHA, než nárazové stresové situace. Abychom tedy zabránili zbytečnému zkreslení výsledků je třeba při používání PHA testu omezit čas manipulace s jedincem na minimum.

Parazitace

Parazité stojí při volbě hostitele před zásadním trade-off. Z hlediska výživy parazita je totiž nejvýhodnější žít na hostiteli nejvyšší kvality (Tschirren et al. 2007), avšak hostitelé v lepší kondici si mohou dovolit účinnější obranu, čímž naopak sníží reprodukční úspěch parazitů (Saks et al. 2006). Větší hustota ektoparazitů by tedy mohla indikovat lepší zdravotní stav hostitele (Lopez-Olvera et al. 2006; Vaclav et al. 2008). Tschirren et al. (2007) manipulovali s přísunem potravy mláďatům sýkory koňdrary (*Parus major*), přičemž vystavovali hnízda různému tlaku ektoparazitů (slepičích blech). Blechy kladly více vajíček na lépe krmená mláďata sýkor, ta však na základě své lepší výživy dokázala rychleji vyvinout imunitní odpověď a tak sýkory se silnější reakcí na PHA nesly blechy s nižší plodností a tím menším reprodukčním úspěchem. Zdá se tedy, že nejlépe prosperují parazité na jedincích středně dobré kondice (Bize et al. 2008).

Imunitní odpověď vyhodnocená PHA testem může být závislá na intenzitě nákazy parazity. Hlodavci s více blechami reagovali slaběji na PHA, než neparazitovaná zvířata (de Bellocq et al. 2006). Tentýž vztah prokázali Gonzalez et al. (1999) i Navarro et al. (2003) u vrabce domácího (*Passer domesticus*) infikovaného krvinkovkami (*Haemoproteus*), či Johnsen & Zuk (1999) u kura domácího (*Gallus gallus*) parazitovaného střevními škrkavkami (*Ascaridia galli*). Jedno z možných vysvětlení může být takové, že parazitovaná zvířata soustředí většinu imunitní obrany k boji s parazitem a schází jim pak energie na dostatečnou reakci imunitního systému na PHA. Právě alokace energie mezi dvě rozdílné složky imunitní odpovědi může být vysvětlením pro sníženou reaktivnost na PHA. Dalším možným vysvětlením nezávislým na množství dostupné energie by mohla být antagonistická regulace imunity Th1 a Th2 lymfocyty, tzn. pokud je již dříve aktivovaná Th2 imunitní odezva nasměrovaná proti parazitické infekci, odezva Th1 uplatňující se při reakci na PHA je značně inhibována (Webster et al. 2002). Zdravější, tzn. méně parazitovaný, jedinec by tak vykazoval silnější imunitní odezvu na PHA, než jedinec parazitovaný.

Limitace zdroji vyvolá trade-off v investici dostupné energie. Např. gravidní samice netopýra velkého (*Myotis myotis*) hostily více ektoparazitů *Spinturnix myoti*, než ostatní samice z populace

a s přibývajícím mírou gravidity jejich odezva na PHA ještě více klesala, což bylo nejspíše zapříčiněno právě realokací zdrojů z imunitní obrany do reprodukce (Christe et al. 2000a). Imunitní systém je schopen alokovat zdroje i mezi jednotlivými složkami imunitní obrany, což je zapříčiněno zřejmě tlakem nejčastěji se vyskytujících parazitů. Odezva na PHA bělozubky tmavé (*Crocidura russula*) totiž neodráží celkovou infekci helminty, ale negativně koreluje s množstvím tasemnic a pozitivně s přítomnými hlísticemi (de Bellocq et al. 2007b). Zdá se, že na různé parazity reaguje imunitní systém různou měrou a pomocí různých imunologických mechanismů. Míru imunitní odezvy jedince na PHA může ovlivnit mnoho aspektů a to jak hustota parazitů, tak např. realokace zdrojů mezi investicema do imunitní obrany a do rozmnožování.

Dědičnost imunity

Imunitní odezvu může ovlivnit řada faktorů, mezi významné patří i genetické predispozice organismu. Jeden z možných způsobů stanovení míry závislosti imunitní reakce na genech je zkoumání nepříbuzných jedinců vystavených stejným podmínkám. K eliminaci vlivu rozdílných podmínek se často používají tzn. crossfosteringy, kontrolované manipulační pokusy, kdy se zaměňují nejčastěji mláďata v hnízdech. Přičemž lze využít i srovnávání imunitní reakce mimopárových (EPY, *Extra-pair young*) a párových (WPY, *Within-pair young*) mláďat z jedné snůšky. Johnsen et al. (2000) i Garvin et al. (2006) prokázali rozdíl mezi EPY a WPY, kde v obou studiích EPY vykazovala silnější reakci na aplikovaný PHA. Přičemž mláďata EP samce v cizím hnízdě reagovala silněji na PHA, než mláďata z hnízda vlastního (Garvin et al. 2006). To podporuje hypotézu komplementárních genů, která předpokládá, že EPP mohou zvýšit míru heterozygotnosti mláďat a tím zvýšit pravděpodobnost jejich přežití do reprodukčního věku (Neff & Pitcher 2005). Edler a Friedl (2008) však u snovače *Euplectes orix* vysledovali opačný trend. WPY reagovali na PHA silnější odezvou než EPY. Toto zjištění naopak odporuje hypotézám dobrých i komplementárních genů, podle který by si měla samička vybírat EP partnera podle jeho kvalitních genů resp. podle genů, které se nejvíce hodí k těm jejím z hlediska případných potomků. V tomto konkrétním případě se zdá, že jsou EPY vynucena na samičkách násilím EP samečky nižší kvality než je jejich sociální partner. Míra dědičnosti imunitních předpokladů se však může měnit populaci od populace (Ardia & Rice 2006). Na závěr je však třeba poznamenat, že mnoho studií neprokázalo žádný rozdíl v síle reakce na PHA mezi EPY a WPY mláďaty z téže snůšky (Kleven et al. 2006; Cichon et al. 2006; Edly-Wright et al. 2007; Pitala et al. 2007b). To by znamenalo, že reakce na PHA je ovlivněna více nedědičnými vlivy působícími na hnízdo, ve kterém mláďata vyrůstají, než jejich genetickými predispozicemi.

Dostupnost zdrojů

Potrava je jedním z nejdůležitějších zdrojů, bez níž se neobejde jak růst tak ani imunita žádného jedince (Brzek & Konarzewski 2007). Reakce na PHA pozitivně koreluje s přísunem potravy (Christe et al. 2003; Cichon et al. 2006; Brzek & Konarzewski 2007). Dokazují to i výsledky pokusu Snoeijs et al. (2005), které prokazují negativní korelaci mezi reakcí na PHA a délkou tarzu u mláďat sýkory koňadry (*Parus major*), která byla krmena pouze matkou a pozitivní korelaci pokud se na krmení podíleli oba rodiče. Podobně lze podstatný vliv dostupnosti potravy dokázat i manipulačními pokusy s počtem mláďat

ve snůšce či různým rodičovským úsilím (Saino et al. 2002b; Fargallo et al. 2002). Alonso-Alvarez et al. (2007) uměle zvyšovali hladinu testosteronu zebříčkám (*Taeniopygia guttata*), čímž docílili poklesu jejich odpovědi na PHA. Pokud byl však ptákům s vyšší hladinou testosteronu podáván leptin (hormon pozitivně regulující metabolismus), zvýšila se jejich imunitní odezva na úroveň kontrolních ptáků (viz též Lohmus et al. (2004)). To by mohlo svědčit na imunitní odezvu limitovanou zdroji. Z tohoto je patrné, že jednotlivé hormony se navzájem ovlivňují a nelze tak chápat jejich působení separátně.

Životní prostředí

Jak už bylo zmíněno výše, životní prostředí může mít na imunitní odezvu jedince větší vliv, než jeho genetické predispozice (Cichon et al. 2006; Pitala et al. 2007a). Odezva na PHA je slabší v chladném a vlhkém počasí (Garvin et al. 2006), což může být způsobeno i tím, že toto počasí limituje dostupné zdroje. Závislost imunitní odezvy na PHA prokázal na vlaštovce stromové (*Tachycineta bicolor*) i Lifjeld et al. (2002). Nezáleží však jen na dostupnosti potravy, kondice mláďat a schopnost jejich imunitního systému adekvátně reagovat se u koloniálně hnízdících ptáků snižuje se i se zvětšující se hustotou hnízdní populace (Tella et al. 2001). Negativní vliv na imunitní systém má i znečištěné životní prostředí, např. těžkými kovy, které se dostávají s potravou do těla jedinců a následně se zde kumulují a to především u vrcholových predátorů (luňák hnědý, *Milvus migrans*) či u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) (Baos et al. 2006).

Sezonalita, cirkadiánní rytmy

Život mnoha ptáků především mírného pásma je značně ovlivněn sezonalitou, kde se střídající se reprodukce, migrace a zimování promítají i do fyziologických procesů, např. kolísání hladiny hormonů v krvi během roku (Buchanan et al. 2003). Během hnízdní sezóny klesá u mláďat lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) citlivost na PHA (Wilk et al. 2007). Odezva na PHA kolísá i cirkadiánně, v noci je silnější než během dne (Navarro et al. 2003). Avšak síla reakce na PHA se mění dokonce i během dne (klesá s přibývajícím hodinou měření). Martinez-Padilla (2006) to vysvětluje jako důsledek soupeření sourozenců během dne. Jeho předpoklad potvrzují i Lifjeld et al. (2002), kteří ve své studii na vlaštovce stromové (*Tachycineta bicolor*) zjistili mj. to, že se odezva na PHA snižovala s přibývajícím nárůstem počtu mláďat v jednom hnízdě. To si můžeme vysvětlovat větší fyzickou aktivitou mláďat z početnější snůšky právě v důsledku bojů o omezenou potravu (rodičovské úsilí není možné zvyšovat do nekonečna) a s tím spojenou vzrůstající mírou stresu. Nejen z tohoto případu je jasně patrné, že míra odezvy na PHA není většinou ovlivněna pouze jedinou proměnnou, ale sledování evolučně ekologických vztahů k imunitnímu systému je značně složité a abychom tyto vztahy dokázali správně interpretovat, je třeba co nejucelenější pohled na danou problematiku.

2.5 Aplikace a interpretace PHA testu

Test kožní hypersenzitivity na PHA se může zdát pro svou jednoduchost, praktičnost při práci v terénu i relativní finanční nenáročnost ideálním postupem, jak efektivně u volně žijících druhů stanovovat schopnost imunitního systému zareagovat na cizorodou agens. Jeho nespornou výhodou je již značné množství studií, které jej využívají, zprvu převážně na kuru domácím (Goto et al. 1978; Mccorkle et al.

1980; Parmentier et al. 1993; Zuk & Johnsen 1998). Hlavní důvod značné oblíbenosti právě tohoto testu spočívá v jeho „relativní“ interpretační jednoduchosti. Změřením otoku, jakožto ekvivalentu míry imunitní reakce, dostaneme jediné konkrétní číslo, což je ohromná výhoda pro další srovnávání a interpretaci výsledků.

Přesto však při používání tohoto zdánlivě nejvhodnějšího testu pro evolučně ekologické studie narážíme na mnohá úskalí, která limitují např. právě interpretaci takto získaných dat. V prvé řadě je potřeba si uvědomit, že PHA testem měříme reakci imunitního systému na podnět, který je velmi vzdálený přirozené imunitní reakci. Toto vychází už z podstaty PHA, který jakožto mitogen způsobuje nespecifickou polyklonální aktivaci T lymfocytů téměř okamžitě (Licastro et al. (1993), viz také kap. 2.1.2), zatímco specifická odezva T lymfocytů na normální antigen trvá několik dní.

Další komplikace mohou nastat při samotném procesu měření. Manipulace s živými bytostmi je obecně složitá, zvláště pak s menšími a neochočenými druhy ptáků, čímž mohou snadno nastat nepřesnosti při měření mocnosti křídla, ať už před anebo s otokem. Získané hodnoty jsou navíc závislé na individualitě měřitele. Problém metodologického charakteru může u volně žijících druhů představovat také nutnost manipulace se zvířetem nejméně ve dvou časových momentech, tj. při aplikaci PHA a o určitou, přesně definovanou, dobu později, při měření imunitní reakce. Zpětný odchyt konkrétního jedince v přesnou dobu je často, zvláště u dospělých ptáků, značně složitý. Ačkoliv je mnohdy možné držet jedince po potřebnou dobu v zajetí, takovýto postup může u volně žijících druhů způsobovat nemalý stres (Butler & Dufty 2007) a ten pak může ovlivnit námi měřenou odezvu imunitního systému (Merino et al. 1999; Berzins et al. 2008). Snad právě proto jsou častou modelovou skupinou mláďata altriciálních druhů ptáků, u kterých nevzniká takový problém s manipulací, stresem a načasováním pokusu. Nelze ovšem zapomínat na skutečnost, že jak imunitní systémy, tak i ekologické podmínky mláďat a dospělých jedinců se v mnohém liší a ne všechny výsledky získané jen na jedné skupině lze tak generalizovat.

Právě generalizace výsledků PHA kožního testu je velmi problematická. Jeden z problémů spočívá v měření odezvy imunitního systému po rozdílných časech, další v nejednotnosti množství injikovaných látek navíc o rozdílných koncentracích, přičemž na výsledcích by se mohlo projevit i užívání nejednotných produktů (PHA-P Sigma L1668, L8754, L9132, vše viz tabulka 2.3 v příloze). Jednotlivé studie se tak stávají mezi sebou jen velmi obtížně korelovatelné. Mezi jednotlivými druhy se nachází značná diverzita v průběhu buněčné reakce na PHA a v míře schopnosti na PHA odpovědět (Goto et al. (1978), Martin et al. (2006), viz také kap. 2.3.4). Toto může vycházet z rozdílné evoluce druhů a jejich imunitního systému.

Naměřená hodnota je sice jednoznačná, avšak při následné interpretaci výsledků je nutné brát ohled na to, že nadměrná aktivita některé ze složek imunitního systému (její hypersenzitivita) nemusí být v boji s parazity prospěšná, naopak může vlastnímu organismu značně uškodit. Z tohoto důvodu nemusí být jedinec, u kterého se projeví největší otok zároveň jedincem, který je schopen se nejlépe vyrovnat s parazity. K zjištění, zda je silnější reakce imunitního systému následek právě probíhající parazitární infekce nebo navýšení počtu lymfocytů zapříčinila až aplikace PHA, by stačilo provádět krevní roztěry vždy před aplikací PHA.

Metoda předpokládá, že velikost otoku závisí na množství buněk imunitního systému (především lymfocytů), které do místa stimulace infiltrovaly. Avšak žádný edém není tvořen pouze buňkami imunitního systému, ale podílí se na něm určitou měrou i další složky, jako např. erytrocyty či plasma, v jejichž poměrném složení může být mezi jedinci značná variabilita, a to bez ohledu na míru infiltrovaných buněk imunitního systému.

Z výše uvedeného tak jasně vyplývá, že výpovědní hodnota PHA testu má značná omezení a i přes velký zájem a široké užití této metody vyvstávají stále mnohé nezodpovězené otázky týkající se především podstaty imunologických mechanismů *in vivo* působení PHA na imunitní systém hostitele. Naše dosavadní znalosti (viz kap. 2.3.2) imunologických vlastností PHA *in vitro* a také částečně (a velmi nedokonale) prostudované účinky *in vivo*, včetně vlivu mnoha různých faktorů, které ovlivňují výsledek imunitní reakce na PHA, určují limity interpretačního rámce tohoto testu. Přesto mohou výsledky získané touto nenáročnou metodou podat užitečné informace o stavu imunitního systému studovaných zvířat. Každý zjištěný průkazný rozdíl v intenzitě podkožní buněčné reakce na PHA nám napovídá o existenci jakéhosi imunologického rozdílu mezi jedinci, který může být dále zkoumán. Známe-li navíc buněčné složení infiltrátu a leukocytární poměry v periferní krvi před aplikací mitogenu, je-li pozorovaný rozdíl důsledkem manipulativního experimentu nebo máme-li k dispozici aditivní informace o zdravotním stavu vyšetřovaných zvířat, otevírá se nám cesta k další detailní interpretaci našich výsledků. Ve své podstatě velice nepřesný PHA test proto může stát na počátku konečného přesného popisu evolučních i ekologických vztahů imunitního systému jedince a jeho okolí, zvláště pak u volně žijících druhů.

Jak bylo zmíněno výše, není zatím o mechanismech působení PHA *in vivo* příliš známo. Předpokládejme, že podstata imunologických dějů vyvolaných aplikací PHA by mohla vycházet z jeho vnitřní struktury a specifických vlastností tohoto mitogenu. V následující Experimentální části této práce jsem se pokusila objasnit působení PHA právě na základě známých schopností jeho strukturních podjednotek, a tím zvýšit interpretační hodnotu tohoto testu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Úvod

Podstata imunologických mechanismů, na kterých je PHA test založen (sensu Smits et al. (1999)), není zatím zcela známa. Provedením následujících experimentů jsme se snažili jednak ověřit, zda je kožní hypersensitivitní reakce po aplikaci PHA-P způsobena specifickými vlastnostmi tohoto mitogenu, a pokud ano, která ze dvou izomer PHA (L nebo E, (Miller et al. 1975)), podrobněji viz kapitola 2.3.1.) zodpovídá za výslednou měřenou reakci. Pro srovnání účinků PHA s reakcí na nespecifický protein byl použit jako modelové inokulum bovinní sérový albumin (BSA). Případná stimulační schopnost BSA nebo čistých PHA-E tetramer, způsobujících výhradně aglutinaci erythrocytů, by do značné míry zpochybnila dosavadní interpretační rámec tohoto testu.

3.2 Metodika

V pokusech bylo použito 48 mladých samců zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*), získaných ze zájmových chovů. Pokusná zvířata byla náhodně rozdělena do experimentálních skupin a držena v prostorných klecích s přístupem k vodě a potravě ad libitum. Každý jedinec byl označen unikátní kombinací barevných kroužků. Před každým pokusem bylo zvířatům ponecháno minimálně 24 hodin na aklimatizaci. Experimenty probíhaly postupně, se všemi zvířaty v rámci jednoho experimentu bylo nakládáno shodně.

Experiment 1: Srovnání PHA-P a BSA

V prvním pokusu bylo použito 10 exemplářů. Tloušťkoměrem Mitutoyo, type 7301 (přesnost 0,01mm) byla změřena mocnost obou křídel v oblasti patagia, tj. v místě budoucí injekce, a to vždy opakovaně třikrát. Do patagia pravého křídla bylo subkutánně injektováno 0,10 mg PHA-P (Sigma Product No. L-8754) rozpuštěného v 20 μ l DPBS, zatímco do téhož místa na levém křídle bylo injektováno 0,10 mg BSA (Sigma Product No. A-3902) rozpuštěného ve stejném objemu DPBS. Ihned po injekci bylo každé pokusné zvíře vráceno do klece a ponecháno v klidu. Po 24 hodinách (+/- 1 hodina) byla změřena mocnost obou křídel, opět vždy tři nezávislá měření. Za výsledný otok byl považován rozdíl v mocnosti křídla 24 hodin po aplikaci pokusné látky a před její aplikací (Smits et al. 1999).

Experiment 2: Srovnávání PHA-L a PHA-E

Do pokusu bylo zařazeno 26 ex; experimentální design byl, s výjimkou aplikovaných látek, shodný s experimentem 1. V tomto pokusu bylo subkutánně do patagia levého křídla injektováno 0,10 mg PHA-L (Sigma Product No. L-2769) rozpuštěného v 20 μ l DPBS a do stejné oblasti pravého křídla 0,10 mg PHA-E (Sigma Product No. L-8629) rozpuštěného ve stejném množství DPBS.

Experiment 3: Srovnávání PHA-P a PHA-L

V tomto pokusu bylo použito 12 ex; experimentální design byl opět shodný s pokusem 1. Do patagia levého křídla bylo subkutánně injektováno 0,10 mg PHA-L rozpuštěného v 20 μ l DPBS a do stejné oblasti pravého křídla 0,10 mg PHA-P rozpuštěného ve stejném množství DPBS.

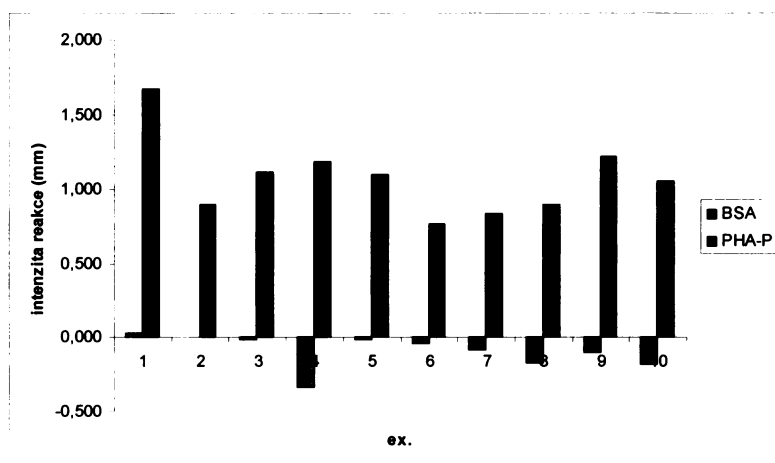
Data byla statisticky analyzována v programu S-plus metodou párového t-testu.

Pokus byl schválen Etickou komisí PŘF UK (č.j. 4788/2008-30).

3.3 Výsledky

Experiment 1: Srovnání PHA-P a BSA

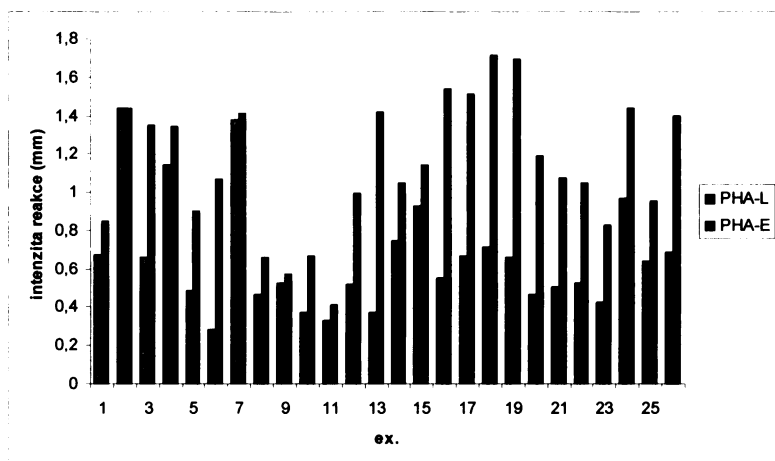
Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi reakcí na PHA-P a BSA ($p < 0,001$). U všech pokusných zvířat došlo k indukci otoku po aplikaci PHA-P, zatímco BSA nevyvolal žádnou reakci (viz graf 3.3/1).



Graf 3.3/1: Porovnání intenzity reakce na BSA a PHA-P.

Experiment 2: Srovnávání PHA-L a PHA-E

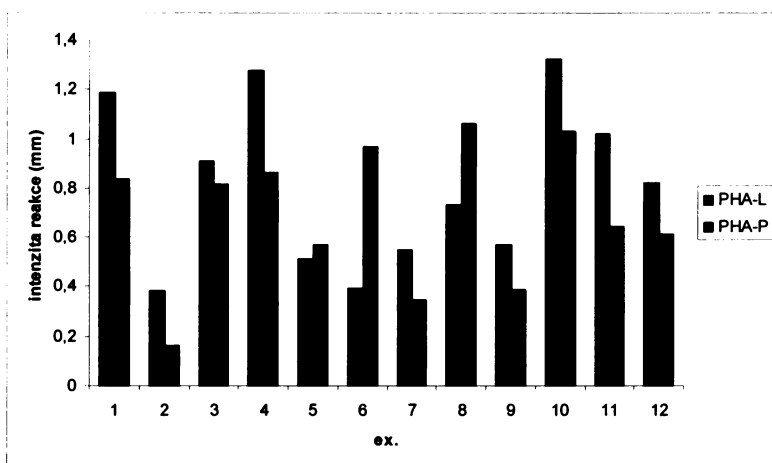
Byl prokázán signifikantní rozdíl mezi mírou reakce na PHA-L a PHA-E ($p = 0,013$). U všech pokusných jedinců způsobila aplikace jak PHA-L, tak PHA-E hypersensitivní otokovou reakci, avšak ve všech případech byla reakce silnější na PHA-E než na PHA-L (viz graf 3.3/2).



Graf 3.3/2: Porovnání intenzity reakce na PHA-L a PHA-E.

Experiment 3: Srovnávání PHA-P a PHA-L

Podle předpokladu u všech pokusných jedinců způsobila aplikace PHA-P resp. PHA-L hypersensitivní otokovou reakci (viz graf 3.3/3). Nebyl však prokázán signifikantní rozdíl mezi mírou reakce na PHA-P a PHA-L ($p=0,210$).



Graf 3.3/3: Porovnání intenzity reakce na PHA-L a PHA-P.

3.4 Diskuze

První experiment prokázal, že otok vyvolaný aplikací PHA-P je skutečně způsobený specifickými vlastnostmi této látky, protože aplikace jiné nepřibuzné látky proteinové povahy (BSA) žádnou infiltraci buněk do místa injekce nezpůsobila. Ve druhém experimentu bylo zjištěno, že reakce na PHA-E je signifikantně silnější než na PHA-L. Tyto, poněkud překvapivé, výsledky naznačují, že se na výsledné otokové reakci stimulované aplikací PHA-P spolupodílejí jak L tak E podjednotky. Nejedná se tedy čistě o důsledek mitogenních vlastností PHA-P. Větší roli než vlastní lymfoproliferace a následá atrakce buněk imunitního systému aktivovanými T buňkami by mohla hrát právě erytaglutinace.

Ačkoli se totiž výrazně mění zastoupení jednotlivých buněčných typů v místě zánětu v čase (viz graf 2.3/1), zůstává mocnost otoku po 6 až 48 hodinách téměř konstantní (Navarro et al. 2003). Zdá se tedy, že je otok způsoben nejen buňkami imunitního systému, ale i dalšími složkami, např. tkáňovým mokem či právě erytrocyty. Bylo však dokázáno, že odpověď na PHA je závislá na přítomnosti thymu v ontogenezi jedince (Dukor & Dietrich 1967; Goto et al. 1978) a tedy na primárním zdroji T lymfocytů. Zvířata s neonatálně vyjmutým brzlíkem totiž vykazovala slabší odezvu na aplikovaný PHA. Právě za touto slabší odezvou by mohl stát právě omezený počet dostupných lymfocytů. Jelikož však nebyl v těchto experimentech proveden rozbor tkáně z místa otoku, nelze o skutečné příčině vzniku edému rozhodnout.

Je tedy značně pravděpodobné, že v současnosti nejpoužívanější test na stanovování míry buněčné imunity neměří překvapivě jen aktivitu buněk imunitního systému, nýbrž také procesy na úrovni srážení krevních buněk. Není ovšem vyloučeno, že i v těchto dějích dochází k aktivaci produkce cytokinů způsobujících následnou infiltraci imunocytů do stimulované tkáně. Více informací o mechanismu reakce na PHA by mohla poskytnout analýza buněčného složení tkáňového infiltrátu po aplikaci PHA-L resp.

PHA-E. V posledním experimentu jsme nicméně ukázali, že míra hypersensitivní reakce není průkazně odlišná v případě aplikace PHA-L vs. PHA-P. Míru reakce na PHA-P lze tedy považovat za dobrý prediktor reakce na PHA-L a proto PHA-P může být používáno k měření imunitní reakce způsobené L podjednotkami. Mohlo by tomu tak být proto, že ve směsi izomer, které jsou přítomny v PHA-P, je větší zastoupení podjednotek L. Tuto skutečnost by bylo vhodné ověřit.

4 ZÁVĚR

Tato práce shrnuje dostupné poznatky o testu PHA indukované kožní hypersenzitivity, v současnosti nejpoužívanější ekoimunologické metodě sloužící ke stanovování aktivity buněčné složky imunitního systému. Nastíněny jsou mnohé nedostatky používání této metody, ať už metodického charakteru či pramenící z nedostatečných znalostí podstaty imunologických mechanismů *in vivo* působení PHA na imunitní systém hostitele, a z toho plynoucí nesprávné interpretace výsledků. Ke zlepšení výpovědní hodnoty PHA testu by bylo vhodné vyšetřit stav imunitního systému (např. na základě početnosti různých leukocytárních typů v krvi) ještě před samotnou aplikací PHA, např. parazitovaní jedinci mají totiž imunitní systém aktivovaný již před aplikací PHA, a následně vyvolaná reakce imunitního systému tak může být silnější (Saks et al. 2006). Takovýto postup by mohl značně zpřesnit a usnadnit interpretaci získaných výsledků.

Jako klíčová pro pochopení mechanismu imunitní odpovědi na PHA *in vivo* se ukázala skutečnost, že v evolučně ekologických studiích běžně používaný PHA-P je tvořen směsí tetramerů dvou izomerních podjednotek: L a E. Pokusy, zmíněné v experimentální části práce, kladou nový náhled na funkční podstatu imunitních mechanismů vyvolaných aplikací PHA. Ukázali jsme totiž, že reakce na PHA není závislá jen na stimulaci T buněk PHA-L v iniciální fázi reakce a že obdobnou reakci mohou vyvolat i tetramery PHA-E, které schopnost vázat a stimulovat lymfocyty nemají. Reakce na PHA-P tak může být závislá na mnohem obecnějších signálech narušení integrity organismu, v nichž se kombinuje jak stimulace leukocytů, tak i reakce na aglutinaci erytrocytů v místě zánětu.

Při interpretaci výsledků bychom neměli zapomínat, že PHA test je založen pouze na stimulaci jediné složky imunitního systému, a nelze tak z vyvolané imunitní reakce stanovit celkový zdravotní stav jedince, v mnoha studiích nesprávně označovaný jako tzv. imunokompetence. Při porovnávání v ekologických korelačních studiích nám tak vztah sledovaných life-history znaků s mírou reakce na PHA neříká nic jiného, než že daní jedinci vykazují silnější/slabší citlivost na PHA než jiní. Jelikož se však na imunitní reakci vyvolané PHA podílí mnoho různých typů imunocytů a to antigenně nespecificky, je reakce velmi komplexní a může naznačovat jakési obecnější rozdíly v reaktivitě těchto buněk. Pokud však zvážíme všechna omezení při interpretaci výsledků, zůstává PHA test i přes značné nedostatky pro svou snadnou aplikovatelnost v terénních studiích vhodným nástrojem v první fázi výzkumu zabývajícího se sledováním evolučně-ekologických vztahů k buněčné imunitě, zejména pak u volně žijících druhů.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala těm, kteří přispěli k zdárnému dokončení této práce. Zejména pak mému školiteli, Mgr. Michalu Vinklerovi, že mi nabídl toto zajímavé téma a obětavě se mi po celou dobu tvoření práce věnoval a Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D., který se podílel na experimentální části práce. Dále pak rodičům za podporu a vytvoření bezvadných pracovních podmínek. Neméně děkuji i Jiřímu Schimrovi, Pavlíně Stachové, Petru Andreasovi a Iloně Kalasové za korekturu pravopisu a anglické části textu. V neposlední řadě patří můj dík i celé katedře ekologie za to, že mi vyšla vstříc a umožnila obhajovat právě tuto práci na své katedře.

SEZNAM ZKRATEK

APC	(<i>Antigen presenting cell</i>), buňka prezentující antigen
BSA	(<i>Bovine serum albumine</i>), albumin ze séra skotu
EP(Y)	(<i>Extra-pair (young)</i>), mimopárová (mláďata)
H/L	(<i>Heterophil/Lymphocyte ratio</i>), poměr heterofilů ku lymfocytům
KLH	(<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>), hemocyanin z klíštěte
LPS	(<i>Lipopolysacharid</i>)
MHC	(<i>Major histocompatibility complex</i>)
PHA	(<i>Phytohaemagglutinin</i>), fytohemaglutinin
PBS	(<i>Phosphate buffer saline</i>), fosfátový pufr
SRBC	(<i>Sheep red blood cells</i>), erytrocyty z ovce
TCR	(<i>T-cell receptor</i>), T-buněčný receptor
WP(Y)	(<i>Within-pair (young)</i>), párová (mláďata)

POUŽITÁ LITERATURA

- Adamo SA (2004) How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* 68:1443-1449
- Allen LW, Svenson RH, Yachnin S (1969) Purification of Mitogenic Proteins Derived from *Phaseolus Vulgaris* - Isolation of Potent and Weak Phytohemagglutinins Possessing Mitogenic Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63:334-&
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004) Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7:363-368
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Sorci G (2007) Energetic reserves, leptin and testosterone: a refinement of the immunocompetence handicap hypothesis. *Biology Letters* 3:271-274
- Alonso-Alvarez C, Tella JL (2001) Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 79:101-105
- Apanius V, Nisbet ICT (2006) Serum immunoglobulin G levels are positively related to reproductive performance in a long-lived seabird, the common tern (*Sterna hirundo*). *Oecologia* 147:12-23
- Ardia DR (2005a) Cross-fostering reveals an effect of spleen size and nest temperatures on immune responses in nestling European starlings. *Oecologia* 145:327-334
- Ardia DR (2005b) Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in tree swallows. *Journal of Animal Ecology* 74:517-524
- Ardia DR, Rice EB (2006) Variation in heritability of immune function in the tree swallow. *Evolutionary Ecology* 20:491-500
- Ardia DR, Schat KA (2008) *Ecoimmunology*. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (eds) *Avian Immunology* Academic Press, Elsevier, London, pp 421-441
- Baos R, Jovani R, Forero MG, Tella JL, Gomez G, Jimenez B, Gonzalez MJ, Hiraldo F (2006) Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Donana (southwestern Spain) after the Aznalcollar toxic spill. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:1153-1159
- Berzins LL, Tilman-Schindel E, Burness G (2008) Sex-specific effects of handling time on an index of immune activity in zebra finches. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:383-387
- Birkhead TR, Fletcher F, Pellatt EJ (1999) Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:385-390
- Bize P, Jeanneret C, Klopfenstein A, Roulin A (2008) What makes a host profitable? Parasites balance host nutritive resources against immunity. *American Naturalist* 171:107-118
- Bize P, Roulin A, Tella JL, Richner H (2005) Female-biased mortality in experimentally parasitized Alpine Swift *Apus melba* nestlings. *Functional Ecology* 19:405-413
- Blaese RM, Weiden P, Oppenhei JJ, Waldmann TA (1973) Phytohemagglutinin As A Skin-Test for Evaluation of Cellular Immune Competence in Man. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 81:538-548
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Surai PF (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300:125-127
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* 161:367-379
- Branton SL, May JD, Lott BD, Maslin WR (1997) Various blood parameters in commercial hens acutely and chronically infected with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* 41:540-547
- Brommer JE (2004) Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:S110-S113
- Brooks RL, Bounous DI, Andreasen CB (1996) Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International* 6:153-159
- Brzek P, Konarzewski M (2007) Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *Journal of Experimental Biology* 210:2361-2367
- Buchanan KL, Evans MR, Goldsmith AR (2003) Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:50-59
- Butler MW, Dufty AM (2007) Nestling immunocompetence is affected by captivity but not investigator handling. *Condor* 109:920-928
- Cadee N (2000) Parent Barn Swallow fluctuating asymmetry and offspring quality. *Journal of Avian Biology* 31:495-503
- Campbell TW, Ellis CK (2007) *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Blackwell Publishing Professional, Ames
- Carlson HC, Allen JR (1969) Acute Inflammatory Reaction in Chicken Skin - Blood Cellular Response. *Avian Diseases* 13:817-&
- Casto JM, Nolan V, Ketterson ED (2001) Steroid hormones and immune function: Experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *American Naturalist* 157:408-420
- Cheng S, Lamont SJ (1988) Genetic-Analysis of Immunocompetence Measures in A White Leghorn Chicken Line. *Poultry Science* 67:989-995

- Christe P, Arlettaz R, Vogel P (2000a) Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecology Letters* 3:207-212
- Christe P, de Lope F, Gonzalez G, Saino N, Moller AP (2001) The influence of environmental conditions on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* 126:333-338
- Christe P, Giorgi MS, Vogel P, Arlettaz R (2003) Differential species-specific ectoparasitic mite intensities in two intimately coexisting sibling bat species: resource-mediated host attractiveness or parasite specialization? *Journal of Animal Ecology* 72:866-872
- Christe P, Moller AP, Saino N, de Lope F (2000b) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, *Delichon urbica* (the house martin). *Heredity* 85:75-83
- Cichon M, Sendecka J, Gustafsson L (2006) Genetic and environmental variation in immune response of collared flycatcher nestlings. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1701-1706
- Clark RAF, Kaplan AP (1975) Eosinophil Leukocytes - Structure and Function. *Clinics in Haematology* 4:635-649
- Costantini D, Dell'Omo G (2006) Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 145:137-142
- D'Costa SS, Hurwitz JL (2003) Phytohemagglutinin inhibits lymphoid tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Leukemia & Lymphoma* 44:1785-1791
- Davison F (2008) The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (eds) *Avian Immunology* Academic Press, Elsevier, London, pp 1-12
- de Bellocq JG, Krasnov BR, Khokhlova IS, Ghazaryan L, Pinshow B (2006) Immunocompetence and flea parasitism of a desert rodent. *Functional Ecology* 20:637-646
- de Bellocq JG, Porcherie A, Moulia C, Morand S (2007a) Immunocompetence does not correlate with resistance to helminth parasites in house mouse subspecies and their hybrids. *Parasitology Research* 100:321-328
- de Bellocq JG, Ribas A, Casanova JC, Morand S (2007b) Immunocompetence and helminth community of the white-toothed shrew, *Crocidura russula* from the Montseny Natural Park, Spain. *European Journal of Wildlife Research* 53:315-320
- Dembic Z (2000) Immune system protects integrity of tissues. *Molecular Immunology* 37:563-569
- Dong ZJ, Wei HM, Sun R, Tian ZG (2007) The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. *Cellular & Molecular Immunology* 4:241-252
- Douglas SD (1972) Electron-Microscopic and Functional Aspects of Human Lymphocyte Response to Mitogens. *Transplantation Reviews* 11:39-59
- Dubiec A, Cichon M, Deptuch K (2006) Sex-specific development of cell-mediated immunity under experimentally altered rearing conditions in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273:1759-1764
- Duffy DL, Ball GF (2002) Song predicts immunocompetence in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:847-852
- Dukor P, Dietrich FM (1967) Impairment of *Phytohaemagglutinin*-Induced Blastic Transformation in Lymphnodes from Thymectomized Mice. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 32:521-&
- Edler R, Friedl TWP (2008) Within-pair young are more immunocompetent than extrapair young in mixed-paternity broods of the red bishop. *Animal Behaviour* 75:391-401
- Edly-Wright C, Schwagmeyer PL, Parker PG, Mock DW (2007) Genetic similarity of mates, offspring health and extrapair fertilization in house sparrows. *Animal Behaviour* 73:367-378
- Ekkel ED, Kuypers AH, Counotte GHM, Tielen MJM (1995) The Phytohemagglutinin [Pha] Skin-Test As An Indicator of Stress-Induced Changes in Immune Reactivity in Pigs. *Veterinary Quarterly* 17:143-146
- El Lethy H, Huber-Eicher B, Jungi TW (2003) Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 95:91-101
- Ewenson E, Zann R, Flannery G (2003) PHA immune response assay in captive zebra finches is modulated by activity prior to testing. *Animal Behaviour* 66:797-800
- Ewenson EL, Zann RA, Flannery GR (2001) Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. *Naturwissenschaften* 88:391-394
- Faivre B, Preault M, Salvadori F, They M, Gaillard M, Cezilly F (2003) Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour* 65:1125-1131
- Fargallo JA, Laaksonen T, Poyri V, Korpimäki E (2002) Inter-sexual differences in the immune response of Eurasian kestrel nestlings under food shortage. *Ecology Letters* 5:95-101
- Felsted RL, Egorin MJ, Leavitt RD, Bachur NR (1977) Recombinations of Subunits of Phaseolus-Vulgaris Isolectins. *Journal of Biological Chemistry* 252:2967-2971
- Flegr J (2005a) Evoluce parazitů. In: Flegr J (ed) *Evoluční biologie* Academia, Praha, pp 338-364
- Flegr J (2005b) Koevoluce. In: Flegr J (ed) *Evoluční biologie* Academia, Praha, pp 326-337
- Fletcher OJ, Barnes HJ (1998) Avian Immunology: Lymphoid organs and their anatomical distribution. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 73-81
- Forsman AM, Vogel LA, Sakaluk SK, Grindstaff JL, Thompson CF (2008) Immune-challenged house wren broods differ in the relative strengths of their responses among different axes of the immune system. *Journal of Evolutionary Biology* 21:873-878
- Garvin JC, Abroe B, Pedersen MC, Dunn PO, Whittingham LA (2006) Immune response of nestling warblers varies with extra-pair paternity and temperature. *Molecular Ecology* 15:3833-3840

- Gonzalez G, Sorci G, Moller AP, Ninni P, Haussy C, de Lope F (1999) Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* 68:1225-1234
- Gordon S (1998) The role of the macrophage in immune regulation. *Research in Immunology* 149:685-688
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 5:953-964
- Goto N, Kodama H, Okada K, Fujimoto Y (1978) Suppression of Phytohemagglutinin Skin-Response in Thymectomized Chickens. *Poultry Science* 57:246-250
- Granbom M, Raberg L, Smith HG (2005) The spatial and temporal repeatability of PHA-responses. *Behavioral Ecology* 16:497-498
- Grecchi R, Saliba AM, Mariano M (1980) Morphological-Changes, Surface-Receptors and Phagocytic Potential of Fowl Mononuclear Phagocytes and Thrombocytes *In vivo* and *In vitro*. *Journal of Pathology* 130:23-&
- Gross WB, Siegel HS (1983) Evaluation of the Heterophil Lymphocyte Ratio As A Measure of Stress in Chickens. *Avian Diseases* 27:972-979
- Grossman CJ (1985) Interactions Between the Gonadal-Steroids and the Immune System. *Science* 227:257-261
- Guillermo LVC, DaMatta RA (2004) Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry Science* 83:776-782
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon BC, Qvarnstrom A (1994) Infectious-Diseases, Reproductive Effort and the Cost of Reproduction in Birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 346:323-331
- Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable True Fitness and Bright Birds - A Role for Parasites. *Science* 218:384-387
- Harmon BG (1998) Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77:972-977
- Harmon BG, Glisson JR (1990) Disassociation of Bactericidal and Fungistatic Activities from the Oxidative Burst of Avian Macrophages. *American Journal of Veterinary Research* 51:71-75
- Harvey JS, Felsburg PJ, Heberlin RL, Kniker WT, Kalter SS (1974) Immunological Competence in Nonhuman-Primates - Differences Observed in Four Species. *Clinical and Experimental Immunology* 16:267-277
- Hasselquist D (2007) Comparative immunoecology in birds: hypotheses and tests. *Journal of Ornithology* 148:S571-S582
- Hausmann MF, Winkler DW, Huntington CE, Vleck D, Sanneman CE, Hanley D, Vleck CM (2005) Cell-mediated immunosenescence in birds. *Oecologia* 145:270-275
- Hawiger J (2001) Innate immunity and inflammation: A transcriptional paradigm. *Immunologic Research* 23:99-109
- Hawley DM, Jennelle CS, Sydenstricker KV, Dhondt AA (2007) Pathogen resistance and immunocompetence covary with social status in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Functional Ecology* 21:520-527
- Hoffmann GW (1975) Theory of Regulation and Self-Nonself Discrimination in An Immune Network. *European Journal of Immunology* 5:638-647
- Hoi-Leitner M, Romero-Pujante M, Hoi H, Pavlova A (2001) Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49:333-339
- Horak P, Ots I, Tegelmann L, Moller A (2000) Health impact of *Phytohaemagglutinin*-induced immune challenge on great tit (*Parus major*) nestlings. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 78:905-910
- Horak P, Saks L, Karu U, Ots I (2006) Host resistance and parasite virulence in greenfinch coccidiosis. *Journal of Evolutionary Biology* 19:277-288
- Horak P, Tegelmann L, Ots I, Moller AP (1999) Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* 121:316-322
- Hungerford DA, Donnelly AJ, Nowell PC, Beck S (1959) The Chromosome Constitution of A Human Phenotypic Intersex. *American Journal of Human Genetics* 11:215-236
- Janeway CA, Goodnow CC, Medzhitov R (1996) Immunological tolerance: Danger - Pathogen on the premises! *Current Biology* 6:519-522
- Johnsen A, Andersen V, Sunding C, Lifjeld JT (2000) Female bluethroats enhance offspring immunocompetence through extra-pair copulations. *Nature* 406:296-299
- Johnsen TS, Zuk M (1999) Parasites and tradeoffs in the immune response of female red jungle fowl. *Oikos* 86:487-492
- Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M (2004) Variable inter-annual relationships between T-cell mediated immunity and individual traits in White Storks. *Ardeola* 51:357-364
- Kaiser P (2007) The avian immune genome a glass half-full or half-empty? *Cytogenetic and Genome Research* 117:221-230
- Karadimitris A, Patterson S, Spanoudakis E (2006) Natural killer T cells and haemopoiesis. *British Journal of Haematology* 134:263-272
- Kennedy MW, Nager RG (2006) The perils and prospects of using *Phytohaemagglutinin* in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 21:653-655
- Klasing KC (1998) Avian macrophages: Regulators of local and systemic immune responses. *Poultry Science* 77:983-989
- Kleven O, Jacobsen F, Izadnegahdar R, Robertson RJ, Lifjeld JT (2006) No evidence of paternal genetic contribution to nestling cell-mediated immunity in the North American barn swallow. *Animal Behaviour* 71:839-845
- Kleven O, Lifjeld JT (2004) Extrapair paternity and offspring immunocompetence in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus*. *Animal Behaviour* 68:283-289
- Knox S, Shifrine M (1979) Cell-Mediated-Immunity in the Dog in Relation to Disease - A Review. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 2:405-514

- Koutsos EA, Klasing KC (2008) Factors Modulating the Avian Immune System. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (eds) *Avian Immunology* Academic Press, Elsevier, London, pp 323-338
- Lam KM (2002) The macrophage inflammatory protein-1 beta in the supernatants of *Mycoplasma gallisepticum*-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 26:85-93
- Lamont SJ, Smyth JR (1984) Effect of Selection for Delayed Amelanosis on Immune-Response in Chickens .2. Cell-Mediated-Immunity. *Poultry Science* 63:440-442
- Le Bouteiller P, Piccinni MP (2008) Human NK cells in pregnant uterus: Why there? *American Journal of Reproductive Immunology* 59:401-406
- Leavitt RD, Felsted RL, Bachur NR (1977) Biological and Biochemical Properties of *Phaseolus-Vulgaris* Isolectins. *Journal of Biological Chemistry* 252:2961-2966
- Lee JE, Austic RE, Naqi SA, Golemboski KA, Dieter RR (2002) Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. *Poultry Science* 81:793-798
- Licastro F, Davis LJ, Morini MC (1993) Lectins and Superantigens - Membrane Interactions of These Compounds with T-Lymphocytes Affect Immune-Responses. *International Journal of Biochemistry* 25:845-852
- Liffield JT, Dunn PO, Whittingham LA (2002) Short-term fluctuations in cellular immunity of tree swallows feeding nestlings. *Oecologia* 130:185-190
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98
- Lochmiller RL, Vestey MR, Boren JC (1993) Relationship Between Protein Nutritional-Status and Immunocompetence in Northern Bobwhite Chicks. *Auk* 110:503-510
- Lohmus M, Olin M, Sundstrom LF, Troedsson MHT, Molitor TW, El Halawani M (2004) Leptin increases T-cell immune response in birds. *General and Comparative Endocrinology* 139:245-250
- Lopez-Olivera JR, Hofle U, Vicente J, Fernandez-de-Mera I, Gortazar C (2006) Effects of parasitic helminths and ivermectin treatment on clinical parameters in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Parasitology Research* 98:582-587
- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008) Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. *Endocrine Reviews* 29:403-440
- Lozano GA, Ydenberg RC (2002) Transgenerational effects of maternal immune challenge in tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 80:918-925
- Lucas AM, Jamroz C (1961) *Atlas of Avian Hematology*. United States Department of Agriculture, Washington
- Lukacova M, Barak I, Kazar J (2008) Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 14:200-206
- Majumdar G, Beachey EH, Tomai M, Kotb M (1990) Differential Signal Requirements in T-Cell Activation by Mitogen and Superantigen. *Cellular Signalling* 2:521-530
- Martin LB, Gilliam J, Han P, Lee K, Wikelski M (2005) Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* 140:126-135
- Martin LB, Han P, Lewittes J, Kuhlman JR, Klasing KC, Wikelski M (2006) Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology* 20:290-299
- Martinez J, Tomas G, Merino S, Arriero E, Moreno J (2003) Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* 17:700-706
- Martinez-Padilla J (2006) Daytime variation in T-cell-mediated immunity of Eurasian kestrel *Falco tinnunculus* nestlings. *Journal of Avian Biology* 37:419-424
- Marzal A, de Lope F, Navarro C, Moller AP (2005) Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142:541-545
- Matson KD, Ricklefs RE, Klasing KC (2005) A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental and Comparative Immunology* 29:275-286
- Matzinger P (1994) Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology* 12:991-1045
- Maxwell MH, Robertson GW (1995) The avian basophilic leukocyte: A review. *Worlds Poultry Science Journal* 51:307-325
- Maxwell MH, Robertson GW (1998) The avian heterophil leukocyte: a review. *Worlds Poultry Science Journal* 54:155-178
- McCorkle F, Olah I, Glick B (1980) Morphology of the Phytohemagglutinin-Induced Cell Response in the Chickens Wattle. *Poultry Science* 59:616-623
- McGraw KJ, Ardia DR (2003) Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. *American Naturalist* 162:704-712
- McGraw KJ, Ardia DR (2004) Immunoregulatory activity of different dietary carotenoids in male zebra finches. *Chemoecology* 14:25-29
- McGraw KJ, Ardia DR (2005) Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evolutionary Ecology Research* 7:251-262
- Mejia EG, Valadez-Vega MDC, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G (2005) Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition* 60:137-145
- Meliska CJ, Stunkard ME, Gilbert DG, Jensen RA, Martinko JM (1995) Immune Function in Cigarette Smokers Who Quit Smoking for 31 Days. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 95:901-910

- Merino S, Martinez J, Moller AP, Sanabria L, de Lope F, Perez J, Rodriguez-Caabeiro F (1999) *Phytohaemagglutinin* injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* 58:219-222
- Milinski M (2006) The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37:159-186
- Miller JB, Hsu R, Henrikson R, Yachnin S (1975) Extensive Homology Between Subunits of Phytohemagglutinin Mitogenic Proteins Derived from *Phaseolus-Vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:1388-1391
- Millet S, Bennett J, Lee KA, Hau M, Klasing KC (2007) Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Developmental and Comparative Immunology* 31:188-201
- Moller AP, Brohede J, Cuervo JJ, de Lope F, Primmer C (2003a) Extrapair paternity in relation to sexual ornamentation, arrival date, and condition in a migratory bird. *Behavioral Ecology* 14:707-712
- Moller AP, de Lope F, Saino N (2004) Parasitism, immunity, and arrival date in a migratory bird, the barn swallow. *Ecology* 85:206-219
- Moller AP, Erritzoe J, Saino N (2003b) Seasonal changes in immune response and parasite impact on hosts. *American Naturalist* 161:657-671
- Moller AP, Petrie M (2002) Condition dependence, multiple sexual signals, and immunocompetence in peacocks. *Behavioral Ecology* 13:248-253
- Moore CB, Siopes TD (2003) Melatonin enhances cellular and humoral immune responses in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) via an opiate mechanism. *General and Comparative Endocrinology* 131:258-263
- Morales J, Moreno J, Merino S, Tomas G, Martinez J, Garamszegi LZ (2004) Associations between immune parameters, parasitism, and stress in breeding pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) females. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 82:1484-1492
- Moreno J, de Leon A, Fargallo JA, Moreno E (1998) Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. *Oecologia* 115:312-319
- Mougeot F (2008) Ornamental comb colour predicts T-cell-mediated immunity in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Naturwissenschaften* 95:125-132
- Mougeot F, Irvine JR, Seivwright L, Redpath SM, Pieltney S (2004) Testosterone, immunocompetence, and honest sexual signaling in male red grouse. *Behavioral Ecology* 15:930-937
- Mougeot F, Redpath SM (2004) Sexual ornamentation relates to immune function in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Journal of Avian Biology* 35:425-433
- Muller W, Dijkstra C, Groothuis TGG (2003) Inter-sexual differences in T-cell-mediated immunity of black-headed gull chicks (*Larus ridibundus*) depend on the hatching order. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:80-86
- Navara KJ, Hill GE, Mendonca MT (2005) Variable effects of yolk androgens on growth, survival, and immunity in eastern bluebird nestlings. *Physiological and Biochemical Zoology* 78:570-578
- Navarro C, Marzal A, de Lope F, Moller AP (2003) Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101:291-298
- Neff BD, Pitcher TE (2005) Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* 14:19-38
- Nielsen HB, Pedersen BK (1997) Lymphocyte proliferation in response to exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 75:375-379
- Nieuwenhuis P (1998) Immunology of the rat: Lymphoid organs, their anatomical distribution and cell composition. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology* Academic Press Limited, London, pp 137-142
- Nolan PM, Dobson FS, Dresp B, Jouventin P (2006) Immunocompetence is signalled by ornamental colour in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Evolutionary Ecology Research* 8:1325-1332
- Norris K, Evans MR (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* 11:19-26
- Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin - An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. *Cancer Research* 20:462-&
- Ohlsson T, Smith HG, Raberg L, Hasselquist D (2002) Pheasant sexual ornaments reflect nutritional conditions during early growth. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:21-27
- Olsson I, Venge P (1979) Role of the Eosinophil Granulocyte in the Inflammatory Reaction. *Allergy* 34:353-367
- Ots I, Horak P (1998) Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* 116:441-448
- Owen-Ashley NT, Hasselquist D, Raberg L, Wingfield JC (2008) Latitudinal variation of immune defense and sickness behavior in the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys*). *Brain Behavior and Immunity* 22:614-625
- Owen-Ashley NT, Hasselquist D, Wingfield JC (2004) Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: Unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *American Naturalist* 164:490-505
- Parmentier HK, Schrama JW, Meijer F, Nieuwland MGB (1993) Cutaneous Hypersensitivity Responses in Chickens Divergently Selected for Antibody-Responses to Sheep Red-Blood-Cells. *Poultry Science* 72:1679-1692
- Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (1998) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press Limited, London
- Penn DJ, Potts WK (1999) The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *American Naturalist* 153:145-164

- Perez-Rodriguez L, Mougeot F, Alonso-Alvarez C, Blas J, Vinuela J, Bortolotti GR (2008) Cell-mediated immune activation rapidly decreases plasma carotenoids but does not affect oxidative stress in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Journal of Experimental Biology* 211:2155-2161
- Pitala N, Gustafsson L, Sendecka J, Brommer JE (2007a) Nestling immune response to *Phytohaemagglutinin* is not heritable in collared flycatchers. *Biology Letters* 3:418-421
- Pitala N, Gustafsson L, Sendecka J, Brommer JE (2007b) Nestling immune response to *Phytohaemagglutinin* is not heritable in collared flycatchers. *Biology Letters* 3:418-421
- Quillfeldt P, Ruiz G, Rivera MA, Masello JF (2008) Variability in leucocyte profiles in thin-billed prions *Pachyptila belcheri*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 150:26-31
- Qureshi MA (1998) Role of macrophages in avian health and disease. *Poultry Science* 77:978-982
- Raberg L, Grahn M, Hasselquist D, Svensson E (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1637-1641
- Raberg L, Stjernman M (2003) Natural selection on immune responsiveness in blue tits *Parus caeruleus*. *Evolution* 57:1670-1678
- Reid JM, Arcese P, Keller LF (2003) Inbreeding depresses immune response in song sparrows (*Melospiza melodia*): direct and inter-generational effects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:2151-2157
- Ren JY, Shi J, Kakuda Y, Kim D, Xue SJ, Zhao M, Jiang YM, Sun J (2008) Comparison of the *Phytohaemagglutinin* from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) purified by different affinity chromatography. *Food Chemistry* 108:394-401
- Ricklefs RE, Wikelski M (2002) The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution* 17:462-468
- Rieke WO (1966) Lymphocytes from Thymectomized Rats - Immunologic Proliferative and Metabolic Properties. *Science* 152:535-&
- Rigas DA, Osgood EE (1955) Purification and Properties of the Phytohemagglutinin of *Phaseolus-Vulgaris*. *Journal of Biological Chemistry* 212:607-615
- Robertson SJ, Hasenkrug KJ (2006) The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Seminars in Immunopathology* 28:51-62
- Saino N, Ambrosini R, Martinelli R, Calza S, Moller AP, Pilastro A (2002a) Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the barn swallow. *Molecular Ecology* 11:1533-1544
- Saino N, Ambrosini R, Martinelli R, Ninni P, Moller AP (2003a) Gape coloration reliably reflects immunocompetence of barn swallow (*Hirundo rustica*) nestlings. *Behavioral Ecology* 14:16-22
- Saino N, Calza S, Moller AP (1997) Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology* 66:827-836
- Saino N, Ferrari R, Romano M, Martinelli R, Moller AP (2003b) Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:2485-2489
- Saino N, Incagli M, Martinelli R, Moller AP (2002b) Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* 13:169-174
- Saino N, Suffritti C, Martinelli R, Rubolini D, Moller AP (2003c) Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology* 14:318-325
- Saks L, Karu U, Ots I, Horak P (2006) Do standard measures of immunocompetence reflect parasite resistance? The case of Greenfinch coccidiosis. *Functional Ecology* 20:75-82
- Saks L, Ots I, Horak P (2003) Carotenoid-based plumage coloration of male greenfinches reflects health and immunocompetence. *Oecologia* 134:301-307
- Schiavino D, Nucera E, Murzilli F, Schinco G, Papa G, Fais G, Patriarca G (1992) Anaphylactic Shock After Skin-Test with Phytohemagglutinin. *Allergy* 47:121-122
- Schwarz MR, Rieke WO (1966) Effect of Phytohemagglutinin on Rat Thymus Cells *in vitro*. *Anatomical Record* 155:493-&
- Sharma JM, Tizard I (1984) Avian Cellular Immune Effector Mechanisms - A Review. *Avian Pathology* 13:357-376
- Siegel HS (1980) Physiological Stress in Birds. *Bioscience* 30:529-534
- Sinha RK, Yang GB, Alexander C, Mage RG (2006) De novo expression of MECA-79 glycoprotein-determinant on developing B lymphocytes in gut-associated lymphoid tissues. *Immunology* 119:461-469
- Smith RT (1972) Specific Recognition Reactions at Cellular Level in Mouse Lymphoreticular Cell Subpopulations. *Transplantation Reviews* 11:178-216
- Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL (1999) Simplifying the *Phytohaemagglutinin* skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* 13:567-572
- Snoeijs T, Pinxten R, Eens M (2005) Experimental removal of the male parent negatively affects growth and immunocompetence in nestling great tits. *Oecologia* 145:165-173
- Soler JJ, de Neve L, Perez-Contreras T, Soler M, Sorci G (2003) Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:241-248
- Soler M, Martin-Vivaldi M, Marin JM, Moller AP (1999) Weight lifting and health status in the black wheatear. *Behavioral Ecology* 10:281-286
- Sorci G, Soler JJ, Moller AP (1997) Reduced immunocompetence of nestlings in replacement clutches of the European magpie (*Pica pica*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1593-1598
- Stadecker MJ, Leskowitz S (1974a) Cutaneous Basophil Response to Mitogens. *Journal of Immunology* 113:496-500

- Stadecker MJ, Lukic M, Dvorak A, Leskowitz S (1977) Cutaneous Basophil Response to Phytohemagglutinin in Chickens. *Journal of Immunology* 118:1564-1568
- Tella JL, Bortolotti GR, Dawson RD, Forero MG (2000a) The T-cell-mediated immune response and return rate of fledgling American kestrels are positively correlated with parental clutch size. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:891-895
- Tella JL, Bortolotti GR, Forero MG, Dawson RD (2000b) Environmental and genetic variation in T-cell-mediated immune response of fledgling American kestrels. *Oecologia* 123:453-459
- Tella JL, Forero MG, Bertelotti M, Donazar JA, Blanco G, Ceballos O (2001) Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: a multiscale approach. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:1455-1461
- Tella JL, Scheuerlein A, Ricklefs RE (2002) Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1059-1066
- Tokuyasu K, Madden SC, Zeldis LJ (1968) Fine Structural Alterations of Interphase Nuclei of Lymphocytes Stimulated to Growth Activity *in vitro*. *Journal of Cell Biology* 39:630-&
- Tschirren B, Bischoff LL, Saladin V, Richner H (2007) Host condition and host immunity affect parasite fitness in a bird-ectoparasite system. *Functional Ecology* 21:372-378
- Tschirren B, Fitze PS, Richner H (2003) Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* 72:839-845
- Vaclav R, Calero-Torralbo MA, Valera F (2008) Ectoparasite load is linked to ontogeny and cell-mediated immunity in an avian host system with pronounced hatching asynchrony. *Biological Journal of the Linnean Society* 94:463-473
- Velando A, Lessells CM, Marquez JC (2001) The function of female and male ornaments in the Inca Tern: evidence for links between ornament expression and both adult condition and reproductive performance. *Journal of Avian Biology* 32:311-318
- Verhulst S, Riedstra B, Wiersma P (2005) Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Journal of Avian Biology* 36:22-30
- Vinkler M (2005) Imunokompetenční závislost exprese samčích sekundárních pohlavních znaků u ptáků: stručný úvod do ekologické imunologie ptáků. Seminární práce. Univerzita Karlova Praha
- von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999) Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1-12
- Wang B, Rathgeber BM, Astatkie T, MacIsaac JL (2008) The stress and fear levels of microwave toe-treated broiler chickens grown with two photoperiod programs. *Poultry Science* 87:1248-1252
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002) Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology* 20:125-163
- Westneat DF, Hasselquist D, Wingfield JC (2003) Tests of association between the humoral immune response of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) and male plumage, testosterone, or reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:315-323
- Westneat DF, Weiskittle J, Edenfield R, Kinnard TB, Poston JP (2004) Correlates of cell-mediated immunity in nestling house sparrows. *Oecologia* 141:17-23
- Wigley P, Hulme SD, Barrow PA (1999) Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to *Salmonella*, *Escherichia coli* and other bacteria. *Avian Pathology* 28:567-572
- Wilk T, Dubiec A, Cichon M (2007) Seasonal decline in cell-mediated immunity of collared flycatcher *Ficedula albicollis* nestlings: does the sex of offspring matter? *Journal of Ornithology* 148:199-205
- Yachnin S, Svenson RH (1972) Immunological and Physicochemical Properties of Mitogenic Proteins Derived From *Phaseolus-Vulgaris*. *Immunology* 22:871-&
- Yachnin S, Svenson RH, Baron JM, Allen LW (1972) Potentiation of Phytohemagglutinin-Induced Lymphocyte Transformation by Cell-Cell Interaction - Matrix Hypothesis. *Cellular Immunology* 3:569-&
- Ye XY, Ng TB, Tsang PWK, Wang J (2001) Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of Protein Chemistry* 20:367-375
- Zeh JA, Zeh DW (2001) Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour* 61:1051-1063
- Zuk M, Johnsen TS (1998) Seasonal changes in the relationship between ornamentation and immune response in red jungle fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1631-1635
- Zuk M, Johnsen TS (2000) Social environment and immunity in male red jungle fowl. *Behavioral Ecology* 11:146-153

PŘÍLOHY

Tabulka 2.3.: Aplikace PHA in vivo - přehled metodických přístupů různých autorů. Upravená a doplněná tabulka z Vinkler (2005).

druh	věk, pohlaví	PHA (mg)	konc. PHA/ PBS (mg/ml)	čas kontroly (h)	lokace injekce	přesnost měření (mm)	počet měření	poznámka	zdroj
Ptáci:									
<i>Apus melba</i>	25-42 dny	0,1	5	24	patagium	0,01	4		(Bize et al. 2005)
<i>Apus melba</i>	30 dny	0,1	5	24	patagium	0,01	?	PHA (Sigma L1668)	(Bize et al. 2008)
<i>Carduelis chloris</i>	ad samci	0,2	5	24	patagium	0,01	3		(Saks et al. 2003)
<i>Carduelis chloris</i>	ad	0,2	5	24	patagium	0,01	3	PHA (Sigma L8754)	(Saks et al. 2006)
<i>Carpodacus mexicanus</i>	ad samci	0,1	0,2	48	patagium	0,01	3	posuvné měřítko Posuvné měřítko	(Hawley et al. 2007)
<i>Ciconia ciconia</i>	37-67 dny	0,2	2	24	membrána mezi prsty	0,001	3		(Jovani et al. 2004)
<i>Coracias garrulus</i>	8-12 dny	0,4	10	24	patagium	?	5		(Vaclav et al. 2008)
<i>Delichon urbica</i>	15 dny	0,625	5	24	patagium	0,01	3	kontrola (PBS)	(Christe et al. 2001)
<i>Delichon urbica</i>	15 dny	0,625	5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Christe et al. 2000b)
<i>Delichon urbica</i>	15 dny	0,2	4	24	patagium	0,01	?		(Marzal et al. 2005)
<i>Delichon urbica</i>	12 dny	0,02	0,5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Merino et al. 1999)
<i>Emberiza schoeniclus</i>	7 dny	0,1	5	24	patagium	0,01	1-2	kontrola (PBS) senzitivizační injekce	(Kleven & Lifjeld 2004)
<i>Euplectes orix</i>	10 dny	0,02	0,7	24	patagium	0,01	?	PHA (Sigma L9132)	(Edler & Friedl 2008)
<i>Falco sparverius</i>	22 dny	0,05	1	24	patagium	0,001	4	kontrola (PBS)	(Tella et al. 2000)
<i>Falco tinnunculus</i>	24-26 dny	0,05	1	24	patagium	0,01	3	Posuvné měřítko	(Costantini & Dell'Omo 2006)
<i>Ficedula albicollis</i>	11 dny	0,2	5	24	patagium	?	3	kontrola (PBS)	(Cichon et al. 2006)
<i>Ficedula albicollis</i>	11 dny	0,2	5	24	patagium	0,01	3		(Wilk et al. 2007)
<i>Passer domesticus</i>	ad	0,025	0,625	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Bonneaud et al. 2003)
<i>Passer domesticus</i>	ad samci	0,25	5	6 a 24	patagium	?	3	kontrola (PBS)	(Buchanan et al. 2003)
<i>Passer domesticus</i>	1K samci	0,025	0,625	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Gonzalez et al. 1999)
<i>Passer domesticus</i>	ad	0,2	4	různé	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Navarro et al. 2003)
<i>Passer domesticus</i>	9 dny	0,04	1	24	patagium	0,01	4	senzitivizační injekce	(Westneat et al. 2004)
<i>Passer domesticus</i>	10 dny	0,04	1	24	patagium	?	3	kontrola (PBS)	(Edly-Wright et al. 2007)
<i>Pavo cristatus</i>	ad samci	0,2	5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Moller & Petrie 2002)
<i>Phasianus colchicus</i>	ad samci	1	10	24	patagium	0,01	3		(Ohlsson et al. 2002)
<i>Pica pica</i>	15-18 dny	0,5	5	24	patagium	0,01	3	kontrola (PBS)	(Sorci et al. 1997)
<i>Pygoscelis antarctica</i>	ad	0,1	1	27,9	membrána mezi prsty	0,01	5	kontrola (PBS)	(Moreno et al. 1998)
<i>Riparia riparia</i>	8 dny	0,2	5	24	patagium	0,01	3	PHA (Sigma L8754) posuvné měřítko kontrola (PBS)	(Brzek & Konarzewski 2007)
<i>Serinus serinus</i>	9 dny	0,5	5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Hoi-Leitner et al. 2001)
<i>Spheniscus magellanicus</i>	pull.	0,2	2	24	membrána mezi prsty	0,001	3		(Tella et al. 2001)
<i>Sturnus vulgaris</i>	11 dny	1	10	24	patagium	0,001	3	PHA do obou křidel	(Granbom et al. 2005)
<i>Taeniopygia guttata</i>	11-13 dny	0,2	10	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Birkhead et al. 1999)

Tabulka 2.3 pokračování

druh	věk, pohlaví	PHA (mg)	konc. PHA/ PBS (mg/ml)	čas kontroly (h)	lokace injekce	přesnost měření (mm)	počet měření	poznámka	zdroj
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,05	2,5	24	patagium	0,01	2	kontrola (PBS)	(Blount et al. 2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,015	0,5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Ewenson et al. 2001)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,015	0,5	24	patagium	0,01	?	kontrola (PBS)	(Ewenson et al. 2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,15	5	24	patagium	0,05	3		(McGraw & Ardia 2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	0,15	5	24	patagium	0,01	3		(McGraw & Ardia 2004)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad	0,15	5	24	patagium	0,05	3		(McGraw & Ardia 2005)
<i>Taeniopygia guttata</i>	ad samci	?	?	?	?	?	?	blíže nespecifikované	(Alonso-Alvarez et al. 2007)
<i>Tachycineta bicolor</i>	ad	0,2	5	24	patagium	0,05	2	kontrola (PBS)	(Lifjeld et al. 2002)
<i>Tachycineta bicolor</i>	15 dní	0,06	2	24	patagium	?	?	kontrola (PBS)	(Lozano & Ydenberg 2002)
<i>Tachycineta bicolor</i>	10 dní	0,1	5	48	patagium	?	3		(Ardia & Rice 2006)
<i>Tachycineta bicolor</i>	ad samice	0,15	5	48	patagium	?	3		(Ardia & Rice 2006)
<i>Turdus merula</i>	ad samci	1,25	10	24	patagium	0,01	2	kontrola (PBS)	(Faivre et al. 2003)
<i>Troglodytes aedon</i>	12 dní	0,25	5	24	patagium	?	3	PHA (Sigma L8754)	(Forsman et al. 2008)
<i>Savci:</i>									
<i>Crocidura russula</i>	ad	0,1	5	24	chodidlo	0,01	3	aplikace 10-12h	(de Bellocq et al. 2007b)
<i>Meriones crassus</i>	ad	0,1	3,3	24	chodidlo	0,01	3		(de Bellocq et al. 2006)
<i>Mus musculus</i>	ad	0,1	3,3	24	chodidlo	0,01	3	kontrola (PBS)	(de Bellocq et al. 2007a)
<i>Myotis myotis</i>	ad samice	?	0,02ml ?!	10	chodidlo	?	?	kontrola (PBS)	(Christe et al. 2000a)
<i>Myotis myotis</i>	juv	?	0,02ml ?!	10	chodidlo	0,01	?		(Christe et al. 2003)
<i>Sus scrofa</i>	juv	0,1ml	2,5	72	podkožně	?	3		(Lopez-Olvera et al. 2006)

Tabulka 2.4: Aplikace PHA in vivo - stručný přehled míry odezvy na aplikaci PHA v závislosti na různých faktorech.

faktor/druh	reakce na PHA	zdroj
Věk jedince		
Různé druhy	Mláďata reagují na PHA silněji než dospělci	(Tella et al. 2002)
<i>Ciconia ciconia</i>	Odezva na PHA se s roky nemění	(Jovani et al. 2004)
<i>Taeniopygia guttata</i> , <i>Tachycineta bicolor</i> , <i>Oceanodroma leucorhoa</i>	Odezva na PHA se snižuje s věkem	(Hausmann et al. 2005)
Hmotnost/velikost jedince		
<i>Apus melba</i>	odezva na PHA pozitivně koreluje s velikostí jedince	(Bize et al. 2008)
<i>Ficedula albicollis</i>	odezva na PHA pozitivně koreluje s velikostí jedince	(Cichon et al. 2006)
<i>Riparia riparia</i>	odezva na PHA pozitivně koreluje s velikostí jedince	(Brzek & Konarzewski 2007)
Vliv pohlaví jedince		
<i>Ficedula albicollis</i>	Mláďata z jedné snůšky nevykazují žádný rozdíl na PHA	(Wilk et al. 2007)
<i>Hirundo rustica</i>	Mláďata z jedné snůšky nevykazují žádný rozdíl na PHA	(Saino et al. 2002)
<i>Apus melba</i>	Mláďata z jedné snůšky nevykazují žádný rozdíl na PHA	(Bize et al. 2005)
<i>Ciconia ciconia</i>	Samci na PHA reagovali silněji než samice (mláďata)	(Jovani et al. 2004)
<i>Parus caeruleus</i>	Samci na PHA reagovali silněji než samice (mláďata)	(Dubiec et al. 2006)
<i>Larus ridibundus</i>	Samice na PHA reagovaly silněji než samci (mláďata)	(Muller et al. 2003)
<i>Mus musculus</i>	Samice na PHA reagovaly silněji než samci (dospělci)	(de Bellocq et al. 2007a)
Vliv hormonů		
<i>Junco hyemalis</i>	Testosteron snižuje reakci na PHA	(Casto et al. 2001)
<i>Melospiza melodia</i>	Testosteron snižuje reakci na PHA	(Owen-Ashley et al. 2004)
<i>Taeniopygia guttata</i>	Testosteron snižuje reakci na PHA	(Alonso-Alvarez et al. 2007)
<i>Sialia sialis</i>	Testosteron snižuje reakci na PHA (obsažený ve žloutku)	(Navara et al. 2005)
<i>Passer domesticus</i>	Kortikosteron snižuje reakci na PHA	(Martin et al. 2005)
<i>Delichon urbica</i>	Kortikosteron snižuje reakci na PHA	(Merino et al. 1999)
<i>Coturnix chinensis</i>	Leptin zvyšuje reakci na PHA	(Lohmus et al. 2004)
<i>Coturnix coturnix</i>	Melatonin zvyšuje reakci na PHA	(Moore & Siopes 2003)
Kondice		
<i>Apus melba</i>	Odezva PHA je závislá na kondici jedince	(Bize et al. 2008)
<i>Ficedula albicollis</i>	Odezva mláďat na PHA klesá během hnízdní sezóny	(Wilk et al. 2007)
<i>Larus ridibundus</i>	U mláďat s pozdějším pořadím líhnutí klesá odezva na PHA	(Muller et al. 2003)
<i>Parus caeruleus</i>	Zhoršení hnízdní kondice se více projeví u mláďat samčího pohlaví	(Dubiec et al. 2006)
<i>Falco tinnunculus</i>	Se zvyšující se koncentrací reaktivních kyslíkových metabolitů roste PHA odezva	(Costantini & Dell'Omo 2006)
Parazitace		
různé druhy	u většiny PHA odezva nepoukazovala na míru parazitace	(Tella et al. 2002)
<i>Coracias garrulus</i>	Větší zatížení ektoparazity znamená silnější odezvu na PHA	(Vaclav et al. 2008)
<i>Myotis myotis</i>	více parazitovaní jedinci vykazovali silnější odezvu na PHA	(Christe et al. 2003)
<i>Sus scrofa</i>	Míra parazitace pozitivně koreluje s odezvou na PHA	(Lopez-Olivera et al. 2006)
<i>Carduelis chloris</i>	náchylnější ptáci k nákaze vykazovali silnější reakci na PHA	(Saks et al. 2006)
<i>Crocidura russula</i>	PHA negativně korelovalo s intenzitou tasemnic PHA pozitivně korelovalo s intenzitou hlístic	(de Bellocq et al. 2007b)
<i>Apus melba</i>	Největší otok vykazují ti, na kterých nejhůře přežívají ektoparazitě, nejvíce parazitů je na středně otékajících jedincích	(Bize et al. 2008)
<i>Parus major</i>	Fekundita blech klesala s zvyšující se odezvou sýkor na PHA	(Tschirren et al. 2007)
<i>Mus musculus</i>	silnější odezva na PHA = lépe odolávali parazitům	(de Bellocq et al. 2007a)
<i>Meriones crassus</i>	odezva na PHA nižší u parazitovaných zvířat	(de Bellocq et al. 2006)

Tabulka 2.4 pokračování

faktor/druh	reakce na PHA	zdroj
<i>Myotis myotis</i>	gravidní samice hostily více ektoparazitů a s přibývajícím stupněm gravidity klesala jejich odezva na PHA	(Christe et al. 2000)
<i>Passer domesticus</i>	slabší odezvu na PHA tam, kde byla větší intenzita a rozmach infekce krvinkovek (<i>Haemoproteus</i>)	(Gonzalez et al. 1999)
<i>Passer domesticus</i>	slabší odezvu na PHA tam, kde byla větší intenzita a rozmach infekce krvinkovek (<i>Haemoproteus</i>)	(Navarro et al. 2003)
<i>Gallus gallus</i>	odezva nižší na PHA u parazitovaných střevními škrkavkami (<i>Ascaridia galli</i>)	(Johnsen & Zuk 1999)
Indikátor kvality		
<i>Tachycineta bicolor</i>	Silnější odezva na PHA u časněji hnízdících samic	(Ardia 2005)
<i>Delichon urbica</i>	Jedinci schopni podruhé zahnízdít vykazovali silnější odezvu na PHA	(Christe et al. 2001)
<i>Sturnus vulgaris</i>	Samci s intenzivnějším zpěvem vykazovali silnější odezvu na PHA	(Duffy & Ball 2002)
<i>Passer domesticus</i>	Odezva na PHA se snižovala (duben), či zvyšovala (listopad) se zvětšující se velikostí melaninové hrdelní skvrny	(Gonzalez et al. 1999)
<i>Melospiza melodia</i>	Inbreeding potlačuje reakci na PHA	(Reid et al. 2003)
<i>Oenanthe leucura</i>	jedinci se silnější reakci na PHA pravděpodobněji přežívali	(Soler et al. 1999)
<i>Larosterna inca</i>	Mláďata ptáků s většími ornamenty (s delšími „kníry“) vykazoval silnější reakci na PHA	(Velando et al. 2001)
<i>Gallus gallus</i>	Samci s větším sexuálním ornamentem (hřebínkem) reagovali silněji na PHA	(Zuk & Johnsen 1998)
<i>Gallus gallus</i>	Dominantní samci s velkými sexuálními ornamenty (hřebínky) reagovali na PHA silněji, než submisivní samci ač také s velkými hřebínky	(Zuk & Johnsen 2000)
<i>Lagopus lagopus scoticus</i>	intenzitou barvy hřebínku koreluje se silou odezvy na PHA	(Mougeot 2008)
<i>Carpodacus mexicanus</i>	Sociálně dominantní samci vykazovali silnější reakci na PHA	(Hawley et al. 2007)
<i>Alectoris rufa</i>	PHA zvýšil koncentraci cirkulujících karotenoidů v krvi	(Perez-Rodriguez et al. 2008)
Dědičnost		
<i>Euplectes orix</i>	EP mláďata reagují na PHA slabší odezvou než WP mláďata z téže snůšky	(Edler & Friedl 2008)
<i>Passer domesticus</i>	neprokázali rozdíl mezi EP a WP mláďaty z jedné snůšky v reakci na PHA	(Edly-Wright et al. 2007)
<i>Ficedula albicollis</i>	neprokázali rozdíl mezi EP a WP mláďaty z jedné snůšky v reakci na PHA	(Pitala et al. 2007)
<i>Ficedula albicollis</i>	neprokázali rozdíl mezi EP a WP mláďaty z jedné snůšky v reakci na PHA	(Cichon et al. 2006)
<i>Hirundo rustica</i>	neprokázali rozdíl mezi EP a WP mláďaty z jedné snůšky v reakci na PHA	(Kleven et al. 2006)
<i>Tachycineta bicolor</i>	míra dědičnosti imunitních předpokladů se mění populace od populace	(Ardia & Rice 2006)
<i>Geothlypis trichas</i>	EP mláďata reagují na PHA silněji než WP	(Garvin et al. 2006)
<i>Luscinia svecica</i>	EP mláďata reagují na PHA silněji než WP	(Johnsen et al. 2000)
Dostupnost zdrojů		
<i>Parus major</i>	Žádný vliv množství potravy na PHA odezvu a množství blech	(Tschirren et al. 2007)
<i>Myotis myotis</i>	odezva na PHA pozitivně korelovala s výživou jedinců	(Christe et al. 2003)
<i>Taeniopygia guttata</i>	PHA odezva se zvyšovala s přidávaným leptinem	(Alonso-Alvarez et al. 2007)
<i>Ficedula albicollis</i>	odezva na PHA pozitivně korelovala s přísunem potravy	(Cichon et al. 2006)
<i>Riparia riparia</i>	odezva na PHA pozitivně korelovala s přísunem potravy	(Brzek & Konarzewski 2007)
<i>Larus cachinnans</i>	Omezení potravy snížilo reakci na PHA	(Alonso-Alvarez & Tella 2001)
<i>Colinus virginianus</i>	Omezení proteinů v potravě snížilo reakci na PHA	(Lochmiller et al. 1993)
<i>Hirundo rustica</i>	Přidávaná potrava zvýšila reakci na PHA	(Saino et al. 1997)
<i>Pica pica</i>	Přidávaný methionin zvýšil reakci na PHA	(Soler et al. 2003)
<i>Parus caeruleus</i>	Přidávaný methionin zvýšil reakci na PHA	(Brommer 2004)

Tabulka 2.4 pokračování

faktor/druh	reakce na PHA	zdroj
Životní prostředí		
<i>Zonotrichia leucophrys</i>	Žádný rozdíl v PHA odezvě mezi populacemi ani mezi různou fotoperiodou	(Owen-Ashley et al. 2008)
<i>Geothlypis trichas</i>	Odezva na PHA je silnější při chladnějším počasí	(Garvin et al. 2006)
<i>Tachycineta bicolor</i>	Odezva na PHA se mezi lokalitami neměnila	(Ardia & Rice 2006)
různé druhy	Zeměpisná šířka nemá na odezvu na PHA žádný prokazatelný vliv	(Hasselquist 2007)
<i>Ficedula albicollis</i>	Odezva mláďat na PHA je zapříčiněna především nedědičnými vlivy působícími na hnízdo	(Pitala et al. 2007)
<i>Ficedula albicollis</i>	Odezva na PHA je více závislá na prostředí, ve kterém jedinec žije, než na genetických předpokladech	(Cichon et al. 2006)