

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kateřina Mojžišová

Alokace karotenoidů a redoxní homeostáza u ptáků

Carotenoid allocation and redox homeostasis in birds

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

Konzultanti: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení:

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

V Praze 10. 8. 2015

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli MVDr. Oldřichu Tomáškoví, Ph.D. za jeho nekonečnou trpělivost, čas, který mi věnoval a za jeho rady a vědomosti, bez kterých by tato diplomová práce nevznikla.

Můj velký dík patří také mému konzultantovi a vedoucímu v laboratoři Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. z ÚEB AV ČR, který se mi věnoval po celou dobu mé práce v laboratoři, naučil mě všechny analytické metody a obsluhy přístrojů a poskytl mi data z LC-MS. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Gabrielové za poskytnutí materiálu z experimentu z roku 2011 a všem, kteří se podíleli na experimentech a odběrech vzorků.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině, která mě po celou dobu mého studia podporovala a prožívala se mnou všechny slasti i strasti, které mé studium provázely.

Abstrakt

Karotenoidní ornamenty hrají u mnoha druhů důležitou roli při výběru partnera a byla pozorována spojitost mezi úrovní jejich exprese, fitness jedince a různými ukazateli jeho kondice. Předpokládá se tedy, že v pohlavním výběru fungují jako ukazatele kvality a kondice jedince. I přes dlouhodobý výzkum stále neznáme mechanismy zajišťující čestnost takové signalizace. V současnosti nejvíce akceptovaná hypotéza předpokládá antioxidační účinky karotenoidů, a tudíž trade-off mezi jejich alokací do ornamentů nebo do obrany proti volným radikálům. Antioxidační funkce karotenoidů *in vivo* byla v nedávné době u ptáků zpochybněna a byly navrženy alternativní hypotézy, předpokládající degradaci karotenoidů volnými radikály, škodlivé (prooxidační) účinky vysokých koncentrací karotenoidů a meziproductů jejich degradace nebo propojenost metabolických drah pro přeměnu karotenoidů a pro homeostatickou kontrolu mitochondriální respirace a redoxního stavu. Tyto hypotézy předpokládají různé nakládání s karotenoidy v organismu při zvýšeném oxidačním stresu, což jsme testovali pomocí experimentálních manipulací oxidační zátěže a příjmu karotenoidů u samců zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*). Výsledky jsou v rozporu s alternativními hypotézami a částečně podporují alokační trade-off, založené na antioxidačních vlastnostech karotenoidů. Výsledky však také naznačují, že barva zobáku u zebřiček pestrých není dána pouze obsahem karotenoidů, a že problematika signalizace kondice bude pravděpodobně mnohem komplexnější, než předpokládají současné hypotézy.

Abstract

In many species carotenoid-based ornaments plays fundamental role in sexual selection. It is believed that carotenoid-based ornaments act as indicators of individual quality and condition during mate-choice, as associations between their expression, individual fitness and various condition indicators were observed. Despite the long-term research, mechanisms ensuring signalling honesty remain unknown. Currently, the most accepted hypothesis suggests antioxidant properties of carotenoids, and, therefore, a trade-off between their allocation to ornamentation or defence against free radicals. The antioxidant function of carotenoids *in vivo* was challenged in birds, however, and alternative hypotheses were proposed, assuming either carotenoid loss due to free-radical oxidation, or harmful (pro-oxidant) effects of high carotenoid levels in the body, or interconnection of metabolic pathways for both, the carotenoid conversion and homeostatic control of mitochondrial respiration and redox state. These hypotheses assume differing allocation of carotenoids under elevated oxidative stress, which we tested using experimental manipulations of oxidative state and carotenoid intake in adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). The results are inconsistent with all the alternative hypotheses, but partly support allocation trade-off, based on carotenoid antioxidant properties. On the other hand, the results also suggest that zebra finch beak colouration is partly independent on beak carotenoid concentration, and that the mechanisms of condition-dependent carotenoid-based signalling are probably much more complex than assumed by the current hypotheses.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Seznam zkratk.....	5
1. Úvod.....	6
2. Literární přehled	7
2.1. Karotenoidy	7
2.2. Oxidativní stres.....	10
2.3. Diquat	13
2.4. Pohlavní výběr	13
2.5. Kondiční závislost ornamentů	15
2.5.1. Schopnost najít karotenoidy.....	16
2.5.2. Trade-off hypotéza	17
2.5.3. Ochrana karotenoidů.....	18
2.5.4. Prooxidační účinky.....	19
2.5.5. Hypotéza sdílení biochemických drah mezi tvorbou ornamentu a důležitými fyziologickými procesy.....	21
2.6. Modelový organismus	22
3. Cíle práce	22
4. Materiál a metody	23
4.1. Design experimentu	23
4.2. Měření barvy zobáku.....	25
4.3. Extrakce karotenoidů	25
4.3.1. Obecný postup	25
4.3.2. Zpracování zobáků.....	26
4.3.3. Zpracování srdcí.....	26
4.3.4. Zpracování tuku.....	27
4.3.5. Zpracování plasmy.....	27
4.4. Analýza celkové koncentrace karotenoidů pomocí měření absorpance	28
4.5. Vyhodnocení množství karotenoidů ve tkáních	30
4.6. Měření na HPLC.....	31
4.7. Statistická analýza	31
5. Výsledky.....	33
5.1. Porovnání výtěžnosti dvou extrakčních metod:.....	33

5.2. Zastoupení různých typů karotenoidů ve vybraných tkáních	34
5.3. Korelace mezi barevnými charakteristikami zobáku.....	38
5.4. Korelace koncentrací karotenoidů mezi jednotlivými orgány a barvou zobáku v kontrolní skupině.....	39
5.5. Vliv manipulace oxidativní zátěže a příjmu karotenoidů na barvu zobáku a alokaci karotenoidů do vybraných orgánů	40
6. Diskuze.....	51
6.1. Porovnání výtěžnosti dvou extrakčních metod	51
6.2. Izolované karotenoidy z tkání.....	51
6.3. Manipulace hladiny oxidativního stresu a příjmu karotenoidů v potravě	52
7. Závěr	55
8. Použitá literatura	56

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
CAR	karotenoidy
DIQ	diquat
EtOH	etanol
GPx	glutation peroxidáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HEX	hexan
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
MeOH	metanol
OS	oxidační stres
RONS	reaktivní kyslíkové a dusíkové molekuly (reactive oxygen and nitrogen species)
SEM	směrodatná odchylka
SOD	superoxid dismutáza
TBME	tert-Butyl methyl ether

1. Úvod

Pohlavní výběr je důležitým evolučním mechanismem, který ovlivňuje morfologii a chování jedinců (Anderson, 2006). Jeho působení vedlo během evoluce k vytvoření nápadných sekundárních pohlavních znaků, jako jsou například u ptáků dlouhá ocasní pera a výrazné zbarvení. Z jakého důvodu a jak se tyto znaky pohlavním výběrem vyvíjí, se snaží vysvětlit několik hypotéz. U mnoha živočišných druhů je zdokumentována souvislost mezi mírou exprese ornamentu a kondicí a fitness jedince, což napovídá tomu, že se ornamenty vyvinuly jako indikátory kvality jedince. Aby se kvalita jedince nedala zfalšovat, musí existovat mechanismy zajišťující závislost exprese ornamentů na fyziologickém a zdravotním stavu jedince (Számadó, 2011). Karotenoidní zbarvení kožních derivátů, jako jsou zobáky, kroužky okolo očí a peří (Alonso-Alvarez et al., 2008; Hill et al, 2002), má významnou úlohu při vnitrodruhové signalizaci, a tedy i v pohlavním výběru (Gray, 1996). Karotenoidní ornamenty proto patří k jedněm z nejdéle studovaných znaků signalizace kvality jedince a jsou v dnešní době hojně využívány jako model pro studování pohlavního výběru. U mnoha druhů (např. zebřičky pestré) byl zdokumentován vliv karotenoidních ornamentů na úspěšnost při výběru partnera (Hill, 1990). Vysvětlení mechanismu kondiční závislosti karotenoidů není doposud uspokojivě vyřešeno. Existuje několik hypotéz, které se snaží tento fenomén vysvětlit a na základě pokusů ho prokázat. Nejednotnost výsledků experimentů však dodnes nevede k jednoznačné odpovědi, jak karotenoidní signalizace odráží kvalitu jedince. V současnosti se za jeden z hlavních mechanismů, které udržují čestnost signalizace, považuje oxidativní stres z volných radikálů a nutnost udržovat redoxní homeostázu organismu (Alonso-Alvarez & Galvan, 2011). Tyto hypotézy předpokládají různý význam karotenoidů na redoxní stav (od antioxidačních až po prooxidační účinky) a implikují tedy rozdílné nakládání s karotenoidy při zvýšené oxidační zátěži.

Cílem mé diplomové práce bylo studovat distribuci karotenoidů v organismu při zvýšené oxidační zátěži, a tím testovat navržené hypotézy. Experiment byl prováděn na zebřičkách pestrých (*Taeniopygia guttata*), kterým byl experimentálně manipulován příjem karotenoidů a hladina oxidační zátěže.

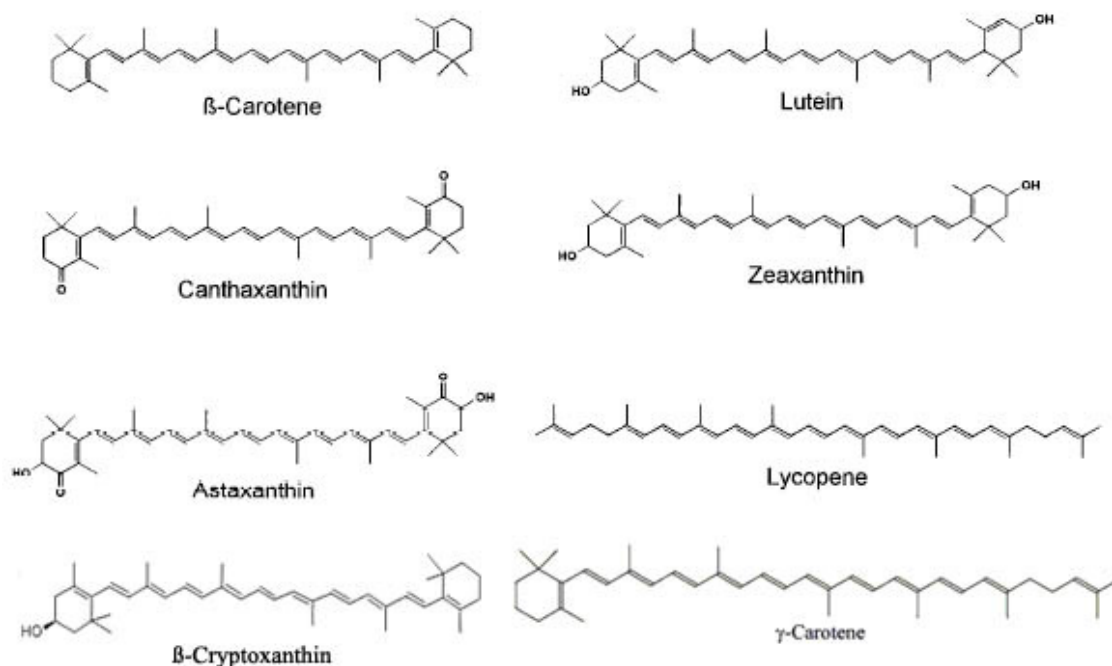
2. Literární přehled

2.1. Karotenoidy

Karotenoidy jsou druhá nejpočetnější barviva u ptáků po melaninech a hojně se vyskytují i u dalších obratlovců (McGraw & Hill, 2006). Počet objevených karotenoidů se od roku 1948, kdy bylo popsáno přibližně 30 druhů, rapidně zvyšuje a dnes je vědci popsáno více než 700 přírodních karotenoidů (Britton et al., 2008). Karotenoidy vytváří žlutá, oranžová a červená zbarvení kůže a kožních derivátů (například peří či zobáku), ale vyskytují se také ve žloutcích ptačích vajec a v sítnici (Hill & McGraw, 2006).

Z chemického hlediska jsou karotenoidy v tučích rozpustné izoprenoidní látky ze skupiny terpenů (Britton, 1995; El-Agamey et al., 2004). Všechny známé karotenoidy obsahují čtyřicet uhlíků, a patří tedy do skupiny takzvaných tetraterpenů, tedy terpenů, skládajících se z osmi izoprenoidních jednotek, obsahujících pět uhlíků (Hill & McGraw, 2006). Základním zástupcem je lykopen, od kterého může být odvozena většina karotenoidů a jehož sumární vzorec je $C_{40}H_{56}$ (Mazza, 1998). Karotenoidy ve své molekule dále obsahují různý počet dvojných vazeb, které ovlivňují jejich fyzikální vlastnosti, výslednou barvu, molekulární tvar a chemickou reaktivitu karotenoidů (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepcion, 2012; Britton, 1995). Část molekuly karotenoidů, která obsahuje dvojně vazby (nejčastěji jich obsahuje tři až patnáct), se chová jako chromofor (Fraser & Bramley, 2004). Dvojně vazby absorbují modrozelené světlo o vlnové délce 400–500 nm, díky čemuž se lidskému oku karotenoidy zdají jako žluté až červené (Svensson & Wong, 2011). Čím vyšší je počet dvojných vazeb v molekule, tím je dosaženo vyššího absorpčního maxima a karotenoid se jeví jako červený (Rodríguez-Amaya, 2001). Většina přírodních karotenoidů se nachází v *all-trans* konfiguraci, protože *cis* konfigurace je termodynamicky nestabilní (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004; Britton, 1995). Molekuly s dvojnými vazbami mohou vytvářet izomery, které se odlišují polohou substituentů, čímž vznikají formy *cis* a *trans*. Karotenoidy se liší nejen počtem svých dvojných vazeb, ale také molekulami tvořícími konce jejich molekul.

U přírodních karotenoidů bylo identifikováno sedm různých molekul, které se vážou na izoprenoidní kostru (Obr. 1). Podle přítomnosti nebo absence těchto struktur můžeme karotenoidy rozdělit do tří základních skupin. Jednu skupinu tvoří karotenoidy s acyklickou strukturou, mezi které patří například lykopen. Další skupinou jsou karotenoidy s cyklickou strukturou na jednom jejím konci, do této skupiny řadíme například γ -karoten. Poslední skupinou jsou karotenoidy obsahující cyklickou formu na obou koncích molekuly, jedná se například o β -karoten a lutein (Britton, 1995).



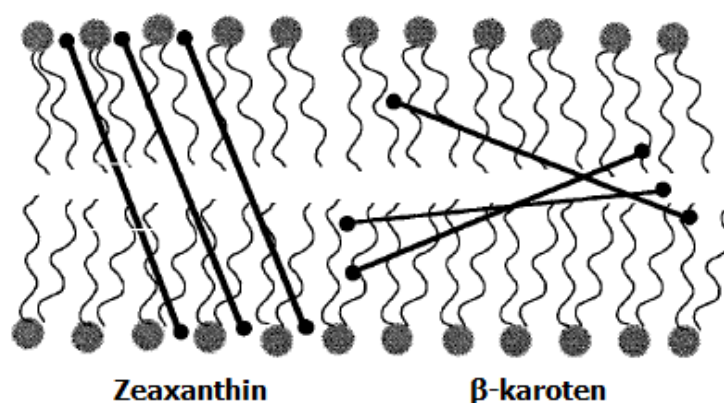
Obr. 1. Struktura vybraných karotenoidů. (Převzato a upraveno z Mortensen & Skibsted, 1997; Barbosa-Filho et al., 2008)

Podle klasické nomenklatury se karotenoidy dělí na dvě základní skupiny. První skupinou jsou uhlovodíky nazývané karoteny, které jsou tvořeny pouze molekulami uhlíku a vodíku. Jsou to nepolární látky tvořící oranžové až červené zabarvení. Mezi karoteny patří například lykopen a $\alpha/\beta/\gamma$ -karoteny (Mazza, 1998). Druhou skupinou jsou kyslíkaté deriváty karotenů, které jsou díky navázanému kyslíku více polární než karoteny. Nazývají se xantofyly a vznikají například hydroxylací nebo epoxidací karotenoidů. Mezi xantofyly patří například lutein, zeaxanthin, canthaxanthin a β -cryptoxanthin (Yamaguchi, 2011). Podle typu substituovaného kyslíku se dále xantofyly dají rozdělit na hydroxykarotenoidy (např. lutein) a na ketony (např. canthaxanthin; Hill & McGraw, 2006).

Karotenoidy se uplatňují nejenom při vytváření zabarvení rostlinných a živočišných těl. Jejich hlavní funkcí v rostlinách je pohlcování světla při fotosyntéze a ochrana

fotosyntetického aparátu před oxidativním stresem. U živočichů některé karotenoidy fungují jako prekurzory vitamínu A, posilují imunitní systém, nachází se v sítnici, kde zvyšují rozlišovací schopnost zraku a podílí se na antioxidační obraně nejen sítnice, ale celého těla (Whitehead et al., 2006; Latscha, 1990).

Karotenoidy jako hydrofobní látky se nejčastěji vyskytují v lipofilních kompartmentech, jako jsou membrány, a zvyšují jejich termostabilitu a rigiditu (Britton, 1995; Gruszecki, 1999). Xantofyly oproti karotenům obsahují na svých koncích častěji polární skupiny, které jim umožňují procházet celou membránou (Obr. 2; Young & Lowe, 2001). Ve vodném prostředí se karotenoidy shlukují do miniaturních krystalků, které se vyskytují například v chromoplastech vyšších rostlin (Britton, 1995).



Obr. 2. Schématické znázornění umístění xantofylu (zeaxanthin) a karotenu (β -karotenu) v membráně. (Převzato a upraveno podle Young & Lowe, 2001)

Výskyt karotenoidů není omezen pouze na membrány, ale nacházejí se např. i v komplexech s proteiny. Ve spojení s proteiny se karotenoidy nacházejí např. ve vnější schránce korýšů a vytvářejí modré až fialové zabarvení (Zagalsky et al., 1970). V ptačím peří jsou karotenoidy navázány na keratin (Stradi et al., 2001). Ve vejcích jsou rozpuštěny v tucích (Blount et al., 2000).

Ve své diplomové práci nazývám jednotlivé karotenoidy jejich běžně používanými triviálními názvy. Pro úplnost dodávám tabulku s jejich systematickými názvy:

Triviální název	Systematický název
Astaxanthin	3,3'-dihydroxy- β,β -karoten-4,4'-dion
Canthaxanthin	β,β -karoten-4,4'-dion
Doradexanthin	β,ϵ -karoten-4-on
β -Karoten	β,β -karoten
β -Cryptoxanthin	β,β -karoten-3-ol
Lutein	β,ϵ -karoten-3,3'-diol
Zeaxanthin	β,β -carotene-3,3'-diol

Tab. 1. Přehled názvů karotenoidů zjištěných v této práci ve tkáních zebřiček pestrých. (Převzato a upraveno podle Rodriguez-Amaya, 2001).

2.2. Oxidativní stres

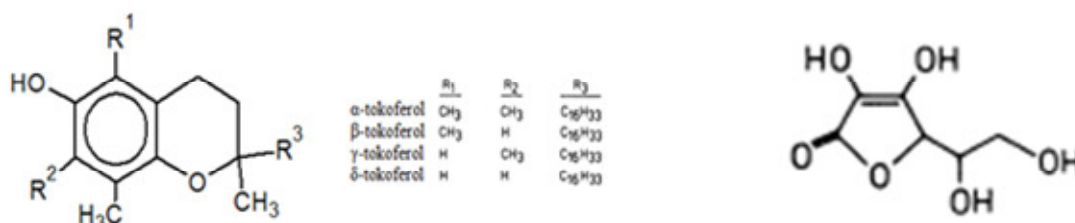
Stres, neboli stresová odpověď, je základní fyziologický proces, kterým organismy reagují na škodlivé faktory (tzv. stresory) ohrožující jejich život a homeostázu. Stejně jako mnoho látek, které jsou v menší míře prospěšné a ve vyšších dávkách naopak zdraví škodlivé, i malé působení stresu tělu nevádí a naopak je potřebné pro přiměřenou reakci na změnu podmínek okolí a při život ohrožujících situacích (Siegel, 1980). Vystavení živočicha stresorům vede k aktivaci hypotalamus-hypofýza-adrenální osy (HPA osy) a ke zvýšení hladiny stresových hormonů (kortikosteroidů) v krvi (Johnstone et al., 2012). Zvýšení hladiny stresových hormonů při krátkodobém vystavení stresovým podmínkám má zásadní vliv na mnohé tělní soustavy a pochody v těle, jako jsou kardiovaskulární systém a metabolismus, které jsou stresovými hormony stimulovány, a dochází tak například ke zvýšení krevního tlaku a zvýšení hladiny glukózy v krvi. Všechny tyto účinky mají dopomoci organismu k přežití a k udržení vnitřní homeostázy (Boonstra, 2013).

Při dlouhodobém nebo nadměrném působení stresu se tělo není schopné vypořádat s negativními účinky, které souvisí se stresem, a dochází k poškození organismu. Dlouhodobě zvýšená hladina kortikosteroidů totiž snižuje příjem potravy, potlačuje imunitní systém a produkci inzulínu, a činí tak zvíře náchylnější k únavě a k nemocím (Buchanan, 2000). Jedním ze stresových faktorů narušujících funkce organismu je tzv. oxidativní stres, který je definován jako nerovnováha mezi vznikem volných radikálů a dalších vysoce reaktivních

kyslíkových a dusíkových molekul (RONS; *reactive oxygen and nitrogen species*) a jejich eliminací, což vede k následnému zvýšení oxidačního poškození tkání (Finkel & Holbrook, 2000). Volné radikály jsou látky, které nesou ve své molekule jeden nebo více nepárových elektronů, a stávají se tak vysoce nestabilními. Mezi RONS řadíme radikály, jako jsou radikál superoxidový $O_2^{\bullet-}$, hydroxylový OH^{\bullet} , peroxylový RO_2^{\bullet} a hydroxyperoxylový HO_2^{\bullet} a další oxidační činidla, jako jsou peroxid vodíku H_2O_2 a kyselina chlorná $HOCl$ (Bayr 2005). Z RONS je nejvíce reaktivní hydroxylový radikál, který reaguje s proteiny a poškozuje je (Surai 2006). Volné radikály běžně vznikají u aerobního metabolismu během přenosu elektronů v dýchacím řetězci, a to především v komplexu I až III, jejich produkce je tak nevyhnutelným vedlejším produktem energetického metabolismu (Inoue et al., 2004). Dalším fyziologickým dějem, při kterém vznikají RONS, je například imunitní reakce, kdy dojde k tzv. oxidačnímu vzplanutí fagocytů, které vytvářejí $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 určených na likvidaci bakterií (Forman & Torres, 2002). Pokud nejsou tyto reaktivní molekuly odstraněny, ovlivňují či poškozují mnohé buněčné struktury od fosfolipidových membrán, přes proteiny až po DNA, čímž narušují jejich funkci (Burton & Jauniaux, 2011). Kumulace tohoto oxidačního poškození je považována za příčinu nebo minimálně za důležitý negativní faktor účastnící se procesu stárnutí (Cadenas & Davies, 2000) a rozvoje mnohých onemocnění, jako jsou například Parkinsonova choroba (Liu et al., 2002) či nádorová onemocnění (Valko et al., 2004). Tato situace se někdy nazývá kyslíkovým paradoxem, což vyjadřuje závislost aerobních organismů na kyslíku, který je zároveň poškozuje, a je tak pravděpodobnou příčinou jejich konečného zániku (Davies, 1995).

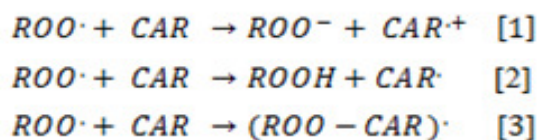
I přesto, že se nedá zabránit jejich vzniku, těla si proti nim vytvořila účinnou ochranu ve formě enzymů a antioxidačních látek. Mezi antioxidační enzymy řadíme především superoxid dismutázu (SOD), glutation peroxidázu (GPx) a katalázu. SOD se vyskytuje ve dvou izofotách podle typu kofaktorů a tvoří prvotní ochranu proti volným radikálům v buňkách, kde přeměňuje superoxidový radikál na méně reaktivní formu - peroxid vodíku (Rodriguez et al., 2004). Peroxid vodíku je dále eliminován pomocí GPx a katalázy na vodu (Krinski, 1992). GPx je tzv. selenoprotein, který ve svém aktivním místě váže glutation, na který se přenáší elektrony z peroxidu vodíku nebo dalších hydroxiperoxidů (Mates, 2000). Kataláza se vyskytuje především v peroxizómech a má oproti GPx vyšší efektivitu v závislosti na koncentraci peroxidu vodíku. Při jeho vysokých koncentracích dochází k inaktivaci katalázy (Dringen & Hamprecht, 1997). Pokud by nebyl peroxid vodíku odstraněn, přeměnil by se Fentonovou reakcí na vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Mates, 2000; Rodriguez et al., 2004).

Na neenzymové ochraně se podílí především nízkomolekulární látky rozpustné jak ve vodě: glutathion, kyselina askorbová (vit. C; Obr. 3), tak v tucích: tokoferoly (vit. E; Obr. 3) a vitamín A a jeho prekurzory-karotenoidy (Bayr, 2005). Vitamín C je považován za nejdůležitější antioxidant v extracelulární tekutině. Ne všechny organismy jsou si ho samy schopny tvořit, některé druhy ptáků, člověk a morčata totiž ztratili enzym L-gulonolaktón oxidázu, která je pro vznik vitamínu C nezbytný, a musí ho proto přijímat v potravě (del Rio, 1997 ; Drouin et al., 2011). Vitamín C dokáže účinně odstranit superoxidové, hydroxylové a peroxylové radikály. Vitamínem E označujeme skupinu tokoferolů, které slouží k ochraně membrán před peroxidací lipidů (Sies & Stahl, 1995).



Obr. 3. Vlevo-chemická struktura tokoferolů, vpravo- chem. struktura vitamínu C. (Převzato a upraveno podle Sies & Stahl, 1995)

Většina karotenoidů obsahuje ve své molekule dvojnou vazbu, díky kterým nabývají antioxidačních vlastností. Karotenoidy v zásadě reagují s volnými radikály třemi způsoby (Obr. 4; Young & Lowe, 2001).



Obr. 4. Reakce karotenoidů s radikály: [1] přenos elektronu, [2] odebrání vodíku, [3] sloučení. (Převzato z Young & Lowe, 2001).

β-karoten a lykopen jsou například schopné deaktivovat singletový kyslík ¹O₂ a peroxylové radikály (Sies & Stahl, 1995). Karotenoidy také kooperují s ostatními neenzymovými lipofilními i hydrofýlními antioxidanty. Podání β-karotenu a α-tokoferolu prokazatelně snižuje peroxidaci lipidů více než jejich jednotlivé podání (Palozza & Krinski, 1992). Karotenoidy totiž mohou chránit α-tokoferol před jeho transformací na radikálovou formu (Bohm et al., 1997) a existuje i opačná reakce, kdy radikál β-karotenu je redukován vitamínem E (Mortensen & Skibsted, 1997). Karotenoidy i vitamín E jsou před oxidativním

poškozením chráněny vitamínem C (Young & Lowe, 2001). Tím, že jsou β -karoten a lykopen uloženy hluboko uvnitř membrán, nemohou se podílet na přenosu elektronů, a zabraňovat tak peroxidaci lipidů. Naopak méně lipofilní xantofyly, jako je např. zeaxanthin, které procházejí membránou, a jsou tak v kontaktu i s vodním prostředím, mohou buňku lépe chránit před peroxylovými radikály (El-Agamey et al., 2004). Karotenoidy kooperují i s ostatními neenzymovými antioxidanty.

2.3. Diquat

V laboratorních podmínkách existuje několik způsobů, jak u pokusných zvířat vyvolat oxidativní stres. Jednou z možností, kterou jsme využili i při našem experimentu, je podávat zvířatům diquat. Diquat a paraquat jsou bipyridilové herbicidy, které jsou v současnosti využívány jako generátory oxidačního stresu v laboratorních modelech Parkinsonovy choroby (Tanner et al., 2011). Negativní působení bipyridilových herbicidů je založeno na jejich schopnosti tvořit RONS skrz reakce tzv. redoxního cyklování (*redox cycling*), tím, že poskytnou svůj elektron dalším sloučeninám, z kterých se dále tvoří RONS (Fussel et al., 2011). Během této reakce jsou bipyridilové herbicidy schopny produkovat především superoxidové anionty (Bonneh-Barkay et al., 2005). V následujících reakcích pak superoxidové anionty reagují s dalšími molekulami za vzniku H_2O_2 , který je přeměněn na vysoce reaktivní kyslíkový radikál na hydroxylový aniont (OH^{\bullet} ; Fussel et al., 2011). Dřívější práce, které studovaly mechanismus účinků těchto herbicidů, jim přisuzovaly schopnost přímo inhibovat dýchací komplex v mitochondriích (Tawara et al., 1996). Pozdější práce však tento účinek zpochybňují a naznačují, že narušení funkce mitochondrií nastává až při vysokých dávkách těchto herbicidů pravděpodobně právě jako důsledek vysokého oxidativního stresu (Richardson et al., 2005).

2.4. Pohlavní výběr

Už Charles Darwin si všiml výrazných vizuálních rozdílů mezi pohlavími u ptáků a preferencí samic pro pestré samce. Svá pozorování shrnul v knize z roku 1871, kde popsal pohlavní dimorfismus a navrhl hypotézu o pohlavním výběru, který je založený na rozdílném reprodukčním úspěchu jedinců (Barraclough et al., 1995). Pohlavní výběr je důležitým

evolučním mechanismem, který má široký dopad na morfologii a chování jedinců (Anderson, 1994). Jeho působení vede ke zvyšování frekvence výskytu znaků, které jsou při výběru partnera preferovány opačným pohlavím. U některých ptačích druhů tak mohly vzniknout velmi nápadné sekundární pohlavní znaky, jako jsou dlouhá pera či nápadné zbarvení, které mohou mít i negativní vliv na přežívání jedince (Kirkpatrick & Ryan, 1991). Při pohlavním výběru si samec či samice vybírají mezi jedinci opačného pohlaví nejvhodnějšího partnera pro zplodění a případnou výchovu potomků. Častěji dochází k výběru samců samicemi, protože ty musí investovat více svých zdrojů a energie do vajíček, počet potomků, které jsou schopny zplodit je tak limitovaná, na rozdíl od samců, kteří tímto nejsou limitováni, a počet jimi zploděných mláďat úměrně vzrůstá s počtem partnerek, které jsou schopni oplodnit (Andersson, 1994).

Existuje několik hypotéz vysvětlujících evoluci sekundárních pohlavních znaků. Jednou z hypotéz je Fisherova (*run away*) hypotéza „sexy synů“ (Fisher, 1930). Podle ní se v evoluci může objevit preference samice pro určitý znak u samců, čímž se jejich potomky přenáší jak geny pro preferenci tohoto znaku, tak geny pro silnou expresi tohoto znaku. Postupně tak může docházet k posilování preferencí a k selekci stále výraznějších forem preferovaného znaku až do stádia, kdy další růst intenzity znaku začne výrazně snižovat přežívání jeho nositelů (Andersson & Simmons, 2006).

Hypotéza smyslového tahu (*sensory bias*), klade důraz na smyslové vnímání samic, které preferují samčí znak, který se nejprve vyvíjel přírodním výběrem. Například u samic ryb *Poecilia reticulata* vyhledávající potravu s oranžovou barvou, vznikla preference pro samce s velkými oranžovými skvrnami na těle (Rodd et al., 2002).

V poslední době jsou velmi populární hypotézy, předpokládající, že ornamenty mohou fungovat jako indikátory určitých kvalit svého nositele. Hypotéza založená na přímém zvýšení fitness samice navrhuje, že samice si vybírají samce s takovými ornamenty, které odrážejí jejich kvality, ze kterých mají samice přímý přínos, jako například schopnost obhájit si kvalitní teritorium s dostatkem potravy a/nebo nízkou mírou predace (Moller & Jennions, 2001). Získání přímých výhod samicí ovšem není mechanismem, který by plně vysvětloval vznik a udržení výrazných sekundárních pohlavních znaků. Existují proto hypotézy, které přisuzují hlavní význam nepřímému zvýšení fitness samice, tzn. zvýšení fitness jejich potomků. Jednou z nich je hypotéza „dobrých genů“, podle níž ornamenty signalizují genetickou kvalitu jedince, která se pak následně přenese i na potomky (Fisher, 1999). Potomci mohou například od samce získat vlastnost, jako je lepší imunita a rezistence vůči

parazitům (Hamilton & Zuk, 1982; Barber et al., 2001). V podobě životaschopnějších potomků si tak samice nepřímo zvyšují fitness (Andersson & Simmons, 2006).

Tyto tři hypotézy se však navzájem nevylučují a signály se tak mohou začít vyvíjet například díky smyslové predispozici vybírajícího pohlaví, přičemž jejich evoluce může být dále tažena *run-away* mechanismem a až později mohou získat signalizační funkci.

2.5. Kondiční závislost ornamentů

Signalizace kondice jedince v pohlavním výběru prostřednictvím výrazných druhotných pohlavních znaků (ornamentů) je v evoluční ekologii široce diskutovaným tématem. U mnoha druhů byla zjištěna souvislost mezi expresí ornamentu a kvalitou a fitness jedince. Kondičně závislé znaky odrážejí stav jedince, jako je například jeho zdraví a imunokompetence, popřípadě jaká je jeho úspěšnost při získávání nějakého omezeného zdroje, jako jsou potrava nebo teritorium (Morehouse 2014). Například jedinci s větší ornamentací mohou mít více heterozygotní genom, takže i potomci mají větší variabilitu genomu (Fromhage et al., 2009; Mays & Hill, 2004). U mnoha druhů byla pozorována korelace mezi expresí ornamentu a schopností vypořádat se s parazitární infekcí a lepší imunologickou odpovědí (Mougeot, 2010). Potomci samců s větším ornamentem mají i větší životaschopnost (Moller, 1994). Na základě těchto studií se zdá, že různé pohlavní ornamenty jsou samicemi (případně i samci) využívány k rozpoznání kvalitních potencionálních partnerů. Pouze kvalitní a zdraví jedinci mohou investovat do nákladných ornamentálních signálů, a tím prezentovat svoji dobrou kondici. Výběrem takového partnera si samice zvyšují vyšší pravděpodobnost, že její potomci budou mít dostatek kvalitní potravy a v případě dědičnosti kondice, budou také odolnější a budou mít celkově větší šanci na přežití. Ornamentace založená na karotenoidech často hraje u ptáků zásadní roli při výběru partnera. Doloženo je to například u zebříček pestrých, často používaného ptačího modelového druhu, kde je prokázána preference zabarvenějších samců samicemi (Hill, 1990). Aby se určitý znak mohl vyvinout a udržet jako signál kondice, musí odrážet skutečný zdravotní stav jedince a být tedy tzv. „čestný“. To znamená, že musí existovat mechanismy, které brání méně kvalitním jedincům plnou expresi takového znaku. Indikátorové ornamentální znaky proto musí mít spojitost s fyziologickými procesy určujícími kondici jedince (Számadó, 2011).

Jako možný mechanismus udržující čestnost signalizace kondice a životaschopnosti je v současnosti široce přijímána tzv. handicapová hypotéza, podle níž musí být tvorba či nošení indikátorového znaku pro nositele zátěží (handicapem), aby si investici do ornamentů a jejich udržování mohli dovolit pouze zdraví a vitální jedinci (Zahavi, 1975). Handicap může být buď ekologický, nebo fyziologický. Typickým ekologickým handicapem je zvýšená nápadnost nositele výrazných znaků, protože svým nápadným zevnějškem na sebe upoutávají větší pozornost, a zvyšuje se tak riziko, že budou spatřeni predátorem, nebo jsou snáze odhaleni potenciální kořistí (Zahavi, 1975; Cotton et al., 2004). Mezi fyziologické typy handicapu může patřit vliv pohlavních hormonů, a to především testosteronu. Při silnější vnitrodruhové kompetici se u samců zvyšuje testosteron, který sice podporuje karotenoidní zabarvení, ale může mít zároveň prooxidační účinky (Martínez-Padilla et al., 2014). Dále se uvažuje, že tvorba ornamentu může kompetovat o limitní zdroje s antioxidační obranou. Jako příklad se často uvádí melaninová ornamentace, kde tvorba pheomelaninu potřebná pro ornamentaci spotřebovává cystein, který je nutný pro tvorbu důležitého intracelulárního antioxidantu glutathionu (Galván et al., 2012).

Alternativou k handicapové hypotéze je hypotéza sdílených drah, která navrhuje, že tvorba ornamentu může být spojena s metabolickými drahami, které jsou zároveň nezbytné pro správné fungování organismu a udržování homeostázy (Hill, 2011). Podle této hypotézy ornamenty nemusí být nákladné, ale odrážejí funkčnost základních životních funkcí organismu, jako je například mitochondriální funkce (Hill, 2014).

Na jakém principu funguje čestnost karotenoidní signalizace, není do dnešních dnů přesně známo. Hypotézy, které se snaží vysvětlit mechanismus kondiční závislosti karotenoidních ornamentů, jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

2.5.1. Schopnost najít karotenoidy

Karotenoidy jsou mikronutrienty, které si živočišné tělo samo nedokáže syntetizovat a je odkázáno na jejich příjem v potravě. Jedna z prvních hypotéz vysvětlující využití karotenoidů v ornamentaci je založena právě na faktu, že dostupnost karotenoidů je dána jejich množstvím v potravě. Tato hypotéza vznikla na základě pozorování, že sytost zabarvení karotenoidních skvrn na těle závisí na příjmu karotenoidů v potravě (Endler, 1980; Hill et al., 2002). Karotenoidní ornamenty by podle této hypotézy mohly fungovat jako signály schopnosti samce najít dostatek kvalitní potravy (Hill, 1991, 1992; Hill et al., 1994). Tuto

hypotézu podporuje například pozorování aktivního vyhledávání potravy bohaté na karotenoidy samci novozélandského pěvce medosavky hvízdavé (*Notiomystis cincta*), kteří mají na rozdíl od samic karotenoidní zbarvení (Walker et al., 2014). Na základě všudypřítomnosti karotenoidů v přírodě však byla jejich vzácnost v potravě volně žijících zvířat zpochybněna, což by znamenalo, že pro expresi karotenoidních ornamentů nemusí být jejich příjem v potravě limitující (McGraw et al., 2003). Ačkoliv je exprese karotenoidních ornamentů do značné míry příjmem karotenoidů ovlivněna, stále existuje značná variabilita v jejich expresi, která je na množství přijatých karotenoidů nezávislá. Manipulace množství karotenoidů v potravě v experimentu na sýkorách modřinkách vedl sice ke změnám v zbarvení peří, ale nevedl ke snížení variability zbarvení mezi jedinci či k vymizení extrémních fenotypů (Hadfield & Owens, 2006). Ani experiment na poštolkách obecných neprokázal vliv karotenoidů v potravě na rozdíly v zbarvení jedinců (Bortolotti et al., 1996). Rozdíly v zbarvení mezi jedinci mohou být důsledkem variability ve velikosti absorpce karotenoidů v trávicím traktu (Fitze et al., 2007) a mohou pravděpodobně záviset i na individuální schopnosti jedince skladovat a metabolizovat jednotlivé druhy karotenoidů (Garcia-de Blas et al., 2014).

2.5.2. Trade-off hypotéza

Kvůli zpochybnění karotenoidů jako limitujícího zdroje v potravě a pozorování na potravě nezávislé variability v expresi ornamentů byly navrženy další hypotézy, předpokládající napojení exprese karotenoidních ornamentů na kondici a fyziologické procesy, probíhající v tělech živočichů.

Jednou z nich je i hypotéza předpokládající trade-off mezi využitím karotenoidů pro ornamentaci nebo pro fyziologické funkce směřující k zachování organismu. Trade-off ve využití karotenoidů v těle bylo poprvé zmíněno v souvislosti s parazitárními infekcemi. V experimentech na zebříčkách pestrých a zvoncích zelených je doloženo, že karotenoidy zlepšují buněčnou (Blount et al., 2003, McGraw et al., 2011) a humorální imunitní odpověď (Saks et al., 2003). Karotenoidy přítomné v ornamentech by se proto při napadení parazitem, pokud je to možné, měly uvolnit pro boj s parazitární infekcí, což má za následek vyblednutí ornamentů (Lozano, 1994).

Aktivace imunitního systému vede k vyblednutí ornamentů založených na karotenoidech, které jsou ve větší míře využity v těle v imunitních reakcích, což bylo dokázáno i v

experimentech např. na zebříčkách a kosech (Faivre et al., 2003; Alonso-Alvarez et al., 2004). Jejich ukládání do ornamentů si proto mohou dovolit jen zdraví jedinci s vysokou imunokompetencí (Blount et al., 2003). Ukládání karotenoidů do trvalých ornamentů (jako je např. peří), kde už nemohou být dále využity v těle, je proto pro jedince handicapem a mělo by být podmíněno dobrou kondicí a zdravím jedince (Saino et al., 1999). Karotenoidy mohou být v těle využity nejen imunitním systémem, ale pro své antioxidační účinky nacházejí uplatnění i v ochraně těla před poškozením RONS (Sies & Stahl, 1995). Omezené množství karotenoidů v těle nemůže být využito na obě funkce současně ve stejné míře. Při nepříznivých životních podmínkách se proto může zvyšovat jejich alokace do antioxidační ochrany na úkor karotenoidní ornamentace (von Schantz et al., 1999). Pouze zdraví jedinci, kteří nejsou v oxidačním stresu, si mohou dovolit investovat karotenoidy jak do vizuální signalizace, tak do vnitřních orgánů (Számadó, 2011).

Karotenoidy ovšem nejsou jedinými antioxidačními látkami, které jsou v tělech využívány. Jejich interakce s dalšími neenzymovými antioxidanty, jako jsou vitamin E a C a možnost jejich vzájemného funkčního zastoupení z nich dělá pouze jednu ze složek antioxidačního systému (Palozza & Krinski, 1992; Young & Lowe, 2001).

2.5.3. Ochrana karotenoidů

Rozporuplné výsledky studií zkoumající antioxidační vlastnosti karotenoidů vedly některé vědce k přesvědčení, že karotenoidy nemusí hrát zásadní roli v antioxidační obraně organismu (Costantini & Moller, 2008).

Jedno z možných vysvětlení navrhli Hartley & Kennedy (2004), kteří ve své hypotéze navrhují, že karotenoidy mohou fungovat jako signály oxidativního poškození, i kdyby žádnou antioxidační funkci neměly. Tato hypotéza je založena na faktu, že karotenoidy při reakci s RONS oxidují a mohou být dále štěpeny a degradovány a je potřeba je před oxidativním stresem chránit prostřednictvím jiných antioxidantů (Krinsky & Yeum, 2003). Pokud nefunguje dostatečně antioxidační obrana, karotenoidy jsou degradovány a ztrácejí svoji barvu. Většina antioxidačních mechanismů v těle je založena na antioxidačních enzymech a jiných nebarevných molekulách (např. glutathion či vitaminy C a E), a karotenoidy by tak mohly fungovat jako barevný indikátor jejich antioxidační kapacity. Zachování intenzity zabarvení karotenoidů by tedy mohlo signalizovat kvalitní antioxidační obranu organismu a tím i kvalitu jedince, i přes to, že by karotenoidy k antioxidační obraně samy

nepřispívaly (Hartley & Kennedy 2004). Výsledky experimentů jsou prozatím dosti rozporuplné. Experimentální manipulace příjmu vitaminů C a E vedly u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) k výraznějšímu karotenoidnímu zabarvení, ne však k větší velikosti ornamentu (Pike et al., 2007). Naopak na zobáku racka středomořského (*Larus michahellis*) došlo při podávání vitaminu E ke zvětšení karotenoidní skvrny, ale nedošlo ke změně intenzity zabarvení (Pérez et al., 2008). V experimentu prováděném na zebříčkách pestrých bylo pozorováno, že zvýšením dostupnosti nebarevného antioxidantu (v tomto případě melaninu) došlo k výraznější karotenoidní ornamentaci (Bertrand & Faivre, 2006). Naopak podávání vitaminu E u hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) a zvonka zeleného (*Carduelis chloris*) neovlivnilo hladinu karotenoidů v plasmě ani v peří (Karu et al., 2008; Giraudeau et al., 2013). Podobně u sýkor koňader (*Parus major*) vitaminy C a E neovlivnily karotenoidní ornamentaci (Marri & Richner, 2014).

2.5.4. Prooxidační účinky

Další z hypotéz je též založena na degradaci karotenoidů po reakci s RONS, ale kromě ztráty barvy předpokládá navíc u karotenoidních rozkladných meziproduktů prooxidační účinky (Zahavi, 2007; Vinkler & Albrecht, 2010). Vysoké koncentrace karotenoidů, které jsou nezbytné pro plné vybarvení ornamentů, mohou v reakci s RONS tvořit reaktivní látky, jako jsou apo-karotenaly a apo-karotenoly, které mohou být potenciálně škodlivé a mohou zvyšovat oxidační poškození organismu (Krinsky & Yeum, 2003). Karotenoidy by tak mohly fungovat jako přímý fyziologický handicap (Zahavi, 2007; Vinkler & Albrecht, 2010).

Pokusy na buněčných kulturách ukázaly, že při fyziologické hladině karotenoidy chrání buňky před poškozením, ale při vysokých dávkách tuto schopnost ztrácí a dochází k poškození membrán (Lowe et al, 1999). Prooxidační účinky karotenoidů byly pozorovány i při experimentu provedeném na kuřácích, kterým byly podávány vysoké dávky karotenoidů. Z výsledků vyplývá, že u kuřáků přijímajících karotenoidy bylo pozorováno zvětšené riziko vzniku karcinomu plic oproti kontrolní skupině, která dostávala placebo (Albanes et al., 1996). Za vysokého oxidativního stresu (např. u kuřáků, při práci s asbestem) metabolické produkty karotenoidů inhibují oxidační fosforylaci v mitochondriích, čímž ještě více zvyšují oxidační stres (Siems et al., 2005). Vysoké dávky karotenoidů mohou mít negativní vliv nejen na člověka, ale byly pozorovány i u pokusných zvířat. Za určitých okolností (jako je zvýšený

stres) mohou vznikat toxické produkty karotenoidů, které, pokud neexistuje dostatečná antioxidační obrana, mohou poškozovat buněčné struktury v těle (Vinkler & Albrecht, 2010).

Jestli karotenoidy budou mít anti- či prooxidační účinky, závisí na mnoha vnějších i vnitřních faktorech. Prooxidační efekt karotenoidů může být zvýšen některými enzymatickými pochody v buňce, teplem, UV zářením a během fyziologických antioxidačních reakcí (Siems et al., 2005). Dále může narůstat při zvýšeném parciálním tlaku kyslíku nebo při jejich vysoké koncentraci (Young & Lowe, 2001). Koncentrace karotenoidů v krvi je u ptačích druhů využívající karotenoidy k ornamentaci významným faktorem. Z metaanalýzy 52 článků je patrné, že ptáci, kteří mají karotenoidní zbarvení peří, mají i nejvyšší hladiny karotenoidů v krvi (Simons et al., 2014). O tom, že záleží na vnějších i vnitřních podmínkách, ve kterých se jedinec nachází, svědčí například i studie provedená na zdravých nekuřácích, kde naopak vyšší hladina β -karotenu v krvi snížila riziko vzniku rakoviny (Ziegler et al., 1996). Negativní působení metabolitů karotenoidů může být vysvětleno např. i jejich schopností peroxidace lipidů a částečně skrze jejich inhibici adenin nukleotid translokázy na membráně mitochondrií, čímž snižují buněčnou respiraci (El-Agamey et al., 2004; Siems et al., 2005). Další z možných mechanismů účinku je, že oxidované karotenoidy (nejčastěji β -karoten) inhibují Na/K APTázu, a tím snižují buněčnou respiraci (Hartley & Kennedy, 2004; Siems et al., 2000).

Pokud karotenoidy nabývají prooxidačních účinků, mohla by karotenoidní ornamentace u ptáků fungovat jako přímý fyziologický handicap. Jedinci s výraznějšími karotenoidními ornamenty jsou při pohlavním výběru úspěšnější, ale musí se vypořádat s vyššími nároky na antioxidační ochranu. S tím souvisí i množství testosteronu v těle, který zvyšuje dostupnost karotenoidů pro ornamentaci, ale zároveň zvyšuje oxidační stres a má imunosupresivní účinky (Alonso-Alvarez et al., 2007). Zdraví jedinci jsou schopni eliminovat zvýšené množství prooxidačních látek pomocí antioxidačních enzymů a dalších antioxidantů. Případný negativní vliv derivátů karotenoidů by měl být proto u nich minimální (Vinkler & Albrecht, 2010).

2.5.5. Hypotéza sdílení biochemických drah mezi tvorbou ornamentu a důležitými fyziologickými procesy

Jako alternativa k výše uvedeným hypotézám založených na přímé interakci karotenoidů s RONS byla navržena tzv. hypotéza sdílených drah. Ta předpokládá, že vstřebávání a metabolismus karotenoidů používá stejné metabolické dráhy, které jsou nezbytné pro udržení homeostázy a pro správné fungování organismu (Hill, 2011). Kondice jedince je dána genotypem, současným fyziologickým stavem těla a epigenetickým nastavením a pouze jedinec, kterému správně fungují všechny biochemické a fyziologické děje a má přístup k dostatku zdrojů, může být kvalitním jedincem (Hill, 2011). Jako jeden z konkrétních příkladů propojení ornamentace s fyziologickým procesem bylo navrženo provázání karotenoidů s mnoha buněčnými pochody v těle skrze syntézu vitamínu A a jeho derivátů z některých karotenoidů, především z β -karotenu a β -cryptoxantinu. Množství vitamínu A proto závisí na množství těchto absorbovaných pro-vitaminových karotenoidů v potravě. Vitamín A má v těle uplatnění v široké škále dějů od imunitní funkce přes růst, lipogenezi, glykolýzu až po energetickou homeostázu. Pokud je narušena homeostáza vitamínu A (např. imunitní reakcí nebo stresem), pak jsou pro-vitaminové karotenoidy využity přednostně k tvorbě vitamínu A, a je jich proto méně dostupných pro tvorbu ornamentu. Plné vybarvení ornamentu by tak bylo možné pouze u zdravých a málo stresovaných jedinců, kteří mají navíc dostatek karotenoidů v potravě (Hill & Johnson, 2012). Meta analýza článků, které se zabývaly vlivem karotenoidů na redoxní homeostázu a byly provedeny celkem na šesti druzích ptáků, však tuto teorii nepotvrdila, ale naopak autoři jsou přesvědčeni, že redoxní hypotéza vitamínu A není v současné době dostatečně průkazná (Simons et al., 2015).

Další možností, jak by mohla být čestnost karotenoidních ornamentů zajištěna prostřednictvím vztahu mezi karotenoidy a redoxní homeostázou, je možnost, že přeměna karotenoidů na červené formy je závislá na stejných drahách, které jsou nezbytné pro oxidativní fosforylaci. Oxidativní fosforylace a tvorba ROS jsou úzce spjaty s buněčným metabolismem a imunitním systémem (Johnson & Hill, 2013; Hill, 2014). Na základě podobnosti mezi karotenoidy a koenzymem Q Johnson & Hill (2013) navrhuje, že syntéza karotenoidů a koenzymu Q, který se účastní transportu elektronů v dýchacím řetězci, by mohly v určitém kroku sdílet stejnou metabolickou dráhu ve vnitřní mitochondriální membráně. Karotenoidy a koenzym Q mají i společné vlastnosti, dokážou odstraňovat superoxidové radikály, a podílet se tak na antioxidační obraně. Hlavní funkci koenzymu Q je

přenos elektronů v rámci elektronového transportního řetězce a udržování membránového potenciálu nezbytného k tvorbě ATP (Turunen et al., 2004). V případě, že by tvorba červených ketokarotenoidů souvisela se syntézou koenzymu Q a mitochondriálním membránovým potenciálem, mohly by karotenoidy fungovat jako signály efektivity mitochondriální respirace. Jakákoliv chyba v mitochondriální a jaderné DNA či stresový faktor způsobující sníženou efektivitu buněčné respirace a tvorbu volných radikálů by se tak projevila i ve snížené expresi karotenoidního signálu (Jonhson & Hill, 2013). Tato hypotéza je v současnosti hlavní alternativou v hypotéze trade-off.

2.6. Modelový organismus

Experimenty byly prováděny na australských pěvcích zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*). U tohoto druhu je výrazný pohlavní dimorfismus, při kterém samci využívají karotenoidy v ornamentaci. U karotenoidního zabarvení zobáků u samic byla experimentálně prokázána jejich preference samicemi (Simons & Verhulst, 2011) a jejich kondiční závislost (Birkhead et al., 1998). Jedinci zebříček s červenějším zobákem mají delší dobu přežívání (Simon set al., 2012) a mají lepší imunitní odpověď (McGraw et al., 2003). Různé stresory vedou k vyblednutí barvy zobáku, například negativní vliv na barvu zobáku má aktivace imunitní obrany (Alonzo-Alvarez et al., 2004) a teplotní stres (Eraud et al., 2007). Je doložené, že tkáň zebříček obsahuje karotenoidy (např. v zobáku byl detekován α -doradoxanthin, adonirubin, astaxanthin, canthaxanthin, lutein a anhydrolutein), z toho α -doradoxanthin byl nalezen pouze v zobáku. Největší koncentrace karotenoidů byla naměřena v zobáku, následovaný tukem a játry. (McGraw & Toomey, 2010).

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo studovat na modelovém ptačím druhu s kondičně závislým karotenoidním ornamentem distribuci karotenoidů mezi orgány a ornamentem v závislosti na intenzitě oxidačního stresu a množství karotenoidů přijímaných v potravě. Tyto znalosti mohou pomoci falsifikovat některé z navržených hypotéz zajištění čestnosti karotenoidní signalizace.

Predikce:

Podle trade-off hypotézy by karotenoidy měly být při zvýšené oxidační zátěži lokalizovány především v životně důležitých orgánech. V experimentálních skupinách, kterým bude zvýšena oxidační zátěž, by proto mělo být pozorováno zvýšení či alespoň zachování množství karotenoidů v srdci a naopak snížení jejich koncentrace v ornamentu a v zásobních tkáních.

Pokud by karotenoidy měly prooxidační účinek (handicapová hypotéza), mělo by naopak u skupiny, ve které bude současně zvýšená oxidační zátěž i příjem karotenoidů, dojít k nejvýraznějšímu poklesu karotenoidů v srdci, případně i v dalších orgánech, kvůli jejich zvýšenému vylučování z organismu.

V případě, že karotenoidy při reakci s RONS pouze ztrácejí barvu a na redoxní stav nemají ani pozitivní ani negativní účinek (hypotéza ochrany karotenoidů), mělo by zvýšení oxidační zátěže vést k podobnému poklesu karotenoidů ve všech orgánech, a to jak u skupiny s nízkým, tak u skupiny s vysokým příjmem karotenoidů.

V případě platnosti hypotézy sdílených drah by mělo při zvýšené oxidační zátěži dojít ke změně v zastoupení žlutých karotenoidů oproti jejich červeným metabolitům v ornamentu. Konkrétně očekáváme pokles červených forem v důsledku snížené funkčnosti mitochondriální respirace a s ní dle této hypotézy související přeměny karotenoidů.

4. Materiál a metody

4.1.Design experimentu

Na moji diplomovou práci byly použity výsledky ze dvou experimentů s totožným designem. Experimenty byly prováděny na pracovišti Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v. v. i. ve Studenci. K experimentu 1 z roku 2011 bylo použito 60 dospělých, přibližně rok starých samců. K experimentu 2 z roku 2012 bylo použito 80 dospělých přibližně rok starých samců. Všichni ptáci pocházeli z německého Max Planck Institute for Ornithology v Seewiesen od dr. Wolfganga Forstmeiera. Ptáci byli chováni v dřevěných bednových klecích o rozměrech 60 × 40 × 40 cm ve speciální místnosti budovy Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v. v. i. ve Studenci. K stimulaci pohlavní aktivity samců bylo do místnosti

umístěno šest samic v oddělených klecích. Délka světelného dne byla nastavena na 14:10 h (světlo:tma). Ptáci byli krmeni loupaným prosem *ad libitum*.

V plně faktoriální 2 x 2 designu byla manipulována intenzita oxidativní zátěže a množství přijatých karotenoidů v potravě. Jedinci zebřiček byli náhodně rozděleni do čtyř skupin: kontrolní bez oxidativního stresu a karotenoidů (OS–, CAR–), se zvýšeným oxidačním stresem a bez karotenoidů (OS+, CAR–), se zvýšeným příjmem karotenoidů a bez oxidačního stresu (OS–, CAR+) a kombinace obou faktorů (OS+, CAR+). Experiment 1 (2011) probíhal po dobu 10 týdnů, experiment 2 (2012) trval 8 týdnů.

Oxidační zátěž byla zvyšována pomocí chemického agens diquatu, který prostřednictvím redoxního cyclingu produkuje superoxidový radikál. Diquat byl podáván každý den v čerstvé pitné vodě (25 mg/l). Tato koncentrace byla vybrána na základě výsledků z pilotní studie, ve kterém se podával diquat ve čtyřech koncentracích 12,5; 25; 50 a 100 mg/l pitné vody čtyřem skupinám zebřiček po šesti jedincích. Pro následný experiment byla vybrána nejvyšší subletální dávka, u které nebyly při dlouhodobém podávání pozorovány žádné klinické projevy intoxikace.

Karotenoidy (FloraGLO Lutein 20% SAF, Kemin/DSM, Francie) dostávali ptáci ve směsi s loupaným prosem v množství 200 mg/kg. Tohoto složení krmiva bylo docíleno smícháním 1 ml FloraGLO a 1 ml světlicového oleje a následným vmícháním této připravené směsi do 1 kg loupaného prosa. Vzhledem k obsahu světlicového oleje a 10 mg/ml alfa-tokoferolu ve FloraGLO, byla do kontrolní diety přimíchána jeho stejná koncentrace ve 2 ml světlicového oleje.

U všech jedinců byla před i po experimentu z jugulární žíly odebrána krev (120 µl) do heparizované mikrohematokritové kapiláry. Krev byla centrifugována 5 min při 8 800 × g a rozdělena na krvinky a krevní plazmu.

Po experimentu byli ptáci usmrceni cervikální dislokací a při následné pitvě byly odebrány vzorky srdce, tuku a zobáku. Všechny vzorky byly po odebrání přechodně uskladněny v nádobě s tekutým dusíkem a následně byly uloženy do hlubokomrazícího boxu (–80°C).

Další zpracování a analýza vzorků probíhala na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i..

4.2. Měření barvy zobáku

Reflektance zobáku byla měřena v rozmezí 300–700 nm pomocí spektrofotometru AvaSpec 2048 s AvaLight-XE pulzním světelným zdrojem (Avantes, Nizozemsko). Na každém jedinci bylo provedeno celkem 12 měření, čtyři na každé straně horní části zobáku a dvě na každé straně jeho spodní části. Sonda byla v průběhu měření držena kolmo k povrchu zobáku. Spektrofotometr byl kalibrován pomocí bílého standardu WS-2 a temné komory vždy po změření pěti jedinců. Následné zpracování dat a výpočet ptačího vizuálního modelu byly provedeny v prostředí R 3.0.2 za použití balíčku *pavo*. Všech 12 získaných reflektančních křivek bylo přepočítáno na 1nm kroky a spojeno do jedné průměrné křivky, která byla vyhlazena pomocí *span* faktoru 0.15. Výsledná křivka byla využita ke kalkulaci parametrů ptačího vizuálního modelu. Nejprve byl pomocí publikovaných parametrů (Hart & Vorobyev, 2005) vytvořen model charakterizující barevnou citlivost oka zebřičky pestré. Výsledké barevné charakteristiky byly spočteny pro podmínky standardního denního světla (D65) implementovaných v *pavo*. Výstupem ptačího vizuálního modelu jsou tři parametry charakterizující barvu, a to θ (*theta*), ϕ (*fi*) a r_a (dosažené *r*, *r-achieved*). Theta udává odstín barvy ve spektru viditelném pro člověka, phi udává UV odstín, r-achieved udává sytost barvy.

4.3. Extrakce karotenoidů

4.3.1. Obecný postup

K extrakci karotenoidů byla použita modifikovaná metoda dle Garcia-de Blas et al. (2013). Na začátku každého zpracování byl nejprve vzorek zvážen, poté byl vložen do třecích misek a homogenizován. Ke vzorku byla následně přidána směs organických rozpouštědel: hexan (Fluka Analytical):tert-Butyl ethylether (Sigma Aldrich; HEX:TBME) v poměru 1:1. Hexan je nepolární rozpouštědlo a patří mezi nejpoužívanější organická rozpouštědla pro extrakci karotenoidů, a to především nepolárních (karotenů) a esterifikovaných karotenoidů (Amorim-Carrilho et al., 2014). Stejně vlastnosti má i TBME, který se také řadí mezi nepolární organická rozpouštědla. Vzniklá suspenze byla zvortexována a vložena na 3 minuty do ultrazvukové čističky. Vzorek pak byl následně centrifugován ($8\ 800 \times g$, 3 min.). Odstředěná svrchní fáze byla odsáta do zkumavky a vysušena dusíkem. Vzniklý extrakt byl

rozpuštěn v acetonu a uskladněn v -80°C mrazáku. Aceton patří mezi organická rozpouštědla, u kterých nedochází po dobu skladování k výraznější degradaci karotenoidů (Craft, 1992). V kombinaci s nízkými teplotami a tmou byla zaručena maximální možná stabilita vzorků.

Tkáně srdce a tuku z Experimentu 2 byla kvůli optimalizaci postupu izolace karotenoidů z tkání rozdělena na dvě části. Zobáky a varlata, stejně tak srdce z prvního experimentu byly použity celé. Detailní postup je rozepsán v následujících podkapitolách.

4.3.2. Zpracování zobáků

Pro analýzu byla použita karotenoidní rohovina z horní čelisti (tzv. ramphotéka). Horní části zobáků byly zváženy na analytických vahách a poté rozdrceny v třecích miskách za použití tekutého dusíku. Následně byla ke vzorkům v miskách přidána směs 1 ml HEX:TBME v poměru 1:1 a vzniklá směs byla odsáta pipetou do 1,5 ml mikrozkušavky. Ke směsi bylo přidáno 100 μl destilované vody (čištění vody probíhalo na přístroji SCI-AQUA) a 1 ml etanolu. Vzorky ve zkumavkách byly promíchány na vortexu a následně vloženy na 3 min do ultrazvukové čističky pro lepší homogenizaci vzorků. Vzorky byly centrifugovány ($8\ 800 \times g$, 3 min.). Poté byly vzniklé svrchní fáze odebrány do skleněných baněk. Protože tkáň byla stále obarvená, zopakovala se extrakce HEX:TBME a vzniklá nová svrchní fáze byla přidána k extraktu v baňce. Aby došlo k co největší výtěžnosti karotenoidů z tkáně, bylo ke tkáni v mikrozkušavkách přidáno 1 ml HEX:TBME a následně byly mikrozkušavky se vzorkem vloženy do lednice po dobu 2-3 dnů. Extrahovaná směs v baňkách byla odpařena na vakuové odparce a po zakrytí baněk nitrocelulózovou membránou byly baňky se vzorky vloženy do -80°C mrazáku. Po přidání extraktů ze vzorků z lednice a opětovném odpaření na vakuové odparce byly extrahované karotenoidy v baňkách rozpuštěny v 400 μl acetonu a pipetou přeneseny do skleněných víalek. Postup extrakce karotenoidů ze zobáků byl pro oba experimenty totožný.

4.3.3. Zpracování srdcí

Poloviny vzorků srdcí z druhého experimentu byly promyty v destilované vodě, aby došlo k maximálnímu vymytí krve z tkáně. Následně byly vzorky zváženy a homogenizovány v třecích miskách. Ke vzorkům byla přidána směs 1 ml HEX:TBME a 1 ml čištěné

destilované vody. Směs byla přenesena do mikrozkušavky, zvortexována a vložena na 3 min. do ultrazvukové čističky. Následně byla směs centrifugována ($8\,800 \times g$, 3 min.) a vzniklá svrchní fáze byla odebrána do víálky a byla vysušena na dusíku. Vzorky byly rozpuštěny ve 400 μ l acetonu.

Druhé poloviny srdcí byly zpracovány stejným postupem, avšak ke vzorkům bylo po rozpuštění v HEX:TBME přidáno navíc 100 μ l etanolu.

Srdce z Experimentu 1 byla použita na analýzu celá a při extrakci se ke vzorkům přidávalo 100 μ l etanolu. Rozdíly ve výtěžnosti karotenoidů z tkání při vynechání a při přidání etanolu jsou uvedeny v části s výsledky.

4.3.4. Zpracování tuku

Tuk byl zvážen a následně homogenizován v třecích miskách. Ke vzorkům byla přidána směs 1 ml HEX:TBME a 1 ml čištěné destilované vody. Směs byla přenesena do mikrozkušavky, byla zvortexována, vložena na 3 min. do ultrazvukové čističky a zcentrifugována ($8\,800 \times g$, 3 min.). Svrchní fáze byla odebrána do víálky, vysušena dusíkem a rozpuštěna ve 400 μ l acetonu.

Takto připravené vzorky byly skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mrazáku. Po jejich vyndání a rozmrazení byly zkumavky zakalené a tvořily se v nich sraženiny pravděpodobně z mastných kyselin. Vzorky byly proto znovu zcentrifugovány a následně byly fáze bez usazenin odsáty a přeneseny do nových viálek. Vzorky byly bez prodlení změřeny na spektrofotometru, aby nedošlo ke zkreslení výsledků případnými sraženinami.

Druhá část tuku byla zpracována stejným postupem, avšak ke vzorkům bylo po rozpuštění v HEX:TBME přidáno navíc 100 μ l etanolu. Po rozmrazení vzorků i zde došlo k zakalení zkumavek. Postup byl proto zopakován podobně jako u předešlých vzorků bez etanolu.

4.3.5. Zpracování plasmy

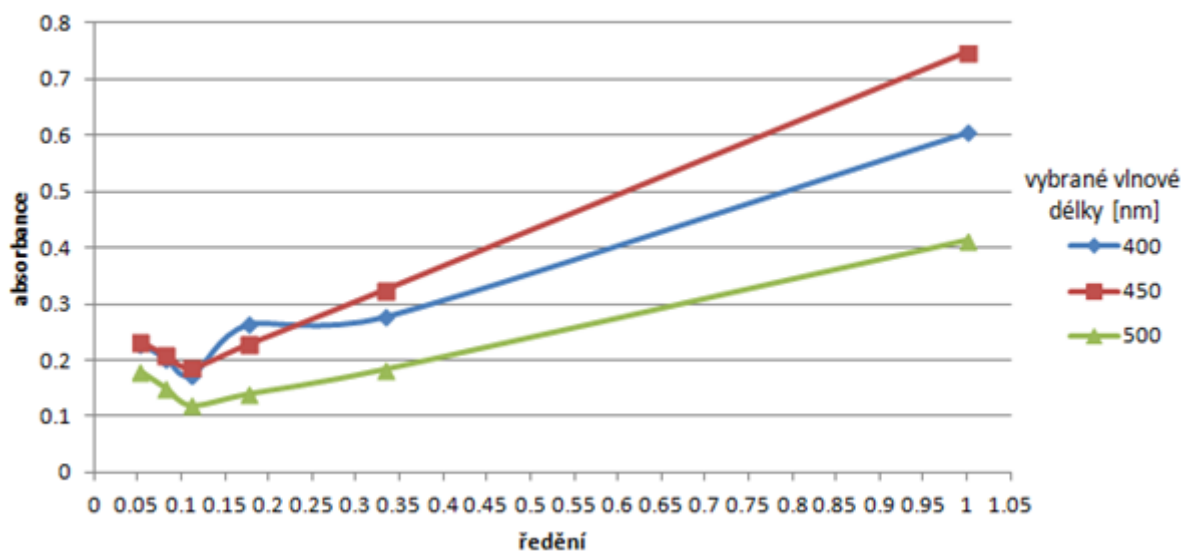
Plasma byla přenesena do mikrozkušavek, ke kterým byla přidána směs 1 ml HEX:TBME a 1 ml čištěné destilované vody. Vzorky byly zvortexovány, vloženy na 3 min. do ultrazvukové čističky a následně byly centrifugovány ($8\,800 \times g$, 3 min.). Svrchní fáze

byly přeneseny do viálek. Protože byla stále výrazně zbarvená i spodní (vodní) frakce, byla k ní opět přidána směs 1 ml HEX:TBME, zkumavky byly vloženy na 3 min. do ultrazvukové čističky, znova zcentrifugovány a nové vrchní fáze byly přidány k již odsátým fázím ve viálkách. Vzniklé extrakty byly vysušeny na dusíku. I přes zopakování extrakce organickými rozpouštědly byla vodní fáze stále zbarvená do žluta. Proměřením takto zbarvené vody na spektrofotometru se potvrdilo, že zbarvení je zapříčiněno karotenoidy. Postup extrakce byl proto zopakován ještě jednou s malou modifikací a to přidáním 100 μ l etanolu. Rozdíly mezi dvěma postupy extrakce jsou uvedeny ve výsledcích.

4.4. Analýza celkové koncentrace karotenoidů pomocí měření absorbance

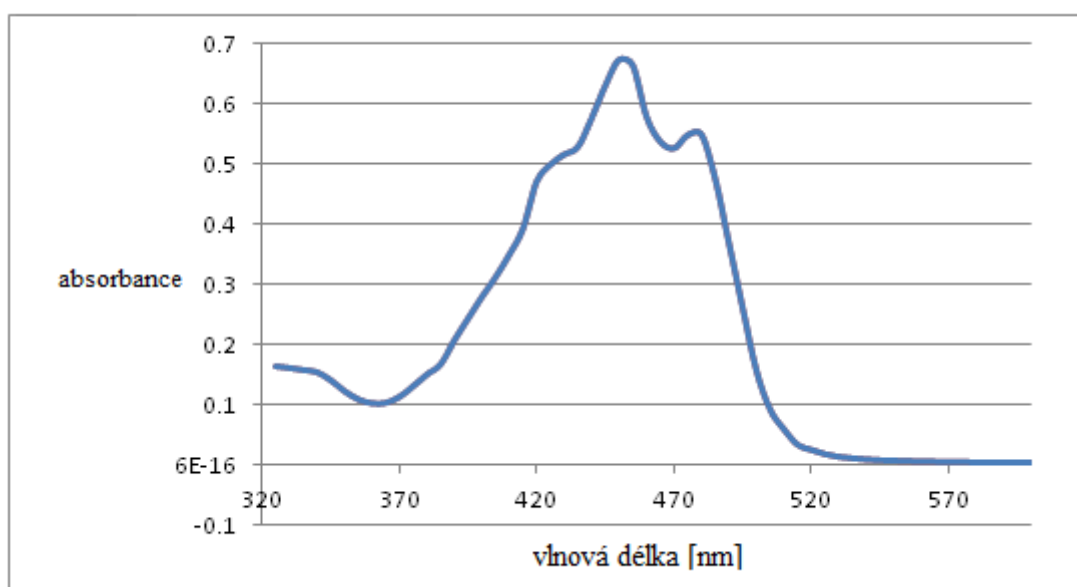
Vzorky rozpuštěné v acetonu byly měřeny na spektrofotometru (Tecan Infinite M200) pomocí softwaru (Tecan i-Control software). Rozsah měření vlnových délek byl od 325 nm do 600 nm s délkou kroku 5 nm. Teplota přístroje byla nastavena na 24 °C. Pro odstranění interference prostředí a rozpouštědla byla před samotným měřením vzorků nejprve proměřena prázdná mikrotitrační destička (Eppendorf), jejíž absorbance se výsledně odečetla od absorbance vzorků. Ke každému vzorku byla měřena absorbance čistého acetonu, která se následně také odečetla od absorbance vzorků. Kvůli poměrně rychlému vypařování acetonu bylo měřeno najednou vždy jen jeden sloupec destičky, tedy 8 vzorků. Do každé jamky bylo napipetováno 200 μ l směsi vzorku a acetonu.

Protože každá tkáň měla různou intenzitu zbarvení, a tím i rozdílnou koncentraci karotenoidů, bylo potřeba pro každou tkáň vybrat nejvhodnější ředění pro měření. Ředění bylo následující (vzorek:aceton): zobáky (30:170 μ l), srdce (100:100 μ l), tuk (60:140 μ l), varlata a plazma nebyly ředěny. Ředění bylo zvoleno podle výsledků spekter ze šesti ředění, které bylo provedeno na pokusných vzorcích: (μ l vzorku: μ l acetonu) 100:100; 50:150; 30:170; 20:180; 15:185; 10:190. Byly vybrány 3 vlnové délky, které se následně vynesly do grafu, podle kterého bylo zvoleno adekvátní ředění.



Graf 1. Příklad koncentrační řady zobáků.

Identifikace jednotlivých druhů karotenoidů probíhala na základě jejich absorpčních maxim a tvaru spekter. Většina karotenoidů má absorpční maximum ve třech vlnových délkách, takže vytváří typické třívrcholové spektrum (viz Graf 2).



Graf 2. Příklad absorbančního spektra karotenoidního extraktu ze zobáku zebřičky pestré.

4.5. Vyhodnocení množství karotenoidů ve tkáních

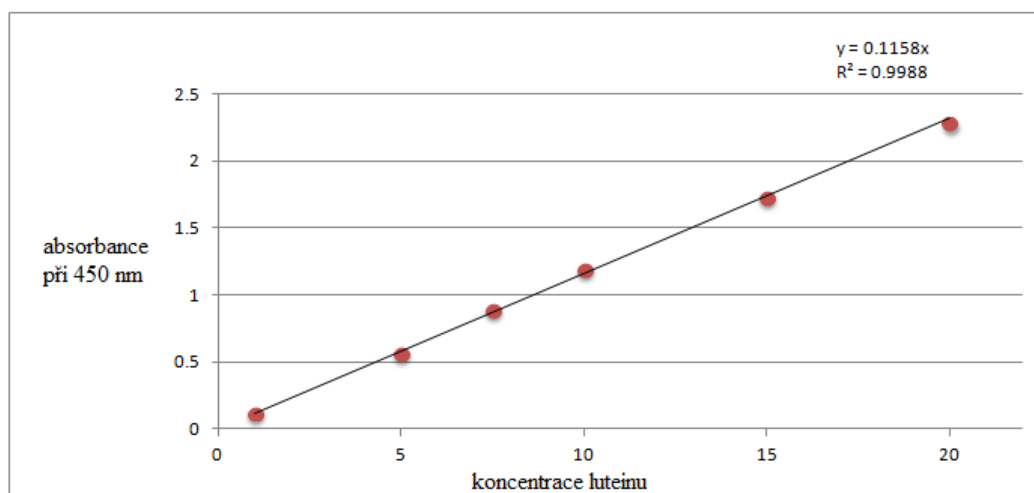
Pro statistické zpracování byla použita absorbance při vlnové délce 450 nm, protože okolo této hodnoty dosahují karotenoidní spektra většinou svého maxima (Graf 2; viz také např. tabulka 1 v Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004).

Od absorbcí vzorků a acetonu byly odečteny absorbance prázdných jamek a následně byly od výsledků vzorků odečteny hodnoty absorbance acetonu. Tím došlo k odstranění interferenci pozadí a rozpouštědla.

Výsledné hodnoty absorbance byly přepočítány podle naměřené absorbance koncentrační řady standartu luteinu a z následné rovnice regrese ($y = 0,1158x$; graf 3) byly vypočítány hodnoty absorbance vzorků na hmotnost karotenoidů v μg na 1 g tkáně nebo 1 ml plasmu. Do vzorce byly zahrnuty i hodnoty objemu vzorku, rozpouštědla, celkového objemu v jamce a hmotnost tkáně.

$$x = (A_{450} \times 0,1158) \times \left(\frac{V_{\text{jamka}}}{V_{\text{vzorek}}} \right) \times V_{\text{rozpouštědlo}} / m_{\text{vzorku}}$$

kde A_{450} je absorbance vzorku při λ_{450} , 0,1158 je sklon kalibrační křivky, V_{jamka} a V_{vzorek} jsou celkový objem směsi v jamce a objem vzorku. $V_{\text{rozpouštědlo}}$ je objem rozpouštědla použitého k extrakci karotenoidů z tkáně a m je hmotnost vzorku.



Graf 3. Kalibrační křivka standartu luteinu. Koncentrační řada standartu luteinu proložená spojnicí trendu s rovnicí regrese procházející nulou (y) a s hodnotou spolehlivosti (R^2). Sklon kalibrační křivky luteinu byl v dalších analýzách použit pro výpočet celkové koncentrace karotenoidů.

4.6. Měření na HPLC

Chromatografie je separační a analytická metoda, při které jsou látky rozděleny mezi stacionární a mobilní fázi na základě jejich chemických a fyzikálně chemických vlastností a vzájemných interakcí. Identifikace jednotlivých karotenoidů v tkáních probíhalo na chromatografu Spectra system UV 6000LP (Wartex). Pro měření byl dále použit kolonový termostat Mistral (Spark Holland) a pumpa DeltaChrom Q-Grad (Wartex). Postup detekce karotenoidů z tkání na HPLC byl částečně převzat z článku Blas et al. (2011).

Na separaci a analýzu karotenoidů byla použita reverzní kolona Develosil C30 (RPAqueous C30, 6 μm , 4,6 \times 25 mm; Nomura Chemical, Japan). Na ovládání přístrojů a vyhodnocení byly použity programy EZChrom Elite a Clarity.

Před začátkem měření se kolona přibližně 10 minut promývala čistým TBME. Teplota kolony byla nastavena na 35 °C. Množství analyzovaného vzorku bylo 10 μl . Na mobilní fáze byly použity TBME, metanol (MeOH) a acetonitril (ACN).

Analýza na chromatografu probíhala po dobu 40 minut. Od začátku měření do 12,5 minuty protékalo kolonou 70 % MeOH a 30 % ACN, poté do 25. minuty se poměr rozpouštědla změnil na 52 % ACN, 46 % TBME a 2 % MeOH a od 35. minuty klesl podíl ACN na 10 % a zvýšil se podíl TBME na 70 %.

Na HPLC byly změřeny kromě vzorků tkání i zakoupené standarty karotenoidů, u kterých je potvrzeno, že se vyskytují v ptačím těle (Inouye et al., 2001). Jednalo se o lutein, astaxanthin, canthaxanthin a zeaxanthin (Sigma Aldrich) a adonirubin, cryptoxanthin a β -karoten (CaroteNature).

Následně byla provedena korekce naměřených chromatogramů o odečet pozadí rozpouštědla (acetonu). Podle maximálních vlnových délek (λ_{max}) spekter a retenčních časů byly určeny jednotlivé karotenoidy, které se vyskytovaly v tkáních. Určování probíhalo podle hodnot max. vlnových délek karotenoidů uvedených v knize (Britton et al., 1995).

4.7. Statistická analýza

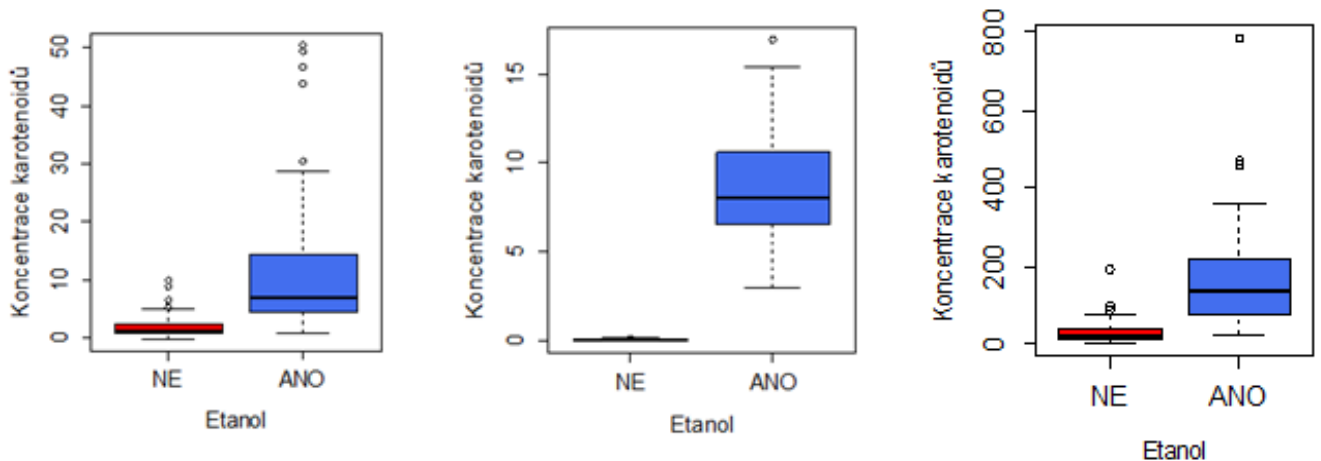
Statistické analýzy byly prováděny v prostředí R 3.0.2. Vzhledem k tomu, že koncentrace karotenoidů ve tkáních měla většinou nenormální rozložení vyšikmené směrem doleva, byl pro analýzu korelací využit neparametrický Spearmanův korelační koeficient (r_s). Z tohoto důvodu jsou kromě průměrů v tabulkách publikovány také mediány jednotlivých

skupin. K analýze vlivu experimentálních manipulací byly využity lineární modely, přičemž nenormálně rozložené proměnné byly před analýzou transformovány pomocí Box-Cox transformace s využitím balíčku (*MASS*). Závislé i nezávislé kontinuální proměnné byly před analýzou standardizovány pomocí z -transformace a kategoriální proměnné byly vycentrovány. Výsledné koeficienty modelu jsou tedy standardizované parciální regresní koeficienty, které jsou obdobou Cohenova d a tudíž standardizovanou mírou velikosti účinku (Schielzeth, 2010). Centrování nezávislých proměnných zároveň umožňuje správnou interpretaci základních efektů v případě přítomnosti interakce. Z tohoto důvodu jsou prezentovány plné modely bez dalšího zjednodušování.

5. Výsledky

5.1. Porovnání výtěžnosti dvou extrakčních metod:

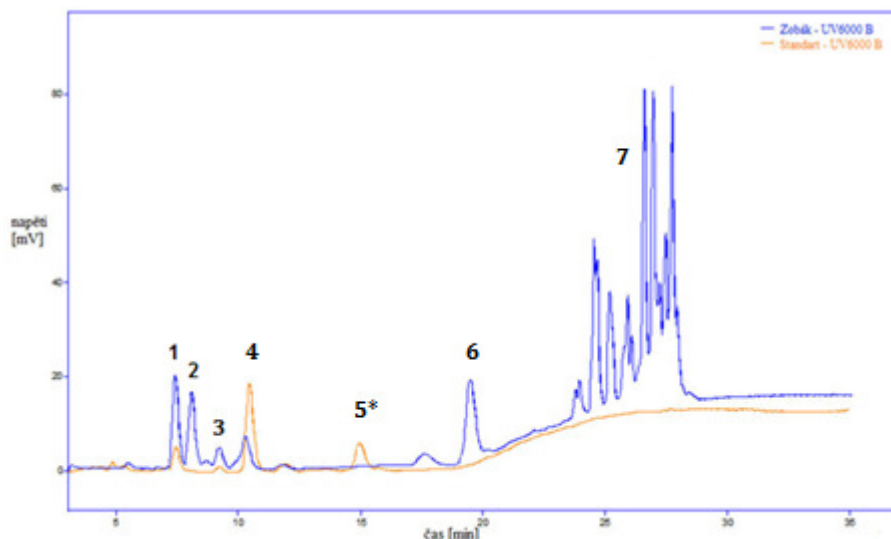
Pro izolaci karotenoidů z tkání byly nejprve otestovány dvě extrakční metody (Graf 4). Tyto metody byly testovány v alikvotech vzorků srdce, plasmy a tuku od stejných jedinců z Experimentu 2. Jedna část vzorku byla extrahována s příměsí etanolu v extrakční směsi a druhá bez etanolu (další detaily viz Metodika). Při porovnání výtěžnosti extraktů je patrné, že účinnost obou metod se významně lišila (Wilcoxonův párový test; plasma: $W = 0$, $P < 0,001$; srdce: $W = 6$, $P < 0,001$; tuk: $W = 2$, $P < 0,001$). Extrakce s etanolem měla vyšší výtěžnost než extrakce bez přidání etanolu ve všech tkáních, a byla proto použita pro všechny další analýzy koncentrací karotenoidů ve tkáních.



Graf 4. Srovnání výtěžnosti dvou metod pro extrakci karotenoidů z tkání. Testovány byly metoda s přídavkem a bez přídavku etanolu. Získané koncentrace karotenoidů v plasmě (vlevo), v srdci (uprostřed) a v tuku (vpravo).

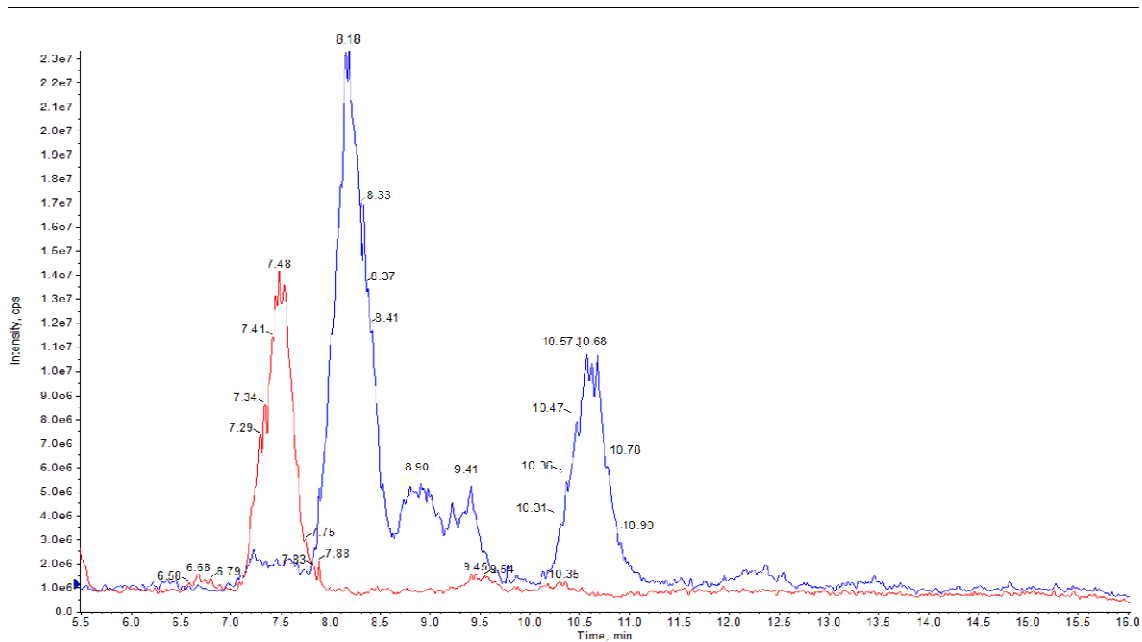
5.2. Zastoupení různých typů karotenoidů ve vybraných tkáních

V zobáku byly podle chromatogramů z HPLC detekovány následující karotenoidy: astaxanthin, doradexanthin, adonirubin, lutein, a estery karotenoidů (Obr. 9, Graf 5).

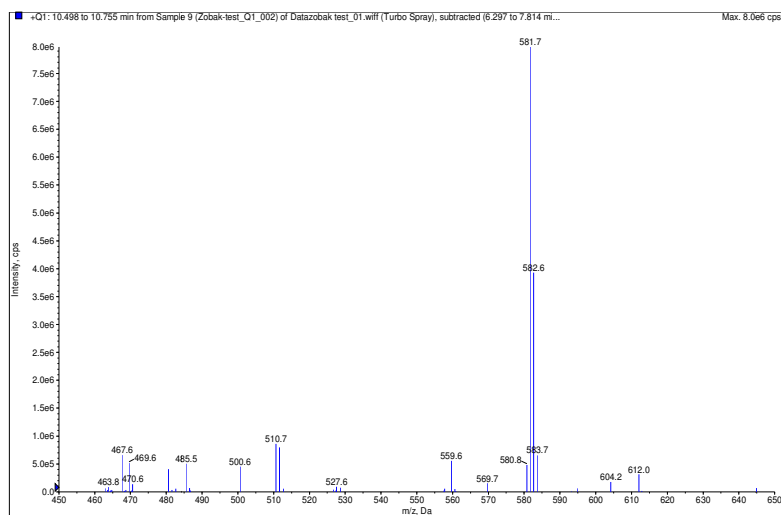


Graf 5. Chromatogram karotenoidů v zobáku. Modrý záznam = chromatogram zobáku, oranžový záznam = chromatogram standartů karotenoidů. 1 = astaxanthin, 2 = doradexanthin, 3 = lutein, 4 = adonirubin, 5* = canthaxanthin (pouze standart), 6 = blíže námi neidentifikovaný karotenoid, 7 = estery doradexanthinu, astaxanthinu a dalších karotenoidů.

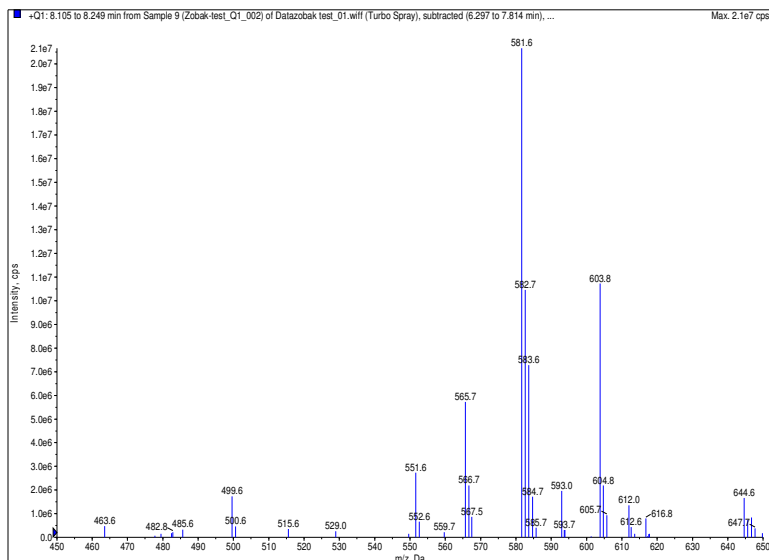
Kvůli nejasnostem při určení původně neznámého karotenoidu z chromatogramu zobáků (Graf 5, číslo 2) byl jeden vzorek zobáku změřen pomocí LC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem) na přístroji UltiMate 3000 (Thermo Scientific). Hmotnostní spektroskopie je analytická metoda založená na rozlišení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Z výsledků se dá určit relativní molekulová hmotnost, podle které byl neznámý karotenoid určen jako doradexanthin (Obr. 5). Karotenoid z grafu 5 (číslo 5) se nám nepodařilo identifikovat.



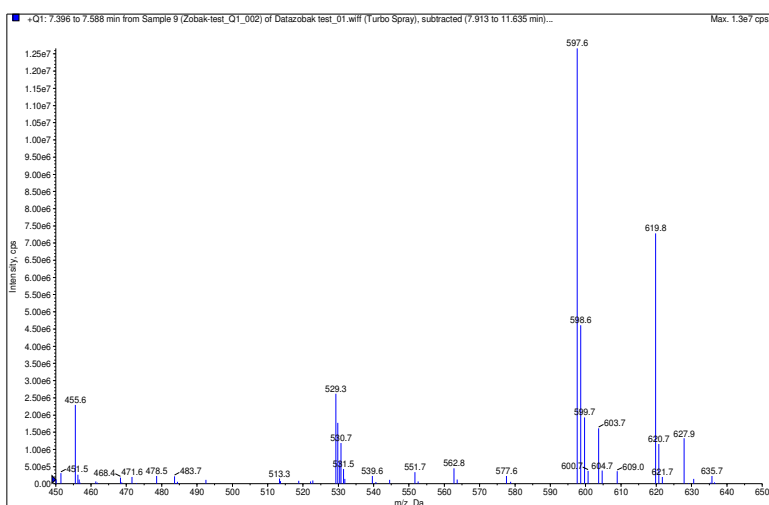
Obr. 5. Chromatogram zobáku. Červený záznam-astaxanthin, modrý záznam-adonirubin, doradexanthin



Obr. 6. Chromatogram adonirubinu.



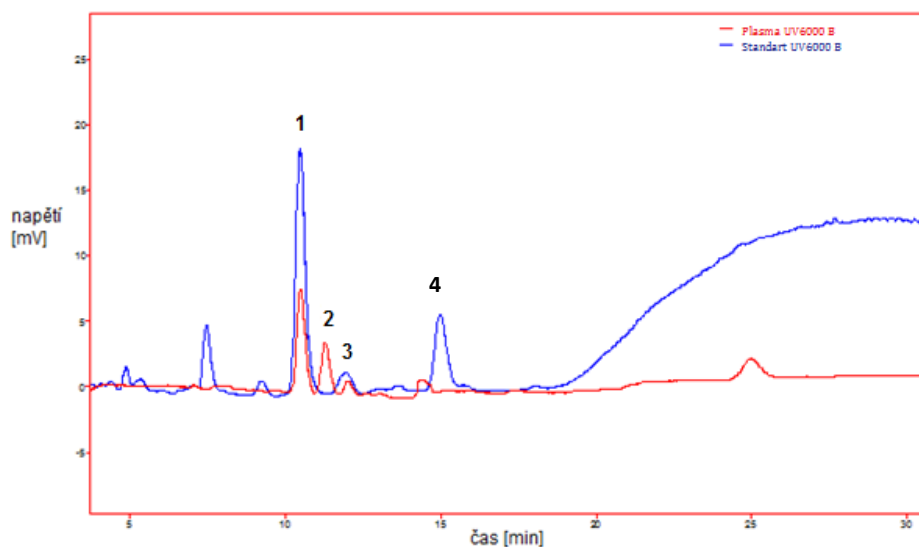
Obr. 7. Chromatogram doradexanthinu.



Obr. 8. Chromatogram astaxanthinu.

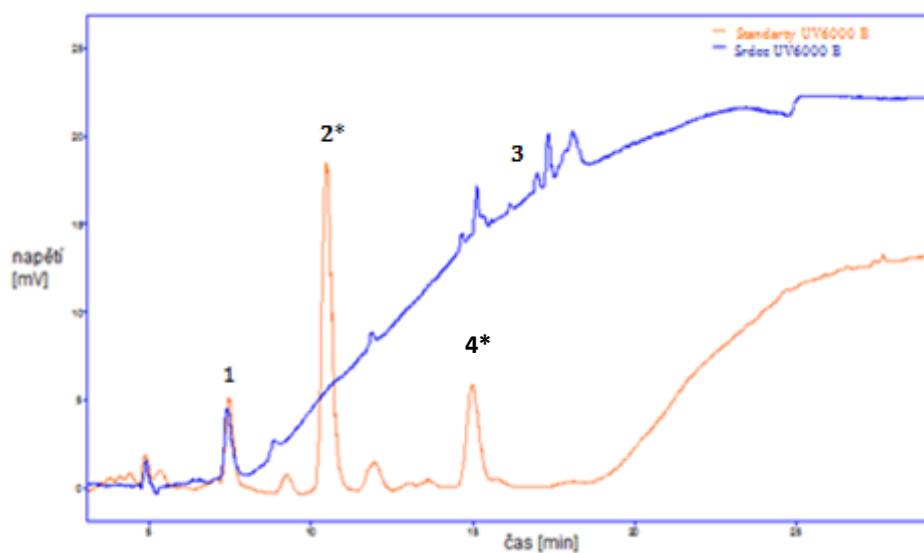
Adonirubin (Obr. 6) dosahuje maxima při molekulové hmotnosti (M_r 581,7). Jedná se o protonovaný molekulový iont (molekulový iont 580,8 + proton (H^+)). Doradexanthin (Obr. 7) dosahuje svého maxima při M_r 581,6 (též se jedná o protonovaný iont; $580,6 + H^+ = 581,6$). Dále tvoří sloučeninu se sodíkem (M_r 603,7 = $580,7 + 22,99$). Astaxanthin (Obr. 8) má stejnou M_r jako adonirubin (580,7). I zde astaxanthin vytváří protonovaný iont (581,7), dále tvoří sloučeninu se sodíkem (619,8) a s draslíkem (635,7).

V plasmě byly podle chromatogramů z HPLC detekovány následující karotenoidy: lutein, zeaxanthin a blíže neurčený xantofyl (Graf 6).

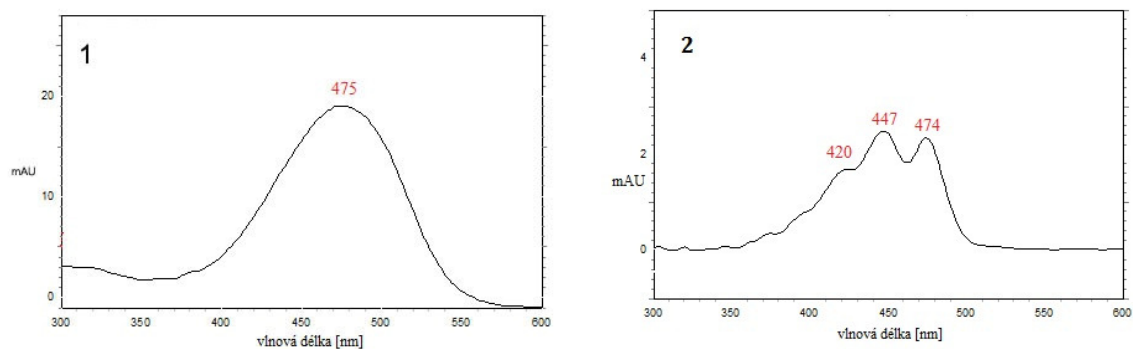


Graf 6. Chromatogram karotenoidů v plasmě. Modrý záznam = chromatogram standartu, červený záznam = chromatogram plasmy; 1- lutein, 2- zeaxanthin, 3 a 4- blíže neurčené xantofyly.

V srdci byl podle chromatogramů z HPLC detekován především lutein. Ostatní karotenoidy nebyly z důvodu problémů při měření vzorků srdcí na HPLC a pravděpodobné tvorbě esterů detekovány (Graf 7).



Graf 7. Chromatogram karotenoidů v srdci. Modrý záznam = chromatogram srdce, oranžový záznam = chromatogram standartů; 1- lutein, 2*-standart adonirubinu, 3- pravděpodobné karotenoidy, 4*- standart canthaxanthinu .



Obr. 9. Příklady spekter karotenoidů. 1- spektrum astaxanthinu ($\lambda_{Max} = 475$), 2- spektrum luteinu ($\lambda_{Max} = 420, 447, 474$).

5.3. Korelace mezi barevnými charakteristikami zobáku

Ptačí vizuální model popisuje barvu pomocí tří parametrů, které však mohou být navzájem korelované. Vzhledem k tomu, že tyto proměnné neměly normální rozložení, testovali jsme jejich vzájemné korelace pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Z Tab. 2 vyplývá, že všechny vizuální parametry byly navzájem korelované, přičemž nejsilnější korelace byla pozorována mezi barevným odstínem θ a UV odstínem φ , o něco slabší pak mezi oběma parametry popisujícími odstín a sytostí r_a . Jelikož byly všechny parametry navzájem silně korelované, použili jsme pro další analýzy barevný odstín θ , jako proměnnou reprezentující barvu zobáku. Nižší hodnoty θ znamenají červenější barvu, nižší hodnoty φ znamenají více UV složky a vyšší hodnoty r_a značí sytější barvu.

	θ	φ	r_a
θ		-0,97	-0,54
φ	<0,001		0,66
r_a	<0,001	<0,001	

Tab. 2. Korelace mezi jednotlivými parametry ptačího vizuálního modelu. Hodnoty pod diagonálou = Spearmanovy korelační koeficienty (r_s), hodnoty pod diagonálou = P hodnoty.

5.4. Korelace koncentrací karotenoidů mezi jednotlivými orgány a barvou zobáku v kontrolní skupině

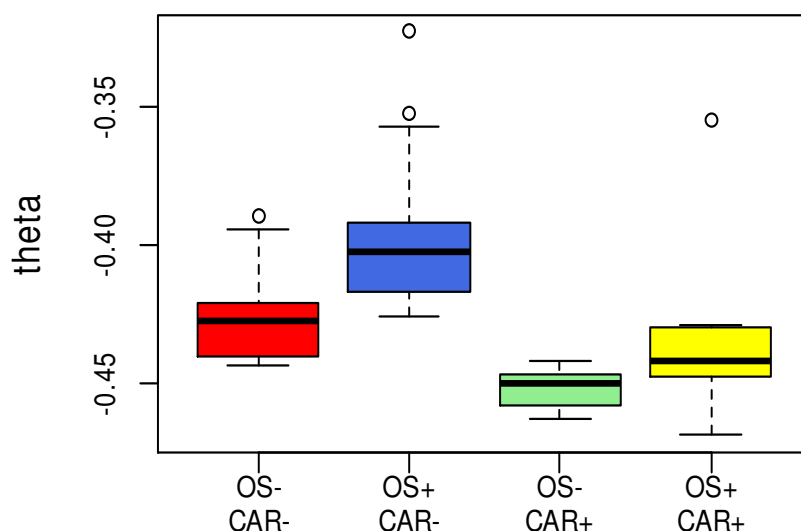
Množství karotenoidů v zobáku pozitivně korelovalo s barevným odstínem θ . U ostatních tkání nebyla pozorována žádná korelace mezi množstvím karotenoidů a θ zobáku (Tab. 3). Koncentrace karotenoidů v jednotlivých orgánech mezi sebou také nekorelovaly.

	θ	Zobák	Tuk	Srdce
θ		-0.63	-0.17	0.00
Zobák	0.004		0.03	-0.08
Tuk	0.488	0.898		0.03
Srdce	0.994	0.753	0.915	

Tab. 3. Korelace (r_s) koncentrací karotenoidů v orgánech a θ v kontrolní skupině.

5.5. Vliv manipulace oxidativní zátěže a příjmu karotenoidů na barvu zobáku a alokaci karotenoidů do vybraných orgánů

Barva zobáků v obou experimentech byla negativně ovlivněna zvýšenou oxidační zátěží. Vyšší příjem karotenoidů v potravě naopak vedl k větší barevnosti zobáků u obou experimentů. Kombinace zvýšené oxidační zátěže a vyššího příjmu karotenoidů neměla v obou experimentech na barvu zobáků žádný průkazný efekt (Tab 4-7, Graf 8 a 9).



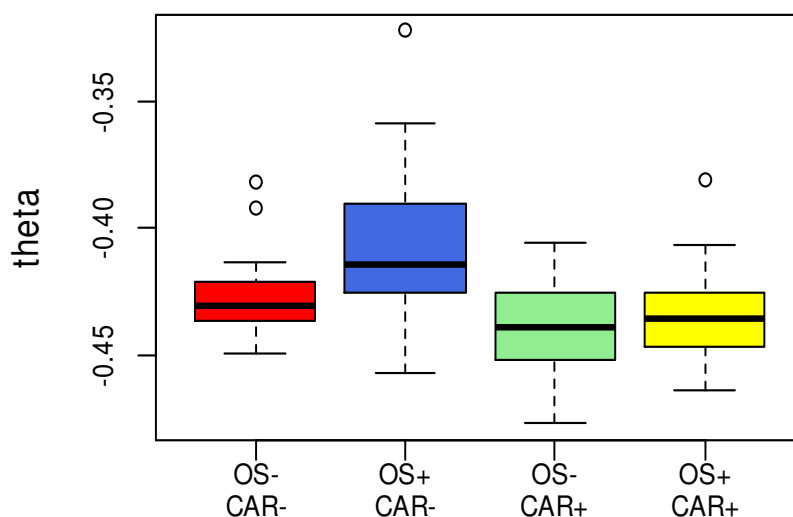
Graf 8. Barevnost zobáku z Experimentu 1. Nižší hodnoty θ znamenají červenější barvu.

		2011			
Skupina	N	medián	průměr	SEM	
OS- CAR-	15	-0,43	-0,43	0,004	
OS+ CAR-	13	-0,40	-0,39	0,008	
OS- CAR+	15	-0,45	-0,45	0,002	
OS+ CAR+	13	-0,44	-0,44	0,007	

Tab. 4. Barva zobáků na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Výraz	2011			
	koeficient	SEM	t	P
theta před experimentem	0,216	0,084	2,572	0,013
diquat	-0,726	0,166	-4,368	<0,001
karotenoidy	1,345	0,165	8,148	<0,001
diquat × karotenoidy	0,148	0,332	0,445	0,658

Tab. 5. Lineární model hodnotící vliv manipulace oxidační zátěže a příjmu karotenoidů na zabarvení zobáků. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.



Graf 9. Barevnost zobáku z Experimentu 2.

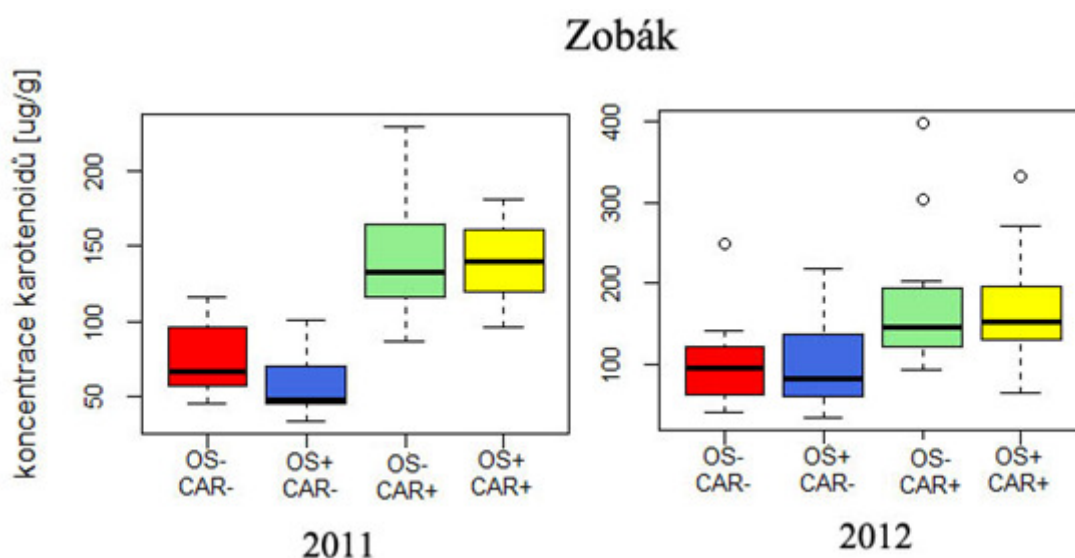
skupina		N	medián	průměr	SEM
OS-	CAR-	19	-0,43	-0,43	0,004
OS+	CAR-	18	-0,41	-0,41	0,007
OS-	CAR+	20	-0,44	-0,44	0,004
OS+	CAR+	19	-0,44	-0,43	0,005

Tab. 6. Barva zobáků na konci Experimentu 2. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Výraz	2012			
	koeficient	SEM	t	P
theta před experimentem	0,367	0,095	3,883	<0,001
diquat	-0,543	0,187	-2,9	0,004
karotenoidy	0,805	0,187	4,312	<0,001
diquat × karotenoidy	0,454	0,375	1,211	0,230

Tab. 7. Lineární model hodnotící vliv manipulace oxidační zátěže a příjmu karotenoidů na zabarvení zobáků. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.

Zvýšený příjem karotenoidů v potravě se odrazil v jejich vyšším ukládání v zobáku (Tab. 8 a 9; Graf 10). Zvýšená oxidační zátěž ani její interakce s příjmem karotenoidů neměly na množství karotenoidů v zobáku žádný signifikantní vliv. Tyto efekty byly podobné v obou experimentech (Tab. 8 a 9; Graf 10). Pouze v experimentu 1 byl pozorován nesignifikantní negativní vliv oxidační zátěže, přičemž v experimentu 2 byl efekt vysoce nevýznamný (Tab. 9).



Graf 10. Celková koncentrace karotenoidů v zobácích na konci obou experimentů.

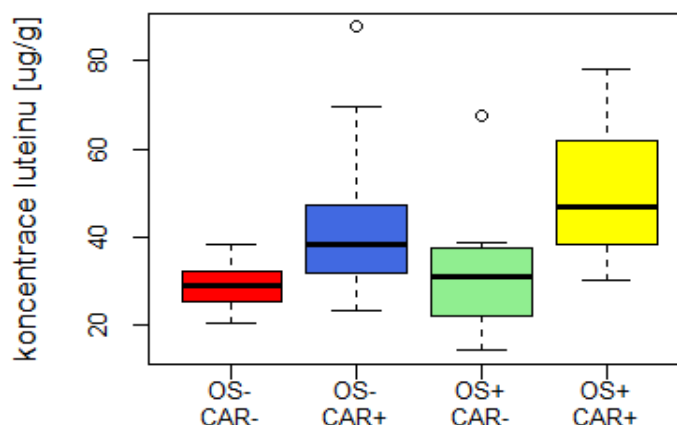
		2011				2012			
skupina	N	medián	průměr	SEM	N	medián	průměr	SEM	
OS- CAR-	15	66,34	75,03	6,06	19	95,33	99,84	11,00	
OS+ CAR-	13	47,97	58,78	5,86	18	81,97	102,43	13,11	
OS- CAR+	15	132,08	143,77	9,54	20	146,19	168,34	16,43	
OS+ CAR+	12	139,48	139,44	7,35	19	152,72	171,86	14,87	

Tab. 8. Celkové koncentrace karotenoidů v zobácích na konci obou experimentů. (N= počet jedinců, SEM= střední chyba průměru).

Prediktor	2011				2012			
	koeficient	SE	t	P	koeficient	SE	t	P
diquat	-0,266	0,155	-0,169	0,098	0,014	0,196	0,069	0,945
karotenoidy	1,606	0,155	10,383	<0,001	1,085	0,196	5,530	<0,001
diquat × karotenoidy	0,416	0,311	1,339	0,186	0,075	0,393	0,191	0,846

Tab. 9. Vliv manipulace oxidační zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na celkové množství karotenoidů v zobáku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.

Dále byl v experimentu 1 analyzován vliv manipulací na jednotlivé karotenoidy v zobáku. Vyšší příjem karotenoidů v potravě měl za následek vyšší zobákové koncentrace luteinu (Tab. 10 a 11, Graf 11), doradexantinu (Tab. 12 a 13, Graf 12) a adonirubinu (Tab. 14 a 15, Graf 13) a naopak nižší koncentrace astaxantinu (Tab. 16 a 17, Graf 14). Naopak vliv zvýšené oxidační zátěže ani její interakce s příjmem karotenoidů na koncentrace jednotlivých karotenoidů v zobáku nebyly statisticky průkazné.



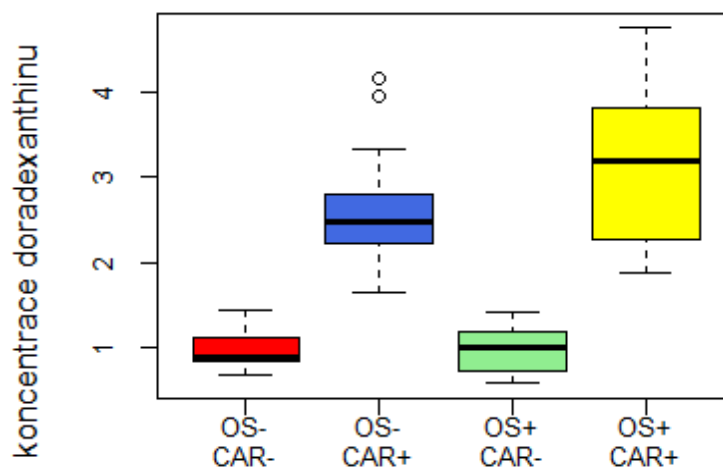
Graf 11. Koncentrace luteinu v zobácích z Experimentu 1.

skupina	N	medián	průměr	SEM
OS- CAR-	15	29,15	28,95	1,26
OS+ CAR-	13	30,9	31,99	3,69
OS- CAR+	15	38,29	43,62	4,57
OS+ CAR+	12	38,34	49,85	4,11

Tab. 10. Koncentrace astaxanthinu v zobácích na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Prediktor	koeficient	SE	t	P
diquat	0,249	0,227	1,094	0,279
karotenoidy	1,111	0,226	4,909	<0,001
diquat × karotenoidy	0,357	0,454	0,785	0,436

Tab. 11. Vliv manipulace oxidační zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na množství luteinu v zobáku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.



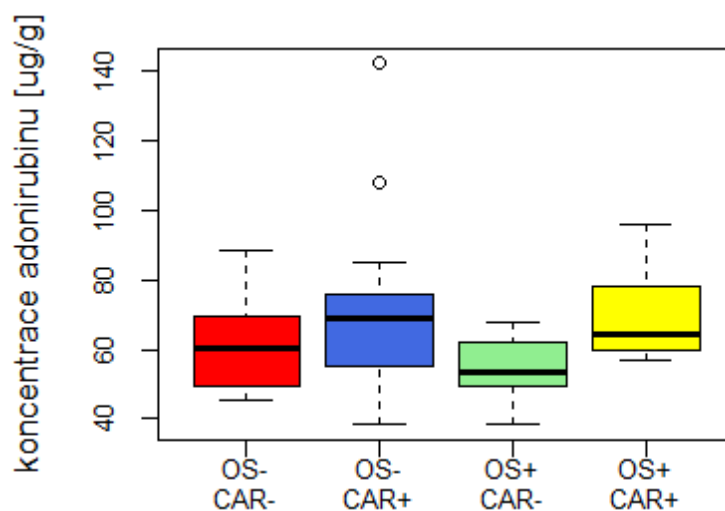
Graf 12. Koncentrace doradexanthinu v zobácích z Experimentu 1. Koncentrace jsou vyjádřeny relativně k průměru kontrolní skupiny.

skupina	N	medián	průměr	SEM
OS- CAR-	15	0,89	1,00	0,06
OS+ CAR-	13	1,00	0,99	0,08
OS- CAR+	15	2,48	2,62	0,18
OS+ CAR+	12	3,19	3,07	0,27

Tab. 12. Koncentrace astaxanthinu v zobácích na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru. Koncentrace jsou vyjádřeny relativně k průměru kontrolní skupiny.

Prediktor	koeficient	SE	t	P
diquat	0,102	0,128	0,796	0,430
karotenoidy	1,756	0,127	13,819	<0,001
diquat × karotenoidy	0,289	0,255	1,132	0,263

Tab. 13. Vliv manipulace oxidativní zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na množství doradexanthinu v zobáku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.



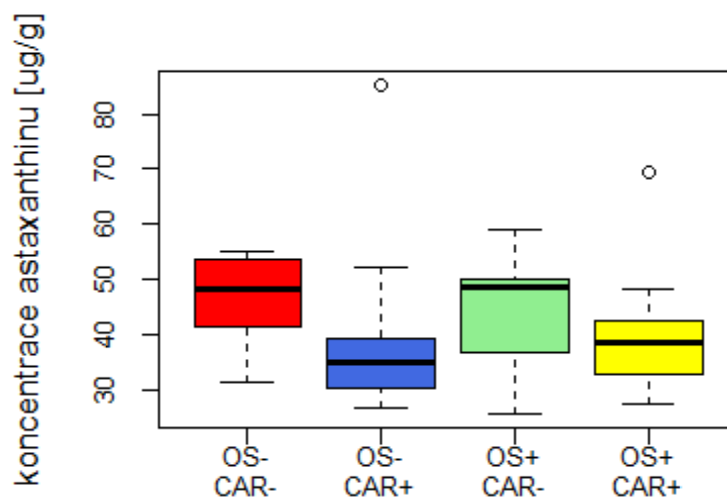
Graf 13. Koncentrace adonirubinu v zobácích z Experimentu 1.

skupina		N	medián	průměr	SEM
OS-	CAR-	15	60,43	61,56	3,22
OS+	CAR-	13	53,52	53,89	2,88
OS-	CAR+	15	68,9	72,17	6,53
OS+	CAR+	12	64,59	69,88	3,84

Tab. 14. Koncentrace adonirubinu v zobácích na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Prediktor	koeficient	SE	t	P
diquat	-0,257	0,251	-1,022	0,312
karotenoidy	0,751	0,250	3,001	0,004
diquat × karotenoidy	0,629	0,503	1,251	0,217

Tab. 15. Vliv manipulace oxidativní zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na množství adonirubinu v zobáku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.



Graf 14. Koncentrace astaxanthinu v zobáčích z Experimentu 1.

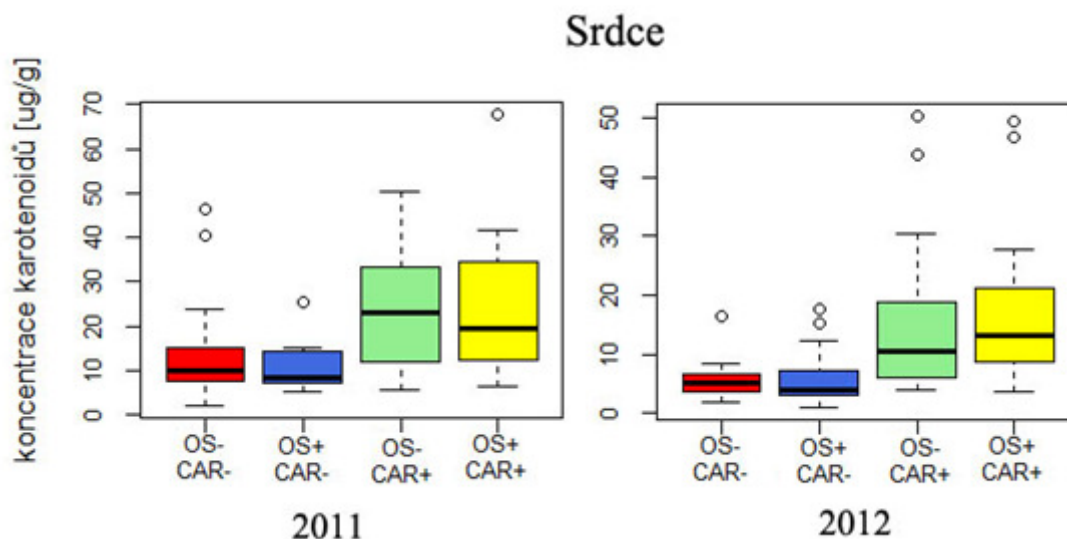
skupina	N	medián	průměr	SEM
OS- CAR-	15	48,17	46,73	1,91
OS+ CAR-	13	48,42	44,35	2,86
OS- CAR+	15	34,8	38,69	3,78
OS+ CAR+	12	38,34	39,83	3,13

Tab. 16. Koncentrace astaxanthinu v zobáčích na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Prediktor	koeficient	SE	t	P
diquat	-0,035	0,258	-0,136	0,893
karotenoidy	-0,704	0,257	-2,739	0,008
diquat × karotenoidy	0,527	0,516	1,022	0,312

Tab. 17. Vliv manipulace oxidativní zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na množství astaxanthinu v zobáku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.

Pozitivní vliv vyššího příjmu karotenoidů v potravě se projevili též na celkové koncentraci karotenoidů v srdci (Tab. 18 a 19; Graf 15). Manipulace oxidační zátěže ani její interakce s příjmem karotenoidů nebyly statisticky významné. Tyto efekty byly konzistentní v obou experimentech (Graf 18).



Graf 15. Celková koncentrace karotenoidů v srdcích na konci obou experimentů.

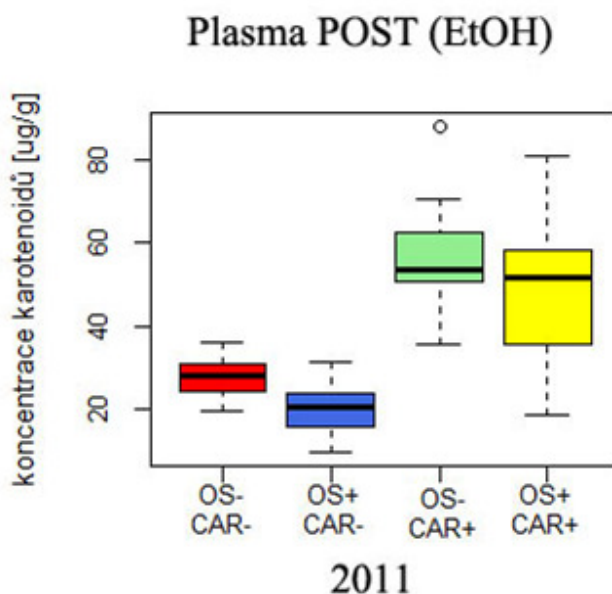
skupina	N	2011			2012			
		medián	průměr	SEM	N	medián	průměr	SEM
OS- CAR-	15	10,05	14,86	3,28	19	5,25	5,63	0,75
OS+ CAR-	11	8,31	11,03	1,80	18	4,04	5,85	1,08
OS- CAR+	15	23,23	31,87	8,81	20	10,34	15,35	2,96
OS+ CAR+	12	19,35	24,72	5,09	19	13,18	17,21	2,91

Tab. 18. Celkové koncentrace karotenoidů v srdcích na konci obou experimentů. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

Prediktor	2011				2012			
	koeficient	SE	t	P	koeficient	SE	t	P
diquat	-0,084	0,261	-0,323	0,748	0,067	0,188	0,358	0,722
karotenoidy	0,831	0,259	3,206	0,002	1,176	0,188	6,265	<0,001
diquat × karotenoidy	0,187	0,522	0,359	0,721	0,320	0,376	0,852	0,397

Tab. 19. Vliv manipulace oxidační zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na karotenoidy v srdci. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.

Pozitivní vliv vyššího příjmu karotenoidů v potravě se též projevil na celkové koncentraci karotenoidů v plasmě (Tab. 20 a 21; Graf 16). Oxidační zátěž naopak způsobila snížení plasmatických koncentrací karotenoidů. Interakce obou faktorů nebyla pozorována. Výsledky z plasmy po experimentu jsou pouze z Experimentu 1. Analýza plasmy z Experimentu 2 z důvodu nedostatku materiálu nebyla provedena.



Graf 16. Celková koncentrace karotenoidů v plasmě na konci Experimentu 1.

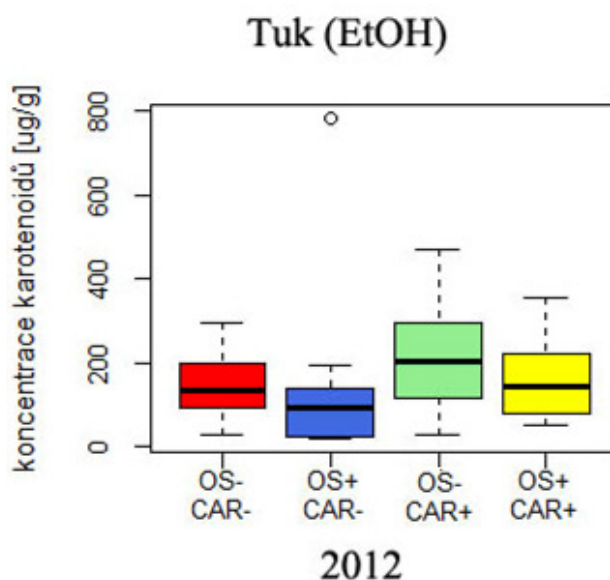
		2011			
skupina	N	medián	průměr	SEM	
OS- CAR-	15	28,44	27,44	1,27	
OS+ CAR-	13	20,80	19,91	1,94	
OS- CAR+	14	53,60	55,76	3,58	
OS+ CAR+	12	51,52	48,84	4,94	

Tab. 20. Celkové koncentrace karotenoidů v plasmě na konci Experimentu 1. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

		2011			
Prediktor	koeficient	SE	t	P	
plasma před experimentem	0,310	0,071	4,347	<0,001	
diquat	-0,421	0,141	-2,986	0,005	
karotenoidy	1,560	0,141	11,078	<0,001	
diquat × karotenoidy	0,173	0,282	0,615	0,542	

Tab. 21. Lineární model hodnotící vliv manipulace oxidační zátěže a příjmu karotenoidů na koncentraci karotenoid v plasmě. Koeficient udává standardizovanou velikost účinku.

Vyšší příjem karotenoidů zvýšil také koncentrace karotenoidů v tuku v Experimentu 2 (Tab. 22 a 23; Graf 17). Zvýšená oxidační zátěž měla naopak za následek hraničně nesignifikantní pokles karotenoidů v tuku. Analýza z Experimentu 1 nebyla z důvodu nedostatku materiálu provedena.



Graf 17. Celková koncentrace karotenoidů v tuku na konci Experimentu 2.

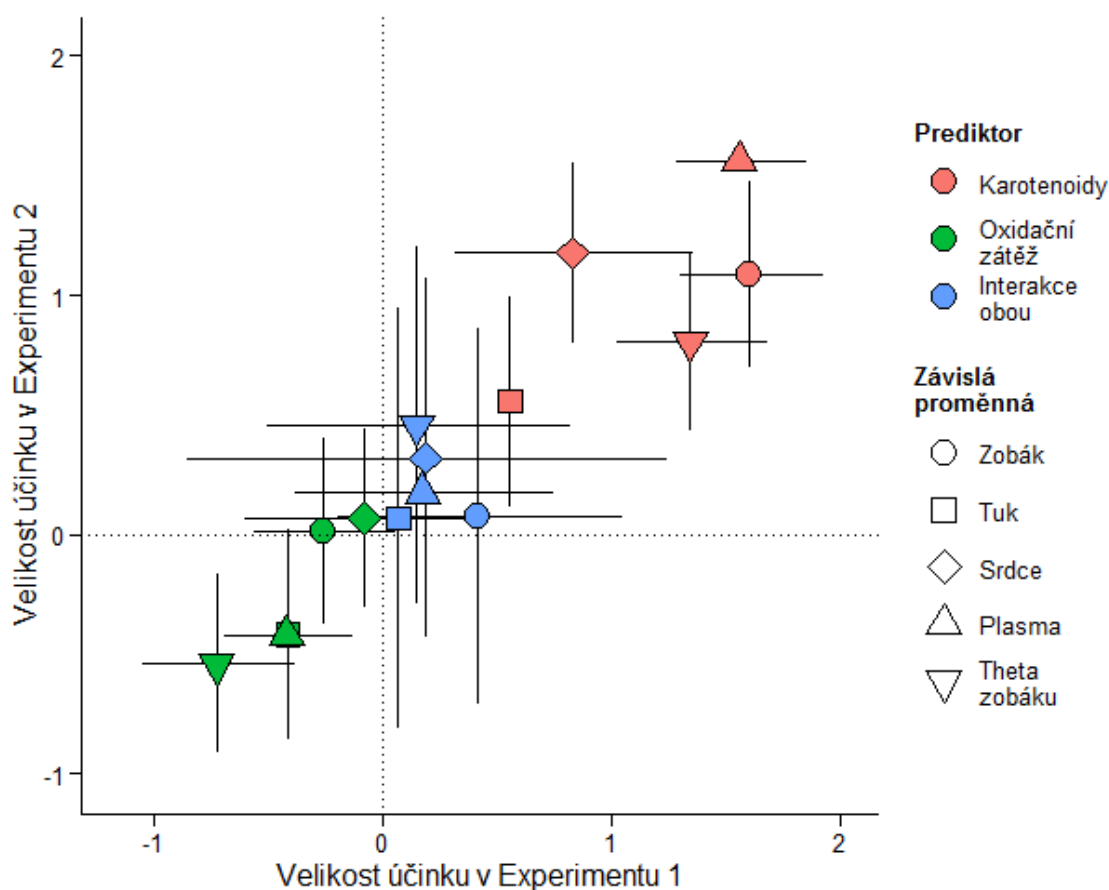
		2012			
skupina	N	medián	průměr	SEM	
OS- CAR-	19	136,69	145,34	17,97	
OS+ CAR-	18	92,25	129,34	40,73	
OS- CAR+	20	202,94	219,35	28,27	
OS+ CAR+	18	143,47	161,46	21,74	

Tab. 22. Celkové koncentrace karotenoidů v tuku na konci Experimentu 2. N = počet jedinců, SEM = střední chyba průměru.

		2012			
Prediktor	koeficient	SE	t	P	
diquat	-0,417	0,221	-1,889	0,063	
karotenoidy	0,556	0,221	2,520	0,014	
diquat × karotenoidy	0,0682	0,442	0,154	0,878	

Tab. 23. Vliv manipulace oxidační zátěže, příjmu karotenoidů a jejich interakce na karotenoidy v tuku. Koeficient je standardizovaný parciální regresní koeficient a udává standardizovanou velikost účinku.

Srovnání standardizovaných velikostí účinku (standardních parciálních regresních koeficientů) ukázalo konzistentní pozitivní vliv na všechny měřené parametry – tzn. na barvu zobáku a na koncentrace karotenoidů ve všech analyzovaných orgánech (Graf 18). Naopak zvýšená oxidační zátěž měla negativní vliv pouze na barvu zobáku a koncentraci karotenoidů v krevní plasmě a hraničně nevýznamný negativní vliv na koncentraci karotenoidů v tuku. Oba faktory spolu v žádné analýze nijak významně neinteragovaly.



Graf 18. Srovnání účinků zvýšené oxidativní zátěže a podávání karotenoidů na barvu zobáku a množství karotenoidů v orgánech. Zobrazeny jsou standardizované parciální regresní koeficienty a jejich 95% konfidenční intervaly. Hodnoty plasmy jsou pouze z Experimentu 1, hodnoty tuku jsou pouze z Experimentu 2.

6. Diskuze

6.1. Porovnání výtěžnosti dvou extrakčních metod

Z porovnání výtěžností karotenoidů mezi extrakcí s a bez EtOH je patrné, že větší výtěžnost byla u extrakce s EtOH (Graf 4). Původně jsme předpokládali, že extrakce s EtOH by mohla mít větší ztráty karotenoidů z důvodu mísitelnosti EtOH s vodou. Po centrifugaci se totiž odebírala jen svrchní fáze organických rozpouštědel. Po porovnání dvou výše zmíněných postupů u tkání srdce a plasmy je patrné že tomu tak není, proto extrakce ostatních vzorků probíhala s přidáním EtOH. Ztráty karotenoidů při extrakci bez EtOH byly pravděpodobně zapříčiněny faktem, že samotná směs HEX:TBME extrahovala z tkáně především karoteny, zatímco EtOH jako polární rozpouštědlo extrahuje převážně xantofyly. Zároveň EtOH slouží k vysrážení proteinů např. v séru a plasmě, a tím předchází ucpání kolony na HPLC (Amorim-Carrilho et al., 2014).

6.2. Izolované karotenoidy z tkání

Pomocí HPLC byly detekovány karotenoidy obsažené v zobáku, srdci a plasmě. Při detekci jednotlivých karotenoidů v tkáních pomocí HPLC jsme s jistotou byli schopni detekovat pouze astaxanthin (zobák), lutein (zobák, srdce, plasma), doradexanthin (zobák), adonirubin (zobák) a zeaxanthin (plasma). Ostatní karotenoidy vytvářely buď směs esterů, nebo jsme karotenoid nebyli schopni identifikovat (Graf 5 a 7). McGraw & Toomey (2010) v plasmě zebřiček pestrých identifikovali oproti nám navíc cryptoxanthin a 3'-anhydrolutein, v zobáku navíc identifikovali canthaxanthin. Červené ketokarotenoidy byly identifikovány pouze v zobáku, což souhlasí s pozorováním McGraw & Toomey (2010) a potvrzuje tak domněnku, že červené ketokarotenoidy vznikají přímo v zobáku. Rozdíly v úspěšnosti detekce karotenoidů jsou dány pravděpodobně rozdílnou metodou extrakce karotenoidů u zobáku, kdy autoři článku extrahovali karotenoidy pomocí saponifikace. Metodu saponifikace pomocí KOH jsme také vyzkoušeli, ale docházelo nám k blednutí vzorků a vznikaly velké ztráty karotenoidů, proto jsme tuto metody nepoužili.

V obou experimentech byly naměřeny nižší hodnoty karotenoidů v zobácích, naopak hodnoty v plasmě a tuku jsme naměřili vyšší, než jaké naměřili McGraw & Toomey (2010),

kteří také studovali množství karotenoidů ve vybraných tkáních zebřiček pestrých. V Experimentu 1 a 2 bylo naměřeno největší množství karotenoidů v tukové tkáni a v zobáku. McGraw & Toomey detekovali mnohem větší množství karotenoidů v zobáku (cca 400 $\mu\text{g/g}$), a naopak o něco menší množství v plasmě (18,8 $\mu\text{g/ml}$) a menší množství v tuku (cca 50 $\mu\text{g/g}$) oproti našim experimentům. Hodnoty stanovené z měření celkové absorbance z našich experimentů byly u zobáku v kontrolní skupině průměrně $75,03 \pm 6,06$; u plasmy činily $27,44 \pm 1,27$ a u tuku byly $145,34 \pm 17,97$. Rozdíly v množství izolovaných karotenoidů z tkání oproti hodnotám z článku mohou být způsobeny rozdílnou metodikou. McGraw & Toomey ve svém experimentu pro detekci a kvantifikaci karotenoidů použili HPLC, takže detekovali konkrétní karotenoidy. V našich experimentech jsme kvantifikovali zastoupení karotenoidů z výsledků měření na spektrofotometru, které měří absorbanci všech přítomných karotenoidů a jejich esterů. To by mohlo vysvětlovat vyšší hodnoty karotenoidů v našem experimentu u plasmy a tuku. Je však možné, že měření pomocí absorbance podhodnocuje množství červených ketokarotenoidů, což by mohlo vysvětlovat námi naměřené nižší hodnoty v zobáku. To, že kvantifikace pomocí absorbance může množství karotenoidů v zobáku podhodnocovat, naznačuje fakt, že součet koncentrací adonirubinu, astaxanthinu a luteinu kvantifikovaných v našem experimentu pomocí HPLC, dává přibližně dvojnásobnou koncentraci karotenoidů než analýza stejných vzorků zobáku pomocí absorbance. Skutečné koncentrace však budou pravděpodobně ještě vyšší, neboť v tomto součtu není z důvodu absence standardu započítán pravděpodobně nejabundantnější karotenoid doradexanthin (derivát luteinu), ani karotenoidní estery, které mohou tvořit největší část karotenoidů alokovaných v zobáku. Vliv věku na množství karotenoidů také není zanedbatelný, bylo například pozorováno, že mladší jedinci mají světlejší a méně červený zobák než starší jedinci (Burley & Coopersmith, 1987). McGraw & Toomey používali jedince staré přibližně 3 roky, zatímco v našich experimentech byli jedinci staří okolo 1 roku.

6.3. Manipulace hladiny oxidativního stresu a příjmu karotenoidů v potravě

Barva zobáku byla negativně ovlivněna zvýšeným oxidačním stresem, během kterého došlo ke snížení barevnosti zobáku. Naopak podávání vyššího množství karotenoidů v potravě vedlo k většímu zbarvení zobáku. Tyto efekty byly pozorovány u obou experimentů.

V zobáku byl navíc studován vliv vysoké oxidační zátěže a vyšší příjem karotenoidů v potravě na množství karotenoidů v tkáni. Efekt na koncentraci karotenoidů měl pouze vyšší příjem karotenoidů. U luteinu, doradexanthinu a adonirubinu došlo ke zvýšení jejich koncentrace. Zvýšení koncentrace luteinu a doradexanthinu je pravděpodobně v důsledku vysokého množství luteinu v experimentální potravě, lutein totiž slouží jako prekurzor pro tvorbu doradexanthinu (Prum et al., 2012). Pouze u astaxanthinu došlo naopak ke snížení jeho koncentrace. Pokles astaxanthinu, který vzniká metabolizací zeaxanthinu, který byl v potravě také přidáván, nedovedeme uspokojivě vysvětlit. Možná byl astaxanthin využit jinde v těle, nebo možná existuje mezi zeaxanthinem a luteinem kompetice o společný enzym v jejich metabolismu nebo o společný přenašeč při vstřebávání. Protože lutein byl nejvíce zastoupeným karotenoidem v potravě, mohl, pokud nějaká kompetice existuje, přednostně interagovat se společným enzymem/přenašečem. Pokles v koncentraci žlutého karotenoidu astaxanthinu by částečně mohl podporovat hypotézu sdílených drah. Ovšem u ostatních karotenoidů k poklesu koncentrace v důsledku zvýšené oxidační zátěže nedošlo a poměr mezi žlutými a červenými karotenoidy se proto nijak výrazně nezměnil. Celkově tedy tyto výsledky hypotézu sdílených drah spíše nepodporují.

Vyšší oxidační zátěž nevedla ke snížení množství karotenoidů v zobáku. Množství karotenoidů bylo ovlivněno pouze vyšším příjmem karotenoidů z potravy. Pokud během vyšší oxidační zátěže došlo v zobáku ke ztrátě barvy, ale nedošlo k úbytku karotenoidů, vyvstává otázka, zda jsou karotenoidy jediným faktorem, zodpovědným za zbarvení zobáku u zebřičky pestré. Efekt zvýšené oxidační zátěže na barvu zobáku pravděpodobně ovlivňuje jinou kvalitu zobáku než množství karotenoidů. Vzhledem k tomu, že velká část karotenoidů je v zobáku vázána v esterech, je také možné, že oxidační zátěž koncentraci karotenoidů v zobáku opravdu snížila, ale námi zvolená metoda extrakce, která neumožňuje uvolnění esterifikovaných karotenoidů, nemusela tuto změnu zachytit. Pro další využití zebřičky pestré k výzkumu kondiční závislosti karotenoidních signálů bude tedy nezbytně nutné určit, od jaké míry jsou karotenoidy zodpovědné za zbarvení zobáku a nakolik se na zbarvení podílí další, dosud nepoznané faktory.

Vyšší oxidační zátěž vedla k statisticky významnému snížení karotenoidů v plasmě. Náznak poklesu koncentrace karotenoidů je ovšem patrný i tuku, i když je statisticky nevýznamný. Pokud by karotenoidy měly, jak předpokládá handicapová hypotéza, prooxidační účinky, tělo by mělo tendenci se jich při vyšší oxidační zátěži zbavovat, aby zabránilo jejich zvýšeným toxickým účinkům. Tento efekt by měl být výrazný především v životně důležitých orgánech jako je srdce, a to zejména v kombinaci zvýšené oxidační zátěže

a vysokého příjmu karotenoidů. Oxidační zátěž však koncentraci karotenoidů v srdci nijak neovlivnila, což naznačuje, že handicapová hypotéza není pravděpodobný mechanismus signalizace čestnosti karotenoidní signalizace.

Další hypotéza předpokládá, že karotenoidy při reakci s RONS ztrácejí svojí barvu, ale redoxní stav organismu neovlivňují. Proto by při vyšší oxidační zátěži a to i v kombinaci s vyšším příjmem karotenoidů v potravě mělo dojít ve všech orgánech k přibližně podobnému poklesu karotenoidů. Jak už jsem zmínila výše, tento efekt nenastal ani v jednom z experimentů. Ani tato hypotéza se proto nezdá být pravděpodobná.

Trade-off hypotéza předpokládá, že karotenoidy mají antioxidační vlastnosti, díky nimž by při zvýšené oxidační zátěži měly být lokalizovány v životně důležitých orgánech (v našich experimentech představovalo životně důležitý orgán srdce). Při zvýšené oxidační zátěži zůstala koncentrace karotenoidů v srdci v obou experimentech neměnná, přestože došlo k poklesu (byť hraničně nesignifikantnímu) množství karotenoidů v tuku. Je tedy možné, že si tělo při vyšší oxidační zátěži snaží udržet jejich konstantní množství v životně důležitých orgánech, což by naznačovalo platnost trade-off mechanismu. Jak již bylo zmíněno, nedošlo však ani k poklesu množství karotenoidů v zobáku, což trade-off hypotéza předpokládá (Alonso-Alvarez et al., 2011). Je však možné, že zásoby karotenoidů v tuku byly dostatečné na to, aby zabezpečily stabilní koncentrace karotenoidů v srdci a i v zobáku zároveň. Snížení barvy zobáku bez snížení koncentrace karotenoidů v tomto orgánu však naznačuje, že mechanismy, jakými je kondiční závislost karotenoidních ornamentů je komplexnější, než současné hypotézy předpokládají.

7. Závěr

Experimentální manipulací oxidační zátěže a příjmu karotenoidů v potravě jsme testovali predikce hypotéz vysvětlující kondiční závislost karotenoidních ornamentů. Výsledky experimentů nepodporují hypotézy navržené jako alternativy k nejčastěji diskutované trade-off hypotéze, tedy handicapovou hypotézu, hypotézu ochrany karotenoidů, ani hypotézu sdílených drah. Na druhou stranu i trade-off mechanismus předpokládající antioxidační vlastnosti karotenoidů byl našimi výsledky podpořen pouze částečně a problematika signalizace kondice prostřednictvím karotenoidních ornamentů bude pravděpodobně mnohem složitější, než předpokládají současné hypotézy.

Vyšší oxidační zátěž snížila barevnost zobáků, ale neovlivnila koncentraci karotenoidů v zobáku. Barva zobáků zebříček pestrých proto nemusí být dána pouze přítomností karotenoidů. Toto téma si určitě zaslouží další studium mechanismů, jakými oxidační stres ovlivňuje zbarvení zobáku u tohoto druhu. Pokud by byla změna barvy opravdu do určité míry nezávislá na obsahu karotenoidů v zobáku, je otázka, zdali je zebříčka pestrá vůbec vhodným modelovým organismem pro studium čestnosti signalizace kondice prostřednictvím karotenoidních ornamentů.

Důležitým poznatkem je také absence jakýchkoliv korelací mezi koncentrací karotenoidů v různých orgánech. To by mohlo opravdu naznačovat redistribuci karotenoidů podle momentálních potřeb organismu a tedy alokační trade-off. Ukazuje to však také na nedostatečnost měření koncentrace karotenoidů v plasmě, jako ukazatele množství karotenoidů v celém organismu. Pro detailní pochopení karotenoidní signalizace a redistribuce karotenoidů v organismu bude nutné analyzovat koncentrace a zastoupení jednotlivých karotenoidů v různých orgánech, nejlépe ve spojení s jejich značením pomocí různých izotopů.

8. Použitá literatura

ANDERSSON, M. *Sexual selection*. Princeton, N.J.: Princeton University Press, c1994, xx, 599 p. ISBN 0691000573.

ALBANES, D., et al. α -Tocopherol and β -carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, 88.21: 1560-1570.

ALONSO-ALVAREZ, C., et al. An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American Naturalist*, 2004, 164.5: 651-659.

ALONSO-ALVAREZ, C., et al. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2007, 274.1611: 819-825.

ALONSO-ALVAREZ, C., et al. The oxidation handicap hypothesis and the carotenoid allocation trade-off. *Journal of evolutionary biology*, 2008, 21.6: 1789-1797.

ALONSO-ALVAREZ, C.; GALVÁN, I.. Free radical exposure creates paler carotenoid-based ornaments: a possible interaction in the expression of black and red traits. *PLoS One*, 2011, 6.4: e19403-e19403.

AMORIM-CARRILHO, K. T., et al. Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 56: 49-73.

ANDERSSON, M.; SIMMONS, L. W. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, 2006, 21.6: 296-302.

BARBER, I., et al. Indirect fitness consequences of mate choice in sticklebacks: offspring of brighter males grow slowly but resist parasitic infections. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2001, 268.1462: 71-76.

BARBOSA-FILHO, J. M., et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2008, 18.1: 135-154.

BARRACLOUGH, T. G.; HARVEY, P. H.; NEE, S.. Sexual selection and taxonomic diversity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1995, 259.1355: 211-215.

BAYR, H.. Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 2005, 33.12: S498-S501.

BERTRAND, S.; FAIVRE, B.; SORCI, G.. Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants?. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209.22: 4414-4419.

- BIRKHEAD, T. R.; FLETCHER, F.; PELLATT, E. J. Sexual selection in the zebra finch *Taeniopygia guttata*: condition, sex traits and immune capacity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1998, 44.3: 179-191.
- BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; MØLLER, A. P.. Why egg yolk is yellow. *Trends in Ecology & Evolution*, 2000, 15.2: 47-49.
- BLOUNT, J. D., et al. Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science*, 2003, 300.5616: 125-127.
- BÖHM, F., et al. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *Journal of the american chemical society*, 1997, 119.3: 621-622.
- BONNEH-BARKAY, D., et al. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Molecular brain research*, 2005, 134.1: 52-56.
- BOONSTRA, R.. Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*, 2013, 27.1: 11-23.
- BRITTON, G.. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 1995, 9.15: 1551-1558.
- BRITTON, G., S LIAAEN-JENSEN a H PFANDER. *Carotenoids*. Boston: Birkhäuser Verlag, 1995, 5 v. in 6. ISBN 97837643750035-.
- BUCHANAN, K. L. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 2000, 15.4: 156-160.
- BURLEY, N.; COOPERSMITH, C. B.. Bill color preferences of zebra finches. *Ethology*, 1987, 76.2: 133-151.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2011, 25.3: 287-299.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29.3: 222-230.
- COLLINS, S. A.; TEN C. C. Does beak colour affect female preference in zebra finches?. *Animal Behaviour*, 1996, 52.1: 105-112.
- COSTANTINI, D.; MØLLER, A. P. Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, 2008, 22.2: 367-370.
- COTTON, S., et al. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis?. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 2004, 271.1541: 771-783.

- CRAFT, N. E.; SOARES, J. H. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and beta.-carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40.3: 431-434.
- DAVIES, Kelvin JA, et al. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: *Biochemical Society Symposia*. PORTLAND PRESS-LONDON, 1995. p. 1-32.
- DEL RIO, C. M.. Can passerines synthesize vitamin C?. *The Auk*, 1997, 513-516.
- DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B.. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain research*, 1997, 759.1: 67-75.
- DROUIN, G.; GODIN, J. R.; PAGÉ, Benoît. The genetics of vitamin C loss in vertebrates. *Current genomics*, 2011, 12.5: 371.
- EL-AGAMEY, A., et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 430.1: 37-48.
- ENDLER, J. A. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 1980, 76-91.
- ERAUD, C., et al. Environmental stress affects the expression of a carotenoid-based sexual trait in male zebra finches. *The Journal of experimental biology*, 2007, 210.20: 3571-3578.
- FAIVRE, B., et al. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science*, 2003, 300.5616: 103-103.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408.6809: 239-247.
- FISHER, R. A.. *The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition*. Oxford University Press, 1930. ISBN 0198504403.
- FISHER, R. A.. *The genetical theory of natural selection: by R.A. Fisher ; edited with a foreword and notes by J.H. Bennett*. A complete variorum ed. Oxford: Oxford University Press, c1999, xxii, 318 p. ISBN 0198504403.
- FITZE, P. S., et al. Carotenoid-Based Plumage Colors and Immune Function: Is There a Trade-Off for Rare Carotenoids?. *the american naturalist*, 2007, 169.S1: S137-S144.
- FORMAN, H. J.; TORRES, M.. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002, 166.supplement_1: S4-S8.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 2004, 43.3: 228-265.

- FROMHAGE, L.; KOKKO, H.; REID, J. M. Evolution of mate choice for genome-wide heterozygosity. *Evolution*, 2009, 63.3: 684-694.
- FUSSELL, K. C., et al. Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50.7: 874-882.
- GALVÁN, I.; GHANEM, G.; MØLLER, A. P. Has removal of excess cysteine led to the evolution of pheomelanin?. *BioEssays*, 2012, 34.7: 565-568.
- GARCÍA-DE BLAS, E., et al. Astaxanthin and papilioerythrinone in the skin of birds: a chromatic convergence of two metabolic routes with different precursors?. *Naturwissenschaften*, 2014, 101.5: 407-416.
- GIRAUDEAU, M., et al. Effects of carotenoid and vitamin E supplementation on oxidative stress and plumage coloration in house finches (*Haemorhous mexicanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166.3: 406-413.
- GRAY, D. A. Carotenoids and sexual dichromatism in North American passerine birds. *American Naturalist*, 1996, 453-480.
- GRUSZECKI, W. I. Carotenoids in membranes. In: *The photochemistry of carotenoids*. Springer Netherlands, 1999. p. 363-379.
- HADFIELD, J. D.; OWENS, I. P. F. Strong environmental determination of a carotenoid-based plumage trait is not mediated by carotenoid availability. *Journal of evolutionary biology*, 2006, 19.4: 1104-1114.
- HAMILTON, W. D.; ZUK, M.. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science*, 1982, 218.4570: 384-387.
- HART, N. S.; VOROBYEV, M.. Modelling oil droplet absorption spectra and spectral sensitivities of bird cone photoreceptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 2005, 191.4: 381-392.
- HARTLEY, R. C.; KENNEDY, M. W. Are carotenoids a red herring in sexual display?. *Trends in Ecology & Evolution*, 2004, 19.7: 353-354.
- HILL, G. E. Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. 1991.
- HILL, G. E. Proximate basis of variation in carotenoid pigmentation in male house finches. *Auk*, 1992, 109.1: U1-12.
- HILL, G. E., et al. Influence of dietary carotenoids on plasma and plumage colour in the house finch: intra-and intersexual variation. *Functional Ecology*, 1994, 343-350.

- HILL, G. E.; INOUE, Caron Y.; MONTGOMERIE, Robert. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2002, 269.1496: 1119-1124
- HILL, G. E a Kevin J MCGRAW. *Bird coloration*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 2006, 2 v. [64] p. of plates. ISBN 06740217622.
- HILL, G. E. Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology Letters*, 2011, 14.7: 625-634.
- HILL, G. E.; JOHNSON, James D. The vitamin A–redox hypothesis: a biochemical basis for honest signaling via carotenoid pigmentation. *The American Naturalist*, 2012, 180.5: E127-E150.
- HILL, G. E. Cellular respiration: the nexus of stress, condition, and ornamentation. *Integrative and comparative biology*, 2014, 54.4: 645-657.
- INOUE, M., et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current medicinal chemistry*, 2003, 10.23: 2495-2505.
- INOUE, C. Y., et al. Carotenoid pigments in male house finch plumage in relation to age, subspecies, and ornamental coloration. *The Auk*, 2001, 118.4: 900-915.
- JOHNSON, J. D.; HILL, G. E. Is carotenoid ornamentation linked to the inner mitochondria membrane potential? A hypothesis for the maintenance of signal honesty. *Biochimie*, 2013, 95.2: 436-444.
- JOHNSTONE, C. P.; REINA, R. D.; LILL, A.. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182.7: 861-879.
- KARU, U.; SAKS, L.; HORAK, P.. Carotenoid-based plumage coloration is not affected by vitamin E supplementation in male greenfinches. *Ecological research*, 2008, 23.6: 931-935.
- KIRKPATRICK, M.; RYAN, M. J. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*, 1991, 350.6313: 33-38.
- KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 1992, 200.2: 248-254.
- KRINSKY, N. I.; YEUM, K. J.. Carotenoid–radical interactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003, 305.3: 754-760.
- LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D.. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 2002, 80.5: 780-787.
- LOWE, G. M., et al. Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free radical research*, 1999, 30.2: 141-151.

- LOZANO, G. A. Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos*, 1994, 309-311.
- MAIA, R., et al. pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4.10: 906-913.
- MARRI, V.; RICHNER, H.. Differential effects of vitamins E and C and carotenoids on growth, resistance to oxidative stress, fledging success and plumage colouration in wild great tits. *The Journal of experimental biology*, 2014, 217.9: 1478-1484.
- MARTÍNEZ-PADILLA, J., et al. Intra-sexual competition alters the relationship between testosterone and ornament expression in a wild territorial bird. *Hormones and behavior*, 2014, 65.5: 435-444.
- MASAYOSHI YAMAGUCHI, editor. *Carotenoids: properties, effects and diseases*. New York: Nova Science Publishers, 2011. ISBN 1612097138.
- MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 2000, 153.1: 83-104.
- MAYS, H. L.; HILL, G. E. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution*, 2004, 19.10: 554-559.
- MAZZA, G. (ed.). *Functional foods: biochemical and processing aspects*. CRC Press, 1998. ISBN 1566764874.
- MCGRAW, K. J.; ARDIA, D. R. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *The American Naturalist*, 2003, 162.6: 704-712.
- MCGRAW, K. J.; TOOMEY, M. B. Carotenoid accumulation in the tissues of zebra finches: predictors of integumentary pigmentation and implications for carotenoid allocation strategies. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2010, 83.1: 97-109.
- MCGRAW, K. J.; NOLAN, P. M.; CRINO, O. L. Carotenoids bolster immunity during moult in a wild songbird with sexually selected plumage coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2011, 102.3: 560-572.
- MØLLER, A. P., et al. Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 2000, 11.3: 137-159.
- MØLLER, A.; JENNIONS, M. How important are direct fitness benefits of sexual selection?. *Naturwissenschaften*, 2001, 88.10: 401-415.
- MØLLER, A. P.; GREGERSEN, J.. *Sexual selection and the barn swallow*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- MOREHOUSE, N. I. Condition-Dependent Ornaments, Life Histories, and the Evolving Architecture of Resource-Use. *Integrative and comparative biology*, 2014, icu103.

- MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS letters*, 1997, 417.3: 261-266.
- MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H.; TRUSCOTT, T. G. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 385.1: 13-19.
- MOUGEOT, F., et al. Oxidative stress and the effect of parasites on a carotenoid-based ornament. *The Journal of experimental biology*, 2010, 213.3: 400-407.
- PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 297.1: 184-187.
- PALOZZA, P., et al. Prooxidant effects of β -carotene in cultured cells. *Molecular aspects of medicine*, 2003, 24.6: 353-362.
- PÉREZ, C.; LORES, M.; VELANDO, A.. Availability of nonpigmentary antioxidant affects red coloration in gulls. *Behavioral Ecology*, 2008, 19.5: 967-973.
- PIKE, T. W., et al. Availability of non-carotenoid antioxidants affects the expression of a carotenoid-based sexual ornament. *Biology Letters*, 2007, 3.4: 353-356.
- PRUM, R. O., et al. Molecular diversity, metabolic transformation, and evolution of carotenoid feather pigments in cotingas (Aves: Cotingidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182.8: 1095-1116.
- RICHARDSON, J. R., et al. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicological Sciences*, 2005, 88.1: 193-201.
- RODD, F. H., et al. A possible non-sexual origin of mate preference: are male guppies mimicking fruit?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2002, 269.1490: 475-481.
- RODRIGUEZ, C., et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 2004, 36.1: 1-9.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A guide to carotenoid*. Washington, D.C: ILSI Press, 2001. ISBN 1578810728.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington, DC, USA: International Food Policy Research Institute (IFPRI), 2004
- RUIZ-SOLA, M. Á.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 2012, 10.

- SAINO, N., et al. Carotenoid plasma concentration, immune profile, and plumage ornamentation of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *The American Naturalist*, 1999, 154.4: 441-448.
- SAKS, L.; OTS, I.; HÖRAK, P.. Carotenoid-based plumage coloration of male greenfinches reflects health and immunocompetence. *Oecologia*, 2003, 134.3: 301-307.
- SCHIELZETH, H.. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients. *Methods in Ecology and Evolution*, 2010, 1.2: 103-113.
- SIEGEL, H. S. Physiological stress in birds. *Bioscience*, 1980, 30.8: 529-534.
- SIEMS, W. G., et al. Carotenoid oxidative degradation products inhibit Na⁺-K⁺-ATPase. *Free radical research*, 2000, 33.4: 427-435.
- SIEMS, W., et al. β -Carotene breakdown products may impair mitochondrial functions—potential side effects of high-dose β -carotene supplementation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2005, 16.7: 385-397.
- SIES, H.; STAHL, W.; Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 1995, 62.6: 1315S-1321S.
- SIMONS, M. J. P.; VERHULST, S.. Zebra finch females prefer males with redder bills independent of song rate—a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 2011, arr043.
- SIMONS, M. J. P., et al. Bill redness is positively associated with reproduction and survival in male and female zebra finches. *PloS one*, 2012, 7.7: e40721-e40721.
- SIMONS, M. J. P., et al. Carotenoid-dependent signals and the evolution of plasma carotenoid levels in birds. *Am. Nat.*, 2014, 184: 741-751.
- SIMONS, M. J. P.; GROOTHUIS, T. G. G.; VERHULST, S.. An appraisal of how the vitamin A-redox hypothesis can maintain honesty of carotenoid-dependent signals. *Ecology and evolution*, 2015, 5.1: 224-228.
- STRADI, R.; PINI, E.; CELENTANO, G. The chemical structure of the pigments in Ara macao plumage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 130.1: 57-63.
- SURAI, P. F. Natural antioxidants in poultry nutrition: new developments. In: *16th European Symposium on Poultry Nutrition*. 2006. p. 669-676.
- SVENSSON, P. A.; WONG, B. B. M. Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review. *Behaviour*, 2011, 148.2: 131-189.
- SZÁMADÓ, S.. The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour*, 2011, 81.1: 3-10.

- TANNER, C. M., et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 2011, 119.6: 866-872.
- TAWARA, T., et al. Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Archives of toxicology*, 1996, 70.9: 585-589.
- TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. 2014.
- TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G.. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2004, 1660.1: 171-199.
- VALKO, M., et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 2004, 266.1-2: 37-56.
- VINKLER, M.; ALBRECHT, T.. Carotenoid maintenance handicap and the physiology of carotenoid-based signalisation of health. *Naturwissenschaften*, 2010, 97.1: 19-28.
- VON SCHANTZ, T., et al. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1999, 266.1414: 1-12.
- WALKER, L. K., et al. Foraging for carotenoids: do colorful male hihi target carotenoid-rich foods in the wild?. *Behavioral Ecology*, 2014, aru076.
- WHITEHEAD, A. J.; MARES, J. A.; DANIS, R. P. Macular pigment: a review of current knowledge. *Archives of ophthalmology*, 2006, 124.7: 1038-1045.
- YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 385.1: 20-27.
- ZAGALSKY, P. F.; CECCALDI, H. J.; DAUMAS, R. Comparative studies on some decapod crustacean carotenoproteins. *Comparative biochemistry and physiology*, 1970, 34.3: 579-607.
- ZAHAVI, A.. 16 Sexual Selection, Signal Selection and the Handicap Principle. 2007.
- ZAHAVI, A.. Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*, 1975, 53.1: 205-214.
- ZIEGLER, R. G.; MAYNE, Susan Taylor; SWANSON, Christine A. Nutrition and lung cancer. *Cancer causes & control*, 1996, 7.1: 157-177.

