

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

Liina Ots

**Antibiootikumiravi mõju rohevintide
(*Carduelis chloris*) stressihormooni tasemele**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Richard Meitern, MSc

Tartu 2016

Infoleht

Isendi kohasus sõltub tema elukeskkonnast. Üheks olulisemaks isendi mõjutajaks keskkonnas on parasiidid. Selleks, et parasiitidega võidelda, on organismidel välja kujunenud immuunsüsteem. Keskkonnast tulenevad negatiivsed signaalid võivad tõsta isendite stressitaset, mida saab hinnata glükokortikoidhormoonide hulka mõõtes.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kas ja kuidas mõjub antibiootikumiravi rohevintide stressitasemele. Vastupidiselt ootustele tõstis koktsidioosi ravimine toltrasuriiliga lindude stressihormooni taset. Võimalik, et ravimi metaboliseerimine oli lindudele kulukas. Trihhomonoosi raviva metronidasooli manustamine ei muutnud lindude stressihormooni taset. Võimalik, et ravimine ei avaldanud oodatud mõju, kuna linnud ei olnud trihhomonoosi nakatunud.

Märkõnad: stress, glükokortikoidid, kortikosteron, immuunvastus, trihhomonoos, koktsidioos, toltrasuriil, metronidasool

Bulletin

Fitness of an organism depends on its living environment. One of the factors most influencing individuals in their environment are parasites. In order to fight with parasites an organisms have an immune system. Negative effects that come from the environment can result in increased levels of stress, which, for example, can be measured by quantifying glucocorticoid hormones.

The aim of this study was to examine whether antibiotic drugs affect stress hormone level in greenfinches. Contrary to expectations Toltrazuril, which treats coccidiosis, increased stress hormone levels. It is possible that drug metabolization was costly for birds. Metronidazole administration, which treats trichomonosis, did not change stress levels. It is possible that medication did not function as birds were not infected by parasites.

Keywords: stress, glucocorticoids, corticosterone, immune response, trichomonosis, coccidiosis, tolrazuril, metronidazole.

Sisukord

1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1 Stressi füsioloogia.....	8
2.2 Sule kortikosteroon ja kvaliteet	11
2.3 Stressihormooni mõõtmine	12
2.4 Immuunsussüsteem.....	15
2.4.1 Immuunvastus ja stress	16
2.5 Parasitism.....	17
2.5.1 Kokksidioos.....	18
2.5.2 Trihhomonoos	20
2.6. Antiparasiitsed ravimid.....	22
2.6.1 Toltrasuriil.....	22
2.6.2 Metronidasool.....	23
3. Materjal ja meetodika.....	24
3.1 Katseobjekt	24
3.2 Katseandmed ja ajakava.....	24
3.3 Statistilised analüüsid	26
4. Tulemused	27
5. Arutelu	28
Kokkuvõte	30
Summary.....	31
Tänuavaldused	32
Kirjanduse loetelu.....	33

1. Sissejuhatus

Isendi kohasus sõltub paljustki sellest, kuidas ta tuleb toime erinevate keskkonnatingimuste ja ohtudega (Råberg *et al.* 2009). Edukam isend suudab läbi allostaatiliste muutuste paremini oma homöostaasi säilitada (McEwen ja Wingfield 2003). Organismid jagavad oma energiaressursse erinevate, omavahel lõivsuhtes olevate funktsioonide vahel. Kui isend kasutab mõne oma füsioloogilise protsessi läbi viimiseks rohkem energiat, siis selle arvelt väheneb energia panustamine teistesse füsioloogilistesse protsessidesse. Näiteks panustades rohkem parasiitidega võitlemisel, saab organism panustada selle võrra vähem reproduktiivsetesse funktsioonidesse (French *et al.* 2009). Parasiitidega toimetulekuks on selgroogsetel organismidel immuunsüsteem, mille võib tinglikult jagada kaasasündinud ning elu jooksul välja kujunenud omandatud immuunsuseks (Seegerstrom 2010).

Stress on reageering keskkonnast tulenevatele negatiivsetele signaalidele, mis organismi mõjutavad. Vastuseks keskkonnast tulenevatele stressoritele vabastatakse neerupealistest glükokortikoidhormoone (Sapolsky *et al.* 2000). Stressorid, mis organismi mõjutavad, on näiteks toidupuudus, kiskjaga kokku puutumine, inimhäiring ning parasiitide esinemine. Krooniline glükokortikoidide taseme tõus mõjub negatiivselt isendi kohasusele (Cockrem 2007) ning pärsib immuunvastuse tekkimist (Calcagni ja Elenkov 2006). Immuunsussüsteemi töös hoidmine on aga kulukas ning seega jääb parasiitidega võitleval organismil vähem ressursse teiste füsioloogiliste protsesside tarbeks (Seegerstrom 2010).

Organismide elukeskkond on pidevas muutumises. Üheks oluliseks organismi mõjutajaks on parasiidid. Mõned isendid tulevad parasiitide negatiivse mõju kontrolli all hoidmisega paremini toime kui teised. Parasiitide esinemine on seotud immuunvastuse ja stressiga. See, kuidas organismid tulevad toime parasiitidega ning kuidas immuunsussüsteem on omakorda stressiga seotud, ei ole veel piisavalt selge ning vajab edasist uurimist (Sild *et al.* 2014). On küll üldlevinud arvamus, et stress on immuunosupressiivne (Calcagni ja Elenkov 2006), kuid samas on leitud, et akuutsel stressil on immuunsüsteemi stimuleeriv mõju (Dhabhar 2008). Seetõttu oleks vaja põhjalikumalt uurida, kuidas parasiidid stressivastust mõjutavad.

Immuunökoloogidele pakub huvi organismide stressihormooni taseme mõõtmine, kuna see võimaldab välja selgitada, millisel määral keskkonnast pärinevad stressorid häirivad isendite normaalset elutegevust. Isendite stressihormooni taseme järgi on võimalik kvantifitseerida ka populatsiooni tervislikku seisundit. Krooniline glükokortikoidide tõus mõjub pikemas perspektiivis negatiivselt isendite kohasusele (Dantzer *et al.* 2014). Lindude puhul kasutatakse pikemaajalisest stressist põhjustatud stressihormooni taseme tõusu uurimiseks lisaks vereplasmast stressihormooni taseme mõõtmisele ka stressihormooni taseme kvantifitseerimist sulgedest (Bortolotti *et al.* 2008).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas mõjutab antibiootikumiravi rohevintide stressihormooni (kortikosterooni) tasemele. Eeldasin, et linnud olid nakatunud nii trihhomonoosi (Hõrak ja Männiste 2015) kui ka koktsidioosiga (Sild *et al.* 2014). Seega eeldasin, et lindude ravimine võiks vähendada nende parasiidinakkuse intensiivsust ja seeläbi ka lindude stressitaset. Koktsidioosi raviks kasutati toltrasuriili, kuna see ravib edukalt koktsiidinakkust (Elsheikha ja Khan 2011). Trihhomonoosi raviks kasutati metronidasooli, kuna see ravib hästi algloomade poolt põhjustatud haigusi (EMEA 1997).

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Stressi füsioloogia

Stress on glükokortikoidide poolt reguleeritud füsioloogiline ja käitumuslik seisund, selleks et toime tulla ja taastuda ebameeldivast sündmusest (Martin 2009). Üks enim uuritud süsteeme, mis stressivastuse esile kutsumises osaleb, on hüpotaalamus-hüpopüüsi-needupeeruste telg (HPA-telg) koos sümpaatilise närvisüsteemiga (McEwen ja Wingfield 2003). Homöostaatilise tasakaalu paigast nihkumine kutsub esile stressivastuse ning aktiveerub sümpaatiline närvisüsteem (Sorrells *et al.* 2009), mille vahendusel vabastatakse organismi katehhoolamiine (epinefriin ja norepinefriin) (Sapolsky *et al.* 2000). HPA-telje kaudu vabastatakse hüpotaalamusest kortikotropiini vabastavat hormooni (KVH), mis omakorda stimuleerib hüpopüüsi vabastama adrenokortikotroopset hormooni (Sorrells *et al.* 2009) ning väheneb ka ajuripatsi gonadotropiinide sekretsioon (Sapolsky *et al.* 2000). Sellele järgneb suurenenud glükokortikoidhormoonide süntees ning nende vabastamine needupeerulistest (Sapolsky *et al.* 2000). HPA-telje hormoonid, katehhoolamiinid ja tsütokiinid on ühed osalised allostaatilistes protsessides, tänu millele organism homöostaasi püüab saavutada. Allostaatilised muutused põhjustavad suurenenud allostaatilist koormust. Kui keskkonnas esineb mingi ootamatu häiring, näiteks inimehäiring või haigused, võib allostaatiline koormus kiiresti tõusta. Suurenenud stress viib ka suurenenud allostaatilise koormuseni (McEwen ja Wingfield 2003).

Keskkonnahäiringud, sealhulgas negatiivne inimõju, võivad aktiveerida selgroogsetel organismidel HPA-telje, mis võib viia glükokortikoidide vabastamiseni (Dantzer *et al.* 2014). Glükokortikoidid on steroidhormoonide klass, mis aitavad organismil kohaneda stressirohkes olukorras (Reul *et al.* 2015). Inimestel ja enamikul imetajatel on üheks olulisemaks glükokortikoidiks kortisool ning närilistel ja lindudel kortikosteron (KORT) (Buchanan 2000). Glükokortikoidid kontrollivad energia tarbimist ja kulutamist. Glükokortikoidide sekretsiooni reguleerimise abil saab organism kontrollida rasvade ning valkude kasutuselevõttu (McEwen ja Wingfield 2003).

Glükokortikoidid, nii kortisool kui ka kortikosteroon, on vereplasmas tavaliselt 90% ulatuses seotud kortikosteroidi siduva globuliiniga (CBG) (Sorrells *et al.* 2009). CBG on 50-60kD veres leiduv valk, mis reguleerib glükokortikoidide jõudmist kudedesse (Breuner *et al.* 2012). Ainult seondumata kujul on glükokortikoidid võimelised läbima vere-aju barjääri (BBB) ning rakumembraane. Tsütoplasmas võivad seondumata glükokortikoidid seonduda nii mineraalkortikoidse retseptoriga (MR) kui ka glükokortikoidi retseptoriga (GR). Kui MR ja GR ei ole seondunud glükokortikoididega, siis on nendele retseptoritele seondunud kuuma šoki valgud (HSP). Kui retseptoritele seondub glükokortikoid, vabanevad retseptoritelt HSP molekulid ja glükokortikoid-retseptor kompleks siseneb rakutuuma, kus see reguleerib geeniekspressiooni (Sorrells *et al.* 2009). Glükokortikoidide afiinsus MR suhtes on kõrgem kui GR suhtes. Tavaolukorras, kui glükokortikoidide tase on madal, on need pigem seotud MRdega, glükokortikoidide taseme suurenemisel seonduvad aga pigem GRdega (Sorrells *et al.* 2009).

Eristatakse akuutset ning kroonilist stressi. Akuutne stress on lühiajaline ning võib kesta vaid mõne tunni (Sorrells *et al.* 2009). Peamised füsioloogilised efektid esmase stressivastuse käigus on näiteks vererõhu ning glükoositaseme tõus, suurenenud südame löökide arv, seedesüsteemi aeglustumine ning energiavarude ümberjaotumine (Buchanan 2000). Kroonilise stressi puhul puutub isend pikema aja vältel kokku erinevate stressoritega, millega ta ei suuda ära harjuda (Cyr ja Michael Romero 2007). Lühiajalise stressi korral on glükokortikoidide taseme tõus organismile pigem kasulik, kuna aitab stressoriga paremini toime tulla. Pikaajalise stressi korral jällegi on suurenenud glükokortikoidide sekretsioon organismile pigem kahjulik (Cockrem 2007).

Organismi mõjutavad stressorid võivad olla nii füüsilised kui ka emotsionaalsed, nagu näiteks kiskja nägemine (Cockrem 2007). Stressoreid, mis mõjutavad isendeid, on mitmeid. Stressi võib põhjustada toitainete vähesus. Kümne päeva vanuseid kaljukajaka (*Rissa tridactyla*) poegi toideti rasvaprotsendi ja toitainete väärtuse poolest erinevate kaladega. KORTi taseme tõusu seostati toitainete vähesuse ja madala rasvaprotsendiga (Kitaysky *et al.* 1999). Stress võib mõjutada ka sigimist. Kuldnokkadel (*Sturnus vulgaris*) kutsuti esile krooniline stress, mängides neile valju heli, kiskja hüüdeid või eksponeerides neile uut objekti pesakastis või kiskja topist pesakasti lähedal. Võrreldes kontrollgrupiga oli lindudel, kellel stress esile kutsuti, väikesem sigimisedukus.

Nii kontrollgrupil kui ka katsegrupil oli küll munetud munade arv ligikaudu sama, kuid lennuvõimeliste poegade arv oli kontrollgrupis suurem. Viimast peetakse lindudel üheks kohasuse näitajaks (Cyr ja Michael Romero 2007). Sõltuvalt olukorrast võib vangistusel olla KORTi tasemele nii negatiivne kui ka positiivne mõju. Vangistuses hoitud koduvarblastel (*Passer domesticus*) suurenes KORTi tase juba peale kahte päeva puuris kinni hoidmist võrreldes metsikute lindudega, keda puuris ei hoitud. KORTi tase küll langes kuu aja möödudes, kuid see oli ikka kõrgem võrreldes metsikute lindudega (Kuhlman ja Martin 2010). Samas, teises uurimuses koduvarblaste peal näidati, et neil suurenes vangistuses vastuvõtlikkus põletiku indutseerimisele. Vangistatud metsikutel lindudel indutseeriti LPSiga (lipopolüsahhariid) põletikuvastus. Eeldati, et vangistuses KORTi tase kasvab ja sellega kaasneb nõrgem immuunvastus. Katsetulemused näitasid aga hoopis vastupidist tulemust: tsütokiinide ekspressioon suurenes vastuseks LPSi süstimisele, sõltuvalt sellest, mida kauem olid linnud vangistuses viibinud (Martin *et al.* 2011). On leitud, et parasiidinakkus põhjustab kõrgeenenud KORTi taset. Ameerika-kaljupääsukeste (*Petrochelidon pyrrhonota*) KORTi tase sõltus koloonia suurusest: kolooniates, kus isenditel esines pesas lutikas *Oeciacus vicarius*, oli KORTi tase positiivselt seotud grupi suurusega. Ilma parasiitideta koloonias sellist korrelatsiooni ei leitud (Raouf *et al.* 2006). KORTi taset võib mõjutada ka inimhäiring. Küülikutel (*Oryctolagus cuniculus*) kutsuti esile stress, hoides neid kunstlikes tingimustes. Vangistuse ajal näitasid küülikud üles tüüpilist põgenemisreaktsiooni, kui keegi neid häiris või kätte tahtis võtta. Lisaks kaasnes kinnihoidmisega küülikute kehamassi vähenemine keskmiselt 9%, kuid see ei osutunud eluohtlikuks. Vangistusest hoolimata ei tõusnud kõigil isenditel glükokortikoidide tase. Osad küülikud suutsid vangistusega piisavalt harjuda ning nende glükokortikoidide tase pigem langes. Mõõdukat glükokortikoidide taseme tõusu seletati kui adaptiivset mehhanismi, mis aitab isenditel toime tulla kriitiliste ning energiat nõudvate protsessidega. Samas liiga suur glükokortikoidide taseme tõus mõjus ellujäämisele negatiivselt. Küülikud, kelle glükokortikoidide taseme tõus oli mõõdukas, jäid pärast loodusesse vabastamist suurema tõenäosusega ellu (Cabezas *et al.* 2007). Enamik uurimusi küll näitab, et inimhäiring suurendab glükokortikoidide taset, kuid alati ei pruugi see nii olla (Blas *et al.* 2007). Valgekiirdsidrikute (*Zonotrichia leucophrys*) pesakastide läheduses mängiti kõlaritest liiklusemüra. Lindudele, kellele lasti liiklusemüra, KORTi tase pigem langes. Suurenenud liiklusemüra ei vähendanud ka linnupoegade lennuvõimestumist (Crino *et al.* 2013). Samas pole tehtud piisavalt mitmetahulisi uuringuid selle kohta, kuidas on omavahelises seoses pikemaajalisem stress, isendite kohasus, glükokortikoidide taseme muutused ning inimõju (Dantzer *et al.* 2014).

2.2 Sule kortikosteroon ja kvaliteet

Sulgedest mõõdetavat KORTi saab kasutada biomarkerina indiviidi KORTi füsioloogia uurimiseks ökoloogilistes uuringutes (Fairhurst *et al.* 2013). Täpseid mehhanisme, kuidas ja millal KORT sulgedesse satub, ei ole teada. KORT võib sulgedesse sattuda verest sule kasvamise ning keratiniseerumise käigus või väliselt, imendudes läbi naha kohast, kust sulg on naha küljes (Lattin *et al.* 2011). Kui KORT tuleks ainult verest, peaks oletuste kohaselt sule tagumises otsas seda vähem olema kui eesmises otsas. Tegelikult on aga täheldatud vastupidist – sule eesmises osas on KORTi sisaldus madalam kui tagumises osas (Lattin *et al.* 2011). Hiljutises uuringus on näidatud, et KORT mõjutab sule nääpsus sule struktuuri rakkude jagunemise ajal. Esimest korda näidati, ka et KORT võib sulge sattuda läbi sule putke veresoone rakkude diferentseerumise ajal (Jenni-Eiermann *et al.* 2015).

Kuna suled koosnevad peamiselt valkudest ja keratiinist, võib suurenenud KORTi sisaldus häirida nende normaalset kasvamist. Kõrge valgusisaldusega *ad libitum* toiduga toidetud kuldnokkadel, kelle vereplasma KORTi sisaldust kunstlikult KORTi süstimisega tõsteti, oli sulgedes rohkem KORTi ning sule kvaliteet oli vähenenud (Lattin *et al.* 2011). Üheks sule kvaliteedi näitajaks on ka kasvulüngad. Need on poolläbipaistvad, nõrgenenud struktuuriga alad sulgedes. Kasvulüngad tekivad sulgimise ajal, kui lind on stressirohkes, ebasoodsate oludega keskkonnas. Pikemas perspektiivis vähendavad need linnu kohasust, kuna lennusalgedes esinevad kasvulüngad vähendavad mõnevõrra lennuvõimet (Møller *et al.* 2009). Kaljutuvidel (*Columba livia*), kes olid nakatunud bakteriga *Campylobacter jejuni*, oli kasvulünkade arv suurem (Jovani *et al.* 2014). See, kuidas KORTi tase on seotud kasvulünkadega, ei ole täpselt teada. Teadaolevalt ei ole tehtud uurimusi, mis näitaks KORTi sisaldust ainult kasvulünkades. Tehtud on vaid uurimusi, mille käigus mõõdeti KORTi kasvulünkades ja nendega külgnevates susegmentides (Jenni-Eiermann *et al.* 2015). Näiteks on tehtud uurimus, milles näidati, et sule segmentides, kus esinesid kasvulüngad, ei olnud KORTi tase tõusnud. Üks seletustest oleks, et halvenenud sule struktuuri tõttu on KORTi sidumissaite vähem (Jenni-Eiermann *et al.* 2015). Samas, Bortolotti ja teised (2009) näitasid, et sule segmentides, kus esinesid kasvulüngad, oli KORTi tase kõrgem võrreldes nende kohtadega, kus kasvulünki ei olnud (Bortolotti *et al.* 2009). Kuidas täpsemalt kasvulünkades on KORTi tase muutunud, tuleb veel uurida (Jenni-Eiermann *et al.* 2015).

2.3 Stressihormooni mõõtmine

Looduskaitsebioloogid kasutavad glükokortikoidide taseme mõõtmist populatsiooni tervisliku seisundi hindamiseks (Dantzer *et al.* 2014) ja isendite keskkonnastressi uurimiseks (Wikelski ja Cooke 2006). Stressihormooni taset mõõdetakse sageli ka selleks, et uurida inimõju populatsioonide elujõulisusele (Cabezas *et al.* 2007). Krooniliselt suurenenud glükokortikoidide tase viitab sellele, et keskkonnas on mingi häiriv tegur, millega organismid pole võimelised kohanema. Seega annab glükokortikoidide taseme mõõtmine kvantitatiivset informatsiooni, kuidas muutused keskkonnas indiviide mõjutavad (Dantzer *et al.* 2014). Seostades glükokortikoidide taset näiteks kehamassiga, on isegi võimalik hinnata stressi mõju oodatavale elueale (Cabezas *et al.* 2007). Biomeditsiinilised uuringud näitavad, et krooniline glükokortikoidide taseme tõus võib mõjutada oluliselt isendite ellujäämist ja sigimisedukust (Dantzer *et al.* 2014).

Glükokortikoidide taset saab mõõta mitmetest kohtadest. Näiteks saab seda teha isendi verest, süljest ning lindude puhul ka sulgedest (Sheriff *et al.* 2011). Verest mõõtmine annab infot isendite hetkelise stressiseisundi kohta. Vereplasma KORTi tase sõltub hooajast, ööpäevasest rütmist, vahetust reageeringust mingile stressorile ning pikemaajaliselt kogetud stressist (Sheriff *et al.* 2011). Vereplasmast glükokortikoidide mõõtmise eeliseks on asjaolu, et lisaks glükokortikoidide taseme mõõtmisele saab verd kasutada ka teiste konditsiooninäitajate määramiseks. Negatiivseks pooleks vereproovide võtmisel on selle meetodi invasiivsus ja töömahukus. Samuti nõuab see uuritava liigi füsioloogia ning ökoloogia head tundmist, sest verd tuleb võtta nii, et verevõtuga kaasnev stress ei kajastuks mõõtmistulemustes. Sõltuvalt liigist kõigub sobilik vereproovi võtmise aeg 2-5 minuti vahel (Sheriff *et al.* 2011).

Alternatiivselt ja vähem invasiivselt on glükokortikoidide taset võimalik määrata ka süljest. Kuigi vere ja sülje glükokortikoidide tase on omavahel korrelatsioonis, esineb süljes ensüüm *11 β -hüdroksüsteroid dehüdrogenaas*, mis võib muuta aktiivse glükokortikoidi (kortisool, kortikosteron) inaktiivseks vormiks - kortisooniks (Wood 2009). Erinevalt verest, kus glükokortikoidide tase tõuseb juba paari minutiga (Romero ja Reed 2005), tõuseb sülje glükokortikoidide sisaldus alles 20-30 minuti möödudes. Lisaks sellele püsivad süljeproovid kuni nädal aega toatemperatuuril ilma riknemata (Sheriff *et al.* 2011).

Kui verest mõõdetakse kogu glükokortikoidide taset, siis linnusulgedest ainult seda alamhulka glükokortikoidi tasemest, mis on seondumata kujul (Sheriff *et al.* 2011). Selleks, et verest välja arvutada vaba glükokortikoidide hulka, on vaja teada CBG hulka (Sheriff *et al.* 2011). Sulgede kasutamise eeliseks on see, et saadakse pikemaajalist infot isendi tervisliku seisundi kohta. Sama informatsiooni saamiseks tuleks verest võtta proove korduvalt. See on aga ajakululaks ja isendit häiriv (Bortolotti *et al.* 2008). Sulgede puhul saab mõõta stressihormoone ka juba sulgitud sulgedest, mille puhul lindu ennast häirima ei pea. Sule KORTi saab mõõta ka päevade lõikes, mõõtes sule osa, mis on mingil ajahetkel juurde kasvanud. Erinevalt vereproovidest on sulgede säilitamine lihtne ning need säiluvad mitmeid aastaid (Bortolotti *et al.* 2008).

Lindude puhul on väga palju kasutatud just sulgedest ja verest KORTi mõõtmist (Bortolotti *et al.* 2008). Enamus uurimusi, mõõtmaks lindude KORTi taseme muutusi, on tehtud kunstlikes tingimustes, kuna looduses on katseid raskem korraldada (Cockrem 2007). Linnusulgedest mõõdetav KORT on kasutatav isendi füsioloogilise seisundi ning ka HPA-telje keskmise aktiivsuse mõõtmiseks pikema perioodi vältel (Fairhurst *et al.* 2013). Selle meetodi abil on võimalik isegi uurida kogu populatsiooni pikemaajalist tervislikku seisundit (Bortolotti *et al.* 2008).

Vereplasma KORT on üldjuhul positiivses seoses sulgede KORTi sisaldusega. Seos esineb peamiselt akuutse stressori poolt esile kutsutud KORTi, aga mitte baastaseme KORTi kontsentratsiooniga. Lääne-kivikanal (*Alectoris rufa*) indutseeriti stress, kui neid hoiti kinni individuaalsetes puurides. Puuris olnud lindude plasma KORTi tase oli korrelatsioonis sulgede KORTi tasemega (Bortolotti *et al.* 2008). Õõnepääsukestega (*Tachycineta bicolor*) tehtud katsetes näidati, et sulgedest mõõdetud KORTi tase korreleerus vereplasma KORTiga, aga mitte kõikidel päevadel eksperimendi jooksul. Seos oli nõrgem siis, kui plasma KORTi taseme tõus veres oli väiksem (Fairhurst *et al.* 2013). KORTi saanud kodutuvidel (*Columba livia domestica*) esines positiivne seos vereplasma ning sulgedest määratud KORTi kontsentratsiooni vahel. Seos oli aga väga nõrk nendel lindudel, kellele KORTi ei manustatud. Lisaks oli eksperimentaalgrupi lindudel sule kasv väiksem ning sule kvaliteet halvem (Jenni-Eiermann *et al.* 2015).

Üks tavalisemaid viise glükokortikoidide taseme mõõtmiseks on immuunanalüüs. Põhiliselt kasutatakse kahte meetodit: radioimmuunanalüüs (RIA) ja ensüümimmuunanalüüs (EIA). Mõlemad, nii RIA kui ka EIA põhinevad antikeha konkureerival seandumisel huvipakkuva steroidmolekuli külge (Sheriff *et al.* 2011). RIA meetod põhineb radioaktiivse märgisega hormooni ja proovis oleva tavalise hormoonimolekuli konkurentsel seandumisel antikeha molekuliga. EIAGA tekitatakse ensüümide abil kolorimeetriline signaal glükokortikoidide kvantifitseerimiseks (Sheriff *et al.* 2011).

2.4 Immuunsussüsteem

Organismidel on pidevalt arenev ja keeruline immuunsüsteem (Schulenburg *et al.* 2009), mis aitab neil patogeenide vastu võidelda (Segerstrom 2000). Selgroogsetel loomadel on eristatav kaasasündinud ning omandatud immuunsussüsteem. Kaasasündinud immuunsussüsteem on mittespetsiifiline ning reageerib kiiresti haigustekitajatele ning nende poolt põhjustatud kudede kahjustustele. Omandatud immuunsüsteem on aeglane ning suuresti antigeen-spetsiifiline (Coutinho ja Chapman 2011). Omandatud immuunsüsteem osaleb immuunmälu tekkimisel (Kenneth *et al.* 2012). Rakkude poolt vahendatud adaptiivne immuunsüsteem aitab eemaldada selliseid rakusiseseid patogeene nagu näiteks viiruseid, aga ka ainurakseid parasiite (Kaiser 2010). Nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi töös hoidmine on energeetiliselt kulukas. Arvatakse, et kuluka immuunsussüsteemi allasurumine on adaptiivne mehhanism energia säilitamiseks (Segerstrom 2010). Isaste sisalike *Psammmodromus algirus* sprintimiskiirus vähenes peale nende immuunsüsteemi aktiveerimist LPSiga võrreldes kontrollgrupiga, kellele süstiti tavalist füsioloogilist lahust. Emaste sprintimiskiirus jäi peale LPSga süstimist samaks. Seega uurijatel õnnestus näidata lõivsuhet vaid isaste sprintimiskiiruse ning immuunvastuse aktiveerumise vahel (Zamora-Camacho *et al.* 2014). Valgekiird-sidrikutel indutseeriti LPSiga immuunsüsteemi aktiveerimine. Esimesel päeval peale LPSiga süstimist jäi lindudel laul poolikuks ning rohkem kui pooltel lindudel sagesid alarmhüüded. Seitsmendal päeval oli LPS mõju peaaegu kadunud, vaid mõnel linnul esines lõpetamata laulu (Munoz *et al.* 2010).

Põletik on organismi kaitsemehhanism haigustekitajatega võitlemiseks ja seeläbi homöostaatilise tasakaalu taastamiseks. Põletik hõlmab endas haigustekitajaga võitlemist, selle eemaldamist ning seejärel kahjustatud kudede parandamist (Coutinho ja Chapman 2011). Olulised valgud immuunrakkude töös on tsütokiinid, mida toodetakse nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunvastuse esilekutsumise käigus (Kaiser 2010). Tsütokiinsed valgud osalevad immuunvastuse reguleerimises. Need võivad olla nii põletikku soodustavad kui ka seda maha suruvad (Robles *et al.* 2005). Tsütokiinidel, nagu näiteks, IL-1 (interleukiin-1) ja TNF- α (tuumori nekroosi faktor- α), on põletiku soodustav toime ning IL-10 põletiku maha suruv toime (Calcagni ja Elenkov 2006). Lindudel on olulised tsütokiine tootvad immuunrakud on heterofiilid ja monotsüüdid. Need immuunrakud mängivad olulist

rolli kaasasündinud immuunvastuse kujunemises (He *et al.* 2008). Heterofiilid on funktsionaalselt sarnased imetajate neutrofiilidega. Heterofiilid ja monotsüüdid osalevad fagotsütoosis ning põletiku esile kutsumises (He *et al.* 2008). Omandatud immuunsüsteemis on olulised B- ja T-lümfotsüüdid. B-lümfotsüüdid osalevad antikehade tootmises. Antikehade molekul tatakse ka kui immunoglobuliine. T-lümfotsüüdid tunnevad ära nakatunud või vigaseid rakke, sealhulgas intratsellulaarse patogeeni nakatunud rakke (Kenneth *et al.* 2012).

2.4.1 Immuunvastus ja stress

Stressi mõju immuunsüsteemile on väga keerukas ja ajas muutuv (Buchanan 2000). Akuutsel stressil on pigem immuunsüsteemi stimuleeriv mõju, samas kui krooniliselt kõrge glükokortikoidide tase pärsib immuunsüsteemi (Martin 2009), inhibeerides põletikku soodustavate T-lümfotsüütide (Th1 rakud) jagunemist ning suurendades Th2 rakkudes põletikuvastaste tsütokiinide produktsiooni (Calcagni ja Elenkov 2006). Immuunsüsteemi üheks oluliseks regulaatoriks on transkriptsioonifaktor NF- κ B, mille kontsentratsioon määrab põletiku soodustavate tsütokiinide tootmise intensiivsuse. Glükokortikoidide taseme tõusuga on NF- κ B produktsioon inhibeeritud (Scheinman *et al.* 1995). Lisaks on stress immuunosupressiivne, kuna stressihormoonid inhibeerivad lümfotsüütide tsütotoksilisust (Calcagni ja Elenkov 2006). Alla surutud immuunsüsteem võib põhjustada suurenenud vastuvõtlikkust haigustele, mis pikemas perspektiivis vähendab isendi ellujäämise tõenäosust haiguse esinemise korral (French *et al.* 2009). Pikaajalise stressi korral võib muutuda immuunrakkude funktsioon, näiteks võib toimuda tsütokiinide produktsiooni ja sekretsiooni ning antikehade tootmise vähenemine. Krooniline stress mõjutab füsioloogilisi protsesse kehas, sealhulgas pärsib immuunvastuse esile kutsumist (Segerstrom 2010).

2.5 Parasitism

Parasitism on kahe organismi vaheline kooselu, milles üks organism (parasiit) kasutab teist (peremees) enda elukeskkonnana (Friend ja Franson 1999). Suurem osa parasiitidest on endoparasiidid, kuid esineb ka ektoparasiite, kes elavad peremeesorganismi pinnal. Parasiitide esinemine mõnel linnul või loomal on pigem reegel kui erand (Friend ja Franson 1999). Vastavalt keskkonnale peab organism suutma parasiitidega toime tulla ning taastama oma organismi normaalse füsioloogilise seisundi (McEwen ja Wingfield 2003). Immuunsüsteemi pideva valmisoleku säilitamine on oluline haigustega võitemiseks ja ellu jäämiseks. Organismil on limiteeritud kogus energiat, mida ta oma elutegevuseks ja eluspüsimiseks kasutada saab. Seega on parasiitidega võitleval organismil teiste füsioloogiliste protsesside jaoks vähem ressursse. Parasiitidega võitlemisel võivad väheneda investeeringud näiteks sigimisse, toidu otsimisse või suhtlemisse (French *et al.* 2009). Näiteks isaste Pürenee kaljukitsede (*Capra pyrenaica*) sperma kvaliteet sõltus ümarussi vastsete esinemisest seedetraktis (Santiago-Moreno *et al.* 2010). Isendi kohasus sõltub ka tema toimetulekust parasiitidega. Isend võib parasiitidega kas võidelda või neid tolereerida. Tolerantsus on peremehe võime parasiitide poolt tekitatud kahjustusi vähendada ning nendega koos elada ilma parasiidi arvukust mõjutamata. Tolerantne isend panustab energiat parasiitidega võitlemisele vähem kui parasiitidega võitlev isend (Råberg *et al.* 2009).

Endoparasiitide nakkuse intensiivsus lindudel võib sõltuda inimasustuse tihedusest (Boal *et al.* 1998). On näidatud, et nii trihhomonoosi kui ka koktsidioosi intensiivsus on suurem linnapiirkondades (Boal *et al.* 1998; Giraudeau *et al.* 2014). Põhja-Ameerikas Arizonase osariigis uuriti aed-karmiinleevikestel (*Haemorrhous mexicanus*) koktsiidinakkuse intensiivsuse seosest inimasustuse tihedusega. Leiti, et koktsiidinakkuse intensiivsus oli positiivselt seotud inimasustuse tihedusega. Tulemust seletati asjaoluga, et linnapiirkondades käivad linnud rohkem linnutoidumajakestes toitumas. Endoparasiidid levivad väljaheidete kaudu. Ilmselt on lindudel kergem nakatuda kohtades, kus nende arvukus on suurem (Giraudeau *et al.* 2014).

Põhja-Ameerikas Arizona osariigis uuriti Põhja-tanukullil (*Accipiter cooperii*) parasiteeriva trihhomonoosi leviku seost inimasustuse tihedusega. Linnas esines pesitsuse ajal linnupoegadel trihhomonoosi 85%, väljaspool linna aga 9%. Linnas elab arvukalt tuvisid, millest põhja-tanukullid toituvad, ning kuna tuvid on trihhomonoosi põhjustaja *T.gallinae* edasikandjad, siis on trihhomonoosi laiem levik linnapiirkonnas seletatav. Linnupojad haigestusid ilmselt siis, kui nad said toitu nakatunud tuvidelt. Linnupojad küll nakatusid, aga täiskasvanud linnud eriti mitte. See on seletatav täiskasvanud lindude pugu pH tasemega, mis *T.gallinae*'le ei sobi. Selline kohastumus aitab lindudel elu jooksul selle parasiidiga võitemisega paremini toime tulla (Boal *et al.* 1998).

Samas on nähtud ka vastupidiseid tulemusi. Tšehhi vabariigi idaosas uuriti muusträsta (*Turdus merula*) erinevate liikide nugiusside arvukust ja intensiivsust seoses linnastumisega. Linnalindudel leiti 14 liiki vähem nugiussid ning nakkuse üldine intensiivsus oli linnas elavatel lindudel 12,1 protsendipunkti väiksem. Tulemusi seletati sellega, et muusträstad on sünanthroopsed linnud ning lisaks on paljude nugiussi liikide jaoks vaja vaheperemeest, keda linnades vähem leidub.

Lisaks parasiitide esinemisele organismis, võib linnades olla ka muid stressoreid, nagu näiteks toidukonkurents, kiskjad ja inimtegevus, mis võivad põhjustada suuremat glükokortikoidide taseme tõusu ning see omakorda võib mõjuda immuunsüsteemile pärssivalt, mis parasiidiga võitlevale organismile kasuks ei tule (Giraudeau *et al.* 2014). Stressi uurimisel peaks arvesse võtma, mitte ainult ühte uuritavat stressi mõjutavat tegurit, vaid ka teisi keskkonnas olevaid tegureid (Dantzer *et al.* 2014).

2.5.1 Koktsidioos

Koktsiidid on *Isoospora* perekonda kuuluvad obligatoorsed intratsellulaarsed parasiitsed algloomad (Friend ja Franson 1999). Peremeesorganism nakatub koktsiididega, kui ta neelab alla ootsüste, mis on pärit teiste isendite väljaheidetest. Soole limaskestale sattunud ootsüstid vabastavad sporosoide, mis peremeesrakku läbistades paljunevad asekuaalselt (Hõrak *et al.* 2004). Haigust, mida nad põhjustavad, nimetatakse koktsidioosiks (Friend ja Franson 1999). Koktsiidid vedavad tavaliselt kogu elu seedetraktis ja nende negatiivne mõju kohasusele võib ilmneb ainult stressirohkel perioodil (Pap *et al.* 2009).

Tavaliselt pärssivad koktsiidid seedekulglat, kuid mõned tüved võivad pärssida ka neerude ja maksa tööd. Tihtipeale esineb lindudel kudede kahjustusi, mis põhjustavad seedeprotsessi või toitainete imendumise häireid, millega kaasneb vedelikupuudus, aneemia ning suurenenud vastuvõtlikkus teistele haigustekitajatele. Haiguse risk suureneb kui ootsüstid saastavad toitu või joogivett (Friend ja Franson 1999). Lind on koktsidioosiga nakatunud, kui tema sulestik on tuhmim, ta kannatab kõhulahtisuse all ning tema väljaheidetest leitakse ootsüste (Friend ja Franson 1999).

Koktsiidinakkuse intensiivsus on negatiivselt seotud sulgede kvaliteediga (Pap *et al.* 2009) ning võib seetõttu suurendada sulgimisjärgset suremust, sest vaenlaste eest põgenemine on sulestiku halvema kvaliteedi korral raskendatud. See on probleem eriti just nendele lindudele, kes oma lennusulgi ainult kord aastas vahetavad, sealhulgas värvulised (Pap *et al.* 2011). Koduvarblaste peal tehtud katsetes on näidatud, et sulgimise ajal kasvasid kontrollgrupi lindude suled pikemaks kui koktsiididega nakatunud lindude suled (Pap *et al.* 2011).

Koktsiidinakkus on seotud KORTiga metsikutel lindudel. Spekuleeritakse, et põletikule vastuvõtlikumad rohevindid on resistentsemad perekonna *Isospora* nakkusele (Sild *et al.* 2014). Neil lindudel võib olla ka kõrgem vere KORTi tase, tänu millele nad põletikuga paremini toime tulevad. Teisisõnu, efektiivne ja tugev põletikuline vastus uuele infektsioonile võib viia suurenenud KORTi tasemeni. Koktsiididega nakatunud rohevintidel nähti positiivset korrelatsiooni sule KORTi ning koktsidioosi resistentsuse vahel (Sild *et al.* 2014).

Koktsidioosivastane ravim ei pruugi alati täielikult koktsiide hävitada. Ravimiga *Vetacox* ravitud rohevintidel kadusid ootsüstid küll peale kuuendat päeva, aga nelja päeva pärast tekkisid need 50% ravitud lindudest uuesti. Põhjus võib olla sulfonamiid ravimi leebes mõjus. Ravimi toimeks on vaid pärssida parasiidi paljunemist (Hõrak *et al.* 2004). Koktsiidinakkuse intensiivsus sõltub rohevintidel peremeesorganismi resistentsusest ning parasiidi virulentsusest (Hõrak *et al.* 2006a).

2.5.2 Trihhomonoos

Lindude trihhomonoosi põhjustab ainurakne organism *Trichomonas gallinae*. Enamasti leidub seda seedekulgla ülemistes osades (Friend ja Franson 1999). *Trichomonas* seondub epiteeli pinnale ja kasutab amööbitaolist liikumist ja hüdrolüütilisi ensüüme, et epiteelkoe alla pääseda, et nii järk-järguliselt sügavamale limaskestast tungida. Infektsioon põhjustab järk-järgulisi kahjustusi ülemistes seedesüsteemi osades, nõrgendades lindude toitumise võimet, mis omakorda põhjustab toitainete kaotust. Kui kahjustused lähevad tõsisemaks, on koed niivõrd kahjustatud, et neelamine on tõsiselt raskendatud, mis viib toidu väljutamiseni ja selle kuhjumiseni suuõõnes ja pugus (Neimanis *et al.* 2010).

Nakkust antakse edasi toiduga või nakatunud joogiveega, kuid mitte väljaheidete kaudu (Friend ja Franson 1999). Linnud nakatuvad rohkem kui külastavad aedades olevaid linnutoidumajakesi ja joogikohti – need on kohad, kus linnud suurema tõenäosusega mitmekesi koos on. Trihhomonoosi nakatunud metsvintide (*Fringilla coelebs*) arv Soomes on palju madalam kui nakatunud rohevintide arv (Lehikoinen *et al.* 2013). Ilmselt peitub põhjus erinevuses lindude elupaigaeelistustes. Soomes on metsvindid pigem metsas elavad linnud ja rohevindid tegutsevat asulate ja inimeste läheduses. Linnu söögimajad, kuhu koguneb söögi olemasolu korral palju linde sööma, asuvad asulates ja nii on rohevintidel palju suurem tõenäosus sattuda sellistesse kohtadesse ning seega trihhomonoosi nakatuda (Lehikoinen *et al.* 2013).

Infektsioon võib kulgeda kergelt, ilma silmale nähtavate sümptomiteta või siis kiiresti, kuni 20 päevaga, ja lõppeda surmaga. Kõige nähtavamad kahjustused kergelt patogeense tüve puhul on suurenenud süljejooks ja limaskestast põletik (Friend ja Franson 1999). Varased suus ilmnevad kahjustused on väikesed, kuid limaskestast pinnale tekkivate kreemikate kuni kollakate täppide tõttu hästi defineeritavad. Kui haigus edasi kulgeb, lähevad kahjustused suuremaks ja paksemaks. Tõsisemad haigusjuhud võivad lisaks seedetraktile põhjustada ka maksa ja kopsu kahjustusi (Friend ja Franson 1999).

Trihhomonaadide hulgas on *T. gallinae* kõige olulisem parasiit tema laia leviku tõttu, peamiselt tuviliste, pistrikuliste ning kakuliste hulgas (Amin *et al.* 2014). Laululindudel on trihhomonoosi palju vähem täheldatud, aga on täheldatud, et *T.gallinae* on kõige olulisem trihhomonoosi põhjustaja puurilindudel. Laululindudel täheldati trihhomonoosi esimest korda Suurbritannias, 2005. aastal rohevintidel ja metsvintidel, millest järgneva kahe aasta jooksul epideemia tekkis. 2008. aastal levis haigus ka Fennoskandiasse (Lawson *et al.* 2011). Enim haigusjuhtumeid on täheldatud hiliskevadel, suvel ja sügisel (Friend ja Franson 1999). Trihhomonoosi põhjustajad on väga tundlikud keskkonnatingimustele. Külmal talvel arvatavasti piirab nende edasikandumist (Neimanis *et al.* 2010).

2.6. Antiparasiitsed ravimid

Antiparasiitseid ravimeid kasutatakse, selleks et ära hoida, vähendada või elimineerida parasiidinakkust. Ravimid mõjuvad tavaliselt pärssivalt parasiidi metabolismile ja liikumisele ning häirivad parasiitide paljunemist ning arenemist peremeesorganismis. Enamus ravimid on suunatud otse, kiiresti jagunevate, kiire elutsükliga parasiitidega võitlemiseks. Samas võivad ravimid kahjustada lisaks parasiidile ka peremeesorganismi enda kudesid (Elsheikha ja Khan 2011). Sageli mõjuvad ravimid parasiidi nukleiinhapete või valkude sünteesile või on siis suunatud kindla parasiidispetsiifilise metaboolse raja vastu (Elsheikha ja Khan 2011).

2.6.1 Toltrasuriil

Toltrasuriil on triasinetriooni derivaat, mis toimib kõikide intratsellulaarsete koktsiidide vastu (Elsheikha ja Khan 2011), pärssides nende mitokondriaalset hingamist ja pürimidiinide sünteesi parasiidis (Krautwald-Junghanns *et al.* 2009). Ravimit manustatakse suukaudselt joogiveega (EMA 1998). Resistentuse suurenemise tõttu teiste ravimite suhtes, nagu näiteks resistentsus sulfonamiidid ja amproolium suhtes, on hea kasutada toltrasuriili, kuna selle toime on efektiivsem ning see aitab immuunsüsteemil nakkusega paremini toime tulla (Krautwald-Junghanns *et al.* 2009).

Toltrasuriili manustamine koktsidioosiga mittenakatunud lindudele omab järgnevat nakkust pärssivat mõju. Rohevindid, kellele enne koktsiididega nakatamist anti toltrasuriili, ei saavutanud peale nakatumist sellist haiguse taset nagu oli see enne ravimi manustamist (Sild *et al.* 2014). Enne nakatamist toltrasuriiliga ravitud kanadel ei esinenud koktsidioosile omaseid kahjustusi (näiteks paksenenud soolestiku seinad või kudede kahjustusi) ega ka suurenenud suremust võrreldes nendega, keda raviti alles peale nakatumist (Alnassan *et al.* 2013).

2.6.2 Metronidasool

Metronidasool kuulub 5-nitroimidiasool gruppi. Seda kasutatakse nii meditsiinis kui ka veterinaarias, et ravida algloomade (*Trichomonas*, *Treponema*, *Histomonas*) poolt põhjustatud haigusi (EMA 1997). Lisaks algloomade vastasele aktiivsusele suudab metronidasool toimida ka anaeroobsete obligatoorsete bakterite vastu (Elsheikha ja Khan 2011). Metronidasool imendub hästi seedetraktis. Peremeesorganism tolereerib ravimit küll hästi, kuid siiski võib see põhjustada seedetrakti ärritusi (Elsheikha ja Khan 2011). Ravim pärsib parasiidi DNA sünteesi. Metronidasooli metaboolse raja efekt seisneb lähteainete ja metaboliitide konjugatsioonil ning kahe kõrvalahela oksüdatsioonil. Järgmisena toimub ühendite lagundamine nitriti grupi redutseerimise ja imidiasooli lõhestamise kaudu. Viimased ained, mis selles rajas moodustuvad, on oksamiid hape ja atsetamiid (EMA 1997).

Ravimi mõju võib sõltuda parasiiditüvest. Kunstlikes tingimustes elavatel kahelt viirpapagoilt (*Melopsittacus undulatus*) ning kolmelt tuvilt isoleeriti *T.gallinae* tüved. Seejärel võrreldi lindudel saadud tüvesid *in vitro* nelja 5'-nitroimidiasool (metronidasool, dimetridasool, ronidasool ning ornidasool) ravimi suhtes. Madalaim letaalne kontsentratsioon leiti viirpapagoidelt saadud tüvedelt, kõrgeim tuvidelt saadud tüvedelt. Efekttiivne metronidasooli doos viirpapagoilt saadud tüve elimieerimiseks oli umbes 2.0 ± 0.3 kuni 3.0 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$, samas kui väiksem letaalne kontsentratsioon tuvidelt isoleeritud tüvede jaoks oli 103.3 ± 3.3 $\mu\text{g/ml}$ (Zimre-Grabensteiner et al. 2011).

3. Materjal ja metoodika

3.1 Katseobjekt

Rohevindid on värvuliste (*Passeriformes*) seltsi kuuluvad linnud, kes kaaluvad ligikaudu 28g. Emaste lindude sulestik on isaste omast tuhmim (Al-Dabbagh *et al.* 2006). Nad on parvelise eluviisiga, seemnetoidulised linnud, kes on looduslikult levinud Lääne-palearktilises regioonis (Hõrak *et al.* 2006b). Neid leidub Põhja-Euroopast Briti saarteni, Lõuna-Skandinaavias ning Venemaal (Clement 1999). Rohevindid taluvad hästi vangistust ning seetõttu on neid hea kasutada ökofüsioloogilistes uuringutes. Üldiselt on vangistuses elavate rohevintide füsioloogilised näitajad sarnased metsikult elavate lindude vastavate näitajatega (Sepp *et al.* 2010).

3.2 Katseandmed ja ajakava

Katses osalesid isased rohevindid, kes püüti loorvõrkudega Tartust, 5., 6. ja 8. jaanuaril 2015. aastal. Linnud elasid katse jooksul eraldi puurides, suurusega 27 x 51 x 55 cm, mille põhjad kaeti liivaga. Lindla keskmine temperatuur katse jooksul oli $15,5 \pm 1^\circ\text{C}$ (standardhälve) ja keskmine õhuniiskus $57,4 \pm 7,2\%$ (standardhälve). Lindudel oli *ad libitum* ligipääs päevalilleseemnetele, mis olid kogu katse aja neile toiduks. Lisaks joodeti neid karotenoide sisaldava lahusega. Kogu katse jooksul hoiti linde kunstlikes valgustingimustes loodusliku päevapikkuse juures. Uuring toimus Eesti Keskkonnaministeeriumi (luba nr. 1-4.1/11/100) ja Põllumajandusministeeriumi loomkatse läbiviimise loakomisjoni (otsus nr. 95, 17. jaanuar 2012) loal. Linnud vabastati 3. märtsil.

Katses osalenud 71 isast rohevinti jaotati kolme gruppi: 24 said toltrasuriili, 24 metronidasooli ja 23 isendit olid kontrollgruppi, kes said tavalist karotenoidilahust. Ravi kestis mõlemal grupil 10 päeva. Mõlemad ravimilahused olid tehtud karotenoidilahusesse. Metronidasooli kontsentratsioon oli 400mg/l ja toltrasuriili kontsentratsioon oli 50mg/l. Ravimid valiti eeldades, et toltrasuriil ei mõjutaks trihhomonoosi nakkust ning metronidasool ei mõjutaks koksidioosi nakkust. Lindudelt koguti peale kinnipüüdmist, enne ravimi manustamise katse algust, 9. jaanuaril ära kaks äärmist sabasulge. Nende sulgede asemele katse aja kasvanud suled eemaldati samal päeval, kui nad vabastati.

Minu osaks eksperimendi juures oli abistamine lindude hooldamisel ja vabastamisel. Samuti oli minu ülesandeks sule KORTi mõõtmise kõikide etappide läbiviimine. Ekstraheerimise protsessi tegin täielikult ise. Peale ekstraheerimise protsessi, kui KORTi analüüsima hakkasin, kasutasin proovide paljususe tõttu juhendaja abi.

Enne KORTi mõõtmiseks vajalike protsesside alustamist kaalusin suled ning mõõtsin nende pikkust ja putke läbimõõtu. KORTi määrati sulgedest RIAGA (Wingfield *et al.* 1992; Bortolotti *et al.* 2008; Lattin *et al.* 2011)

Kõigepealt lõigati sulgetelt ära putke (*calamus*) osa, mille järel need kaaluti ja mõõdeti. Edasi lõigati need kääridega <math> < 5\text{mm}^2 </math> tükkideks ning pandi viaali, kuhu lisati ka 10ml metanooli. Siis pandi viaalid 30 minutiks toatemperatuuril sonikeerivasse vesivanni, milles oli destilleeritud vesi ja PBS puhver. Edasi asetati need üleöö loksutisse, 300 rpm ja 50 kraadi peal. Järgmisel päeval toimus töö tõmbekapi all: maksimaalse tõmbe all eraldati vaakumfiltratsiooni abil sulgedest metanool, kasutades selleks nr 4 Watman filterpaberit. Üleöö loksutil olnud sulgedega metanool valati läbi filterpaberi ümber uude viaali. Seejärel pesti sulgedega proovi viaali, filterpaberit ning klaasist letrit kokku 3 ml metanooliga, iga etapi jaoks vastavalt 1 ml metanooli. Uude viaali kogunenud filtraat pandi 60 kraadi peal üleöö aurustuma, maksimaalse tõmbe alla tõmbekapis nii, et viaalidel korki peal ei olnud. Järgmisel päeval ekstrakt rekonstitueeriti 550µl PBS puhvril ning pandi 10-15 sekundiks lokustile, 300 rpm juurde. Igast viaalist võeti seejärel välja kahe EPSi jaoks 200µl proovi. Proovid külmutati -20°C juures kuni KORTi analüüsimiseni. Edasi lisati proovidele 100µl Sigma-Aldrich c8784 antikeha (stokk lahjendatud 1:100 0.05 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% Na asiid puhvril) ning siis 100µl H3 CORTi (umbes 10 000 cpm, 0.05 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% Na asiid puhvril), proovid inkubeeriti 4 C peal üleöö. Seotud ja vaba KORT eraldati lisades 0,5 ml dekstraaniga kaetud aktiivsütt (0.5 % aktiivsütt koos 0.5% dekstraaniga 0.05 M Tris-HCl puhvril, pH 8, 0.1 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% NaN₃) Lahuse valmistamisel lisati kõigepealt dekstraan ning siis aktiivsüsi. Saadud suspensiooni segati 0-kraadises vees magnetsegajal vähemalt pool tundi, enne kui seda kasutada sai. Lahus oli kasutamise ajal magnetsegajal ja veetemperatuur hoiti 0°C juures. Peale aktiivsöe lisamist segati proovid vorteksil ja hoiti 10 min 4°C peal. Peale seda proovid tsentrifuugiti 4°C peal, 2000g 10min. 700µl supernatanti pandi uutesse ependorfi tuubidesse, aktiivsütt kaasa võtmata ja asetati 4°C külma. Proove fuugiti ka teine kord, et vabaneda

kogu aktiivsöest: 3 minutit 4°C juures 2000g. Seejärel pipeteeriti 550µl supernatanti tsintsillatsiooni tuubidesse, millele lisati 5ml tsintsillatsioonivedelikku ning siis asetati proovid tsintsillaatorisse. Programm nr 13 (tritium), mis igat proovi mõõtis 2 korda ja 3 minutit.

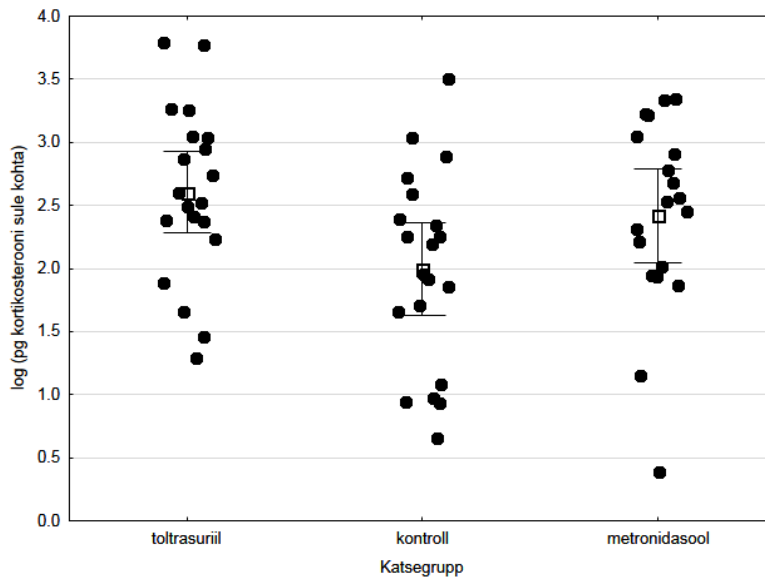
Duplikaatide korduvus sama linnu eri sulgede vahel oli 0,44 ($F_{29,30}=2.59$; $p<0,0058$). Sama sule duplikaatide korduvus oli 0,67 ($F_{125,126}=4,96$; $p<0,00001$).

3.3 Statistilised analüüsid

Toorandmete töötlemise protsessi ja statistilist analüüsi aitas teha juhendaja. Sule KORTi statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (ANOVA). Analüüsist jäeti välja kaheksa isendit, kelle sulgede vahelisel võrdlusel selgus, et sulgede vaheline KORTi sisalduse variatsioonikoefitsient oli suurem kui 100. Kuna sule KORTi väärtused ei olnud algselt normaaljaotusega jaotunud, tuli enne ANOVA tegemist algväärtused logaritmida, et saada normaaljaotusega tunnus. Seejärel tehti ühefaktorilist ANOVA analüüsi. Katsegruppide ühe kaupa võrdlemiseks kasutati Tukey *post-hoc* testi.

4. Tulemused

KORTi tase erines katsegruppide vahel ($F_{2;56}=3,51$, $p=0,037$), kuna toltrasuriiliga, ravitud grupis leiti kõrgem KORTi tase sulgedes kui kontrollgrupis (*post-hoc*, $p=0.03$). Teiste katsegruppide vahel olulisi erinevusi ei olnud.



Joonis 1. Ravimite mõju erinevate katserühmade sulgedel. Punktid tähistavad isendite vasaku ja parema sule keskmist KORTi väärtust *log* skaalal. Kastike näitab katsegrupi keskmist väärtust ning vurrud 95% usalduspiire.

5. Arutelu

Vastupidiselt oodatule mõjus toltrasuriili menetlus sule KORTi suurendavalt. Samas oli teada, et linnud olid nakatunud koksidioosiga. Kokksiidi ootsüste olemasolu kõikide lindude väljaheidetest oli eelnevalt määratud (U.Karu avaldamata andmed). Toltrasuriili efektiivsust koksidioosi ravimisel on näidatud varasemates uurimustes (Alcala-Canto *et al.* 2014; Sild *et al.* 2014). Samas võis kokksiidinakkus peale ravimenetluse lõppu toltrasuriili saanud lindudel tagasi tulla, kuna koksidioosi raviva ravimi positiivne mõju ei pruukinud olla pikaajaline ning lühiajaline langus isendite plasma KORTis ei jõudnud sule KORTi mõjutada. Seda, et koksiidinakkus võib taastuda peale ravimi manustamist, on varasemalt näidatud (Hõrak *et al.* 2004), kuid selles töös ei kasutatud ravimina toltrasuriili. Samuti on toltrasuriili puhul näidatud, et see mõjutab koksiidinakkuse intensiivsust vähendavana, aga ootsüste siiski 100% ära ei kaota (Alcala-Canto *et al.* 2014). Käesolevas uurimuses koksiidinakkuse intensiivsus vähenes (U.Karu, avaldamata andmed), aga täielikult ei suutnud toltrasuriil ootsüste ära kaotada. Samas arvan, et nakkuse taastumine ei mõjutanud isendite sule KORTi suurendavalt, kuna on näidatud, et rohevindid on suutelised hästi tolereerima endalt pärinevaid koksiiditüvesid, tänu millele võib koksiidinakkus nende KORTi taset mitte mõjutada (Sild *et al.* 2014). Samas nakatades linde nende jaoks uute koksiiditüvedega, tõuseb KORTi tase (Sild *et al.* 2014). Käesolevas uurimuses võis ravitud lindude KORTi tase tõusta ravimi metaboliseerimise kulukuse tõttu. Koksidioosi suhtes tolerantset linnud saavad ka ise ilmselt parasiitide kontrolli all hoidmisega hakkama ning seega võis ravimi manustamine olla neile pigem kahjulik kui kasulik. Mulle teadaolevalt aga ei ole varasemalt näidatud, et toltrasuriili manustamine võiks mõjuda stressitaset tõstvalt. Samuti ei tea ma, et mõni teine ravim võiks seda tõsta. Arvan, et juba niigi koksidioosi suhtes tolerantsetes lindudes, võimendasid nakkus ning ravimi metaboliseerimise kulukus teineteist, mille tõttu ka KORTi tase oli lindudel sulgedes kõrgem.

Võrreldes kontrollgrupiga, metronidasooli saanud lindude KORTi tase, vastupidiselt oodatule, oluliselt ei muutunud. Kuna on näidatud, et metronidasool mõjub erinevatele *T.gallinae* tüvedele pärssivalt (Zimre-Grabensteiner *et al.* 2011), ei saa eeldada, et ravim trihomoosile ei mõju. Samas trihomoosi puhul ei saa olla tegelikult kindel, et kõikidel

lindudel oleks trihhomonoos esinenud, sest puudusid võimalused, et elusatelt lindudelt trihhomonoosi määrata. Katse jooksul suri neli isast rohevinti, kelle puhul otseseid trihhomonoosi tunnuseid ei leitud, kuid ühe linu puhul oli teatavaid kahtlusi (P.Hõrak, avaldamata andmed). Seega võib arvata, et KORTi tase ei langenud selle tõttu, et linnud ei olnudki haiged. Samas ei saa seda ka kindlalt väita, kuna ülejäänud lindude puhul ei olnud selge, kas nad on trihhomonoosi nakatunud või mitte ning seega võis ravimine olla edukas, kuid raviga kaasnenud muutused füsioloogias ei kajastunud KORTi tasemetes sulgedes.

Mõlema ravimi vastuoluliste tulemuste põhjus võis peituda ka meetodi ebatäpsuses (Romero ja Fairhurst 2016). Näiteks võis ekstraheerimise etapis osa KORTist kaduma minna. Samas ei ole see väga tõenäoline, et ekstraheerimine oli põhjus, miks tulemused oodatust erinesid, arvestades seda, et ekstraheerimise etapi tegin kõikidel sulgedel ise ning seega peaks kaotsi läinud KORTi hulk sule kohta kõigil lindudel ligikaudu sama olema. Teine võimalus on, et töö viimases etapis, kus kasutati seondumata KORTi sadestamiseks aktiivsütt, võis supernatandi eemaldamisel erinevatel proovidel erinev kogus aktiivsütt kaasa tulla. Samas mõõtmiste korduvus sama linu sulgede vahel oli siiski piisav, et mõõtmistulemusi usaldada.

Kokkuvõte

Keskonnatingimustel on oluline mõju isendi elukäigule. Kui organism võitleb näiteks parasiitidega, siis selle tõttu on tal vähem energiat, mida panustada teistesse füsioloogilistesse protsessidesse. Parasiitidega võitlemiseks on organismil immuunsüsteem, mida tinglikult jagatakse kaasasündinud immuunsussüsteemiks ning elu jooksul tekkinud omandatud immuunsüsteemiks. Keskkonnast tulenevad negatiivsed signaalid võivad lisaks immuunvastuse esile kutsumisele põhjustada ka akuutset või kroonilist stressi. Organismi stressitaset on võimalik mõõta glükokortikoidhormoonide hulka kvantifitseerides.

Käesolevas töös hinnati antibiootikumiravi mõju rohevintide stressihormooni tasemele. Linnud jagati vastavalt kolme katsegruppi: metronidasooliga ravitud linnud, toltrasuriiliga ravitud linnud ning kontrollgrupp, kus linde ei ravitud. Eeldati, et mõlemad ravimid langetavad lindude KORTi taset. Katse jooksul laboritingimustes kasvanud sulged tõmmati välja peale katse lõppemist ning sulgede KORTi taset mõõdeti RIA meetodi abil.

Koktsidioosiravi toltrasuriiliga mõjus rohevintide stressitasemele vastupidiselt oodatule. Võimalik, et koktsiidinakkuse suhtes niigi resistentsetele lindudele oli ravimi metaboliseerimine kulukas, mis põhjustas KORTi taseme tõusu sulgedes võrreldes kontrollgrupiga. Metronidasooli manustamine KORTi taset ei mõjutanud. Võimalik, et ravimi manustamine mõjus trihhomonoosinakkusele pärssivalt, kuid see ei avaldunud stressitaseme languses. Samas võis metronidasooliga ravimisel puududa mõju sulgede KORTi tasemele, kuna linnud ei pruukinudki olla trihhomonoosi nakatunud.

Alati ei ole üheselt mõistetav, kuidas on omavahel seotud parasiidid, immuun- ja stressivastus. Käesolevas töös ei õnnestunud näidata, et linde ravides nende stressitase langeb. Loodetavasti toovad edasised uuringud rohkem selgust, kuidas parasiitide arvukuse kontroll on seotud isendi stressivastusega.

Summary

Effects of antibiotic treatment on stresshormone levels of greenfinches (*Carduelis chloris*)

Environmental conditions influence life history of an individual. If an organism fights off parasites, it has less energy to contribute to other physiological processes. To fight off parasites, organisms have an immune system, which can be roughly divided into innate and acquired immunity. Harmful environmental signals may both induce an immune response and result in acute or chronic stress. An organism stress level can be measured via quantifying its glucocorticoid hormone levels.

This study describes the effect of drug administration on greenfinch stress hormone levels. Birds were divided into three test groups: metronidazole-treated birds, toltrazuril-treated birds and control group, where birds did not receive any treatment. I assumed that both treatments will lower birds corticosterone (CORT) levels. CORT was measured from feathers grown during the experiment, using RIA method.

Treatment of coccidiosis with Toltrazuril increased CORT concentration contrary to my expectations. It is possible that drug metabolization was costly for those birds as they were resistant enough to coccidian infection, which resulted in increased CORT levels. Treatment with Metronidazole did not affect CORT levels. It is possible that the drug reduced trichomonosis infection intensity, but it did not result in decreases in stress hormone levels. However, the treatment might not have had an effect on feather CORT level, because it is possible that birds were not infected with trichomonosis.

It is not always clear, how parasite load, immune response and stress response interact with each other. Current study failed to demonstrate that drug administration lowers birds stress hormone. Hopefully, future studies will bring more clarity how parasite infection is associated with stress response.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Richard Meiterni, tänu kelle nõuannetele ja abile mu töö valmis. Tänan ka immuunökoloogia töörühma juhatajat Peeter Hõrakut ja Ulvi Karu, kes aitasid mu tööle viimast lihvi anda ning lisaks tänan ka teisi toremaid töörühma inimesi.

Kirjanduse loetelu

- Al-Dabbagh K.Y., Marchant S. ja Higgins P.J. (2006). *Handbook of Australian, New Zealand, & Antarctic birds. 7, B. Boatbill to starlings.-Part B. Dunnock to starlings.* Oxford University Press.
- Alcala-Canto Y., Ramos-Martinez E., Tapia-Perez G., Gutierrez L. ja Sumano H. (2014). Pharmacodynamic evaluation of a reference and a generic toltrazuril preparation in broilers experimentally infected with *Eimeria tenella* or *E. acervulina*. *British Poultry Science*, in press.
- Alnassan A.A., Shehata A.A., Kotsch M., Schrödl W., Krüger M., Dauschies A. ja Bangoura B. (2013). Efficacy of early treatment with toltrazuril in prevention of coccidiosis and necrotic enteritis in chickens. *Avian Pathology*, 1-9.
- Amin A., Bilic I., Liebhart D. ja Hess M. (2014). Trichomonads in birds—a review. *Parasitology*, 141, 733.
- Blas J., Bortolotti G.R., Tella J.L., Baos R. ja Marchant T.A. (2007). Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8880-8884.
- Boal C.W., Mannan R.W. ja Hudelson K.S. (1998). Trichomoniasis in Cooper's hawks from Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 34, 590-593.
- Bortolotti G.R., Marchant T., Blas J. ja Cabezas S. (2009). Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *J Exp Biol*, 212, 1477-1482.
- Bortolotti G.R., Marchant T.A., Blas J. ja German T. (2008). Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, 22, 494–500.
- Breuner C.W., Delehanty B. ja Boonstra R. (2012). Evaluating stress in natural populations of vertebrates: total CORT is not good enough. *Functional Ecology*, n/a-n/a.
- Buchanan K.L. (2000). Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 156-160.
- Cabezas S., Blas J., Marchant T.A. ja Moreno S. (2007). Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones and Behavior*, 51, 313-320.
- Calcagni E. ja Elenkov I. (2006). Stress System Activity, Innate and T Helper Cytokines, and Susceptibility to Immune-Related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, 62-76.
- Clement P. (1999). *Finches and sparrows.* Bloomsbury Publishing.

- Cockrem J. (2007). Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal of Ornithology*, 148, S169-S178.
- Coutinho A.E. ja Chapman K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335, 2-13.
- Crino O.L., Johnson E.E., Blickley J.L., Patricelli G.L. ja Breuner C.W. (2013). Effects of experimentally elevated traffic noise on nestling white-crowned sparrow stress physiology, immune function and life history. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 2055-2062.
- Cyr N.E. ja Michael Romero L. (2007). Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success. *General and Comparative Endocrinology*, 151, 82-89.
- Dantzer B., Fletcher Q.E., Boonstra R. ja Sheriff M.J. (2014). Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology*, 2.
- Dhabhar F.S. (2008). Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16, 300-317.
- Elsheikha H. ja Khan N.A. (2011). *Essentials of veterinary parasitology*. Horizon Scientific Press.
- EMEA (1997). The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Veterinary Medicine Evaluation Unit Metronidazole - Summary Report EMEA/MRL/173/96-FINAL.
- EMEA (1998). The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Veterinary Medicine Evaluation Unit Toltrazuril - Summary Report (1) EMEA/MRL/314/97-FINAL. In.
- Fairhurst G.D., Marchant T.A., Soos C., Machin K.L. ja Clark R.G. (2013). Experimental relationships between levels of corticosterone in plasma and feathers in a free-living bird. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 4071-4081.
- French S.S., Moore M.C. ja Demas G.E. (2009). Ecological immunology: The organism in context. *Integrative and Comparative Biology*, 49, 246-253.
- Friend M. ja Franson J.C. (1999). Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases of birds. In. DTIC Document.
- Giraudeau M., Mousel M., Earl S. ja McGraw K. (2014). Parasites in the City: Degree of Urbanization Predicts Poxvirus and Coccidian Infections in House Finches (*Haemorrhous mexicanus*). *PLoS ONE*, 9, e86747.

- He H.Q., Genovese K.J., Swaggerty C.L., Nisbet D.J. ja Kogut M.H. (2008). Differential induction of nitric oxide, degranulation, and oxidative burst activities in response to microbial agonist stimulations in monocytes and heterophils from young commercial Turkeys. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, 177-185.
- Hõrak P. ja Männiste M. (2015). Viability selection affects black but not yellow plumage colour in greenfinches. *Oecologia*, 1-10.
- Hõrak P., Saks L., Karu T. ja Ots I. (2006a). Host resistance and parasite virulence in greenfinch coccidiosis. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 277-288.
- Hõrak P., Saks L., Karu U., Ots I., Surai P.F. ja McGraw K.J. (2004). How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *Journal of Animal Ecology*, 73, 935-947.
- Hõrak P., Zilmer M., Saks L., Ots I., Karu U. ja Zilmer K. (2006b). Antioxidant protection, carotenoids, and the costs of immune challenge in greenfinches. *Journal of Experimental Biology*, 209, 4329-4338.
- Jenni-Eiermann S., Helfenstein F., Vallat A., Glauser G. ja Jenni L. (2015). Corticosterone: Effects on feather quality and deposition into feathers. *Methods in Ecology and Evolution*, n/a-n/a.
- Jovani R., Montalvo T. ja Sabaté S. (2014). Fault bars and bacterial infection. *Journal of Ornithology*, in press.
- Kaiser P. (2010). Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology*, 39, 309-324.
- Kenneth M., Travers P. ja Walport M. (2012). Janeway's immunobiology. *New York, NY: Garland Science*.
- Kitaysky A.S., Piatt J.F., Wingfield J.C. ja Romano M. (1999). The adrenocortical stress-response of Black-legged Kittiwake chicks in relation to dietary restrictions. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 169, 303-310.
- Krautwald-Junghanns M.E., Zebisch R. ja Schmidt V. (2009). Relevance and treatment of coccidiosis in domestic pigeons (*Columba livia forma domestica*) with particular emphasis on toltrazuril. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23, 1-5.
- Kuhlman J.R. ja Martin L.B. (2010). Captivity affects immune redistribution to skin in a wild bird. *Functional Ecology*, 24, 830-837.
- Lattin C.R., Reed J.M., DesRochers D.W. ja Romero L.M. (2011). Elevated corticosterone in feathers correlates with corticosterone-induced decreased feather quality: a validation study. *Journal of Avian Biology*, 42, 247-252.

- Lawson B., Robinson R.A., Neimanis A., Handeland K., Isomursu M., Agren E.O., Hamnes I.S., Tyler K.M., Chantrey J., Hughes L.A., Pennycott T.W., Simpson V.R., John S.K., Peck K.M., Toms M.P., Bennett M., Kirkwood J.K. ja Cunningham A.A. (2011). Evidence of Spread of the Emerging Infectious Disease, Finch Trichomonosis, by Migrating birds. *EcoHealth*, 8, 143-153.
- Lehikoinen A., Lehikoinen E., Valkama J., Väisänen R.A. ja Isomursu M. (2013). Impacts of trichomonosis epidemics on Greenfinch *Chloris chloris* and Chaffinch *Fringilla coelebs* populations in Finland. *Ibis*, 155, 357-366.
- Martin L.B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *General and Comparative Endocrinology*, 163, 70-76.
- Martin L.B., Kidd L., Liebl A.L. ja Coon C.A. (2011). Captivity induces hyper-inflammation in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Journal of Experimental Biology*, 214, 2579-2585.
- McEwen B.S. ja Wingfield J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43, 2-15.
- Møller A.P., Erritzøe J. ja Nielsen J.T. (2009). Frequency of fault bars in feathers of birds and susceptibility to predation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97, 334-345.
- Munoz N.E., Blumstein D.T. ja Foufopoulos J. (2010). Immune system activation affects song and territorial defense. *Behav. Ecol.*, 21, 788-793.
- Neimanis A.S., Handeland K., Isomursu M., Agren E., Mattsson R., Hamnes I.S., Bergsjø B. ja Hirvela-Koski V. (2010). First Report of Epizootic Trichomoniasis in Wild Finches (Family Fringillidae) in Southern Fennoscandia. *Avian diseases*, 54, 136-141.
- Pap P.L., Vagasi C.I., Czirjak G.A., Titilincu A., Pintea A. ja Barta Z. (2009). Carotenoids modulate the effect of coccidian infection on the condition and immune response in moulting house sparrows. *Journal of Experimental Biology*, 212, 3228-3235.
- Pap P.L., Vagasi C.I., Czirjak G.A., Titilincu A., Pintea A., Osvath G., Fulop A. ja Barta Z. (2011). The effect of coccidians on the condition and immune profile of molting house sparrows (*Passer domesticus*). *Auk*, 128, 330-339.
- Råberg L., Graham A.L. ja Read A.F. (2009). Review. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 37-49.
- Raouf S.A., Smith L.C., Brown M.B., Wingfield J.C. ja Brown C.R. (2006). Glucocorticoid hormone levels increase with group size and parasite load in cliff swallows. *Animal Behaviour*, 71, 39-48.

- Reul J.M.H.M., Collins A., Saliba R.S., Mifsud K.R., Carter S.D., Gutierrez-Mecinas M., Qian X. ja Linthorst A.C.E. (2015). Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. *Neurobiology of Stress*, 1, 44-59.
- Robles T.F., Glaser R. ja Kiecolt-Glaser J.K. (2005). Out of Balance A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. *Current Directions in Psychological Science*, 14, 111-115.
- Romero L.M. ja Fairhurst G.D. (2016). Measuring Corticosterone in Feathers: Strengths, Limitations, and Suggestions for the Future. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*.
- Romero L.M. ja Reed J.M. (2005). Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140, 73-79.
- Santiago-Moreno J., Luzón M., Coloma M.A., Pulido-Pastor A., Gómez-Guillamón F., de la Vega R.S., Toledano-Díaz A. ja López-Sebastián A. (2010). Relationship between Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sperm quality and level of parasitism. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 605-611.
- Sapolsky R.M., Romero L.M. ja Munck A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21, 55-89.
- Scheinman R.I., Gualberto A., Jewell C.M., Cidlowski J.A. ja Baldwin A.S. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Molecular and cellular biology*, 15, 943-953.
- Schulenburg H., Kurtz J., Moret Y. ja Siva-Jothy M.T. (2009). Introduction. Ecological immunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 3-14.
- Seegerstrom S.C. (2000). Personality and the immune system: Models, methods, and mechanisms. *Annals of Behavioral Medicine*, 22, 180-190.
- Seegerstrom S.C. (2010). Resources, Stress, and Immunity: An Ecological Perspective on Human Psychoneuroimmunology. *Annals of Behavioral Medicine*, 40, 114-125.
- Sepp T., Sild E. ja Hõrak P. (2010). Hematological Condition Indexes in Greenfinches: Effects of Captivity and Diurnal Variation. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83, 276-282.
- Sheriff M.J., Dantzer B., Delehanty B., Palme R. ja Boonstra R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166, 869-887.

- Sild E., Meitern R., Männiste M., Karu U. ja Hõrak P. (2014). High feather corticosterone indicates better coccidian infection resistance in greenfinches. *General and Comparative Endocrinology*, 204, 203-210.
- Sorrells S.F., Caso J.R., Munhoz C.D. ja Sapolsky R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*, 64, 33-39.
- Zamora-Camacho F.J., Reguera S., Rubiño-Hispán, María Virtudes ja Moreno-Rueda G. (2014). Eliciting an immune response reduces sprint speed in a lizard. *Behavioral Ecology*.
- Zimre-Grabensteiner E., Arshad N., Amin A. ja Hess M. (2011). Genetically different clonal isolates of *Trichomonas gallinae*, obtained from the same bird, can vary in their drug susceptibility, an in vitro evidence. *Parasitology International*, 60, 213-215.
- Wikelski M. ja Cooke S.J. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 38-46.
- Wingfield J.C., Vleck C.M. ja Moore M.C. (1992). Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of the Sonoran desert. *Journal of Experimental Zoology*, 264, 419-428.
- Wood P. (2009). Salivary steroid assays—research or routine? *Annals of clinical biochemistry*, 46, 183-196.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Ots,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Antibiootikumi ravi mõju rohevintide (*Carduelis chloris*) stressihormooni tasemele“, mille juhendaja on Richard Meitern.
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **19.05.2015**