

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

Mari-Ann Lind

**Immuunaktivatsiooni ja psühholoogilise
stressi mõju DNA kahjustustele rohevintidel
(*Carduelis chloris*)**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Richard Meitern, MSc
Peeter Hõrak, PhD

Tartu 2013

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
2. Kirjanduse ülevaade.....	5
2.1 Oksüdatiivne stress.....	5
2.1.1 Reaktiivsed hapniku osakesed.....	5
2.1.2 Reaktiivsed lämmastiku osakesed.....	6
2.1.3 Antioksidandid.....	6
2.1.4 Oksüdatiivsed DNA kahjustused.....	8
2.1.5 DNA kahjustuste mõõtmine.....	10
2.1.6 Üksiku raku geelelektrofoores ehk komeedi test.....	10
2.2 Immuunaktivatsioon.....	13
2.2.1 Immuunsüsteemi aktiveerimine LPSiga.....	13
2.2.2 Immuunaktivatsioon ja oksüdatiivne stress.....	15
2.2.3 Immuunfunktsiooni kulude tähtsus ökoloogias.....	16
2.3 Psühholoogiline stress.....	18
2.3.1 Stressi füsioloogia.....	18
2.3.2 Stress ja immuunfunktsioon.....	19
2.3.3 Stressi mõju DNA kahjustustele ja kohasusele.....	19
3. Materjal ja meetodika.....	21
3.1 Katseobjekt.....	21
3.2 Katseandmed ja ajakava.....	21
3.3 Statistilised analüüsid.....	24
4. Tulemused.....	25
5. Arutelu.....	26
Kokkuvõte.....	28
Summary.....	29
Tänuavaldused	30
Kirjanduse loetelu.....	31

1. Sissejuhatus

Isendi kohasus sõltub tema võimest tulla toime keskkonnas esinevate parasiitide ja stressoritega. Nakkushaigused ja parasiidid on looduses laialt levinud ning infektsioonide vältimiseks ja kontrolli all hoidmiseks on peremeesorganismidel välja kujunenud immuunsüsteem. Hamilton ja Zuk (1982) pakkusid välja, et vastuvõtlikkus parasiitidele ja nakkusintensiivsus mõjutavad signaaltunnuste avaldumist ja intensiivsust ning on olulised sugulises valikus. Vastavalt Zahavi (1975) händikäpi printsiibile, peavad signaaltunnused olema kulukad. Immuunsüsteemi tööshoidmiseks on vaja ressursse, mida isend võiks kasutada ka muuks otstarbeks, näiteks investeerimiseks signaaltunnustesse või sigimispingutusse, ning seega mõjutab immuunfunktsioon isendi elukäigutunnuseid ja kohasust (Sheldon ja Verhulst 1996).

Immuunökoloogidele pakuvad huvi mehhanismid, mis teevad immuunsüsteemi kulukaks. Levinud arvamuseks on, et immuunsüsteemi aktiveerimisel toodetud reaktiivsed osakesed põhjustavad oksüdatiivset stressi, mis kahjustab organismile olulisi biomolekule, sealhulgas desoksüribonukleiinhapet (DNA) (Halliwell ja Gutteridge 2007). Sellegipoolest on leitud vähe tõendeid immuunsüsteemi kulude ning oksüdatiivse stressi seostest loomaökoloogilistes mudelites ning probleem vajab täiendavat uurimist (Costantini ja Møller 2009). Oksüdatiivse stressiga hakkama saamine mõjutab arvatavasti ka oluliselt elukäigutunnuseid (Monaghan *et al.* 2009), kuid oksüdatiivse stressi ja kohasuse vahelisi seoseid on vaadeldud vaid üksikutes uurimustes (Hörak ja Cohen 2010). Oksüdatiivse stressi otsene mõõtmine ja tulemuste tõlgendamine on keeruline, seetõttu oleks informatiivsem mõõta biomolekulidele oksüdatiivseid kahjustusi (Monaghan, Metcalfe *et al.* 2009).

Psühholoogiline stress on negatiivne emotsionaalne kogemus (Romero 2004), millega kaasnevad füsioloogilised ja käitumuslikud muutused, mis parandavad isendi väljavaateid ellu jääda (Tsigos ja Chrousos 2002). Loomad puutuvad elu jooksul kokku mitmete psühholoogist stressi põhjustavate sündmustega, milleks võivad olla näiteks toidukonkurents või kiskjad. Stressivastus on samuti isendile kulukas ning mõjutab elukäiku ja kohasust (Cyr ja Romero 2007; Tilgar ja Kikas 2009). On leitud, et stress

võib põhjustada organismile oksüdatiivseid kahjustusi (Liu ja Mori 1999; Muqbil, Azmi *et al.* 2006; Costantini, Marasco *et al.* 2011). Enamasti hinnatakse stressi mõju mõõtes stressihormoonide taset organismis, vähem on uuritud stressi kahjustavaid toimeid biomolekulidele, sealhulgas DNAle (Johnstone, Reina *et al.* 2012) ning seni teostatud uurimused on viidud läbi laboriloomadega (Adachi, Kawamura *et al.* 1993; Muqbil, Azmi *et al.* 2006; Consiglio, Ramos *et al.* 2010). Stressi mõju ning stressi ja immuunaktivatsiooni koosmõju metsikute loomaliikide DNAle pole minule teadaolevalt varem uuritud. Samuti ei ole varem vaadeldud bakteriaalsete lipopolüsahhariidide abil indutseeritud immuunaktivatsiooni mõju lindude DNA kahjustustele.

Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada, kas ja kuidas mõjutab immuunsüsteemi aktiveerimine ja lühiajaline psühholoogiline stress DNA kahjustuste hulka rohevintidel (*Carduelis chloris*). Lisaks pakub töö ülevaadet oksüdatiivse stressi, immuunsüsteemi aktiveerimise ja stressivastuse füsioloogilistest ja molekulaarsetest mehhanismidest. Rohevintide DNA kahjustuste uurimiseks viidi Tartu Ülikooli zoologia osakonna immuunökoloogia töörühmas läbi 2*2 faktoriaalkatse, kus lindude immuunsüsteemi aktiveeriti *Escherichia coli* lipopolüsahhariididega (LPS) ja linde hirmutati kaku pildiga. Moodustati katserühmad: LPS-/hirm-, LPS+/hirm-, LPS+/hirm+ ja LPS-/hirm+. Ennustasin, et aktiveeritud immuunsüsteemiga lindude DNA võiks olla kahjustunum kui kontrollrühma lindudel. Laboriloomadel tehtud katsete (Muqbil, Azmi *et al.* 2006; Consiglio, Ramos *et al.* 2010) põhjal ennustasin, et psühholoogiline stress suurendab oksüdatiivsete DNA kahjustuste hulka ning esmajoones just aktiveeritud immuunsüsteemiga lindudel. DNA kahjustuste hulga määramiseks viidi läbi ühe raku geelelektroforees ehk komeedi test. Oksüdatiivse stressi hindamiseks vaadeldi ühe isendi puhul nii oksüdeerunud nukleotiide äratundva endonukleaasse ensüümiga töödeldud proovi kui ka ensüümiga töötlemata proovi. Eeldasin, et ensüümiga töödeldud proovil on DNA kahjustuste hulk suurem.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Oksüdatiivne stress

Oksüdatiivne stress on olukord, kus reaktiivseid osakesi tekib organismis rohkem, kui antioksidandid on võimelised kahjutuks tegema. Selle tagajärjel saavad kahjustada biomolekulid (Halliwell ja Gutteridge 2007). Reaktiivsed osakesed (RO) on paardumata elektroni sisaldavad radikaalid (superoksiidi radikaal $O_2^{\cdot-}$, hüdroksüülradikaal $\cdot OH$, lämmastikoksiid ($NO\cdot$) ja osakesed, millest võivad kergesti tekkida radikaalid (vesinikperoksiid H_2O_2 , peroksünitrit $ONOO-$, monohapnik 1O_2). Tavaliselt mõeldakse ROde all reaktiivseid hapnikku osakesi (RHO) ja reaktiivseid lämmastiku osakesi (RLO), aga reaktiivseid osakesi leidub ka väävli-, raua- ja halogeeniühendite hulgas (Halliwell 2012).

Kontrollitud kogustes on reaktiivsed osakesed (RO) organismile vajalikud. Vesinikperoksiid ja lämmastikoksiid on olulised organismisisesed signaalmolekulid. Superoksiidi radikaali ja teisi ROSid toodetakse fagotsüütides patogeenide tapmiseks (Halliwell ja Gutteridge 2007). Samas soodustab oksüdatiivsete kahjustuste kuhjumine mitmete haiguste väljaarenemist ja kiirendab rakkude vananemist (Finkel ja Holbrook 2000). Erinevate signaaltunnuste (ornamendid, kognitiivsed ja füüsilised võimed jt) ekspressioon on tundlik oksüdatiivsele stressile ning annab seega teavet isendi tervislikku seisukorra kohta (von Schantz, Bensch *et al.* 1999).

2.1.1 Reaktiivsed hapniku osakesed

Reaktiivsed hapniku osakesed (RHO) on nii hapniku radikaalid kui ka mitteradikaalsed hapniku derivaadid. Vabad radikaalid on osakesed, millel on üks või rohkem paardumata elektroni ning mis on võimelised iseseisvalt eksisteerima (Halliwell ja Gutteridge 2007). Hapniku molekulil on kaks paardumata elektroni, mis asuvad erinevatel orbitaalidel ja on sama kvantarvuga. (Halliwell ja Gutteridge 1984). Kui hapnik (O_2) omastab ühe elektroni tekib superoksiidi radikaal. Teise elektroni lisandumisel on tulemuseks peroksiidioon, mis füsioloogilistes tingimustes dismutatsiooni reaktsioonil protoneerub, andes saadusteks vesinikperoksiidi ja hapniku.

Seda protsessi kiirendab ensüüm superoksiidi dismutaas (SOD) (Finkel ja Holbrook 2000; Halliwell 2012). Superoksiidi radikaal tekib põhiliselt mitokondris elektrontranspordi ahelast lekkinud elektronide kandumisel otse hapnikule. Samuti toodetakse fagotsüütides reaktiivseid osakesi, mis võivad lekkida rakuvaheruumi ning põhjustada koekahjustusi (Halliwell ja Gutteridge 1984). Kui H₂O₂ läheduses leidub raua või vase ioone tekib Fentoni (valem 1) ja Haber-Waissi reaktsioonide käigus hüdroksüülradikaal (Oter, Jin *et al.* 2012).



Hüdroksüülradikaal on ülireaktiivne ja reageerib pea igat tüüpi molekulidega, mis raku leiduvad ning tekitab sekundaarseid radikaale. Hüdroksüülradikaal reageerib koheselt esimese ettejuhtuva molekuliga, kahjustades suhkruid, aminohappeid, fosfolipiide ja DNAd (Halliwell ja Gutteridge 1984). Superoksiidi radikaal enamiku biomolekulidega ei reageeri, kuid on reaktiivne hüdrofoobses keskkonnas. Superoksiidi radikaal on võimeline vabastama Fentoni reaktsiooniks vajalikku raua valkudest, näiteks ferretiinilt ja Fe-S klastreid sisaldavatest valkudest (Halliwell 2012). Vesinikperoksiid on võimeline difundeeruma tekkimiskohast kaugemale ning seetõttu võib Fentoni reaktsioonil tekkida ülireaktiivseid hüdroksüülradikaale igal pool, kus leidub raua või vaske (Halliwell ja Gutteridge 1984).

2.1.2 Reaktiivsed lämmastiku osakesed

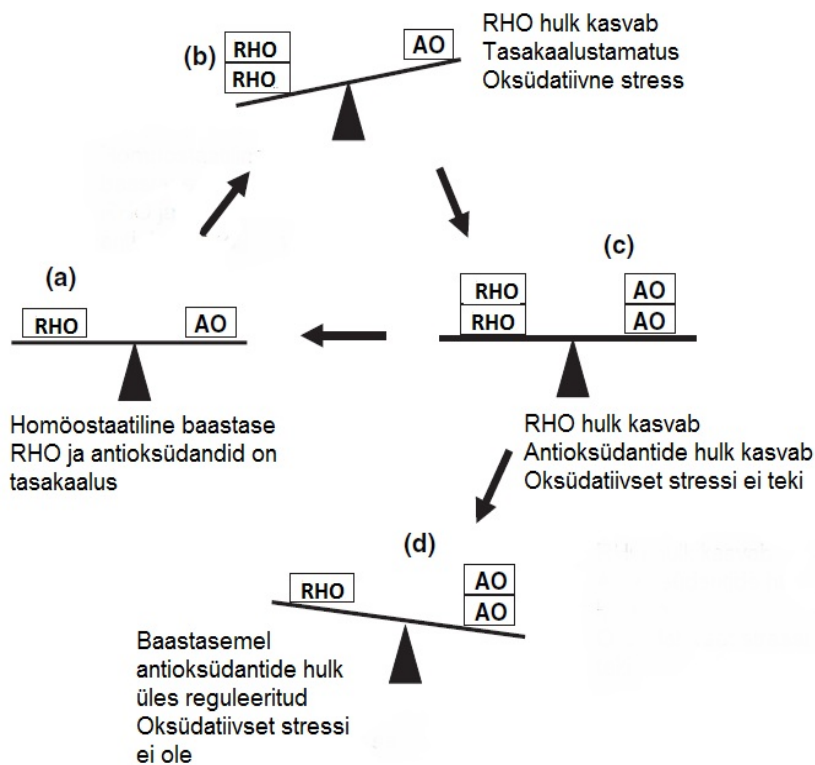
Lämmastikoksiid on oluline signaalmolekul ning seda toodetakse endogeenselt. Üheks oluliseks lämmastikoksiidi funktsiooniks on veresoonte laienemise reguleerimine (Halliwell ja Gutteridge 2007). Kui lämmastikoksiidi toodetakse liiga suures koguses, reageerib see superoksiidi radikaaliga ja moodustub tugev oksüdant peroksünitrit (Halliwell 2012). Peroksünitrit reageerib Fe-S klastrites oleva rauaga, algatab lipiidide peroksüdatsiooni, põhjustab DNA aluste deamineerimist ja nitreerimist ja ahelate katkeid (Halliwell ja Gutteridge 2007).

2.1.3 Antioksidandid

ROde kahjustavate mõjude vastu on välja kujunenud mitmed kaitsemehhanismid. Esmalt üritatakse minimaliseerida ROde teket mitokondris. Juba tekkinud ROSid

neutraliseeritakse antioksidantide abil (Monaghan, Metcalfe *et al.* 2009). Antioksidantideks nimetatakse aineid, mis kaitsevad biomolekule oksüdatiivsete kahjustuste eest. Antioksidante võib jaotada erinevatesse rühmadesse. Katalüütiliselt eemaldavad ROsid ensüümid. Superoksiidi dismutaas kiirendab superoksiidi radikaali eemaldamist dismutatsiooni reaktsioonil, katalaas ja peroksüdaasid neutraliseerivad vesinikperoksiidi. Teiseks oluliseks rühmaks on valgud, mis eemaldavad pro-oksüdante sealhulgas raua ja vase ioone. Lisaks on organismis hulgaliselt madalmolekulaarseid ained, mis reageerivad ROdega enne kui need jõuavad biomolekule kahjustada (Halliwell ja Gutteridge 2007). Oluline on ka struktuurne kaitse. Kõige olulisemate ja oksüdatsioonile eksponeeritumate biomolekulide struktuur on vähem vastuvõtlik oksüdatiivsetele kahjustustele. See saavutatakse stabiilsemate aminohapete või rasvhapete kasutamisega. Erinevatest kaitsestest hoolimata tekib siiski oksüdatiivseid kahjustusi. Nende eemaldamiseks on organismidel evolutsioneerunud parandussüsteemid (Monaghan, Metcalfe *et al.* 2009).

Oksüdatiivse stressi korral ei suuda antioksidantmehhanismid kompenseerida RO poolt tekitatud kahju. Ometigi ei saa pelgalt ROde või antioksidantide hulga järgi hinnata, kas organism on oksüdatiivse stressi seisukorras. Kõrge ROde tase võidakse kompenseerida kõrgenenud antioksidantide hulgaga. Samuti ei saa öelda, et kõrge antioksidantide tasemega isendid on paremas konditsioonis (joonis 1). Seetõttu oleks sobilikum mõõta ROde poolt tekitatud kahjustusi, sest just need mõjutavad kõige rohkem organismi normaalset funktsioneerimist (Monaghan, Metcalfe *et al.* 2009).



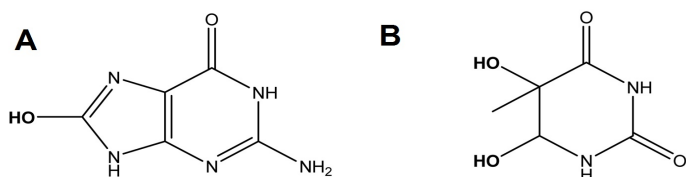
Joonis 1. Reaktiivsete hapniku osakeste ja antioksidantide vahelised seosed. a) RHO ja antioksidantide tase homöostaatilisel baastasemel on madal. b) RHODE hulga kasv ületab antioksidantide kaitsevõime, tulemuseks on oksüdatiivne stress. c) RHODE kasv kompenseeritakse antioksidantide hulga suurenemisega, oksüdatiivset stressi ei teki. d) pikaajaline eksponeeritus RHODEle võib esile kutsuda püsiva antioksidantide taseme tõusu. Ainult RHODE või ainult antioksidantide mõõtmine võib anda eksitava pildi organismi redokstasakaalu kohta (Monaghan, Metcalfe *et al.* 2009).

2.1.4 Oksüdatiivsed DNA kahjustused

DNA kahjustused põhjustavad replikatsiooni peatumist, häireid rakkude jagunemises ja aluste valepaardumisi, millel võivad olla fenotüübilised tagajärjed (Halliwell ja Gutteridge 2007). Ristsidemed DNA ja valkude vahel häirivad kromatiini lahtivoltumist, reparatsiooni, replikatsiooni ja transkriptsiooni (Halliwell ja Gutteridge 2007). Telomeerid on kahjustustele eriti tundlikud, ning oksüdatiivne stress kiirendab telomeeride lühenemist (von Zglinicki, Pilger *et al.* 2000; Salomons, Mulder *et al.* 2009). Telomeeride lühenemise kiirus võib olla kohasuse markeriks. Näiteks

kaelushakid (*Corvus monedula*), kelle telomeerid lühenesid kiiremini, pöördusid järgneval aastal väiksema tõenäosusega kolooniasse tagasi (Salomons, Mulder et al. 2009). DNA kahjustuste hulk võib olla oluline ka sugulises valikus (Freeman-Gallant, Amidon et al. 2011).

Üheks DNA kahjustuste allikaks on oksüdatiivne stress (Halliwell ja Gutteridge 2007). Oksüdatiivse stressi tagajärjel tekivad DNA lämmastikaluste ja desoksüriboosi modifikatsioonid, ahelate katked ning DNA ja valkude vahelised ristsidemed (Monaghan, Metcalfe et al. 2009). RHOD võivad DNAd kahjustada kaudselt, näiteks aktiveerides Ca^{2+} sõltuvad endonukleaasid, ning otseselt lämmastikaluste ja desoksüriboosiga reageerides. Hüdroksüülradikaal on võimeline tekitama igat tüüpi kahjustusi. Superoksiidi radikaal ja vesinikperoksiid kahjustavad DNAd vaid siis, kui läheduses on vabu siirdemetallide ioone, mis võimaldavad Fentoni reaktsioonil hüdroksüülradikaali teket (Halliwell ja Gutteridge 2007). Tuvastatud on üle 80 lämmastikaluste oksüdeerumisprodukti (Cadet, Douki et al. 2011). Kõige kergemini oksüdeeruv nukleotiid on guaniin (Cadet, Douki et al. 2010). Hüdroksüülradikaali lisandumisel guaniini kaheksandale positsioonile, moodustub 8-hüdroksü-2'deoksüguaniin (8-OHdG, joonis 2), mis on üks levinumaid DNA aluse modifikatsioone. Sagedasti esineb ka 5,6-dihüdroksü-5,6-dihüdrotümiini (joonis 2) ehk tümiinglükooli (Halliwell ja Gutteridge 2007). RLO põhjustavad lämmastikaluste deamineerimist. Desoksüriboosi kõik süsinikud on vastuvõtlikud oksüdatsioonile, mille tulemuseks võib olla suur hulk erinevaidprodukte ning ahelate katkete tekkimine (Halliwell ja Gutteridge 2007; Cadet, Douki et al. 2011).



Joonis 2. A) 8-hüdroksü-2'deoksüguaniin B) 5,6-dihüdroksü-5,6-dihüdrotümiin (Mateos ja Bravo 2007)

2.1.5 DNA kahjustuste mõõtmine

DNA kahjustuste mõõtmiseks on erinevaid tehnikaid. Üheks võimaluseks on kromatograafilised meetodid, näiteks gaasikromatograafia (*gas chromatography* GC), kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (*high-pressure liquid chromatography* HPLC) ja vedelikkromatograafia massispektromeetria (*liquid chromatography-mass spectrometry* HPLC-MS). Kõige laialdasemalt on kasutusel HPLC elektropihustusionisatsioon koos tandem-massanalüsaatoritega (*High Performance Liquid Chromatography – electrospray tandem mass spectrometry* HPLC-ESI-MS/MS) (Mateos ja Bravo 2007; Cadet, Douki *et al.* 2011). Kromatograafiliste meetodite puhul lagundatakse DNA nukleotiidideks, mille käigus võib proov töötlemise ajal täiendavalt oksüdeeruda ning on oht kahjustusi ülehinnata. Immuunmeetodite puhul kasutatakse oksüdeerunud nukleotiidide vastaseid antikehasid. Oksüdeerumisreaktsioonid põhjustavad keemilises struktuuris vaid väikeseid muutusi, seega ei ole antikehad eriti spetsiifilised ja seonduvad ka normaalsete nukleotiididega (Cadet, Douki *et al.* 2011). Ensümaatilistes meetodites kasutatakse bakteriaalseid aluse väljalõike reparatsioonisüsteemi (BER) ensüüme formamidopürimidiin DNA glükosülaasi (FPG) ja endonukleas III (endoIII), mis tekitavad oksüdeerunud lämmastikaluste juures ahelasse katke. Ahelate katkeid on võimalik tuvastata elektroforeetiliselt, näiteks kapillaarsel elektroforeesil ja üksiku raku geelelektroforeesi ehk komeedi testi meetodi abil (Mateos ja Bravo 2007; Cadet, Douki *et al.* 2011).

2.1.6 Üksiku raku geelelektroforees ehk komeedi test

Komeedi test ehk üksiku raku geelelektroforees võimaldab hinnata DNA kahjustuste hulka eukarüootsetes rakkudes (Collins 2004). Komeedi test on lihtne ja kiire meetod (Olive ja Banáth 2006), mis võimaldab mõõta madalaid kahjustuste tasemeid (Mateos ja Bravo 2007). Komeedi testi abil saab mõõta neutraalsetes tingimustes DNA ahelate katkeid ning aluselises keskkonnas ka puriine või pürimidiine mittesisaldavate suhkrute (AP-saitide) hulka DNAs (Collins 2009). Komeedi testi läbiviimiseks kinnitatakse rakud agarosiga kaetud mikroskoobiplaadile ning lüüsitakse. Selle käigus eemaldub rakumembraan, tsütoplasma ning nukleosoomid lagunevad. Järele jääb nn nukleoid –

DNA, mis on seotud RNA ja valkudega ning säilitab tänu sellele superspiralisatsioonile. Katkete kohal kaotab DNA superspiralisatsioon ja moodustuvad nukleoidist väljaulatuvad DNA lingud. Elektriväljas kiiremini liikuvad DNA lingud tõmmatakse geelelektroforeesil anoodi poole, ning neist moodustub komeedi saba meenutav struktuur (Azqueta, Shaposhnikov *et al.* 2009).

Komeedi test mõõdab eri mehhanismidega tekkinud DNA kahjustuste koguhulka, samuti kahjustuste parandamise vaheprodukte. Komeedi testi on võimalik muuta spetsiifilisemaks ja tundlikumaks, kui lisada enne geelelektroforeesi proovile ensüüme, mis tunnevad ära kindlat tüüpi kahjustusi ning teevad vastavas kohas DNA ahelasse katke. Selleks, et hinnata DNA oküdatiivseid kahjustusi, kasutatakse bakteriaalseid ensüüme endoIII ja FPG. EndoIII tunneb ära oksüdeerunud pürimidiine ja eemaldab need DNA ahelast, jättes järele AP-saidi. Ensüümi AP-endonukleaase aktiivsuse mõjul tekitatakse seejärel katke DNAsse. Peamine FPG substraat on 8-OHdG (joonis 2). Ensüümiga töödeldud proovi võrdlemisel puhvriga töödeldud prooviga, on võimalik kindlaks määrata oksüdeerunud nukleotiidide osakaal (Collins 2009).

Preparaate värvitakse DNAGA seonduvate fluorestsentsvärvidega ning vaadeldakse seejärel fluorestsentsmikroskoobis. DNA kahjustuste hulka saab kindlaks määrata visuaalsel vaatlusel või kasutades spetsiaalset tarkvara. Kahjustuste hindamiseks kasutatakse erinevaid parameetreid. Enamasti vaadeldakse suhtelist komeedi saba intensiivsust, mida väljendatakse DNA protsendina sabas (Collins 2004). Meetodi puuduseks on see, et kahjustuste tegeliku hulga kohta saab infot ainult kaudsel kalibreerimisel (Azqueta, Shaposhnikov *et al.* 2009).

Komeedi testi kasutatakse sageli inimese ja teiste imetajate DNA kahjustuste määramiseks, lindude kohta on uurimusi märksa vähem (Dhawan, Bajpayee *et al.* 2009). Põhja-maskäälikutel (*Geothlypis trichas*) on kollane rinnaesine signaaltunnuseks, mis peaks andma infot isendi kvaliteedi kohta. Neutraalsetes tingimustes läbi viidud komeedi testi abil leiti, et erksamad tooni kollaste sulgedega isastel oli vähem DNA kahjustusi. Samuti elasid tervema DNAGA linnud talve suurem tõenäosusega üle (Freeman-Gallant, Amidon *et al.* 2011). Itaalias Milaanos vaadeldi aasta jooksul õhusaastatuse mõju kodutuvi (*Columba livia*) DNA kahjustustele. Proove võeti vabalt elavatelt lindudelt ja vangistuses puhastatud õhus elavatelt lindudelt.

Vabalt elavate lindude DNA oli oluliselt kahjustunud, kui vangistuses elanud lindude DNA ning leiti positiivne korrelatsioon DNA kahjutuste ja osooni kontsentratsiooni vahel (Sicolo, Tringali *et al.* 2010). Ross 308 liini kodukanadel (*Gallus gallus domesticus*) uuriti komeedi testi abil polüküllastumata rasvhapete ja E-vitamiini mõju oksüdatiivsele stressile. Linaseemneõlist polüküllastumata rasvhappeid saanud lindude DNA oli rohkem fragmenteerunud kui lindudel, kellele manustati palmiõli, mis sisaldab küllastunud rasvhappeid. Kanadel, kellele lisaks linaseemneõlile anti ka E-vitamiini, oli kahjustuste tase võrreldav lindudega, kes tarbisid palmiõli (Voljč, Frankič *et al.* 2011).

2.2 Immuunaktivatsioon

Immuunsüsteemi ülalpidamine ja kasutamine on organismile kulukas (Sadd ja Schmid-Hempel 2009). Immuunsüsteemi tööhoidmiseks on vaja ressursse, mida isend võiks kasutada ka muuks otstarbeks, näiteks investeerimiseks signaaltunnustesse või sigimisse ning seega mõjutab immuunfunktsioon isendi elukäigutunnuseid ja kohasust (Sheldon ja Verhulst 1996). Immuunsüsteemi kulukust on näidatud eksperimentaalselt mitmetes katsetes (Moret ja Schmid-Hempel 2000; Bonneaud, Mazuc *et al.* 2003; Munoz, Blumstein *et al.* 2010). Üheks mehhanismiks, mis muudab immuunvastuse kulukaks, võib olla oksüdatiivne stress (von Schantz, Bensch *et al.* 1999; Costantini ja Møller 2009). Samas on lindudel teostatud uurimusi aluseks võtvas meta-analüüsis leitud vaid nõrku tõendeid selle kohta, et immuunsüsteemi aktivatsioon põhjustaks oksüdatiivseid kahjustusi (Costantini ja Møller 2009), mistõttu probleem vajab edasist uurimist.

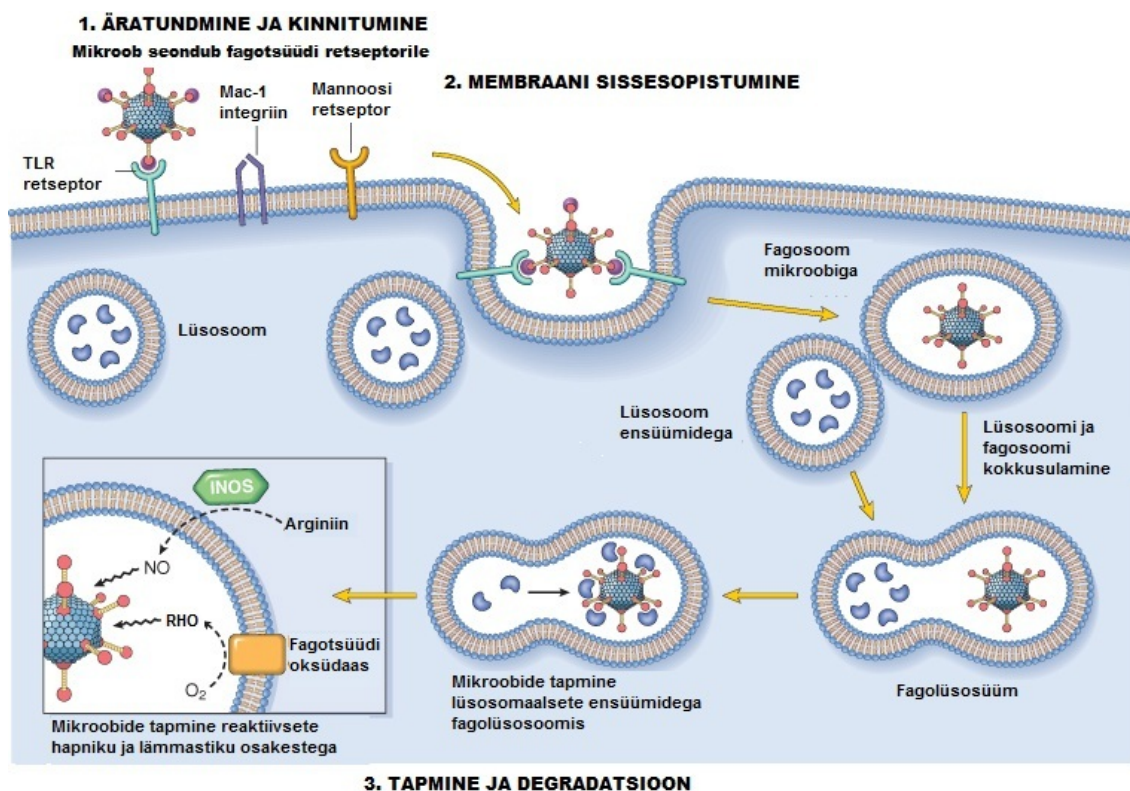
2.2.1 Immuunsüsteemi aktiveerimine LPSiga

Immuunökoloogias kasutatakse sageli immuunfunktsiooni kulude uurimiseks immuunsüsteemi stimuleerimist ainetega, mis ei ole haigustekitajad ega põhjusta infektsiooni, kuid aktiveerivad immuunrakke (Graham, Shuker *et al.* 2011). Selliste ainete hulka kuuluvad patogeensetele mikroorganismidele omased struktuurid, mida selgroogsetes ei esine, näiteks lipopolüsahhariidid, lipoteihhuhapped, peptiidoglükaan, kaheahelaline RNA, flagelliin ja oligonukleotiidid (He, Genovese *et al.* 2008; Murphy, Travers *et al.* 2012). Neid struktuure tunnevad ära fagotsüütide pinnal olevad retseptorid, sealhulgas toll-sarnased retseptorid (TLR), mis vahendavad immuunvastuse käivitamist (Beutler ja Rietschel 2003). Immuunsüsteemi võivad stimuleerida ka muud kehavõõrad komponendid, näiteks mikrolatekshelmed, mille suurus on võrreldav bakterite suurusega (Moret ja Schmid-Hempel 2000).

Immuunsüsteemi aktiveerimiseks kasutatakse sageli lipopolüsahhariide (Graham, Shuker *et al.* 2011). Lipopolüsahhariidid (LPS), mis vahendavad patofüsioloogilisi reaktsioone bakteri ja peremeesorganismi vahel on gram-negatiivsete bakterite välismembraani üheks koostisosaks (Beutler ja Rietschel 2003). LPS koosneb polüsahhariidist ja lipiidsest osast. Immunoloogilist aktiivsust omab lipiid A.

(Rietschel, Kirikae *et al.* 1994). LPS seondub immuunsüsteemi rakkude, näiteks dendriidi rakkude ja makrofaagide TLR4 retseptorile (Beutler and Rietschel 2003). Selle tagajärjel aktiveeritakse NF- κ B transkriptsioonifaktor, mille kontrolli all on erinevate immuunfunktsiooniks vajalike geenide ekspressioon. Hakatakse sünteesima tsütokiine, kemokiine, antimikroobseid peptiide, interferoone ja tuumori nekroosi faktorit TNF- α . Need ained indutseerivad põletiku ning immuunrakkude migreerumise infektsioonikohta (Murphy, Travers *et al.* 2012). Lisaks ekspresseeruvad ensüümid, mis toodavad ROsid (Halliwell ja Gutteridge 2007). LPS on seega oluline bakteriaalsete infektsioonide äratundmises ja immuunvastuse esilekutsumises (Beutler ja Rietschel 2003; Murphy, Travers *et al.* 2012). LPSi kasutamise eeliseks on võimalus mõõta ainult immuunsüsteemi aktiveerimisest tulenevaid efekte, kuna LPS ei replitseeru ega tekita infektsiooni ning puuduvad patogeeni poolt otseselt tekitatavad kahjustused (Graham, Shuker *et al.* 2011).

Lindudel on olulised kaasasündinud immuunsuse rakud heterofiilid ja makrofaagid. Need rakud fagotsüteerivad patogeene ja kutsuvad esile põletikuvastuse (He, Genovese *et al.* 2008; Murphy, Travers *et al.* 2012). Heterofiilid vastavad imetajate neutrofiilidele ning on esimesed rakud, mis migreeruvad infektsioonikohta, jõudes sinna 30 minuti jooksul pärast nakatumist (He, Genovese *et al.* 2008). Heterofiilid on granulotsüütilised fagotsüüdid ning on arvukuselt erütrotsüütide järel kõige levinum rakutüüp lindude veres. Nad tapavad patogeene vabastades oksüdatiivse purske käigus RHOSid, RLOsid ja degranulatsioonil antimikroobseid valke (joonis 3) (He, Genovese *et al.* 2008). Makrofaagidest ja heterofiilidest võivad hüdrolüütilised ensüümid, RHOD ja RLOd pääseda rakuvälisesse ruumi ning tekitada peremehele ulatuslikke kahjustusi. Seega võib fagotsüütide aktivatsioonil olla ka organismile kulukaid tagajärgi (Murphy, Travers *et al.* 2012).



Joonis 3. Fagotsütoosil seondub fagotsüteeritav partikkel (näiteks mikroob) fagotsüüdi pinnaretseptoritele ning rakumembraan sopistub sisse neelates patogeeni. Tekkinud fagosoom liitub lüsoosoomiga ning moodustub fagolüsoosium, kus toimub bakteri tapmine lüsoosomaalsete ensüümide, RHO ja RLOde abil. Fagolüsoosoomi komponendid võivad sattuda ekstratsellulaarsesse maatriksisse ning tekitada koekahjustusi (Vinay, Abbas *et al.* 2004).

2.2.2 Immuunaktivatsioon ja oksüdatiivne stress

Immuunsüsteemi kasutamine on organismile kulukas (Sadd ja Schmid-Hempel 2009). Seetõttu võivad suured kulutused immuunsüsteemile üle kaaluda kasud, mis tulevad madala intensiivsusega nakkuse tolereerimisest organismis ning kõige suurema kohasusega võivad olla isendid, kes indutseerivad patogeeni vastu keskmise tugevusega immuunvastuse (Stjernman, Raberg *et al.* 2008). Koktsiidinakkusest ravitud ning eksperimentaalselt uuesti nakatud rohevintidel täheldati suuremaid lipiidide oksüdatiivseid kahjustusi kui ainult ravitud lindudel. Seejuures oli kõrgem lipiidide peroksüdatsiooni produkti maloondialdehüüdi kontsentratsioon veres lindudel, kelle

nakkusintensiivsus vähenes kõige rohkem, mille põhjal võib oletada, et kahjustusi põhjustas pigem peremehe immuunsüsteem kui nakkus ise (Sepp, Karu *et al.* 2012). Herpesviiruse poolt põhjustatud Mareki haigust põdevatel kodukanadel oli erinevate oksüdatiivse stressi markerite ja DNA kahjustuste hulk oluliselt kõrgem kui tervetel kanadel. Selle põhjal oletati, et Mareki haigus põhjustas oksüdatiivset stressi, mis kahjustas DNAd (Keles, Fidan *et al.* 2010). Sinijalg-suuladel (*Sula nebouxii*) põhjustas immuunsüsteemi aktiveerimine LPSiga lipiidide peroksüdatsiooni. Samuti mõjutas LPSi süstimine sinise jalavärvi tuhmumist, seda eriti vanematel lindudel (Torres ja Velando 2007). Kodukanadel põhjustas koktsiidinakkus lipiidide peroksüdatsiooni produkti maloondialdehüüdi kõrgemat kontsentratsiooni veres (Georgieva, Koinarski *et al.* 2006).

2.2.3 Immuunfunktsiooni kulude tähtsus ökoloogias

Kulutused immuunsüsteemile mõjutavad ka elukäigutunnuseid ja kohasust (Sheldon ja Verhulst 1996) ning nende uurimiseks on tehtud hulgaliselt katseid. Kuntsliku valiku käigus saadud äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) endoparasiidi *Asobara tabida* suhtes resistentse liini äädikakärbeste suurem oli toidukonkuretsi tingimustes oluliselt suurem, kui kontroll-liini äädikakärbestel. Küllusliku toidu puhul erinevus puudus. Oletati, et resistentse liini kärbsed investeerisid rohkem ressursse rakulise immuunvastuse ülalpidamiseks, mis on vajalik parasiidi enkapsulatsiooniks ning seetõttu jäi neil stressiga toimetulekuks vähem vahendeid. (Kraaijeveld ja Godfray 1997). Sarnaseid tulemusi on saadud ka katsetes karukimalastega (*Bombus terrestris*), kus töölistele süstiti LPSi. Piiramatu hulga toidu korral ei erinenud suurem kontrollgrupi ja aktiveeritud immuunsüsteemiga karukimalaste vahel, toidunappusel vähenes LPSiga süstitud karukimalaste eluiga oluliselt. Seega võidakse immuunsüsteemi kasutamise kulusid kompenseerida suurenenud ressursi tarbimisega (Moret ja Schmid-Hempel 2000). Valgekiird-sidrikutel (*Zonotrichia leucophrys*) mõjutas LPSi süstimine oluliselt lindude käitumist ja territoriaallaulu. Territoriaallaulule vastasid lauluga alla poole LPSi saanud lindudest ning laul erines tavapärasest, sisaldades vähem lõpunoote. LPSiga süstitud lindudel oli ka kõrgenenud alarmkäitumine. Laulmisest hoidumine võib olla haigete lindude jaoks kasulik juhul, kui halvema tervisega isendite jaoks võib suhtlemine kaasa tuua negatiivseid tagajärgi, näiteks vähenenud paaritumisedu (Munoz,

Blumstein *et al.* 2010). LPSi süstimine vähendas vangistuses peetavate koduvarblaste (*Passer domesticus*) aktiivsust ja põhjustas neil kehakaalu langust (Bonneaud, Mazuc *et al.* 2003). Bonneaud, Mazuc jt (2003) näitasid ka, et LPSi süstimine vähendas vabalt elavate emaste koduvarblaste sigimisedukust.

2.3 Psühholoogiline stress

Psühholoogiline stress (edaspidi stress) on negatiivne emotsionaalne kogemus, millega kaasnevad muutused organismi psüühilises ja füsioloogilises seisundis ning mille eesmärgiks on paremini kohaneda stressi tekitanud faktorite mõjudega (Romero 2004). Stressoriks võib olla iga ebatavaline sündmus, mis kutsub esile stressivastuse, millega kaasnevad olulised muutused füsioloogias (Johnstone, Reina *et al.* 2012). Stressivastus võib olla kulukas, näiteks laboriloomadel on korduvalt näidatud stressist põhjustatud DNA kahjustusi (Adachi, Kawamura *et al.* 1993; Muqbil, Azmi *et al.* 2006; Consiglio, Ramos *et al.* 2010). Stressi mõju metsikute loomade DNAle pole minule teadaolevalt varem uuritud. Küll aga on ökoloogilises kontekstis uuritud stressi mõju kohasusele (Cyr ja Romero 2007; Tilgar ja Kikas 2009).

2.3.1 Stressi füsioloogia

Füsioloogiliste muutuste eest vastutavad hüpotaalamuse-hüpopüüsi-neerupealiste telg (HPA-telg) ja sümpaatiline närvisüsteem (Sapolsky, Romero *et al.* 2000). Hüpotaalamusest sekreteeritakse kortikotropiini vabastavat hormooni (KVH), mis stimuleerib hüpopüüsi adrenokortikotroopse hormooni sekretsiooni (AKTH). Vereringega kantakse AKTH neerupealistesse, kus see indutseerib glükokortikoidide ekspressiooni (Padgett ja Glaser 2003). Glükokortikoidid kontrollivad kogu keha homöostaasi ja organismi stressivastust (Tsigos ja Chrousos 2002). Sümpaatilise närvisüsteemi vahendusel vabastatakse närviühendustest ja neerupealistest katehhoolamiine epinefriini ja norepinefriini (Sapolsky, Romero *et al.* 2000).

Stressivastuse korral suureneb kõigepealt katehhoolamiinide süntees sümpaatilises närvisüsteemis ning KVH ja AKTH süntees HPA-teljel (Sapolsky, Romero *et al.* 2000). Esmase vastuse käigus kiireneb pulss, tõuseb vererõhk, paraneb jäsemete verevarustus, tõuseb veresuhkur ja tähelepanuvõime. Need muutused võimaldavad kiiret vastust stressorile ning vajadusel põgeneda (Siegel 1980; Padgett ja Glaser 2003). Mõne minuti pärast hakatakse tootma glükokortikoide, millel on erinevaid funktsioone sõltuvalt kontsentratsioonist ja kõrge taseme ajalisest kestvusest (Sapolsky, Romero *et al.* 2000). Sarnaselt katehhoolamiinidele, kiirendavad glükokortikoidid glükoosi metabolismi ning võimaldavad energiavarude kasutuselevõttu (Padgett ja Glaser 2003).

Väikeses koguses on glükokortikoidid vajalikud stressivastuse esilekutsumiseks. Kõrgematel kontsentratsioonidel on glükokortikoididel aga pärssiv mõju, mille eesmärgiks on organismi kaitsta stressivastuse üleekspressioonist eest (Calcagni ja Elenkov 2006).

2.3.2 Stress ja immuunfunktsioon

Stress võib immuunsüsteemi nii maha suruda kui ka stimuleerida: lühiajaline stress soodustab immuunsüsteemi aktiveerumist, samas kui kroonilisel stressil on immuunsupressiivne mõju (Dhabhar ja McEwen 1997). Immuunsupressiooni vahendavad glükokortikoidide siduvad retseptorid, mis translokeeruvad rakutuuma ja reguleerivad geenide ekspressiooni (Tsigos ja Chrousos 2002). Eksisteerib kahte tüüpi retseptoreid, kõrge ja madala afiinsusega. Immuunrakkudes leiduvatele madalama afiinsusega retseptorile seonduvad glükokortikoidid ainult siis, kui neid on ringluses suurenenud hulgal, näiteks stressi korral (Padgett ja Glaser 2003). Glükokortikoidid blokeerivad transkriptsioonifaktori NF- κ B aktiveerimist, mis on oluline immuunrakkude tööks vajalike geenide ekspresseerimiseks ja põletikuliste tsütokiinide tootmiseks (Scheinman, Gualberto *et al.* 1995). Immuunsüsteemi pärssimisest võib ka kasu olla, näiteks infektsioonide puhul, mille patoloogiline efekt seisneb põletiku poolt põhjustatud kahjustustes (Siegel 1980). Lühiajalisel stressil on immuunvastust stimuleeriv mõju (Dhabhar 2009). Kohe pärast stressi algust indutseerivad katehhoolamiinid leukotsüütide vabanemise põrnast ja teistest siseorganistest vereringesse. HPA-telje aktiveerimisel liiguvad leukotsüüdid kohtadesse, mis tõenäoliselt võivad saada haavata ning kust kaudu nakkused võivad organismi siseneda. Nii suureneb leukotsüütide hulk nahas, kopsudes, seedesüsteemis ja limaskestadel ning väheneb veres (Dhabhar ja McEwen 1997).

2.3.3 Stressi mõju DNA kahjustustele ja kohasusele

Stress võib organismis põhjustada oksüdatiivseid kahjustusi, sealhulgas DNA kahjustusi (Liu, Wang *et al.* 1996; Muqbil, Azmi *et al.* 2006). Oksüdatiivsete kahjustuste üheks tekkemehhanismiks võib olla kiirenenud metabolism (Liu ja Mori 1999). Enamasti hinnatakse stressi mõju mõõtes stressihormoonide taset organismis, vähem on uuritud stressi kahjustavaid toimeid biomolekulidele (Johnstone, Reina *et al.* 2012). Stressist

põhjustatud DNA kahjustuste esinemist on näidatud laboriloomadel (Adachi, Kawamura et al. 1993; Muqbil, Azmi et al. 2006) ja koduloomadel (Sohn, Subramani et al. 2012). Katses Sprague-Dawley tüve rottidega (*Rattus norvegicus*) mõjutati ühte osa rotte korduvate elektrilöökidega ning teise rühma rottidel oli võimalus jälgida nende reaktsiooni, saades nii visuaalseid, lõhna- kui ka kuulmissignaale. Rottidel, kes elektrilööke ei saanud, täheldati maksarakkudes DNA kahjustusi pärast korduvat stressorile eksponeerimist (Adachi, Kawamura et al. 1993). Šveitsi albiino rottidel, keda eksponeeriti liikumisvabadust piiravale stressorile ning kellele manustati oksüdatiivset stressi esilekutsuvat ainet 7,12-dimetüülbens(a)antratseeni (DMBA), esines komeedi testiga mõõtes oluliselt rohkem DNA-kahjustusi, kui rottidel, keda eksponeeriti ainult stressorile või DMBAle (Muqbil, Azmi et al. 2006). Wistari rottidel põhjustas sunnitud ujumine ja liikumisvabaduse piiramine ajurakkude DNA kahjustusi. Vererakkudes muutusi ei täheldatud (Consiglio, Ramos et al. 2010). Comb White Leghorn tõugu kodukanasid eksponeeriti kahele stressorile: kanad majutati väiksematesse puuridesse ja vähendati söögikogust. Komeedi testi abil tuvastati, et stressitingimustes olnud kanade lümfotsüütide DNA oli rohkem fragmenteerunud kui kontrollgrupi kanadel (Sohn, Subramani et al. 2012).

Stressi mõju vabalt elavate loomade DNAle ei ole uuritud. Küll aga on leitud, et stress mõjutab kohasust (Cyr ja Michael Romero 2007; Tilgar ja Kikas 2009). Kuldnokki (*Sturnus vulgaris*) eksponeeriti kaheksa päeva jooksul erinevatele stressoritele (vali heli, kiskja hüüd, uudne objekt, kiskja mulaaž jt) ning leiti, et krooniline stress vähendas lennuvõimestunud poegade arvu (Cyr ja Michael Romero 2007). Raudkulli (*Accipiter nisus*) topisega hirmutatud must-kärbsenäpid (*Ficedula hypoleuca*) viivitasid poegade uuesti toitma hakkamisega kauem, kui kurna oli eksperimentaalselt vähendatud (Tilgar ja Kikas 2009). Nende uurimuste põhjal saab oletada, et stress mõjutab kohasust; samas on füsioloogilisi protsesse, mille kaudu stress kohasust mõjutada võiks, vähe uuritud.

3. Materjal ja metoodika

3.1 Katseobjekt

Rohevindid on mittepesitsusajal seltsingulise eluviisiga värvuliste (*Passeriformes*) seltsi kuuluvad linnud, kes kaaluvad ligikaudu 30 g. Nad on looduslikult levinud kogu Euroopas, Edela-Aasias ja Loode-Aafrikas ning nad toituvad peamiselt seemnetest (Cramp ja Perrins 1994). Rohevindid taluvad hästi vangistust ning on seetõttu sobilikud ökofüsioloogiliste uuringute läbiviimiseks. Vangistuses hoitud lindude enamik uuritud füsioloogilisi näitajaid on võrreldavad looduslikes tingimustes elavate lindude omadega ning tänu sellele on võimalik vangistuses hoitud lindudega tehtud katsete tulemusi kasutada looduses esinevate olukordade seletamiseks (Sepp, Sild *et al.* 2010).

3.2 Katseandmed ja ajakava

Katses osalenud isased rohevindid püüti loorvõrkudega Tartus (58°22`N; 26°43`E) 2., 3. ja 9. jaanuaril 2012. Linnud paigutati siseruumides individuaalsetesse puuridesse (27 x 51 x 55 cm), mille põhjad kaeti liivaga. Lindla keskmine temperatuur katse jooksul oli $14,2 \pm 1,5^{\circ}$ C (standardhälve) ja keskmine õhuniiskus $43,9 \pm 9\%$ (standardhälve). Linde toideti *ad libitum* päevalilleseemnetega ning joodeti filtreeritud kraaniveega. 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 ning linnud vabastati 9. märtsil oma looduslikku elupaika.

Katses osales 63 isast rohevinti, kes jaotati vanuselist koosseisu ja 24. jaanuari kehamassi arvestades ligikaudu nelja võrdsesse rühma: LPS-/hirm-, LPS+/hirm-, LPS-/hirm+ ja LPS+/hirm+. 30. jaanuari õhtul, pärast tulede kustumist, süstiti LPS katsegrupi lindudele rinnalihasesse 0,1 mg *E. coli* LPSi (tüvi 055:B5, Sigma L2880), mis oli lahustatud 40 µL isotoonilises NaCl lahuses. Ülejäänud lindudele süstiti 40 µL isotoonilist NaCl lahust. LPS doosi valimisel lähtuti koduvarblastega tehtud katsest (Martin, Kidd *et al.* 2011). Samal õhtul eemaldati lindudelt ka toidunõud ning puuripõhjad puhastati. Järgmisel hommikul hoiti linde 2 tundi ja 40 minutit näljas, ning

seejärel tagastati lindudele päevalilleseemnetega täidetud toidunõud. Poolte lindude toidunõu kohale kinnitati kakulise *Glaucidium nanum* pilt (autor Danté Fenolio, Internet 1). Pilti (joonis 4) eksponeeriti lindudele 83 minuti jooksul ning seejärel eemaldati toidunõude küljest. 1. veebruaril, keskmiselt 38 h pärast LPS süstimist, võeti lindudelt vereproov, et hinnata LPSi ja hirmutamise mõju DNA kahjustustele eri katserühmades.

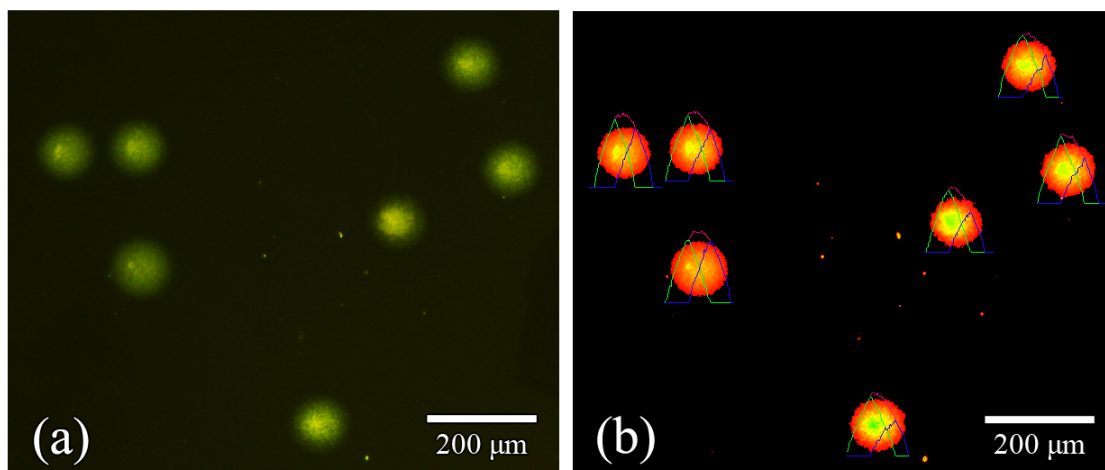


Joonis 4. Hirmutamiskatses kasutatud pilt, kinnitatuna toidunõule

DNA kahjustusi hinnati komeedi testi abil, mis viidi läbi vastavalt valmistaja (Trevigen Gaithersburg, MD, USA) juhistele ning kohendati arvestades rohevintidega teostatud pilootkatsete tulemusi ning meetodile pühendatud artikleid (Azqueta, Shaposhnikov *et al.* 2009; Collins 2009).

DNA kahjustuste ulatuse määramiseks lahjendati linnu täisverd vahetult peale verevõttu kuni saavutati kontsentratsioon ~10 000 raku/ml. Selleks võeti igalt linnult 1 µl verd ning lahjendati fosfaatpuhvriga füsioloogilises soolalahuses (PBS) 10 000 korda. 10 µL verelahjendust segati 105 µL 1 % madala sulamistemperatuuriga agarosiga (LMAgarose, Trevigen Gaithersburg, MD, USA) ning saadust segust pipeteeriti 50 µL mikroskoobislaidi mõlemale augule (CometSlide, Trevigen Gaithersburg, MD, USA). Slaidid märgistati linnu numbriga ning asetati üheks tunniks horisontaalselt +4 °C külmkappi tahenema. Seejärel asetati slaidid 10 % dimetüül sulfoksiidi (DMSO) sisaldavasse lüüsilahusesse (Lysis solution, Trevigen Gaithersburg, MD, USA). Slaide hoiti lüüsilahuses 4 ± 1 h (standardhälve) +4 °C kraadi juures. Järgnevalt eemaldati

slaididelt lüüsilahuse jäägid ning hoiti 30 minutit formamidopürimidiin DNA glükosülaas puhvril (FPG puhver: 10 mM HEPES, 0,1 M KCl, 10 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH=7,4), mida vahetati nimetatud aja jooksul 3 korda. Samaaegselt valmistati ette FPG reaktsioonilahus (10 mM HEPES, 0,1 M KCl, 10 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, ~28U/ml FPG ensüüm (Sigma F3174), pH=7,4). Slaidi esimesele augule pipeteeriti 80 µl FPG reaktsioonipuhvrit ja teisele augule sama kogus FPG reaktsioonilahust. Slaidid asetati horisontaalselt +37 °C pimedasse niiskesse kambrisse ning 30-45 minuti möödudes eemaldati slaididelt FPG reaktsioonipuhver ja reaktsioonilahus. Denatureerimiseks hoiti slaidid 20 minutit tugevalt aluselises lahuses (fooresilahus, 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH=13). Järgnevalt teostati +4 °C-ni jahutatud fooresilahusega täidetud fooresivannis (Comet 40, Scie-Plas Ltd., Suurbritannia) geelelektrofoores (vooluallikas Consort EV261, Belgia). Elektrofoores toimus 5 minutit voolutugevusel 1V/cm. Pärast fooresi pesti slaidid 20 minuti jooksul destilleeritud vees, mida vahetati korra 10 minuti möödumisel ning järgnevalt hoiti slaidid 5 minutit 70% etanoolis. Seejärel asetati slaidid üheks tunniks horisontaalselt +37 °C juurde kuivama. Kuivi slaidid hoiti toatemperatuuril kuivas ja pimedas, kuni slaidi aukude töötlemiseni DNA-ga seonduva fluorestsentsvärviga SYBR® Green I (Trevigen Gaithersburg, MD, USA). DNA värvimiseks lahjendati tõmbekapi all 1 µl SYBR® Green I 10 ml TE puhvril (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7.5), kanti 50 µl lahjendatud SYBR® Green I igale slaidiaugule ning jäeti 20 minutiks toatemperatuuril pimedasse kinnituma. Seejärel eemaldati slaididelt üleliigne SYBR® Green I lahus ning kuivatati slaidid 20 min toatemperatuuril otsese valguse eest varjatult. Kuivad slaidid pildistati esimesel võimalusel fluorestsentsmikroskoobiga Olympus BX41 Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis (TÜMRI), kasutades 10x suurendust. Slaidi iga augu kohta salvestati NIBA filtrit (ergastav valgus vahemikus 470–490 nm, neeldumine vahemikus 510-550 nm) kasutades vähemalt 4 pilti, küljesuurusega 2040 x 1536 pikslit (joonis 5). Iga isendi kohta hindasin 82 ± 25 (standardhälve) raku DNA kahjustuste hulga. Selleks kasutasin vabavaralist tarkvara CometScore 1.5.2 (TriTek Corp., USA), millega hindasin DNA protsenti komeedi sabas. DNA kahjustuste hulga hindamiseks järgisin tarkvaratootja juhiseid. Pärast skoorimist jätsin välja 30 kõige rohkem kõrvalekandunud rakku iga proovi kohta.



Joonis 5. Rohevindi vererakkude DNA peale komeedi testi läbi viimist (a) pildistatuna fluorestsentsmikroskoobiga ja (b) sama pildi DNA kahjustuste hindamine programmiga CometScore 1.5.2.

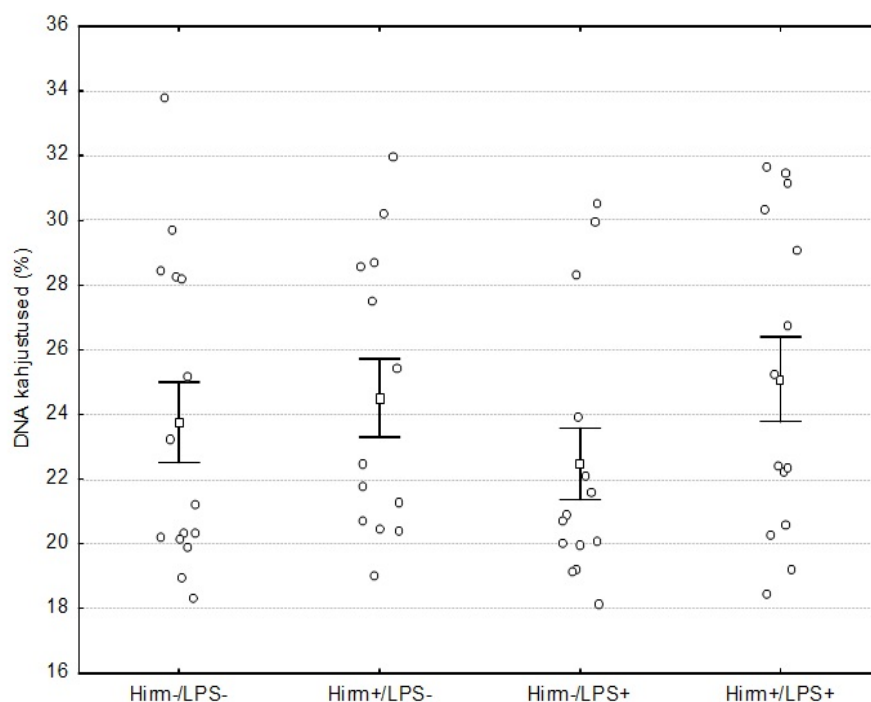
Paariviisilist t-testi kasutades ei ületanud FPGga töödeldud proovide DNA kahjustuste hulk töötlemata proovide DNA kahjustuste hulka ($t= 0,32$, $df=111$, $p=0,75$). Selline olukord võib esineda, kui DNA kahjustuste baastase on väga kõrge, mistõttu ensüümtöötuse käigus tekkinud lisakatmete hulk on liialt väike, võrreldes proovis juba olemasolevate katmete hulgaga (Collins 2009). Seetõttu analüüsisin ainult FPGga töötlemata proovide tulemusi.

3.3 Statistilised analüüsid

DNA kahjustuste statistiliseks analüüsiks kasutasin dispersioonanalüüsi (ANOVA). Analüüsil jätsin kõrvale ühe erindi, kelle DNA oli üle kahe korra rohkem kahjustunud, kui teistel lindudel keskmiselt. Analüüsi eeldused olid täidetud (studentiseeritud jääkide absoluutväärtus oli alla 2,5; homeskedastilisusse eeldus oli täidetud). Andmeanalüüsi tarkvarana kasutasin analüüside läbi viimiseks programmi Statistica (Statsoft, USA).

4. Tulemused

Hirmutamine ja LPSi manustamine DNA kahjustuste määra ei mõjutanud. Samuti ei mõjutanud DNA kahjustuste hulka hirmu ja LPSi koosmõju. (Joonis 6, Tabel 1). Tabelist 1 on lisaks näha, et ka interaktsiooni mudelist välja jättes ei avalda kumbki menetlus DNA kahjustustele mõju.



Joonis 6. DNA kahjustused erinevates katsegruppides (valimi keskmine \pm standardviga). Y-teljel on DNA osakaal komeedi sabas, väljendatuna protsentides.

Tabel 1. Katsemenetluste mõju DNA kahjustuste määrale dispersioonanalüüsis. Täismudel ja interaktsioonita mudel.

Menetlus	F _{df}	p
Hirm	1,89 _{1,52}	0,18
LPS	0,08 _{1,52}	0,78
Hirm*LPS	0,58 _{1,52}	0,45
Hirm	1,91 _{1,53}	0,17
LPS	0,10 _{1,53}	0,75

5. Arutelu

Vastupidiselt oodatule ei mõjutanud käesolevas töös immuunsüsteemi aktiveerimine DNA kahjustuste hulka. Hulgaliselt uurimusi on näidanud, et immuunaktivatsioon ja nakkus põhjustab oksüdatiivse stressi markerite muutusi (Georgieva, Koinarski *et al.* 2006; Torres ja Velando 2007; Sepp, Karu *et al.* 2012), kuid alati ei ole seost immuunaktivatsiooni ja oksüdatiivse stressi vahel leitud (Perez-Rodriguez, Mougeot *et al.* 2008). Põhjus, miks käesolevas töös ei tuvastatud menetluste mõju DNA kahjustustele, võib peituda asjaolus, et vereproov võeti 38h pärast LPSi süstimist ning on võimalik, et selle ajaga jõuti DNA kahjustused ära parandada. Varasemates uurimustes on näidatud, et tugevaim põletikuvastus tekib laulusidrikul (*Melospiza melodia*) vahemikus 3-24h pärast lindude LPSiga mõjutamist (Adelman, Bentley *et al.* 2010) ning heterofiile on infektsioonikohas kõige arvukamalt 6-12 h pärast nakatumist (Harmon 1998). Samuti on võimalik, et kahjustused puudusid seetõttu, et erütrotsüütide DNA on piisavalt hästi kaitstud põletikuvastusel tekkivate ROde eest.

Vastupidiselt varasemalt avaldatud tulemustele (Muqbil, Azmi *et al.* 2006), ei õnnestunud tuvastada psühholoogilise stressi mõju aktiveeritud immuunsüsteemiga isendite DNA kahjustuste määrale. Üks võimalik seletus on, et hirmutamiskatse ei kutsunud esile piisavalt tugevat stressivastust. Muqbil, Azmi jt (2006) leidsid, et rottidel, kellel kutsuti keemiliselt esile oksüdatiivne stress, suurendas psühholoogiline stress oluliselt DNA kahjustusi. Stress üksida aga DNA kahjustusi ei põhjustanud (Muqbil, Azmi *et al.* 2006). Alternatiivseks seletuseks, miks menetluse mõju ei õnnestunud tuvastada, võib olla, et vererakud on vähem vastuvõtlikud psühholoogilise stressi poolt tekitatud oksüdatiivsetele kahjustustele kui näiteks aju- või maksarakud (Costantini, Marasco *et al.* 2011). Rottidega läbi viidud katses põhjustas akuutne stress DNA kahjustusi küll ajurakkudes, kuid vererakkudel muutusi ei täheldatud (Consiglio, Ramos *et al.* 2010). Samuti on väidetud, et oksüdatiivset stressi põhjustab pigem krooniline kui akuutne stress (Costantini, Marasco *et al.* 2011).

Komeedi testiga ei õnnestunud tuvastada erinevusi FPGga töödeldud proovi ja FPGga töötlemata proovi vahel ning see võib olla veel üheks põhjuseks, miks katserühmade vahel DNA kahjustuste hulga erinevused puudusid. Endonukleasete ensüümidega

töötlemata mõõdab aluseline komeedi test DNA ahelate katkeid ja AP-saite, kuid ei anna teavet oksüdeerunud nukleotiidide kohta (Collins 2009). Samas kahjustavad ROd ka desoksüriboose, mille tagajärjel tekivad ahelate katked (Halliwell and Gutteridge 2007). Seega võiks eeldada, et ka komeedi testi aluselise versiooniga on erinevused DNA kahjustuste hulgas märgatavad. Võimalik, et käeolevas töös oleks pidanud pikendama foreesi aega. Neutraalses keskkonnas (Freeman-Gallant, Amidon *et al.* 2011) ja aluselises keskkonnas läbi viidud komeedi testi (Sicolo, Tringali *et al.* 2010; Voljč, Frankič *et al.* 2011) on varem lindudel edukalt kasutatud. Komeedi testiga, kus töödeldi proove FPGga, õnnestus tuvastada keemiliselt esile kutsutud oksüdatiivse stressi mõju rohevintide DNA kahjustuste hulga (Meitern, Sild *et al.* 2013). Käesolevas töös ei õnnestunud komeedi testi abil leida seost menetluste ja DNA kahjustuste määra vahel ning seega vajab komeedi testi sobilikkus ökoloogilistes uuringutes edasist uurimist. Samuti peaks välja selgitama, millistes tingimustes läbi viidud komeedi test oleks rohevintide mudelsüsteemis kõige otstarbekam.

Kokkuvõte

Immuunsüsteemi aktiveerimine on kulukas ning mõjutab loomade elukäigutunnuseid. Arvatakse, et immuunsüsteemi aktiveerimisel toodetud reaktiivsed osakesed põhjustavad oksüdatiivset stressi, mis kahjustab organismile olulisi biomolekule, sealhulgas DNAd. Enamasti mõõdetakse erinevaid oksüdatiivse stressi markereid ja antioksüdantide hulka, kuid uurimusi, kus hinnatakse biomolekulide kahjustusi, on märksa vähem. Stressivastusega kaasnevad mitmed füsioloogilised muutused ning arvatakse, et stress tekitab samuti oksüdatiivseid kahjustusi.

Käesolevas töös hinnati immuunsüsteemi aktivatsiooni ja psühholoogilise stressi mõju rohevintide DNA kahjustustele. Linde süstiti LPSiga ja hirmutati kiskjapildiga 2*2 faktoriaalse disainiga katses. DNA terviklikkust hinnati üksiku raku geelelektroforeesi ehk komeedi testi abil.

Ükski menetlus DNA kahjustuste määra ei mõjutanud. Võimalik, et immuunsüsteemi aktiveerimine ei avaldanud mõju, sest vereproov võeti 38h pärast LPSi süstimist ning kahjustused jõuti selleks ajaks juba ära parandada. Lisaks on võimalik, et menetluste mõju ei õnnestunud tuvastada, kuna erütrotsüütide DNA on oksüdatiivsete kahjustuste eest piisavalt hästi kaitstud. Psühholoogilise stressi mõju puudumise üheks põhjuseks võib olla see, et hirmutamismenetlus ei kutsunud esile piisavalt tugevat stressivastust. Samuti võivad olla vererakud stressi tekitatud oksüdatiivsetele kahjustustele vähem vastuvõtlikud ning stressi kahjulik mõju DNAle võib olla täheldatav pigem kroonilise stressi puhul.

Oksüdatiivse stressi ja DNA kahjustuste vahelisi seoseid on metsikutel loomadel vähe uuritud. Käesolevas töös ei õnnestunud tuvastada immuunaktivatsiooni ja stressi mõju rohevintide DNA kahjustustele ning seega võib öelda, et probleem vajab edasist uurimist. Samuti vajab edasist selgitamist komeedi testi kasutamise otstarbekus ökoloogilistes uuringutes.

Summary

Effects of immune system activation and psychological stress on DNA damage in greenfinches

Activation of immune system is costly and affects life history traits of animals. It is suggested, that reactive species produced during immune system activation cause oxidative stress, which damages biomolecules, including DNA. Measuring amounts of antioxidants and markers of oxidative stress are common methods to evaluate oxidative stress, fewer studies have examined damages on biomolecules. Stress response is accompanied by several physiological changes and it has been proposed that psychological stress also causes oxidative stress.

This study describes the effects of immune system activation and application of an acute psychological stressor on DNA damage in greenfinches. Birds were injected with bacterial lipopolysaccharide (LPS) and exposed to an image of a predator in a 2*2 factorial experiment. Single cell gel electrophoresis method (comet assay) was used to evaluate DNA integrity.

None of the treatments affected the amount of DNA damage. It is possible that immune system activation did not impact DNA damage, because blood sampling of birds took place too long (38h) after injection of LPS and DNA damage might have been already repaired by that time. It is also possible that treatments had no effect, because erythrocyte DNA might be well protected from oxidative stress. One of the reasons why psychological stress had no effect on DNA damage might be that treatment with an image of a predator failed to evoke sufficient stress response. Blood cells might also be less susceptible to stress induced oxidative damage than cells in other tissues. It is also possible that detrimental effect of stress on DNA might be observable rather in case of a chronic than acute stress.

The relations between oxidative stress and DNA damage are seldom studied in free-living animals. This study failed to detect effects of immune system activation and acute psychological stress on DNA damage in greenfinches, suggesting that further investigation of suitability of different versions of comet assay for ecological research purposes is needed.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada oma juhendajaid Richard Meiterni ja Peeter Hõrakut, tänu kelle nõuannetele ja soovitustele töö valmis. Tänaksin ka kõiki immuunökoloogia töörühma liikmeid Ulvi Karu, Tuul Seppa, Elin Silda ja Marju Männistet. Lisaks tänaksin Rita Hõrakut, kes võimaldas komeetide pildistamiseks kasutada Tartu Ülikooli Raku- ja Molekulaarbioloogia instituudi fluorestsentsmikroskoopi.

Kirjanduse loetelu

- Adachi, S., K. Kawamura ja K. Takemoto (1993). "Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress." Cancer Research **53**: 4153.
- Adelman, J. S., G. E. Bentley, J. C. Wingfield, L. B. Martin ja M. Hau (2010). "Population differences in fever and sickness behaviors in a wild passerine: a role for cytokines." The Journal of Experimental Biology **213**: 4099-4109.
- Azqueta, A., S. Shaposhnikov ja A. R. Collins (2009). "DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **674**: 101-108.
- Beutler, B. ja E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nature Reviews Immunology **3**: 169-176.
- Bonneaud, C., J. Mazuc, G. Gonzalez, C. Haussy, O. Chastel, B. Faivre ja G. Sorci (2003). "Assessing the cost of mounting an immune response." American Naturalist **161**: 367-379.
- Cadet, J., T. Douki ja J.-L. Ravanat (2010). "Oxidatively generated base damage to cellular DNA." Free Radical Biology and Medicine **49**: 9-21.
- Cadet, J., T. Douki ja J.-L. Ravanat (2011). "Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **711**: 3-12.
- Calcagni, E. ja I. Elenkov (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.
- Collins, A. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair." Molecular biotechnology **26**: 249-261.
- Collins, A. R. (2009). "Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **681**: 24-32.
- Consiglio, A., A. Ramos, J. Henriques ja J. Picada (2010). "DNA brain damage after stress in rats." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **34**: 652-656.
- Costantini, D., V. Marasco ja A. P. Moller (2011). "A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **181**: 447-456.
- Costantini, D. ja A. P. Møller (2009). "Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **153**: 339-344.

- Cramp, P. ja C. M. Perrins (1994). The Birds of Western Palearctic. Oxford, Oxford University Press.
- Cyr, N. E. ja L. M. Romero (2007). "Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success." General and Comparative Endocrinology **151**: 82-89.
- Dhabhar, F. S. (2009). "Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology." Neuroimmunomodulation **16**: 300-317.
- Dhabhar, F. S. ja B. S. McEwen (1997). "Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking." Brain Behavior and Immunity **11**: 286-306.
- Dhawan, A., M. Bajpayee ja D. Parmar (2009). "Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models." Cell Biology and Toxicology **25**: 5-32.
- Finkel, T. ja N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**: 239-247.
- Freeman-Gallant, C. R., J. Amidon, B. Berdy, S. Wein, C. C. Taff ja M. F. Hausmann (2011). "Oxidative damage to DNA related to survivorship and carotenoid-based sexual ornamentation in the common yellowthroat." Biology Letters **7**: 429-432.
- Georgieva, N. V., V. Koinarski ja V. Gadjeva (2006). "Antioxidant status during the course of Eimeria tenella infection in broiler chickens." Veterinary Journal **172**: 488-492.
- Graham, A. L., D. M. Shuker, L. C. Pollitt, S. K. J. R. Auld, A. J. Wilson ja T. J. Little (2011). "Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology." Functional Ecology **25**: 5-17.
- Halliwell, B. (2012). "Free radicals and antioxidants: updating a personal view." Nutrition reviews **70**: 257-265.
- Halliwell, B. ja J. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochemical Journal **219**: 1.
- Halliwell, B. ja J. M. C. Gutteridge (2007). Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, Oxford University Press.
- Hamilton, W. D. ja M. Zuk (1982). "Heritable true fitness and bright birds: a role of parasites." Science **218**: 384-387.
- Harmon, B. G. (1998). "Avian heterophils in inflammation and disease resistance." Poultry Science **77**: 972-977.
- He, H. Q., K. J. Genovese, C. L. Swaggerty, D. J. Nisbet ja M. H. Kogut (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.
- Hörak, P. ja A. Cohen (2010). "How to measure oxidative stress in an ecological

- context: methodological and statistical issues." Functional Ecology **24**: 960-970.
- Johnstone, C. P., R. D. Reina ja A. Lill (2012). "Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates." Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology: 1-19.
- Keles, H., A. F. Fidan, I. H. Cigerci, I. Kucukkurt, E. Karadas ja Y. Dundar (2010). "Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with Natural Marek's Disease." Veterinary Immunology and Immunopathology **133**: 51-58.
- Kraaijeveld, A. ja H. Godfray (1997). "Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*." Nature **389**: 278-280.
- Liu, J. ja A. Mori (1999). "Stress, aging, and brain oxidative damage." Neurochemical Research **24**: 1479-1497.
- Liu, J., X. Wang, M. Shigenaga, H. Yeo, A. Mori ja B. Ames (1996). "Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats." The FASEB journal **10**: 1532-1538.
- Martin, L. B., L. Kidd, A. L. Liebl ja C. A. C. Coon (2011). "Captivity induces hyperinflammation in the house sparrow (*Passer domesticus*)." The Journal of Experimental Biology **214**: 2579-2585.
- Mateos, R. ja L. Bravo (2007). "Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins)." Journal of Separation Science **30**: 175-191.
- Meitern, R., E. Sild, K. Kilk, R. Porosk ja P. Hõrak (2013). "On the methodological limitations of detecting oxidative stress: effects of paraquat on measures of oxidative status in greenfinches." The Journal of Experimental Biology.
- Monaghan, P., N. B. Metcalfe ja R. Torres (2009). "Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation." Ecology Letters **12**: 75-92.
- Moret, Y. ja P. Schmid-Hempel (2000). "Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers." Science **290**: 1166-1168.
- Munoz, N. E., D. T. Blumstein ja J. Foufopoulos (2010). "Immune system activation affects song and territorial defense." Behavioral Ecology **21**: 788-793.
- Muqbil, I., A. S. Azmi ja N. Banu (2006). "Prior exposure to restraint stress enhances 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced DNA damage in rats." FEBS Letters **580**: 3995-3999.
- Murphy, K. M., P. Travers ja M. Walport (2012). Janeway's immunobiology, Garland Science New York, NY, USA.
- Olive, P. L. ja J. P. Banáth (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature Protocols **1**: 23-29.
- Oter, S., S. Jin, L. Cucullo ja H. J. D. Dorman (2012). "Oxidants and antioxidants: friends or foes?" Oxidants and Antioxidants in Medical Science **1**: 1-4.
- Padgett, D. A. ja R. Glaser (2003). "How stress influences the immune response."

- Trends in Immunology **24**: 444-448.
- Perez-Rodriguez, L., F. Mougeot, C. Alonso-Alvarez, J. Blas, J. Vinuela ja G. R. Bortolotti (2008). "Cell-mediated immune activation rapidly decreases plasma carotenoids but does not affect oxidative stress in red-legged partridges (*Alectoris rufa*)." The Journal of Experimental Biology **211**: 2155-2161.
- Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel ja F. Di Padova (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function." The FASEB journal **8**: 217-225.
- Romero, L. M. (2004). "Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research." Trends in Ecology & Evolution **19**: 249-255.
- Sadd, B. M. ja P. Schmid-Hempel (2009). "Principles of ecological immunology." Evolutionary Applications **2**: 113-121.
- Salomons, H. M., G. A. Mulder, L. van de Zande, M. F. Haussmann, M. H. K. Linskens ja S. Verhulst (2009). "Telomere shortening and survival in free-living corvids." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences: **276**: 3157.
- Sapolsky, R. M., L. M. Romero ja A. U. Munck (2000). "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions." Endocrine reviews **21**: 55-89.
- Scheinman, R. I., A. Gualberto, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski ja A. Baldwin (1995). "Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors." Molecular and cellular biology **15**: 943-953.
- Sepp, T., U. Karu, J. D. Blount, E. Sild, M. Männiste ja P. Hõrak (2012). "Coccidian Infection Causes Oxidative Damage in Greenfinches." PLoS ONE **7**: e36495.
- Sepp, T., E. Sild ja P. Hõrak (2010). "Hematological Condition Indexes in Greenfinches: Effects of Captivity and Diurnal Variation." Physiological and Biochemical Zoology **83**: 276-282.
- Sheldon, B. C. ja S. Verhulst (1996). "Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology." Trends in Ecology & Evolution **11**: 317-321.
- Sicolo, M., M. Tringali, P. Fumagalli ja A. Santagostino (2010). "Columba livia as a sentinel species for the assessment of urban air genotoxicity." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **59**: 484-491.
- Siegel, H. (1980). "Physiological stress in birds." BioScience: 529-534.
- Sohn, S., V. Subramani, Y. Moon ja I. Jang (2012). "Telomeric DNA quantity, DNA damage, and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens." Poultry Science **91**: 829-836.
- Stjernman, M., L. Raberg ja J. A. Nilsson (2008). "Maximum Host Survival at Intermediate Parasite Infection Intensities." PLoS ONE **3**: e2463.
- Zahavi, A. (1975). "Mate selection - a selection for a handicap." Journal of Theoretical Biology **53**: 205-215.

- Tilgar, V. ja K. Kikas (2009). "Is parental risk taking negatively related to the level of brood reduction? An experiment with pied flycatchers." Animal Behaviour **77**: 43-47.
- Torres, R. ja A. Velando (2007). "Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby." Journal of Animal Ecology **76**: 1161-1168.
- Tsigos, C. ja G. P. Chrousos (2002). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress." Journal of psychosomatic research **53**: 865-871.
- Vinay, K., A. Abbas ja N. Fauston (2004). "Robbins and Cotran pathologic basis of disease." New York: Saunders: 623-625.
- Voljč, M., T. Frankič, A. Levart, M. Nemeč ja J. Salobir (2011). "Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of alpha-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat." Poultry Science **90**: 1478-1488.
- von Schantz, T., S. Bensch, M. Grahn, D. Hasselquist ja H. Wittzell (1999). "Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals." Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences **266**: 1-12.
- von Zglinicki, T., R. Pilger ja N. Sitté (2000). "Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts." Free Radical Biology and Medicine **28**: 64-74.

Internetiallikad

1. <http://anotheca.com/wordpress/2009/09/02/working-in-chile-to-serve-darwins-frogs/>. Külastatud 21. mail 2013

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mari-Ann Lind (sünnikuupäev: 18.10.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Immuunaktivatsiooni ja psühholoogilise stressi mõju DNA kahjustustele rohevintidel (*Carduelis chloris*),“ mille juhendajad on Richard Meitern ja Peeter Hõrak,
 - 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, **22.05.2013**