

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Ššeglova

**Antibiootikumiravi mõju rohevintide
(*Carduelis chloris*) sulestiku värvusele**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Richard Meitern, MSc

Tartu 2016

Infoleht

Isendid populatsioonis varieeruvad selle osas, kuidas nad haigustekitajatele reageerivad. Immuunaktivatsioon tähendab tihti isendi jaoks seda, et teistele olulistele organismi funktsioonidele pööratakse vähem tähelepanu. Näiteks võib immuunvastus mõjutada sugulise valiku signaaltunnuste väljaarendamist. Käesoleva töö eemärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutavad parasiithaiguste vastased ravimid lindude sulgede kollase värvi intensiivsust. Selleks viidi läbi eksperiment rohevintidega. Katselinde raviti kahe antibiootikumiga ning jälgiti, kuidas ravimine mõjutab sulgede kollase värvi intensiivsust. Kollase värvi intensiivistumine toimus nende lindude sulgedes, keda raviti metronidasooliga. Lindudel, keda raviti toltrasuriiliga, erinevusi sulgede kollases värvis ei esinenud võrreldes kontrollrühma lindude sulgedega. Tulemustest saab järeldada, et metronidasooli ravi tõstis ühe sugulise valiku signaaltunnuse intensiivsust, st mikroobid, mis on tundlikud metronidasoolile, võivad olla sugulise valiku ausust garanteerivaks mehhanismiks.

Märksõnad: trihhomonoos, koktsidioos, metronidasool, toltrasuriil, immuunsüsteem, tervis, oksüdatiivne stress, karotenoidid, rohevint

Information sheet

Individuals vary in how they react to different parasitic diseases. Immune system stimulation is thought to reduce energy availability to other functions of an organism. For instance one such function is the expression of sexual selection signals. In this study I conducted an experiment with greenfinches. The birds were cured with two types of antibiotics and subsequently the effect of manipulation on feather yellow colour intensity was recorded. Increase in yellow colour intensity occurred in the feathers of birds that were treated with Metronidazole. There was no significant change in the yellow colour intensity on feathers of birds that were treated with Toltrazuril. These results show that treatment with Metronidazole was effective in enhancing a signaling trait of sexual selection. I.e., microbes sensitive to Metronidazole, may mediate the honesty of sexual selection on carotenoid-based plumage colouration.

Keywords: trichomonosis, coccidiosis, Metronidazole, Toltrazuril, immune system, health, oxidative stress, carotenoids, greenfinch

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1 Parasiithaigused	6
2.1.1 Trihhomonoos	6
2.1.2 Koktsidioos.....	7
2.2 Metronidasool	9
2.3 Toltrasuriil	10
2.4 Oksüdatiivne stress ja antioksidandid.....	11
2.4.1 Karotenoidid.....	11
2.4.1.1 Koktsidioos ja karotenoidsed ornamendid.....	14
2.4.2 Koktsidioos ja oksüdatiivne stress	14
2.5 Immuunvastuse ja oksüdatiivse stressi tähtsus ökoloogias	15
3. Materjal ja meetodika.....	16
4. Tulemused	19
5. Arutelu	20
Kokkuvõte	22
Summary.....	23
Tänuavaldused.....	24
Kirjanduse loetelu.....	25

1. Sissejuhatus

Isendi kohasust mõjutavad mitmed sisemised ja välimised faktorid. Tingimustes, kus organismid on pidevalt parasiitide ja teiste haigusekitajate rünnaku all, on oluline ellujäämist ja kohasust mõjutav roll organismi kaitsval immuunsüsteemil (Sheldon & Verhulst 1996). Kuigi esmapilgul võiks eeldada, et kõik isendid populatsioonis võiksid sama hästi haigustekitajatega hakkama saada, esineb isendite vahel oluline varieeruvus haiguste vastuvõtlikkuse osas (Medzhitov *et al.* 2012). Immuunökoloogias seletatakse seda varieeruvust lõivusuhete esinemisega immuunsüsteemi ja teiste oluliste organismi funktsioonide vahel (Martin *et al.* 2011). Lõivusuhted tekivad seetõttu, et ressursse on looduses enamasti piiratud koguses. Immuunökoloogide eesmärgiks on leida ja kirjeldada selliseid mehhanisme, mis seovad immuunsüsteemi teiste elutähtsate funktsioonidega nagu näiteks signaaltunnuste väljaarendamine (Martin *et al.* 2011).

On pakutud seletus, et sekundaarsed sootunnused, näiteks pigmentidel baseeruv lindude värviline sulestik, on evolutsioneerunud peegeldamaks isendi kvaliteeti (Zahavi 1975; Zahavi & Zahavi 1997). Karotenoididel baseeruvate ornamentide ekspressioon arvatakse olevat sõltuvuses isendi tervislikust seisundist, kuna karotenoididel on roll nii immuunsüsteemis kui ka isenditevahelises signaliseerimises (Møller *et al.* 2000). Kuna linnud ei suuda karotenoide ise sünteesida ning peavad saama neid toiduga, võib esineda füsioloogiline lõivusuhe karotenoidide kasutamises. Hamilton & Zuk (1982) väitsid, et kuna sellised ornamendid on paljude lindude puhul sugulise valiku tunnuseks, peegeldab sulgede värvi intensiivsus isendi kvaliteeti.

Vaatamata immuunökoloogide suurele huvile karotenoididel baseeruvate ornamentide ökoloogia vastu, ei ole ikka veel selge, mida täpselt karotenoididega signaliseeritakse ning kas haigusresistentsus on üks nendest signaalidest (Vinkler & Albrecht 2009; Svensson & Wong 2011).

Üheks võimaluseks, kuidas seda küsimust uurida, on manipuleerida parasiitidega nakatunud lindude tervislikku seisundit, manustades neile ravimit ning seejärel jälgida manipulatsiooni efekti sulgede värvusele. Hea parasiitmodelsüsteem oleks selline, mis on looduslikes populatsioonides väga levinud. Sobilikul mudelorganismil peaks olema karotenoidne ornamentatsioon. Näiteks rohevintidel on näidatud, et karotenoididega

toitmine tõstab plasma karotenoidide kontsentratsiooni ning sulgede kollase värvi intensiivsust (Hõrak *et al.* 2010).

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas ja kuidas mõjutab parasiitidevastaste ravimite manustamine kollase värvi intensiivsust rohevintide katse ajal kasvanud sulgedel. Ennustasin, et ravimite manustamine tõstab ravitud lindude sulgede kollase värvi intensiivsust võrreldes kontrollrühma lindude sulestikuga. Ennustus põhineb eelnevatel uurimustel, kus näidati, et parasiitnakkused suudavad negatiivselt mõjuda karotenoididel baseeruvale pigmentatsioonile kahel viisil. Esiteks läbi rasvlahustuvate karotenoidide omastamise pärssimise soolestikus (Allen & Fetterer 2002; Hõrak *et al.* 2004) ning teiseks läbi immuunvastusega kaasneva suurenenud oksüdatiivse stressi (Allen 1997; Sepp *et al.* 2012).

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Parasiithaigused

Parasitism on kooselusuhe kahe erineva liigi vahel, mille puhul üks (parasiit) kasutab teist (peremeest) oma elukeskkonnana, kust ta saab kõike eluks ja kasvuks vajalikku. Parasiidid moodustavad väga suure osa bioloogilisest mitmekesisusest Maal ning parasiitidega nakatunud olemine on lindudel ja teistel loomadel pigem reegel kui erand (Friend & Franson 1999). Enamik parasiite ei kutsu peremehes esile kliinilisi muutusi (Friend & Franson 1999), kuid leidub ka neid, mis põhjustavad erineva ulatusega haigusi ning tõsisematel juhtudel ka surma (Friend & Franson 1999; Combes 2005). Erinevate parasiitide patogeensus ehk võime kutsuda esile kliinilisi haigusi sõltub juba olemasolevate parasiitide arvust peremehes ja sisemistest faktoritest, millest sõltub peremehe vastus parasiitide rünnakule (Friend & Franson 1999). Näiteks võib vähepatogeenne parasiit nälgival või stressis linnul põhjustada tema surma (Friend & Franson 1999). Indiviidide vahelised erinevused immuunvastuse tugevuses võivad olla seotud immuunsüsteemi rakendamise kulukusega ning lõivsuhte esinemisega immuunsüsteemi ja teiste elutähtsate funktsioonide (näiteks sigimise, oksüdatiivse stressi vastase kaitse, sugulise valiku all olevate signaaltunnuste väljaarendamise) vahel (Schmid-Hempel 2011; Sepp *et al.* 2012).

2.1.1 Trihhomonoos

Trihhomonoos on alglooma *Trichomonas gallinae* põhjustatud nakkushaigus, mida on ajalooliselt enam leitud tuvilastel ja röövlindudel, kuid haigestuda võivad ka linnud värvuliste (*Passeriformes*), kanaliste (*Galliformes*), haneliste (*Anseriformes*) ja papagoiliste (*Psittaciformes*) seltsidest (Höfle *et al.* 2004). Haiguskolded tekivad enamasti hingamisteede ja seedetrakti ülemistesse osadesse, kus parasiidid koloniseerivad suud, neelu, söögitoru ja pugu (Amin *et al.* 2014).

T.gallinae primaarseks peremeheks peetakse kaljutuvi (*Columba livia*), kelle kaudu haigus levis üle maailma teistele liikidele (Atkinson *et al.* 2008), kuid ka teised tuvilaste (*Columbidae*) sugukonna esindajad, näiteks kaelus-turteltuvi (*Streptopelia decaocto*) ja kaelustuvi (*Columba palumbus*), aitasid oluliselt patogeeni levimisele kaasa (Amin *et al.* 2014). *T.gallinae* ülenkandumine liikide ja isendite vahel võib toimuda mitmel moel. Otsene parasiidi ülekandumine vanematelt järglastele toimub läbi toitmise. Täiskasvanud tuvilastel toimub ülekandumine kosimise ajal. Röövlindude nakatumine

toimub, kui tarbitakse toiduks parasiiti kandvat saaklooma. Samuti võib parasiit sattuda linnu kehasse koos veega, mis on saastunud sülje, väljehaidete või pugu sekreetidega. Üldiselt peab ülekandumine toimuma kiirelt, kuna *T. gallinae* ei suuda peremeesorganismist väljaspool kaua elada (Amin *et al.* 2014).

Erinevad *T.gallinae* tüved varieeruvad oma patogeensuse poolest. Varieeruvust tüvede virulentsuse osas seostatakse erinevustega tüvede antigeenses koostises (Stepkowski & Honigberg 1972; Dwyer 1974; Amin *et al.* 2014). Arvatakse, et suurem antigeenide mitmekesisus põhjustab peremehes tugemavama immuunvastuse. Seega on suurema antigeense mitmekesisusega tüved kokkuvõttes vähem virulentsed võrreldes nendega, mis omavad väiksemat antigeenset mitmekesisust (Atkinson *et al.* 2008; Amin *et al.* 2014).

Haiguse väljakujunemine ja ulatlikkus sõltuvad *T.gallinae* tüvest ja peremeesorganismi immuunsüsteemist (Höfle *et al.* 2004). Madalama patogeensusega tüved kutsuvad esile süljekoostist ja põletikku suuõõne ja kurgu piirkondades. Kõrgema patogeensusega tüved põhjustavad juustjaid haiguskohtadeid suus, kurgus ja pugus. Mõnede tüvede puhul liiguvad trihhomoonased rindmikus ja kõhuõõnsuses olevatesse elunditesse (kopsudesse, südamesse, maksa, pankreasse) (Atkinson *et al.* 2008). Lisaks võivad mõnede tüvede esindajad liikuda koljuõõnde, tungides sealt aju ja silmade piirkondadesse. Nakatumine patogeensete tüvedega viib tavaliselt linnu surmani, mida põhjustab kas lämbumine, nälgimine või dehüdratsioon (Amin *et al.* 2014).

Silmaga nähtavad sümptomid, mis esinevad trihhomonoosi puhul, võivad viidata ka teistele patoloogiatele, näiteks nakatumisele poksviirustega, seenhaigusele seente perekondadest *Candidida* ja *Aspergillus*, nakatumisele ümarussidega perekonnast *Capillaria*, A-vitamiini defitsiidile. Seega selleks, et kindlaks teha, kas lind on nakatunud just trihhomonoosi, on vaja linnu kehast saadud proove uurida mikroskoobi all ja/või identifitseerida parasiit DNA järjestuse alusel. Proove võetakse suuõõnest ning vajadusel saab kasvatada *T.gallinae* rakke ka kultuuris (Amin *et al.* 2014).

2.1.2 Koktsidioos

Vabas looduses elavatel lindudel põhjustavad koktsidioosi peamiselt *Isospora* perekonna koktsiidid, kes on üherakulised obligatoorsed sooleparasiidid ning enamasti parasiteerivad soolestiku epiteelil, kuid värvuliste puhul ka teistes organites (maks, põrn ja kopsud), kuhu võivad liikuda esimese põlvkonna sporosoidid. Nakatumine toimub

nakatunud isendi väljaheites olevate ootsüstide allaneelamisel. Seedetrakti jõudnud ootsüstid vabastavad soole limaskesta epiteelirakkudes sporooside, mis sisenevad peensoole rakkudesse ja paljunevad mittesugulisel teel (Giacomo *et al.* 1997). Selles haiguse etapis võib hävida suur hulk peremeesorganismi peensoole rakke, mille tagajärjel on häiritud toitumine ja toitainete omastamine, tekib dehüdratsioon ning suureneb vastuvõtlikkus muudele haigustekitajatele, mis võib lõpuks põhjustada surma (Friend & Franson 1999). Iga mittesugulise paljunemise korral toodetakse ka teatud hulk merosoide, mis nakatavad uusi rakke (Giacomo *et al.* 1997). Mõned merosoidid arenevad gametotsüütideks, millest saavad gameedid. Need ühinevad ning tekkinud sügoot hakkab arenema ootsüstiks. See väljub rakust ning suundub väljaheidetesse (Giacomo *et al.* 1997).

Koktsiidid kuuluvad enamlevinud lindude parasiitide hulka (Greiner 2008). Suurima patogeensusega liigid on perekonnast *Eimeria* (Friend & Franson 1999). Nakatades kodulinde, põhjustab koktsidioos suuri kadusid linnukasvatustööstuses (Chapman 2014). Kodukanadega tehtud katsetest on teada, et koktsiidid perekonnast *Eimeria* pärsvad oluliste toitainete, kaasa arvatud karotenoidide ja E-vitamiini, omastamist soolestikus (Allen & Fetterer 2002) ning võivad pärssida karotenoidse pigmentatsiooni intensiivsust (Tyczkowski *et al.* 1991b).

Koktsidioos on immuunökoloogilistes uuringutes heaks parasiithaiguse mudeliks, kuna eeldatavalt esinevad proportsionaalsed seosed peremeesorganismi resistentsuse, parasiidi viruletsuse ja parasiidi kohasuse vahel (Hõrak *et al.* 2006). Seega peaks peremeesorganismi väljaheidetest mõõdetud ootsüstide kontsentratsioon otseselt peegeldama parasiidi paljunemisedukust (Chapman 1998). Koktsiidide parasiteeriva elutegevuse käigus võib olla alla surutud karotenoidsete ornamentide väljakujunemine (Tyczkowski *et al.* 1991b); ainult kõige kõrgema kvaliteediga isendid suudavad välja arendada sulgedel erksaid karotenoidseid ornamente (Lozano 1994; Svensson & Wong 2011). Seega võiks koktsidioosi mudelsüsteem võimaldada signaliseerimise aususe uurimist (Hõrak *et al.* 2006). Lisaks on mudeli eeliseks võimalus kergesti peatada koktsiidide paljunemist koktsidiostaatilise ravimiga, standardiseerides sellega katselindude tervislikku seisundit ning seejärel nakatada linde uuesti soovitud tüvedega (Hõrak *et al.* 2006).

2.2 Metronidasool

Metronidasool kuulub nitroimidasooli rühma, mille moodustavad sarnaste struktuuridega ühendid (Edwards 1993). Ta on nitroimidasoolide rühmast enim uuritud ning on efektiivne mitmete algloomade ja anaeroobsete bakterite põhjustatud haiguste, kaasa arvatud trihhomoonoosi, ravimisel (Edwards 1980).

Nitroimidasooli rühma antibiootikumid on laia mõjuspektriga olles aktiivsed nii grampositiivsete ja gramnegatiivsete bakterite kui ka algloomade ja mõnede nematoodide vastu. Nad avaldavad tsütotoksilist efekti vaid anaeroobsetele või mikroaeroofiilsetele organismidele (Edwards 1980). Tundlikkust metronidasooli suhtes tagab elektron-transport süsteemi olemasolu, mis on võimeline loovutama elektroni antibiootikumi molekulile, redutseerides selle nitrorühma, mille tulemusena moodustub tsütotoksilist aktiivsust omav anioonradikaal. Seejärel tekib rakuvälise ja rakusise keskkondade vahel gradient, kus redutseerimata antibiootikumi vormid sisenevad raku kiiresti, kuid nende kontsentratsioon raku sees säilib madalana tänu pidevale redutseerimisele. Aktiivne antibiootikumi vorm tekitab DNA-sse katkeid, mille hulk sõltub A+T nukleotiidide arvust DNA-s. Lisaks võivad nitroimidasoolid kahjustada DNA reparatsiooni mehhanisme (Edwards 1980).

Vanematest uuringutest on teada, et antud antibiootikumide aktiveerimine toimub hüdrogenosoomides, kus ensüümi püruvaadi süntetaasi ehk püruvaat-ferredoksiini oksüdo reduktaasi abil toimub elektroni eemaldamine püruvaadist ning ferredoksiini abil selle üleviimine antibiootikumi nitrorühmale (Edwards 1980; Hrdý *et al.* 2005). Vastuolus selle mudeliga on 2004. aastal tehtud uuring, kus konstrueeriti *Trichomonas vaginalis* rakkudest püruvaadi süntetaasi geeni suhtes *knock-out*, mille tulemusena langes ensüümi aktiivsus 95%, kuid mutantsed rakud jäid antibiootikumi suhtes tundlikuks (Land *et al.* 2004). On leitud ka teisi võimalikke mehhanisme, kuidas nitroimidasoolid oma tsütotoksilise aktiivsuse saavutavad (Hrdý *et al.* 2005; Leitsch *et al.* 2009). Leitsch *et al.* (2009) näitasid *Trichomonas vaginalis* (põhjustab inimese trihhomoonoosi) rakkudel, et metronidasooli ja teiste nitroimidasooli rühma antibiootikumide toimemehhanism põhineb flaviini sisaldava thioeredoksiini reduktaasi katalüütilisel nitrorühma redutseerimisel. Metronidasooli reaktiivsed metaboliidid moodustavad kovalentseid sidemeid valkudega, mis on seotud thioeredoksiini-vahendatud redoks-regulatsiooniga (Leitsch *et al.* 2009).

2.3 Toltrasuriil

Toltrasuriil on koktsidostaatiline ravim, mis on efektiivne elimineerimaks kõiki *Eimeria* perekonda kuuluvate koktsiidide arengustaadiumeid. Toltrasuriil on eriti aktiivne parasiidi perinukleaarses ruumis, mitokondrites ja endoplasmaatilises retiikulumis (Harder & Haberkorn 1989). Ravim mõjub eelkõige hingamisahela ensüümidele ning kahele pürimidiini sünteesiga seotud ensüümile. Toltrasuriilile on mõnel määral tundlikud ka pürimidiini sünteesiga seotud ensüümid kana maksas, näiteks dihidrofolaadi reduktaas (Harder & Haberkorn 1989).

Toltrasuriili eeliseks on selle pikem efektiivne toimeaeg võrreldes mõnede teiste koktsidiosisvastaste ravimitega. See mõju saavutatakse seetõttu, et toltrasuriil kinnitub soolestiku limaskestale, kus ta säilib kauemat aega, kui kehavedelikes (Krautwald-Junghanns *et al.* 2009; Sepp *et al.* 2012). Toltrasuriili võidakse eelistada kasvava resistentsuse tõttu teiste koktsiidiravimite suhtes (Krautwald-Junghanns *et al.* 2009).

2015. aastal testiti toltrasuriili kahe *Eimeria* liigiga nakatunud ida-põldvuttide (*Coturnix japonica*) peal. Jälgiti patomorfoloogilisi muutusi lindude kaksteistsõrmik-, tühi-, niude- ja pimesooles, maksas ja neerudes. Katselinde jagati kolme rühma ja manustati erinevate kontsentratsioonidega toltrasuriili lahuseid: 7 mg/kg kehamassi kohta (ravi kestvus 24 tundi), mis on tavaline kanade ravimiseks välja pakutud kontsentratsioon, 14 mg/kg (ravi kestvus 24 tundi) ja 24,5 mg/kg (ravi kestvus 8 tundi). Ükski nendest kontsentratsioonidest ei viinud parasiidi täieliku elimineerimiseni peremehest; täielik vabanemine parasiidist õnnestus vaid kahel ida-põldvutil 24,5 mg/kg kontsentratsiooni rühmas. Leiti, et toltrasuriili manustamine põhjustab patoloogilisi muutusi maksas ja neerudes nii ravimi 14 mg/kg kui ka 24,5 mg/kg kontsentratsioonide juures. Erinevaid muutusi neerudes leiti kõikide katserühmade lindudel (Gesek *et al.* 2015).

Diaferia *et al.* (2013) näitasid toltrasuriili ravi tõhusust kodulammastel. Suukaudne ravimi manustamine elimineeris noortes lammastes suurima patogeensusega *Eimeria* liigid ning parandas oluliselt lammaste tervist. Ravimi efektiivsust ja efekti tervisele kontrolliti fekaaliproovidest. Alustades ravimi manustamise päevast, koguti iga nädal (kokku 9 nädalat) väljaheidete proove, millele anti hinnangud skaalal 0 kuni 3, kus „0“ tähendas normaalset konsistentsi ning „3“ kõhulahtisust. Lisaks mõõdeti katse vältel ootsüste sisaldust fekaalidest (Diaferia *et al.* 2013).

Resistentsus *Eimeria* liikide vastu on saavutatav nii atenueeritud ootsüste sisaldava elusvaktsiini manustamise kui ka koktsidostaatiliste ravimite manustamise ajal, loomuliku immuunsuse kujunemise teel (Chapman 1999).

2.4 Oksüdatiivne stress ja antioksidandid

Oksüdatiivset stressi defineeritakse kui olukorda organismis, kus reaktiivsete osakeste hulk ületab neid kahjutuks muutvate antioksidantide hulka niipalju, et reaktiivsed osakesed põhjustavad kahjustusi (Sies & Jones 2007). Oksüdatiivset stressi põhjustavad normaalse metabolismi ja immuunreaktsioonide käigus vabanevad kõrgelt reaktiivsed ühendid ja vabad radikaalid (Sies 1997). Reaktiivsed osakesed on paardumata elektroniga radikaalid. Nende hulka kuuluvad superoksiidradikaal, hüdroksüülradikal, lämmastikoksiid (Halliwell & Gutteridge 2015). Teatud kogustes on reaktiivsed osakesed vajalikud, sest nad osalevad organismisiseses signaaliülekanDES (Dröge 2002). Näiteks reguleerib lämmastikoksiid silelihaste lõtvumist (Radomski *et al.* 1987) ja vesinikperoksiid aktiveerib transkriptsioonifaktorit NF-κB (Schreck *et al.* 1991). Immuunsüsteem kasutab reaktiivseid osakesi organismi sissetungivate patogeenide vastu, hävitades nende valke, lipiide ja DNA-d (Halliwell & Gutteridge 2015). Kuna nad ei ole patogeen-spetsiifilised, võivad nad kahjustada ka organismi enda elutähtsaid biomolekule nagu nukleiinhappeid, valke ja lipiide. Oksüdatiivsetele kahjustustele on eriti tundlikud neurogenes, immuunoregualtsioon, MHC molekulide ekspressioon ning lisaks on oksüdatiivne stress seotud mitme vananemisega seotud protsessiga (Beckman & Ames 1998). Kokkuvõtlikult avaldab oksüdatiivne stress mõju isendi ellujäämis- ja paljunemisedukusele (Costantini *et al.* 2010).

Oksüdatiivse stressi ärahoidmiseks on organismidel välja kujunenud antioksidantidel põhinev kaitsesüsteem. Antioksidandid on ühendid, mis on elektronide doonoriteks reaktiivsetele osakestele. Eksogeenseid antioksidante saadakse toiduga ning nende hulka kuuluvad näiteks E- ja A-vitamiinid ja karotenoidid. Endogeensete ehk organismi poolt sünteesitavate antioksidantide hulka kuuluvad näiteks ensüümid katalaas (neutraliseerib vesinikperoksiidi veeks ja hapnikuks) ja superoksiid dismutaas (katalüüsib superoksiid radikaali dismutatsiooni vesinikperoksiidiks ja hapnikuks), glutatioon, peroksidaasid, kusihape (Monaghan *et al.* 2009; Halliwell & Gutteridge 2015).

2.4.1 Karotenoidid

Karotenoididel arvatakse olevat roll nii isendite vahelises kommunikatsioonis (sugulise valiku tunnuse signaalide väljakujunemises) kui ka organismi tervena hoidmises (immuunvastuse kujunemises) (Olson & Owens 1998).

Karotenoidid moodustavad suure, ligikaudu 600-liikmelise pigmentide rühma, kuhu kuuluvad sarnaste biokeemiliste omadustega ühendid. Struktuuri alusel jagatakse neid ksantofüllideks ja karoteenideks. Karotenoide on võimelised sünteesima paljud taimed, vetikad, seemned ja bakterid (Møller *et al.* 2000). Vaatama sellele, et loomad ise ei suuda karotenoide sünteesida, on loomariigis väga levinud karotenoididel baseeruvate visuaalsete signaalide kasutamine näiteks kommunikatsiooniks vanemate ja järglaste vahel või hoiatussignaalidena (Møller *et al.* 2000; Blount & McGraw 2008). Lisaks on karotenoididel roll immuunregulatsioonis ja immuunstimulatsioonis (Møller *et al.* 2000); näiteks modulleerivad A-vitamiini vormi konverteerimata karotenoidid lümfotsüütide funktsiooni (Surai 2002). Katses sebra-amadiinidega (*Taeniopygia guttata*) manustati katselindudele karotenoide ning mõõdeti rakulist ja humoraalset immuunsust (McGraw *et al.* 2003). Leiti, et manustamine tõstis nii humoraalset kui rakulist immuunvastust. Lisaks tõstis karotenoididega toitmine vere karotenoidide sisaldust ning noka värvi intensiivistumist (McGraw *et al.* 2003). Rakuline immuunvastus oli ennustatav noka värvi intensiivsuse ja plasma karotenoidse sisalduse muutuse järgi. Lähtudes saadud tulemustest arvatakse, et karotenoididel baseeruvad tunnused signaliseerivad isase isendi tervislikku seisundit (McGraw & Ardia 2003). Samuti võib karotenoididel olla tähtis roll antioksidandina arenevates embrüotes (McGraw *et al.* 2005). Emaslind investeerib karotenoide munadesse, kus nad aitavad säilitada redoks homöostaasi embrüonaalse arengu ajal ja esimestel päevadel peale koorumist (McGraw *et al.* 2005; Costantini & Møller 2008). Esimestel päevadel peale koorumist on oksüdatiivse stressi tekkeoht suurem, sest linnupoeg satub atmosfääri hapniku keskkonda, toimub üleminek kopsuhingamisele ning suureneb metabolismitase (Costantini & Møller 2008).

Arvatakse, et karotenoididel baseeruvad ornamendid edastavad ausat informatsiooni indiviidi geneetilise ja/või fenotüüpilise kvaliteedi kohta (näiteks võimekusest oksüdatiivse stressiga toime tulla) (Lozano 1994; Olson & Owens 1998). Vaid kõige kvaliteetsemad isendid omavad erksaid karotenoidsed ornamente (Lozano 1994). Selliste signaalide aususe ja kauakestvuse tagab ka see, et sulgedesse paigutatud karotenoidid muutuvad bioloogiliselt inaktiivseteks ning neid ei saa mujal kasutada (Olson & Owens 1998).

Kooskõlas Hamilton & Zuk'i (1982) hüpoteesiga on näitatud rohevintidel, et teatud karotenoidselt pigmenteerunud sulestiku osad võivad olla indikaatoriks indiviidi võimest viirusnakkusega toime tulla (Lindström & Lundström 2000).

Hartley & Kennedy (2004) pakkusid välja hüpoteesi, et karotenoidide primaarne bioloogiline roll ei ole signaliseerida karotenoidide enda antioksidatiivset potentsiaali, vaid signaliseerida teiste, olulisemate oksidatiivse stressi eest kaitsvate mittepigmentsete antioksidantide (nt antioksidatiivsete ensüümide, C ja E vitamiinide) taset läbi karotenoidsete ornamentide (Hartley & Kennedy 2004). Katses rohevintidega manustati isastele katselindudele toiduga karotenoide ja mittepigmentset antioksidanti E-vitamiini ning mõõdeti kollast värvi manustamise ajal kasvanud sabasulgedel. Karotenoididega toitmine mõjutas sulgede värvust positiivselt, kuid E-vitamiin seda ei teinud. Seega ei toeta antud uurimuse tulemused hüpoteesi, et karotenoidid on peamiselt teiste antioksidantide rohkuse indikaatorid (Karu *et al.* 2008).

Ühe hüpoteesi kohaselt on karotenoidide olemasolu händikäp-tunnus, kuna teatud tingimustel võivad karotenoididest tekkida toksilised laguproduktid. Olukorras, kus teiste kaitsvate antioksidantide hulk organismis on ebapiisav, tekib füsioloogiline lõivsuhe karotenoidide kasutamise või nende organismist väljutamise vahel. Lisaks arvatakse mängus olevat testosteroon, mis intensiivistab ornamentide karotenoidide värve läbi selle, et tõstab karotenoidide bioloogilist kättesaadavust, võib soosida oksidatiivse stressi teket ning läbi selle vähendada antioksidantide hulka. Seega suur hulk karotenoide, mis on vajalikud intensiivselt värvunud ornamentide ekspressiooniks, võib olla händikäp-tunnus, mis avaldub vaid kõrge kvaliteediga isenditel (Vinkler & Albrecht 2009).

Mitmete uuringute kõrval, mis näitavad karotenoidide antioksidantset aktiivsust, leidub ka neid, kus on saadud teistsuguseid tulemusi (Costantini & Møller 2008). Hartley & Kennedy (2004) arvavad, et karotenoidide bioloogiline roll ei ole antioksidantne kaitse, vaatama sellele, et *in vitro* on karotenoidide antioksidantset aktiivsust näidatud (Krinsky & Yeum 2003). Sarnaselt polüküllastunud rasvadele võivad karotenoidide pikad konjugeeritud sabad sattuda reaktsioonidesse ning see võib teatud tingimustel viia edasise oksüdeerumiseni ja toksiliste aldehyüdide tekkeni (Hartley & Kennedy 2004). On pakutud välja vähemalt kaks põhjendust, miks on saadud erinevaid ja vastuolulisi tulemusi karotenoidide antioksidantaktiivsuse uuringutes. Esimeseks

põhjenduseks on erinevate meetodite ja protokollide kasutamine ning teiseks on võimalus, et oksüdatiivse stressi bioloogia on liigispetsiifiline (Costantini & Møller 2008). Seetõttu on vaja täiendavaid uuringuid, kuhu tuleks kaasata erinevaid liike nende erinevatel elutsükli perioodidel. Samuti tuleks jätkata uuringuid karotenoidide alternatiivsete funktsioonide väljaselgitamisega, nagu näiteks karotenoidide rollist immuunfunktsioonis. Lisaks tuleks rohkem tähelepanu pöörata ka karotenoidide teisele, hapniku aatomit mittesisaldavale rühmale – karoteenidele, et välja selgitada, kas ka nendel võib olla antioksidatiivne aktiivsus (Costantini & Møller 2008).

2.4.1.1 Koktsidioos ja karotenoidsed ornamendid

Isastel kuldsiisikestel (*Carduelis tristis*) on näidatud, et eksperimentaalne nakatamine perekonna *Isospora* koktsiididega põhjustab karotenoidedel baseeruva sulestiku ja noka värvi vähem intensiivset ekspressiooni võrreldes kontrollrühma lindudega (McGraw & Hill 2000). Analoogilisi tulemusi saadi ka sarnases eksperimendis aedkarmiinleevikestega (*Carpodacus mexicanus*) (Brawner *et al.* 2000) ja rohevintidega (Hörak *et al.* 2004).

2.4.2 Koktsidioos ja oksüdatiivne stress

Traditsiooniliselt seletatakse isenditevahelisi erinevusi immuunvastuse tugevuses immuunsüsteemi rakendamise energeetilise kulukusega (Stearns 1992; Sheldon & Verhulst 1996), kuid pakutud on ka alternatiivseid hüpoteese. Ühe hüpoteesi kohaselt on immuunsüsteemi kasutamise hinnaks oksüdatiivsed kahjustused peremeesorganismis (Dowling & Simmons 2009; Sorci & Faivre 2009). Immuunsüsteemi rakud paiskavad välja reaktiivseid osakesi, mis ei ole parasiitspetsiifilised ning seega võivad ebapiisava antioksidantkaitse korral kahjustada ka peremehe enda kudesid (Sepp *et al.* 2012). Kodukanadel (*Gallus gallus domesticus*) on näidatud, et koktsiidiperekonna *Eimeria* nakkus stimuleerib makrofaage tootma parasiidi hävitamisele suunatud superoksiid radikaali ja lämmastikoksiidi (Allen 1997; Lillehoj & Li 2004). Koktsidioosinakkusest tulenevat oksüdatiivset stressi on näidatud ka rohevintidel (Sepp *et al.* 2012). Sama uuring toetab ka hüpoteesi, et oksüdatiivsed koekahjustused tulenevad eelkõige immuunsüsteemi vastusest mitte sellest, et on pärsitud manustatavate antioksidantide omastamine (Allen & Fetterer 2002; Sepp *et al.* 2012).

2.5 Immuunvastuse ja oksüdatiivse stressi tähtsus ökoloogias

Immuunsüsteemi rakendusest tulenevad kulud, näiteks oksüdatiivne stress, mõjutavad isendi elukäigutunnuseid ja kohasust (Sheldon & Verhulst 1996; Monaghan *et al.* 2009). Immuunsüsteemi ülalpidamine ja kasutamine nõuab ressursse, mida isend võiks kasutada ka näiteks investeerimiseks kasvu ja sigimisse või kasutada signaaltunnuste väljaarendamiseks (Sheldon & Verhulst 1996). Näiteks on eksperimentaalselt näidatud, et immuunsüsteemi aktivatsioon mõjutab linnulaulu (Munoz *et al.* 2010), mis on hüpoteetiliselt sugulise valiku tunnus (Gilman *et al.* 2007; Munoz *et al.* 2010).

Oksüdatiivne stress võib mõjutada mitmeid tähtsaid isendi füsioloogilisi funktsioone, näiteks sugulises valikus oluliste ornamentide silmatorkavust (Monaghan *et al.* 2009). Samuti võib oksüdatiivset stressi vaadelda kui evolutsioonilist valikusurvet. Evolutsioonilise ökoloogia vaatepunktist on peremeeste ja parasiitide vahelised suhted olulised, kuna nende abiga on võimalik seletada näiteks kulukate sugulise valiku tunnuste eksisteerimist ja MHC molekulide mitmekesisust (Summers *et al.* 2003).

On näidatud, et lisaks immuunsüsteemi kasutamisest tuleneva oksüdatiivse stressi ohule, võib oksüdatiivne stress tuleneda teistest keskkonnafaktoritest, näiteks toitainete puudusest, osmootsest stressist või sõltuda termotolerantsusest (Costantini *et al.* 2010).

Seedekulglä parasiidid põhjustavad peremeesorganismis üldist ja lokaalset häiret seedimises ja toitainete omastamises. Levinud on parasiidi põhjustatud toitainete omastamise efektiivsuse langus peremeesorganismi neis piirkondades, kus parasiit elab (Hoste 2001). Parasitismi tagajärg peremehele võib olla krooniline alatoitumus (Hoste 2001), mis võib otseselt mõjutada indiviidi kohasust. Katses rohevintidega põhjustas mitme *Isospora* tüvega nakatamine märkimisväärselt katselindude kehamasside langemist ja triglütseriidide kontsentratsioonide vähenemist. Üheks võimalikuks seletuseks on parasiidi põhjustatud kahjustused soolestiku limaskestas, mis takistas toitainete efektiivset imendumist (Hörak *et al.* 2004).

3. Materjal ja metoodika

3.1 Katseobjekt

Rohevindid on värvuliste seltsi kuuluvad keskmise suurusega (ca. 28-30 g) linnud, kes on levinud kogu Euroopas, Loode-Aafrikas ja Edela-Aasias. Pesitsusaja väliselt on nad seltsingulise eluviisiga ning nende peamiseks toiduks on seemned (Cramp & Perrins 1994). Kollased laigud rohevintide sulgedel baseeruvad karotenoididel ning on isastel sugulise valiku tunnus (Eley 1991). Kollase värvi intensiivsus sulgedes sõltub kahe põhilise karotenoidi – ksantofüllü A ja B kogusest (Saks *et al.* 2003). Rohevindid on immuunökoloogilisteks uuringuteks sobiv objekt, sest neid on sarnastes uuringutes juba varem kasutatud ning näidatud, et vangistuses hoitud lindude enamik füsioloogilisi näitajaid on võrreldavad vabas looduses elavate isendite näitajatega. Seetõttu võib laborikatsete tulemusi kasutada seletamiseks looduses esinevaid olukordi (Sepp *et al.* 2010).

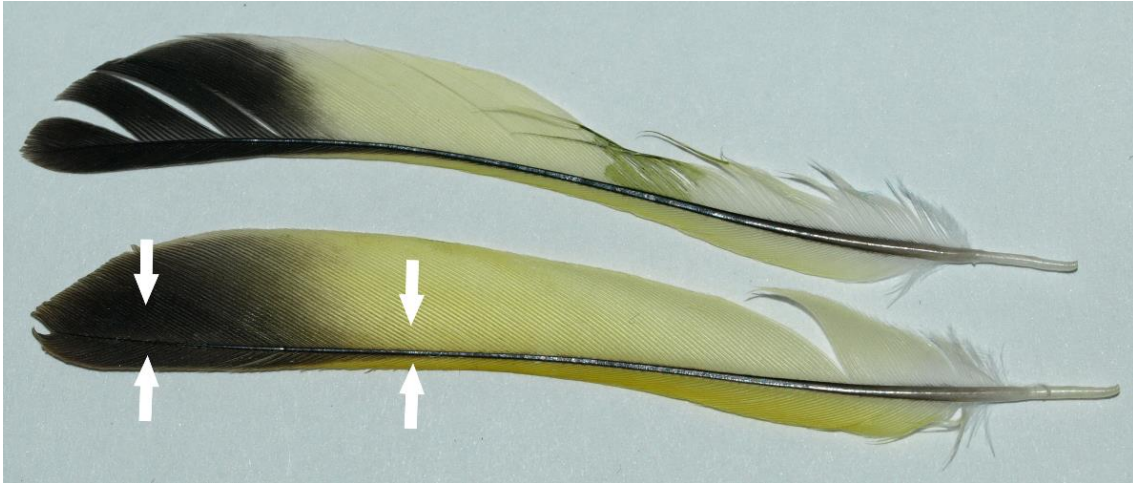
3.2 Katseandmed ja ajakava

Katses osalenud isased rohevindid püüti loorvõrkudega Tartus (58°22'N; 26°43'E) 5., 6. ja 8. jaanuaril 2015. Linnud paigutati siseruumides individuaalsetesse puuridesse (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). Linde toideti *ad libitum* päevalilleseemnetega ning joodeti karotenoididest küllastunud filtreeritud kraaniveega. Karotenoidilahus kosnes luteiinist ja zeaksantiinist (vahekorras 20:1) ning oli valmistatud OroGlo lahusest ksantofüllü aktiivsusega 11 g/kg (valmistaja Kemin AgriFoods Europe, Herentals, Belgia). Joogilahuseid vahetati kord ööpäevas. Kogu katse jooksul hoiti linde kunstlikes valgustingimustes loodusliku päevapikkuse juures. Katselinnud vabastati looduslikku elupaika 3. märtsil. Uuring toimus Eesti Keskkonnaministeeriumi (luba 1-4.1/11/100) ja Põllumajandusministeeriumi loomkatse läbiviimise loakomisjoni (otsus nr. 95, 17. jaanuar 2012) loal.

9. jaanuaril võeti 73-lt püütud isaselt rohevindilt 2 sabasulge (parem ja vasak). 19. jaanuaril jagati 71 isast lindu kolme katserühma (24+24+23). Esimesele manustati toltrazuriili karotenoidilahuses kontsentratsiooniga 50 mg/l (Intracox Oral, Interchemie, Castenary, Netherlands). Teisele karotenoidilahuses metronidasooli kontsentratsiooniga

400 mg/l (tootja Fresenius Kabi Polska Sp.z.o.o., Sienkiewicza 25, 99-300 Kutno, Poola). Kolmas grupp linde sai tavalist karotenoidilahust. Raviperiood kestis 10 päeva.

3. märtsil koguti igalt linnult vangistuses kasvanud 2 asendussulge. Laborisulgi hoiti mõõtmiste momendini pimeduses kahekaupa (ühe linu kaks sulge) plastikkotikestes. Sulgede värvi mõõtmist alustasin 7. aprillil. Sulevärvi mõõtsin spektrofotomeetriselt (Ocean Optics USB2000 with Ocean Optics DH2000 lamp). Kaablitega ühendasin valgusallika (UV-VIS-NIR Lightsource), spektrofotomeetri (Avaspec-2048-2) ja arvuti. Valgusallikast tulev valgus jõudis proovile 45° nurga all. Enne mõõtmise alustamist salvestasin valge ja musta taustad. Valge puhul mõõtsin Ocean Optics kaliibri valget tausta. Musta puhul eemaldasid kaabli valgusallikast. Sulgede mõõtmisel kasutasin alusena musta värvi paberit. Sule kollaseid laike mõõtsin sulelaba sisemistel külgedel, suleroo läheduses, vältisin kasvulünkade piirkondi (Joonis 1). Iga sule kohta tein kolm kordusmõõtmist, igal korral paigutades mõõteriista uuesti proovile. CV (mõõtmiste vaheline variatsioonikoefitsent) väärtuse piiriks kolme kordusmõõtmise jaoks võtsin 20 % ning juhul, kui CV ületas selle piiri, kordasin mõõtmised vastaval sulel. Sule kollase värvi iseloomustamiseks kasutasin *chroma* värviparameetrit, mis on Munsell'i värvisüsteemi järgi üks kolmest värvi iseloomustavatest dimensioonidest. *Chroma* näitab värvi intensiivsust/küllastatust või värvi puhtust (Color & Cooper 1941). On näidatud, et *chroma* korreleerub tugevalt karotenoidide tegeliku kontsentratsiooniga sulgedes (Saks *et al.* 2003). Mõõtmiste tulemusel saadud TRM failid (transmissiooni info) salvestasin ümber ASCII formaati. Programmi „compute-bird-feather-data-from-spectro-files.py“ (koostanud Richard Meitern) abil sain Exceli faili, mis sisaldas arvutatud värviparameetreid, nende hulgas *chroma*'t. Programmiga „Repeatability calculator“ (koostanud Richard Meitern) arvutasin mõõtmiste korduvust, mis sama linu vasaku ja parema laborisule vahel oli $r=0.7$, $F_{60;61}=5.1$, $p<0.0001$.



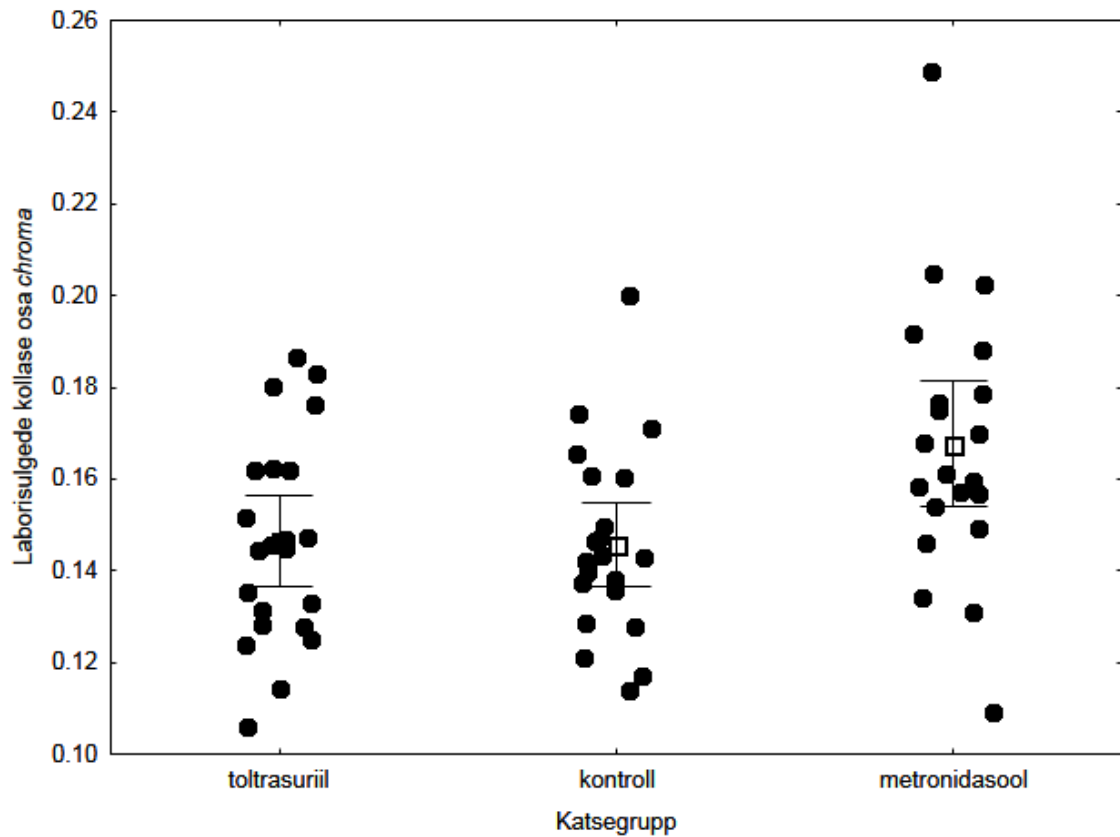
Joonis 1. Nooltega on tähistatud standardsed positsioonid sulgedel, kust mõõtsin värviparameetrid.

3.3 Statistilised analüüsid

Statistiliseks analüüsiks kasutati ühefaktoriaalset dispersioonanalüüsi ANOVA. Värvandmed olid normaalselt jaotunud. Paariviisiliseks võrdluseks kasutati *post hoc* teste. Andmeanalüüsi tarkvarana kasutati programmi Statistica (Statsoft, USA).

4. Tulemused

Katsemenetlus mõjutas positiivselt kollase sulevärvu intensiivsust (*chroma*) ($F_{2, 62}=5,6$, $p=0,005$). Sulgede värvus erines katsegruppide vahel seetõttu, et metronidasooliga ravitud grupis olid suled kollasemad kui kontrollgrupis (*post-hoc*, $p=0,012$) ja toltrasuriiliga ravitud grupis (*post-hoc*, $p=0,016$; Joonis 2). Teiste gruppide vahel olulisi erinevusi ei olnud.



Joonis 2. Kollase värvi *chroma* erinevate katserühmade sulgedel. Punktid tähistavad isendite vasaku ja parema sule keskmist *chroma* väärtust, must kast katsegrupi keskmist väärtust ja vurrud 95% usalduspiire.

5. Arutelu

Vastavalt oodatule tõstis metronidasool sulgede kollase värvi intensiivsust. Seda tulemust võib seletada oksüdatiivse stressi alanemisega, mida ravimi manustamine võib põhjustada. Immuunvastuse aktiveerimine võib esile kutsuda oksüdatiivset stressi (Sheldon & Verhulst 1996); makrofaage stimuleeritakse tootma parasiidi hävitamisele suunatud superoksiid radikaali ja lämmastikoksiid (Allen 1997; Lillehoj & Li 2004), mis võivad antioksidantkaitse puudumise korral põhjustada peremeesorganismi enda kudede kahjustusi (Costantini & Møller 2009). Alglooma põhjustatud haigusega kaasnevat oksüdatiivset stressi on näidatud ka rohevintidel (Sepp *et al.* 2012).

Lisaks on võimalik seletus, et terveks ravimine parandas üldist seedeefektiivsust ja toitainete imendumist, mis protistist parasiidi olemasolu korral on oluliselt pärsitud (Hoste 2001). Samuti võib arvata, et metronidasool hävitas teisi tundmatuid lindude seedesüsteemis elavaid parasiitseid mikroorganisme, kuna metronidasool on laia mõjuspektriga ravim (Edwards 1980). Seedekulglas parasiitide, näiteks tundmatute sooleparasiitide, hävimise tagajärjel paranes seedeefektiivsus veelgi, sealhulgas paranes ka karotenoidide omastamine. Sellest tulenevalt jõudis rohkem karotenoide kasvavatesse sulgedesse.

Lisaks peaks arvestama võimalusega, et katselinnud ei olnud siiski trihhomonoosi nakatunud, vaid neil esines mingi muu patoloogia, millest vabanemine parandas lindude kehakonditsioone. Tõsine haigestus virulentsetesse *T.gallinae* tüvedesse põhjustab populatsioonides kõrget suremust (Amin *et al.* 2014). Näiteks vähenes 2009. ja 2010. aastate vahel trihhomonoosi epideemia tõttu pesitsevate rohevintide hulk Lõuna-Soomes 47% (Lehikoinen *et al.* 2013). Siinses töös suri katse ajal vaid neli lindu, kellest ühe puhul oli kahtlus, et tegu võis olla trihhomonoosiga (P.Hõrak avadamata andmed). See annab põhjust arvata, et haiguse ulatlikkus ei olnud kuigi tõsine. Sellest tulenevalt võib arvata, et parasiidi põhjustatud negatiivsete efektide likvideerimine toimus metronidasooli abiga väga kergelt.

Vastupidiselt oodatule ei suurendanud toltrasuriili manustamine kollase värvi intensiivsust sulgedel. Ennustus, et toltrasuriil suurendab värvi intensiivsust (*chroma* väärtust), põhines mitmete eelnevate tööde tulemustel, kus näidati, et koktsiidinakkusest terveks ravimine parandab oluliselt rasvlahustuvate ainete omastamist. Selle tulemusel

jõuab ka rohkem karotenoide kasvavatesse sulgedesse. Näiteks näidati 2012. aastal kodukanadel, et *Eimeria* koktsidioos pärssib rasvlahustuva E-vitamiini omastamist soolestikus, kuna koktsiidide nakkus tekitab absorbeeruva soolestiku limaskestale füüsilisi kahjustusi. Ühtlasi näidati ka karotenoidide omastamise pärssimist, kuna karotenoidid on sarnaselt E-vitamiinile rasvlahustuvad ained ning koktsiidinakkuse ajal on üldiselt pärssitud rasvlahustuvate ainete omastamine (Allen & Fetterer 2002). Sarnaseid tulemusi oli näidatud kodukanadel juba aastal 1991 (Tyczkowski *et al.* 1991a).

Saadud tulemusi võiks seletada toltrasuriilravi alternatiivse välja pakutud mõjuga. Eraslan *et al.* (2004) leidsid, et toltrasuriil inhibeerib kanades kataalaasi aktiivsust. *Eimeria* koktsiidinakkusega kaasneb peremehe lipiidide peroksüdatsioon, mille tulemuseks kuhjub organismi reaktiivseid osakesi rohkem, kui antioksidantidel põhinev kaitse suudab neid neutraliseerida (Eraslan *et al.* 2004). Selle katse tulemustest lähtudes võiks arvata, et toltrasuriil suurendas oksüdatiivset stressi katselindudes. Lisaks on näidatud, et parasiitinfektsioon võib alandada antioksidantsete vitamiinide sisaldust veres, mis samuti võib olla seotud suurenenud oksüdatiivse stressiga (Dede *et al.* 2002).

See, et katselinnud olid tõepoolest koktsidioosi nakatunud, oli enne katse algust kindlaks tehtud ootsüstide tuvastamisega väljaheidetes (U.Karu avaldamata andmed). Samuti oli varem näidatud toltrasuriilravi efektiivsust lindude koktsidioosi vastu (Alcala-Canto *et al.* 2014).

Saadud tulemustest saab järeldada, et metronidasooli ravi oli efektiivne ning õnnestus tõsta rohevintide sulgedel kollase värvi intensiivsust, mis on rohevintidel sugulise valiku tunnus. Oluline saadud tulemuste tõlgendus on ka see, et mikroobid, kes olid tundlikud metronidasooli ravimile, on karotenoidide omastamise seisukohast tähtsamad kui koktsiidid. Koktsiidide tundlikkust toltrasuriili ravile on varem näidatud (Alcala-Canto *et al.* 2014), kuid antud katse tulemustest lähtuvalt omavad suuremat mõju karotenoidide omastamisele mitte koktsiidid, vaid teised, metronidasoolile tundlikud mikroobid rohevintide organismis. Seega võivad sellised mikroorganismid olla sugulise valiku ausust garanteerivaks mehhanismiks.

Kokkuvõte

Isendid varieeruvad populatsioonisiselt oluliselt haiguste vastuvõtlikkuse osas. Parasitism on üks levinumaid kooseluvorme, mille puhul kasutab üks organism (parasiit) teist organismi (peremeest) enda elukeskkonnana. Selleks, et pidevale parasiitide rünnakule vastu seista, on organismidel arenenud keeruline kaisemehhanism – immuunsüsteem. Immuunsüsteemi kasutamine on isendile kulukas. Selle kasutamise hind väljendub immuunkaitse rakendamises teiste oluliste funktsioonide arvelt. Üheks selliseks funktsiooniks on signaaltunnuste väljaarendamine. Karotenoididel baseeruvad signaaltunnused on väga levinud paljude lindude ja teiste loomade seas ning on seotud sugulise valikuga. Ainult kõige kõrgema kvaliteediga isendid on võimelised paigutama sulgedesse piisavalt palju karotenoide, et suled oleksid erksalt värvunud. Käesolevas töös püüti välja selgitada, kas isendi karotenoididel baseeruvate ornamentide intensiivsus peegeldab tema haigusresistentsust. Selleks kasutati mudelsüsteemina kahte parasiithaigust – trihhomonoosi ja koktsidioosi. Mudelorganismiks kasutati rohevinti. Rohevintide kollased laigud sulgedel baseeruvad karotenoididel ning on sugulises valikus oluline tunnus. Katses manustati lindudele kahe haiguse vastast ravimit – metronidasooli ja toltrasuriili. Sulgedelt mõõdeti spektrofotomeetriliselt kollase värvi intensiivsust (*chroma*). *Chroma* suurenemine toimus vaid metronidasooli katserühma lindude sulgedes. Toltrasuriili katserühma lindude sulgede *chroma* ei erinenud statistiliselt oluliselt kontrollrühma lindude omast. Arvatavasti oli metronidasool efektiivne trihhomoonaste vastu ning ka teiste parasiteerivate mikroorganismide vastu, keda katselindude organismis leidis. Selle tagajärjel paranes üldine toitainete, sealhulgas karotenoidide omastamise efektiivsus, mille tulemusena jõudis rohkem karotenoide sulgedesse. Saadud tulemustest saab järeldada, et metronidasooli ravi oli edukas ning õnnestus tõsta rohevintide sulgede ornamentatsiooni intensiivsust, mis on rohevintidel sugulise valiku tunnus. Tulemused osutavad, et mikroobid, mis on tundlikud metronidasoolile, võivad olla sugulise valiku ausust garanteerivaks mehhanismiks.

Summary

Effects of antibiotic treatment on feather coloration in greenfinches

(*Carduelis chloris*)

Individuals within populations vary significantly in their disease susceptibility. Parasitism is one of the most widespread relationships between two species, where one (parasite) uses another (host) as its environment. In order to cope with the constant attacks by different parasites, organisms have developed a complicated defence mechanism, the immune system. Immune system function is costly for an individual. The costs lie in trade-offs between immune function and other vital functions of an organism. One such function is the expression of signal traits. Carotenoid-based signals are very common among birds and other animals, and have a role in sexual selection. Only the most high-quality individuals are capable of allocating enough carotenoids into their feathers for the feathers to look intensely bright-coloured. In this study an attempt was made to find out if the intensity of carotenoid-based ornaments correlates to its bearer's resistance to disease. For this purpose, two parasitic diseases – trichomonosis and coccidiosis – were used as the model system. Greenfinches were used as the model organism. They have yellow areas on feathers, which are based on carotenoids and are important in sexual selection. In this experiment, infected birds were treated with two types of antibiotic drugs – Metronidazole and Toltrazuril. The intensity of the feathers' yellow colour (*chroma*) was measured spectrophotometrically. Increase in *chroma* values occurred only in the feathers of Metronidazole-medicated birds. *Chroma* values of feathers of the birds from the Toltrazuril group did not show any statistically significant difference compared to the *chroma* values of the control group. Apparently Metronidazole was effective against trichomonads and possibly also effective against other unknown parasitic microorganisms. This led to the general improvement in the absorption of dietary nutrients, including carotenoids. This allowed more carotenoids to be deposited into feathers. These results suggest that Metronidazole treatment was effective and there was a success in increasing greenfinches's plumage ornamental intensity which is a sexual selected signal in the bird. This study suggests that microbes sensitive to Metronidazole may mediate the honesty of sexual selection based on carotenoid-coloured plumage.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada enda juhendajat Richard Meiterni, tänu kelle nõuannetele ja kannatlikkusele töö valmis. Olen väga tänulik Peeter Hõrakule ja Ulvi Karule. Samuti tänaksin kõiki teisi immuunökoloogia töörühma liikmeid sõbraliku keskkonna ja abivalmiduse eest.

Kirjanduse loetelu

- Alcala-Canto Y., Ramos-Martinez E., Tapia-Perez G., Gutierrez L. & 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.
- Allen P.C. (1997). Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, 76, 814-821.
- Allen P.C. & Fetterer R.H. (2002). Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, 81, 41-48.
- Amin A., Bilic I., Liebhart D. & Hess M. (2014). Trichomonads in birds-a review. *Parasitology*, 141, 733-747.
- Atkinson C.T., Thomas N.J. & Hunter D.B. (2008). *Parasitic diseases of wild birds*. Wiley Online Library, Singapore.
- Beckman K.B. & Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78, 547-81.
- Blount J. & McGraw K. (2008). Signal functions of carotenoid colouration. In: *Carotenoids. Natural Functions* (eds. Britton G, Liaaen-Jensen S & Pfander H). Birkhauser, pp. 213-236.
- Brawner W.R., Hill G.E. & Sundermann C.A. (2000). Effects of coccidial and mycoplasmal infections on carotenoid- based plumage pigmentation in male House Finches. *Auk*, 117, 952-963.
- Chapman H. (1999). Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian pathology*, 28, 521-535.
- Chapman H.D. (1998). Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *International Journal for Parasitology*, 28, 1141-1144.
- Chapman H.D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: A review. *Poultry Science*, 93, 501-511.
- Color M. & Cooper F.G. (1941). *Munsell Manual of Color: Defining and Explaining the Fundamental Characteristics of Color*. Munsell Color Company.
- Combes C. (2005). *The art of being a parasite*. University of Chicago Press.
- Costantini D. & Møller A.P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, 22, 367-370.
- Costantini D. & Møller A.P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 153, 339-344.

- Costantini D., Rowe M., Butler M.W. & McGraw K.J. (2010). From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. *Functional Ecology*, 24, 950-959.
- Cramp P. & Perrins C.M. (1994). *The Birds of Western Palearctic*. Oxford University Press, Oxford.
- Dede S., Deger Y., Kahraman T., Deger S., Alkan M. & Cemek M. (2002). Oxidation products of nitric oxide and the concentrations of antioxidant vitamins in parasitized goats. *Acta Veterinaria Brno*, 71, 341-345.
- Diaferia M., Veronesi F., Morganti G., Nisoli L. & Fioretti D.P. (2013). Efficacy of toltrazuril 5% suspension (Baycox®, Bayer) and diclazuril (Vecoxan®, Janssen-Cilag) in the control of Eimeria spp. in lambs. *Parasitol Res*, 112, 163-8.
- Dowling D.K. & Simmons L.W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276, 1737-1745.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82, 47-95.
- Dwyer D.M. (1974). Analysis of the Antigenic Relationships Among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba III. Immunoelectrophoresis Technics. *The Journal of protozoology*, 21, 139-145.
- Edwards D.I. (1980). Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *The British journal of venereal diseases*, 56, 285-290.
- Edwards D.I. (1993). Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31, 9-20.
- Eley C. (1991). Status signalling in the western greenfinch (*Carduelis chloris*). In: University of Sussex.
- Eraslan G., Cam Y., Eren M. & Liman B.C. (2004). Changes in malondialdehyde level and catalase activity and effect of toltrazuril on these parameters in chicks infected with Eimeria tenella. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48, 251-254.
- Friend M. & Franson J.C. (1999). Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases of birds. In: DTIC Document.
- Gesek M., Sokół R., Welenc J., Tylicka Z., Korzeniowska P., Kozłowska A., Małgorzata W.A. & Otrócka-Domagala I. (2015). Histopathological Observations of the Internal Organs during Toltrazuril (Baycox®) Treatment against Naturally Occurring Coccidiosis in Japanese Quail. *Pakistan Veterinary Journal*, 35, 479-483.
- Giacomo R., Stefania P., Ennio T., Giordina V.C., Giovanni B. & Giacomo R. (1997). Mortality in black siskins (*Carduelis atrata*) with systemic coccidiosis. *J Wildl Dis*, 33, 152-7.

- Gilman S., Blumstein D.T. & Foutoupoulos J. (2007). The Effect of Hemosporidian Infections on White-Crowned Sparrow Singing Behavior. *Ethology*, 113, 437-445.
- Greiner E.C. (2008). Isospora, Atoxoplasma, and Sarcocystis. In: *Parasitic Diseases of Wild Birds* (eds. Atkinson CT, Thomas NJ & Hunter DB). Wiley-Blackwell New York, pp. 109-119.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hamilton W.D. & Zuk M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role of parasites. *Science*, 218, 384-387.
- Harder A. & Haberkorn A. (1989). Possible mode of action of toltrazuril: studies on two Eimeria species and mammalian and Ascaris suum enzymes. *Parasitology Research*, 76, 8-12.
- Hartley R.C. & Kennedy M.W. (2004). Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 353-354.
- Hoste H. (2001). Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology*, 31, 231-244.
- Hrdý I., Cammack R., Stopka P., Kulda J. & Tachezy J. (2005). Alternative pathway of metronidazole activation in Trichomonas vaginalis hydrogenosomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 5033-5036.
- Hõrak P., Saks L., Karu T. & Ots I. (2006). 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. & McGraw K.J. (2004). How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *Journal of Animal Ecology*, 73, 935-947.
- Hõrak P., Sild E., Soomets U., Sepp T. & Kilk K. (2010). Oxidative stress and information content of black and yellow plumage coloration: an experiment with greenfinches. *Journal of Experimental Biology* 213, 2225-2233.
- Höfle U., Gortázar C., Ortíz J., Knispel B. & Kaleta E. (2004). Outbreak of trichomoniasis in a woodpigeon (Columba palumbus) wintering roost. *European Journal of Wildlife Research*, 50, 73-77.
- Karu U., Saks L. & Hõrak P. (2008). Carotenoid-based plumage coloration is not affected by vitamin E supplementation in male greenfinches. *Ecological Research*, 23, 931-935.
- Krautwald-Junghanns M.E., Zebisch R. & 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.

- Krinsky N.I. & Yeum K.-J. (2003). Carotenoid–radical interactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 305, 754-760.
- Land K.M., Delgadillo-Correa M.G., Tachezy J., Vanacova S., Hsieh C.L., Sutak R. & Johnson P.J. (2004). Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Molecular microbiology*, 51, 115-122.
- Lehikoinen A., Lehikoinen E., Valkama J., Väisänen R.A. & Isomursu M. (2013). Impacts of trichomonosis epidemics on Greenfinch *Chloris chloris* and Chaffinch *Fringilla coelebs* populations in Finland. *Ibis*, 155, 357-366.
- Leitsch D., Kolarich D., Binder M., Stadlmann J., Altmann F. & Duchêne M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular microbiology*, 72, 518-536.
- Lillehoj H.S. & Li G. (2004). Nitric oxide production by macrophages stimulated with *Coccidia* sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon-gamma, and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian diseases*, 48, 244-53.
- Lindström K. & Lundström J. (2000). Male greenfinches (*Carduelis chloris*) with brighter ornaments have higher virus infection clearance rate. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48, 44-51.
- Lozano G.A. (1994). Carotenoids, parasites and sexual selection. *Oikos*, 70, 309-311.
- Martin L.B., Hawley D.M. & Ardia D.R. (2011). An introduction to ecological immunology. *Functional Ecology*, 25, 1-4.
- McGraw K.J., Adkins-Regan E. & Parker R.S. (2005). Maternally derived carotenoid pigments affect offspring survival, sex ratio, and sexual attractiveness in a colorful songbird. *Naturwissenschaften*, 92, 375-380.
- McGraw K.J. & Ardia D.R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. *American Naturalist*, 162, 704-712.
- McGraw K.J., Gregory A.J., Parker R.S. & Adkins-Regan E. (2003). Diet, plasma carotenoids, and sexual coloration in the Zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Auk*, 120, 400-410.
- McGraw K.J. & Hill G.E. (2000). Differential effects of endoparasitism on the expression of carotenoid- and melanin-based ornamental coloration. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 267, 1525-1531.
- Medzhitov R., Schneider D.S. & Soares M.P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, 335, 936-941.

- Møller A.P., Biard C., Blount J.D., Houston D.C., Ninni P., Saino N. & Surai P.F. (2000). Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian and Poultry Biology Reviews*, 11, 137-159.
- Monaghan P., Metcalfe N.B. & Torres R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12, 75-92.
- Munoz N.E., Blumstein D.T. & Foufopoulos J. (2010). Immune system activation affects song and territorial defense. *Behav. Ecol.*, 21, 788-793.
- Olson V.A. & Owens I.P.F. (1998). Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 510-514.
- Radomski M.W., Palmer R. & Moncada S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology*, 92, 639-646.
- Saks L., McGraw K. & Hõrak P. (2003). How feather colour reflects its carotenoid content. *Functional Ecology*, 17, 555-561.
- Schmid-Hempel P. (2011). *Evolutionary Parasitology. The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics* Oxford University Press, New York.
- Schreck R., Rieber P. & Baeuerle P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*, 10, 2247.
- Sepp T., Karu U., Blount J.D., Sild E., Männiste M. & Hõrak P. (2012). Coccidian infection causes oxidative damage in greenfinches. *PLoS ONE*, 7, e36495.
- Sepp T., Sild E. & Hõrak P. (2010). Hematological Condition Indexes in Greenfinches: Effects of Captivity and Diurnal Variation. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83, 276-282.
- Sheldon B.C. & Verhulst S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 317-321.
- Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82, 291-295.
- Sies H. & Jones D.P. (2007). Oxidative stress. In: *Encyclopaedia of stress* (ed. Fink G). Elsevier San Diego, CA, pp. 45-48.
- Sorci G. & Faivre B. (2009). Review. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 71-83.
- Stearns S.C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.

- Stepkowski S. & Honigberg B. (1972). Antigenic analysis of virulent and avirulent strains of *Trichomonas gallinae* by gel diffusion methods. *The Journal of protozoology*, 19, 306-315.
- Summers K., McKeon S., Sellars J., Keusenkothen M., Morris J., Gloeckner D., Pressley C., Price B. & Snow H. (2003). Parasite exploitation as an engine of diversity. *Biological Reviews*, 78, 639-675.
- Surai P.F. (2002). *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press.
- Svensson P. & Wong B. (2011). Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review. *Behaviour*, 148, 131-189.
- Zahavi A. (1975). Mate selection: a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53, 205-214.
- Zahavi A. & Zahavi A. (1997). Mate selection. In: *The handicap principle: a missing piece of Darwin's puzzle*. Oxford University Press Oxford, pp. 25-40.
- Tyczkowski J.K., Hamilton P.B. & Ruff M.D. (1991a). Altered metabolism of carotenoids during pale-bird syndrome in chickens infected with *Eimeria acervulina*. *Poultry Science*, 70, 2074-2081.
- Tyczkowski J.K., Schaeffer J.L. & Hamilton P.B. (1991b). Measurement of malabsorption of carotenoids in chickens with pale-birds syndrome. *Poultry Science*, 70, 2275-2279.
- Vinkler M. & Albrecht T. (2009). Carotenoid maintenance handicap and the physiology of carotenoid-based signalisation of health. *Naturwissenschaften*, 97, 19-28.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristiina Štšeglova

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Antibiootikumide ravi mõju rohevintide (*Carduelis chloris*) sulestiku värvusele“, 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, **19.05.2016**

