

**TARTU ÜLIKOOL**  
**ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT**  
**ZOOLOOGIA OSAKOND**  
**LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL**

Uku Rooni

**SULE KORTIKOSTEROON JA POEGADE KASVUKIIRUS:  
PESAKONNA SUURUSE MANIPULATSIOON  
RASVATIHASEL (*Parus major*)**

Magistritöö

Juhendaja: Jaanis Lodjak, MSc

**TARTU 2014**



## SISUKORD

1. SISSEJUHATUS.....	4
2. MATERJAL JA METOODIKA .....	10
2.1. Urimissüsteem .....	10
2.2. Pesakonna suuruse manipulatsioon .....	10
2.3. Proovide kogumine .....	11
2.4. Hormooni analüüs.....	11
2.5. Andmeanalüüs .....	12
3. TULEMUSED.....	14
4. ARUTELU .....	18
KOKKUVÕTE.....	22
SUMMARY .....	23
TÄNUAVALDUSED.....	25
KASUTATUD KIRJANDUS .....	26

# 1. SISSEJUHATUS

Isendi kasvukiirus on oluline elukäigutunnus, mis seostub otseselt kohasusega läbi ellujäämise ja sigimisedukuse edasises elus (Roff 1992; Stearns 1992). Kui kiiresti on isend võimeline kasvama, oleneb tugevalt teda ümbritsevatest keskkonnatingimustest (nt toidu kättesaadavus). Hormoonid on ühed tähtsamad füsioloogilised mediaatorid, mis vahendavad keskkonnatingimuste stohhastilisusest tulenevat kasvu plastilisust (Jacobs & Wingfield 2000; Dufty Jr, Clobert & Moller 2002; Crespi *et al.* 2013). Glükokortikoidid (kortisool ja kortikosteron), mis on tuntud ka kui „stressihormoonid“, reguleerivad isendi poolt kasvu investeeritud ressursside hulka ja ajalist dünaamikat muutuv kasvukeskkonnas (McEwen & Wingfield 2003; Schoech, Rensel & Heiss 2011). Siiski on senini veel vabalt elavatel loomadel glükokortikoidide mõju nende kasvu plastilisusele suhteliselt vähe uuritud ja autorile teada olevalt ei ole eelnimetatud kontekstis ükski senine uurimus mõõtnud hormooni taset sulest, mis on integraalne glükokortikoidide mõõt üle poja sulistumisperioodi (Bortolotti *et al.* 2008; Bortolotti *et al.* 2009; Lattin *et al.* 2011).

Glükokortikoidid on selgroogsetel evolutsiooniliselt kõrgelt konserveerunud steroidhormoonid (Denver 2009; Close *et al.* 2010; Jiang, Liu & Tasker 2014). Suurima bioloogilise tähtsusega nimetatud ühendite grupis on kortikosteron ja kortisool (Ovejero *et al.* 2013). Kortisool on domineeriv glükokortikoid enamike imetajate taksonite ja kalade vereringes, seevastu kortikosteron domineerib lindudel, roomajatel, paljudel närilistel ning kahepaiksetel (Romero 2004). Samas on näidatud, et mitmetel liikide vereplasmas on kortikosteron ja kortisool kas püsivalt võrreldavate kontsentratsioonidega (Kenagy & Place 2000; Romero *et al.* 2008; Ovejero *et al.* 2013) või on nimetatud hormoonide tasemete suhe tugevas vanuse-spetsiifilises muutumises (Schmidt & Soma 2008). Glükokortikoidid eritatakse vereringesse hüpotaalamuse–ajuripatsi–neerupealiste (HPA; *hypothalamic–pituitary–adrenal axis*) telje aktivatsiooni lõpp-produktina (Boonstra 2005). Eelnimetatud signalisatsioonirada saab alguse hipokampusest, kust keskkonnast vastuvõetud signaal liigub hüpotaalamuse paraventrikulaarsesse tuuma, mille rakud eritavad neuropeptide kortikotropiini vabastav hormoon (CRH; *corticotropine-releasing hormone*) ja arginiin-vasototsiin (Romero, Soma & Wingfield 1998; Boonstra 2005). Viimati nimetatud ühendid liiguvad adenohüpofüüsi, kus initsieerivad adrenokortikotroopse hormooni (ACTH; *adrenocorticotropic hormone*) sünteesi

(Sapolsky, Romero & Munck 2000). ACTH liigub vereringega neerupealistesse, kus viimane stimuleerib glükokortikoidide sünteesi (Boonstra 2005). Vereringesse vabanenud viimati nimetatud hormoonid seonduvad märklaudrakkudes peamiselt kahte tüüpi rakusiseste retseptoritega: tüüp I ehk mineralokortikoidi (MR) ja tüüp II ehk glükokortikoidi retseptoritega (GR). Tüüp I retseptorid on lokaliseerunud tihedalt näiteks hipokampuses, neerudes ja käärsooles (Breuner & Orchinik 2001). Tüüp II retseptorid paiknevad enamikes kudedes ja seonduvad glükokortikoididega umbes 10 korda väiksema afiinsusega (Breuner & Orchinik 2001). Lisaks mainitud rakusisestele retseptoritele seonduvad glükokortikoidid veel membraansete kortikosteroidi retseptoritega (mCR; *membrane corticosteroid receptor*), mis on tihedalt lokaliseerunud neuronite plasmamembraanides, kuid senini selgrogsetel suhteliselt vähe uuritud (Breuner & Orchinik 2001; Breuner & Orchinik 2009). Membraanseid retseptoreid on kirjeldatud näiteks koduvarblasel (*Passer domesticus*) ja sebra-amadiinil (*Taeniopygia guttata*) ning näidatud, et nende afiinsus kortisooli ja kortikosterooni suhtes on tugevalt liigiti erinev (Breuner & Orchinik 2009; Schmidt *et al.* 2010). Glükokortikoidide sünteesi regulatsioon toimub peamiselt läbi negatiivse tagasiside mehhanismi – kõrgenenud hormooni tase ja seetõttu suurenenud seondumine rakusiseste retseptoritega erinevate HPA-telje punktides hakkab enese edasist aktiivsust inhibeerima (Boonstra 2005). Nimelt, negatiivne tagasisidestus toimub nii hipokampuse, hüpotaalamuse paraventrikulaarse tuuma, adenohüpofüüsi ja neerupealiste tasemel (de Kloet, Oitzl & Joëls 1999; Breuner & Orchinik 2001). Vereplasmasse sekreteeritud glükokortikoididest on ca 90% seotud kandjavalgudega kortikosteroid-seonduv globuliin (CBG; *corticosteroid-binding globulin*; Breuner & Orchinik 2002; Breuner, Delehanty & Boonstra 2013; Schoech *et al.* 2013). Kandjavalgude funktsioonideks on (a) kaitsta glükokortikoidide maksas läbi viidava degradatsiooni eest ja pikendada seeläbi nende poolestusaega, (b) toimida puhversüsteemina, mis aitab vältida kõrgetel hormooni kontsentratsioonidel tekkivaid koekahjustusi (c) reguleerida kudedele kättesaadavate glükokortikoidide hulka ja (d) osaleda negatiivse tagasiside regulatsioonis (Breuner, Delehanty & Boonstra 2013; Schoech *et al.* 2013).

Glükokortikoidide üheks peamiseks funktsiooniks on olla organismi hormonaalne allostaasi mediaator, mis reguleerib isendi poolt erinevatesse kulukatesse funktsioonidesse panustatava energia hulka vastuseks ümbritseva keskkonna ressursside leiduvusele (McEwen & Wingfield 2003). Allostaas on defineeritud, kui füsioloogiliste protsesside

kogum, mille tulemusena säilitatakse organismi homöostaas ehk säilitatakse füsioloogiliselt oluliste parameetrite stabiilsus muutuvates keskkonnatingimustes ja erinevates elukäigu etappides (McEwen & Wingfield 2003). Isendi allostaatilise koormuse, defineeritud kui organismi energiavajadus kindlal ajahetkel sõltuvalt ümbritsevast keskkonnast säilitamiseks homöostaasi, suurus on otseses sõltuvuses ressursside hulgest, mis isendil on võimalik investeerida kasvu ja arengusse (McEwen & Wingfield 2003; Schoech, Rensel & Heiss 2011; Schultner *et al.* 2013). Suhteliselt hästi on kirjeldatud glükokortikoidide kahesuunaline mõju selgroogsete kasvule sõltuvalt allostaatilise koormuse suuruselt (Hayward & Wingfield 2004; Wada 2008). Soodsates keskkonnatingimustes on isendi allostaatiline koormus suhteliselt väike ning plasma glükokortikoidide kontsentratsioon on baastaseme lähedal. Eelkirjeldatud tingimustes kalduvad glükokortikoidid vahendama valdavalt anaboolseid füsioloogilisi protsesse ja reguleerivad energeetiliste ressursside mobiliseerimist ning on seeläbi normaalseks kasvuks ja arenguks olulised füsioloogilised mediaatorid (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Wada 2008). Baastaseme juures on glükokortikoididel leitud neurogeneesi stimuleerivad omadused, mis väljenduvad näiteks närvirakkude kasvu, müeliniseerumise ja neuroglia moodustumise initsieerimises (Lupien *et al.* 2009). Lisaks on glükokortikoidid vajalikud normaalseks osteoblastide diferentseerumiseks, mõjutades seeläbi luustumisprotsesse (Eijken *et al.* 2006), aga ka mitmete teiste kudede ja organite arenguks, nagu näiteks südamelihas, kopsud, maks, neerud ja soolestik (Fowden, Li & Forhead 1998; Kim *et al.* 2014). Baastaseme juures mõjutavad glükokortikoidid kasvu ka läbi mõjude käitumisele ja üldisele aktiivsusele (Kitaysky, Wingfield & Piatt 2001; Landys, Ramenofsky & Wingfield 2006). On leitud, et kortikosterooni taseme tõus seostub positiivselt toitumis- ja mangumiskäitumise ning üldise füüsilise aktiivsusega, mis võivad viia, läbi edukuse pesakonkurentsis, varajase postnataalse kasvu kiirenemiseni ja konditsiooni paranemiseni (Kitaysky, Wingfield & Piatt 2001; Landys, Ramenofsky & Wingfield 2006). Kaudselt mõjutavad glükokortikoidid kasvukiirust veel läbi teiste hormonaalsete signalisatsiooniradade, nagu näiteks kasvuhormooni–insuliinilaadse kasvufaktori (GH-IGF; *growth hormone – insulin-like growth factor*) telje, mille hormoonid (kasvuhormoon ja insuliinilaadne kasvufaktor 1 (IGF-1)) on ühed olulisemaid selgroogsete kasvu ja arengut reguleerivad peptiidid (Lupu *et al.* 2001; Stratikopoulos *et al.* 2008; Dantzer & Swanson 2012). Näiteks on leitud, et neerupealiste alatalitlusest tuleneva glükokortikoidide puuduse korral on nii kasvuhormooni vabastava hormooni kui ka kasvuhormooni eritamine pärsitud, mis otse või läbi IGF-1 taseme languse viib

kasvukiiruse aeglustumiseni (Lupu *et al.* 2001; Mazziotti & Giustina 2013; Lodjak, Mägi & Tilgar 2014). Allostaatilise ülekoormuse ja viimasest tulenevate kõrgete kontsentratsioonide korral vahendavad glükokortikoidid valdavalt kataboolseid füsioloogilisi protsesse, mis vähendavad isendi kasvukiirust ja üldist konditsiooni, kuid suurendavad tema ellujäämustõenäosust halbades keskkonnatingimustes (Hayward & Wingfield 2004; Wada 2008). Krooniliselt kõrge glükokortikoidide kontsentratsioon mõjutab inhibeerib kasvuks suunatavate ressursside hulka läbi: (a) luustumisprotsesside aeglustamise, initsieerides luu resorptsiooni, inhibeerides osteoblastide aktiivsust ja luude mineraliseerumist; (b) proteolüüsi intensiivistamise, mille tulemusena väheneb lihaskude; (c) neurogeneesi inhibeerimise, kiirendades neuronite atroofiat ning apoptoosi; (d) osalemise glükoosi metabolismis, vähendades rakkude insuliinitundlikkust, mille tagajärjel siseneb rakkudesse vähem glükoosi; või (e) teiste hormonaalsete signalisatsiooniradade mõjutamise (Fowden, Li & Forhead 1998; Sapolsky 1999; Sapolsky, Romero & Munck 2000; Eijken *et al.* 2006; Kim *et al.* 2014). Eelkirjeldatud mustrit on sageli näidatud ka eksperimentaalsete uuringutega, kus nii akuutsel, kui krooniliselt kõrgel plasma glükokortikoidide kontsentratsioonil on isendite pre- ja postnataalne kasvukiirus pärsitud (Kitaysky *et al.* 2001; Boonstra 2005; Saino *et al.* 2005; Wada & Breuner 2008). Näiteks suitsupääsukese (*Hirundo rustica*) munadest, kuhu akuutse kortikosterooni taseme tõusu matkimiseks süstiti füsioloogiline doos kortikosterooni, koorusid väiksemate kehamõõtmete ja aeglasema sulestiku arenguga pojad (Saino *et al.* 2005). Sebra-amadiini pojad, kellele kasvuperioodi jooksul anti igapäevaselt toiduga lisa kortikosterooni, kaalusid katse lõpuks võrreldes kontrollgrupiga 7-10% vähem (Spencer *et al.* 2003).

Üksikud tööd, mis senini on glükokortikoidide poolt vahendatud keskkonna stohhastilisusest tulenevat kasvu plastilisust uurinud, põhinevad vereplasma hormonaalanalüüsidele (Heath & Dufty 1998; Pravosudov & Kitaysky 2006). Nimelt on näidatud, et keskkonna muutused ja selle mõju isendi allostaatilisele koormusele on aga üldiselt pikaajalised (Fairhurst *et al.* 2013). Isegi lühiajalise stressori puhul on näidatud, et stressireaktsioon võib kesta oluliselt kauem, kui on stressori reaalne kestvus (Butler, Leppert & Dufty 2010). Seega, pikaajalise allostaatilise koormuse hindamine vereanalüüside abil, mis kajastavad glükokortikoidide hetke kontsentratsioone, ei pruugi olla bioloogiliselt kõige esinduslikum hormooni mõõt (Fairhurst *et al.* 2013). Sule kortikosteroon salvestub sulge, vastavalt kontsentratsioonile vereplasmas, kogu selle kasvamise aja (Bortolotti 2010; Fairhurst *et al.* 2013). Jagades sule (risti sulerooga,

proksimaalsest otsast distaalse poole) seksioonideks, on võimalik analüüsida kortikosterooni tasemeid tagasiulatuvalt, kuni paaripäevase eraldusvõimega (Bortolotti *et al.* 2009). Analüüs kogu sulest, eraldamata täpsemaid seksioone, seevastu kajastab terve sule kasvamise aja keskmist glükokortikoidide taset ja annab pikaajalisema hinnangu allostaatilise koormuse suurusele (Bortolotti *et al.* 2009; Fairhurst *et al.* 2013). Senini on tehtud ainult üksikud uurimused, milles analüüsitakse kortikosterooni sisaldust pesapoegade sulgedes (Fairhurst *et al.* 2012a; Fairhurst *et al.* 2012b; Fairhurst *et al.* 2013; Martnez-Padilla *et al.* 2013). Näiteks Fairhurst *et al.* (2012a) uurisid atlantise tormilindude (*Calonectris diomedea*) vanemliku hoole intensiivsuse muutuse mõju poegade sule kortikosteroonile, kuid ei käsitletud seoseid poegade kasvukiirusega. Autorid leidsid, et vanemhoole intensiivsuse vähenemine põhjustas poegadel kroonilise HPA-telje inhibeerimise ja seeläbi sulekortikosterooni taseme languse, et vältida kõrge plasma kortikosterooni taseme kahjustavaid mõjusid erinevatele kudedele. Fairhurst *et al.* (2013) uurisid kortikosterooni implantaatide abil õõnepääsukeste (*Tachycineta bicolor*) vereplasma kortikosterooni sisalduse seotust sule kortikosterooni sisaldusega ja selle seotust poegade morfoloogiliste tunnustega. Kortikosteroonil leiti oluline poegade kehamõõtmeid vähendav ja kasvu aeglustav mõju (Fairhurst *et al.* 2013). Käesoleva töö autoritele teadaolevalt ei ole läbi viidud ühtegi korrelatiivset ega manipulatiivset uurimust, mis seostaks vabalt elavate lindude poegade sulgede kortikosterooni taseme nende kasvu plastilisusega sõltuvalt allostaatilise koormuse gradiendile.

Poegade kasvukiirus sõltub tugevalt vanemhoole intensiivsusest ja toidu kättesaadavusest (Saether 1994; Sanz & Tinbergen 1999). Eelnimetatud suuruste kaudseks manipuleerimiseks viidi käesolevas töös läbi pesakonna suuruse manipulatsioon rasvatihasega (*Parus major*). Mitmed uuringud on näidanud, et vähendatud pesakondades toovad vanemlinnud poegadele *per capita* rohkem toitu ning ühtlasi on poegade lennudevõimestumise mass suurem võrreldes kontroll ja suurendatud pesakondadega (Tinbergen 1987; Sanz & Tinbergen 1999; Bulit, Barrionuevo & Massoni 2014). Lisaks on näidatud, et toidukogus mõjutab poegade kortikosterooni taset – vähem toitu saavate poegade kortikosterooni tase on kõrgem (Kitaysky *et al.* 1999; Corbel & Groscolas 2008). Seega, antud töös me eeldasime, et vähendatud pesakondade poegadel on suurem kasvukiirus ja madalam sule kortikosterooni tase. Lisaks ootasime, et poegade sule kortikosteroon seostub negatiivselt nende kasvukiirusega, kuna madal kortikosterooni tase vähendab valdavalt anaboolseid protsesse ja energia mobiliseerimist, samas tõusva



allostaatilise koormusega koos suurenev plasma kortikosterooni tase kaldub enam vähendama kataboolseid füsioloogilisi protsesse, mis vähendab isendi poolt kasvu panustatavate ressursside kogust (vaata eespool). Ühtlasi oleme varasemalt näidanud, et sigimisedukus (nt pesitsustihedus, munemise algus, kurna suurus, lennuvõimestunud poegade arv, poegade lennuvõimestumise mass) erinevad märkimisväärselt rasvatihastel, kes elavad okas- või lehtmetsas (Tilgar, Mänd & Leivits 1999; Mänd *et al.* 2005). Viimasest lähtuvalt eeldasime, et pesakonnasuuruse manipulatsioon mõjutab poegade kasvukiirust ja sule kortikosterooni taset erinevalt okas- ja lehtmetsas.

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1. Uurimissüsteem

Uurimus viidi läbi Edela-Eestis, Kilingi-Nõmme linna (58°7'N, 25°5'E) ümbruses, 2012. aasta mais ja juunis. Ligikaudu 50 km<sup>2</sup> suurust uurimisala iseloomustab mosaiikne leht- ja okasmetsade vaheldumine. Lehtmetsad paiknevad enamasti isoleeritud laikudena põldude vahel või ojade kallastel ning on üldiselt majandamata ning tiheda alusmetsaga. Lehtmetsades on domineerivateks puuliikideks hall lepp (*Alnus incana*) ja arukask (*Betula pendula*). Okasmetsad on männi (*Pinus sylvestris*) enamusega ja valdavalt majandatavad puistud, mis moodustavad kohati segapuistuid hariliku kuuse (*Picea abies*) ja sookasega (*Betula pubescens*).

Rasvatihased pesitsesid pesakastides, mille sisemised mõõdud on 11×11×30 cm ja lennuava läbimõõt 3,5–4,0 cm. Kastid asuvad maapinnast 1,5–2,0 m kõrgusel ja paiknevad transektil 50–60 meetriste vahedega. Pesakastid puhastati vanast pesamaterjalist ja vajadusel parandati enne rasvatihase pesitsushooaja algust. Munemisaja alguse, täiskurna suuruse ja koorumise kuupäeva kindlaks tegemiseks kontrolliti pesakaste regulaarselt. Poegade vanust hakati arvestama koorumiskuupäevast (koorumiskuupäev = 0 päev).

### 2.2. Pesakonna suuruse manipulatsioon

Poegade allostaatilise koormuse eksperimentaalseks manipuleerimiseks viidi läbi pesakonna suuruse manipulatsioon, kui pojad olid 2 päeva vanad. (Kitaysky *et al.* 2001; Schoech, Rensel & Heiss 2011). Sama koorumiskuupäevaga pesad jagati juhuslikult kolme manipulatsiooni gruppi: vähendatud, kontroll ja suurendatud. Enne eksperimendi algust ei erinenud gruppidevaheline kurna suurus ja koorunud poegade arv ei manipulatsiooni gruppide (vastavalt  $F_{2,94}=1,84$ ,  $p=0,16$ ;  $F_{2,94}=1,77$ ,  $p=0,18$ ) ega biotoopide vahel (vastavalt  $F_{1,94}=0,96$ ,  $p=0,33$ ;  $F_{1,94}=0,75$ ,  $p=0,39$ ). Kurna suurused (keskmine (SD)) enne manipulatsiooni olid järgmised: okasmetsas: vähendatud pesakondades 10,94 (1,24), kontroll pesakondades 11,47 (1,23) ja suurendatud pesakondades 11,36 (1,55); lehtmetsas: vähendatud pesakondades 11,18 (0,81), kontroll pesakondades 11,75 (1,09) ja suurendatud

pesakondades 11,57 (1,55). Koorunud poegade arvud enne manipulatsiooni olid järgmised: okasmetsas: vähendatud pesakondades 10,52 (1,62), kontroll pesakondades 11,16 (1,14) ja suurendatud pesakondades 10,54 (1,84); lehtmetsas: vähendatud pesakondades 10,52 (1,62), kontroll pesakondades 11,16 (1,14) ja suurendatud pesakondades 10,54 (1,84). Kaks juhuslikult valitud poega vähendatud pesakondadest paigutati vastavasse suurendatud gruppi pessa. Poegade alajahtumise vältimiseks transporditi neid mitte kauem, kui 10 minutit ja koos soojavee kotiga. Kontrollgrupi pesakondade poegi käsitleti sarnaselt, kuid paigutati tagasi nende enda pessa. Manipulatsiooni gruppide vahel ümber paigutatud poegade sugu ei määratud, sest lähtudes katsedisaini juhuslikkusest ei ole põhjust arvata, et pesakondades sugude suhe võiks olla oluliselt erinev. Manipuleeritud pesakondade keskmised suurused, kui pojad olid kahe päeva vanused, olid järgnevad: okasmetsas: vähendatud pesakondades 8,25 (1,88), kontroll pesakondades 10,88 (0,99) ja suurendatud pesakondades 12,71 (1,86); lehtmetsas: vähendatud pesakondades 8,76 (1,35), kontroll pesakondades 11,40 (1,23) ja suurendatud pesakondades 12,36 (1,86).

### **2.3. Proovide kogumine**

Kui pojad olid 2 ja 15 päeva vanused, nende kehamass mõõdeti vastavalt kas elektroonse või vedrukaaluga (täpsusega 0,1 g). Lisaks mõõdeti nihikuga poegade jooksme (täpsusega 0,1 mm) ja tiiva pikkus (täpsusega 1,0 mm) 15 päeva vanuselt. Ühtlasi eemaldati viimati mainitud ajal kolmelt juhuslikult pojalt kaks sabasulge (üks mõlemalt poolt äärest), et analüüsida nendes sisalduva kortikosterooni taset. Kui vereplasmast määratud kortikosterooni tase on tugevas sõltuvuses proovi kogumiseks kuluvast ajast (Romero & Reed 2005), siis viimane ei oma sule kortikosterooni puhul märkimisväärset tähtsust.

### **2.4. Hormooni analüüs**

Sulgede kortikosterooni sisaldus määrati radioimmuunanalüüsiga (RIA; *radioimmunoassay*; Bortolotti *et al.* 2008; Meitern *et al.* 2013). Suled lõigati kääridega <math> < 5\text{mm}^2 </math> tükki, millele lisati 10 ml metanooli (Sigma-Aldrich 34860). Edasi asetati lahus 30 minutiks sonikeerivasse vesivanni ning inkubeeriti üleöö loksutis (300 rpm, 50°C). Metanool eraldati suletükkidest vaakumfiltratsiooni teel, kasutades Whatman'i filterpaberit

nr. 4. Proovi tuub, filter ja vaakumfiltratsiooni kolb pesti omakorda 3 ml metanooliga, mis lisati juba eraldatud metanooli hulga. Saadud metanooli lahus aurustati tõmbekapis 60°C juures. Järgnevalt ekstrakt rekonstitueeriti 450 µl PBS (*phosphate buffered saline*) puhvris, mis jagati omakorda edasi duplikaatideks (200 µl). Järgnevalt lisati igale proovile 100 µl kortikosterooni antikeha Sigma-Aldrich C8784 (lähtelahuse lahjendus 1:100 RIA puhvris (0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub>; pH=8,0)) ja 100 µl triitiumiga (H<sup>3</sup>) märgistatud kortikosterooni (Perkin Elmer, ~10000 cpm (1:10000 lahjendatud RIA puhvris). Proovid inkubeeriti üleöö 4°C juures. Seejärel lisati proovile 0,5 ml dekstraaniga kaetud aktiivsõe suspensiooni (0,5% dekstaani (Sigma-Aldrich 31390), 0,5% aktiivsüsi (Sigma-Aldrich C3345) RIA puhvris, 0 °C juures magnetilisel segajal). Proovid inkubeeriti 4°C juures 10 min. ja siis tsentrifuugiti 2 korda (10 min; 2000 g). 500 µl proovist eraldatud supernatanti pandi sintsilatsioonituumi, millele lisati 5 ml sintsilatsioonivedelikku (Optiphase 'Hisafe' 3, Perkin Elmer, USA) ning analüüsiti sintsillaatoris (Perkin Elmer Precisely Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 2800TR) kahe järjestikuse lugemistsükli vältel. Ühe proovi analüüs lugemistsükli kestis 3 min. Duplikaatide kontsentratsioonide korduvus oli 0,73 (F<sub>263,273</sub>=6,43; n<sub>0</sub>=2,03; p<0,001) ja viimase variatsioonikoefitsient oli 7,25%. Keskmise ekstraheerimise efektiivsus oli 80,3%.

## 2.5. Andmeanalüüs

Üldisi lineaarseid mudeleid (GLM; *general linear model*) kasutati, et analüüsida manipulatsiooni ja biotoobi mõju normaaljaotusega tunnustele (lennuvõimestunud poegade arv, poegade lennudevõimestumise edukus, poegade jooksme ja tiiva pikkus ning kasvukiirus). Poegade lennudevõimestumise edukus defineeriti kui lennudevõimestunud poegade ja manipulatsioonijärgsete (2 päeva vanused pojad) poegade arvu jagatis. Poegade kasvukiirus on antud töös defineeritud kui 2 ja 15 päeva vanuste poegade massi lineaarse regressiooni jäägid (Lodjak, Mägi & Tilgar 2014). GLM mudelite normaaljaotuse eelduse täitmiseks lennudevõimestumise edukus *arctan*-transformeeriti ja lennudevõimestunud poegade arv tõsteti ruutu enne analüüsi.

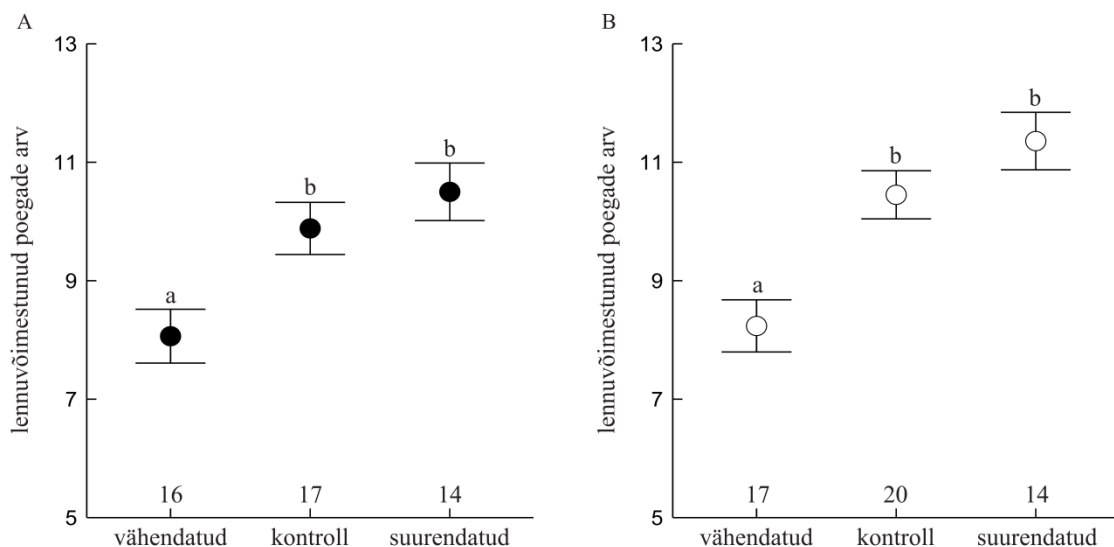
Üldistatud segatüüpi lineaarseid mudeleid (GLMM; *generalized linear mixed-effects model*) kasutati, et analüüsida kuidas manipulatsioon ja biotoop mõjutavad sule kortikosterooni ja kuidas poegade kasvukiirus seostub nende sule kortikosterooniga.

Viimasel juhul kaasati analüüsi kovariaadina kurna suurus. Hormooni määramisel analüüsiti proovid mitmel eri korral, millest tulenevalt kaasati mõlemasse GLMM analüüsi juhusliku faktorina analüüsi kord (*assay*), sealjuures olid igas analüüsis esindatud proovid igast manipulatsiooni grupist ja biotoobist. GLMM mudelite normaaljaotuse eelduse täitmiseks sule kortikosteroon *arctan*-transformeeriti enne igat analüüsi.

Andmeanalüüs viidi läbi programmiga R v3.0.2 (R Development Core Team 2013). GLM analüüs sisaldus *stat* paketi ja GLMM analüüsiks kasutati R-i paketti lme4 (Bates, Maechler & Bolker 2010). Tukey HSD *post-hoc* mitmese võrdluse läbiviimiseks kasutati andmepaketti lsmeans (Lenth 2013). Andmete homoskedastilisuse hindamiseks kasutati Levene'i testi ja normaaljaotuste testimiseks Shapiro–Wilk ning Lilliefors'i teste. Tulenevalt kontrastsest kasvutingimuste erinevusest okas- ja lehtmetsas, analüüsiti kõiki hüpoteesides toodud seoseid eri elupaikades eraldi, olenemata biotoobiga statistilise koosmõju olulisusest. Kõikides analüüsides olid sõltumatuteks andmepunktideks pesa keskvaartused ning valimi suurused olid järgmised: okasmetsas: vähendatud pesakondi 16, kontroll pesakondi 17 ja suurendatud pesakondi 14; lehtmetsas: vähendatud pesakondi 17, kontroll pesakondi 20 ja suurendatud pesakondi 14.

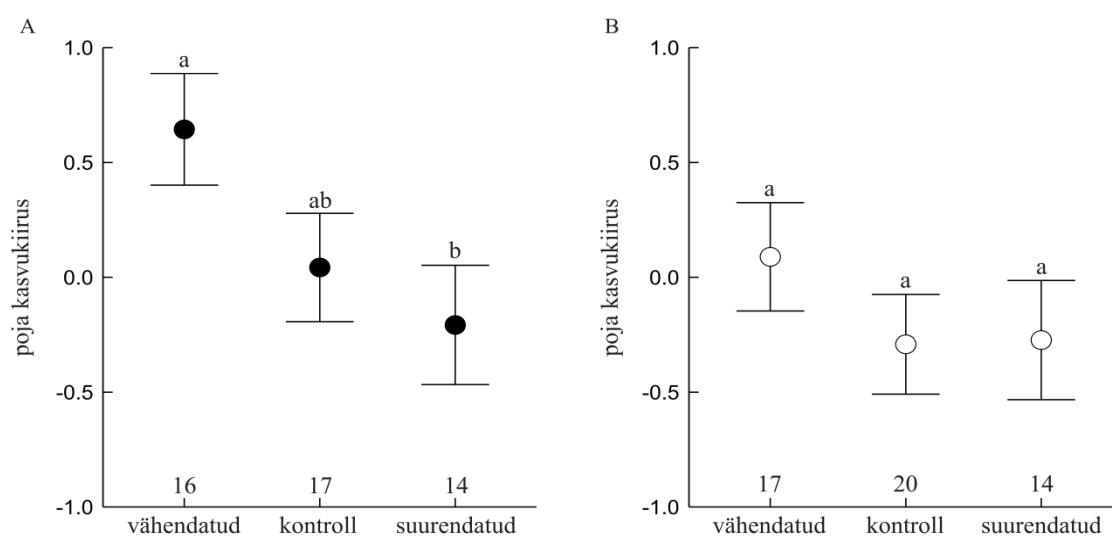
### 3. TULEMUSED

Lennuvõimestunud poegade arv erines manipulatsiooni gruppide ( $F_{2,92}=13,75$ ,  $p<0,001$ ; joonis 1), aga mitte biotoopide vahel ( $F_{1,92}=1,09$ ,  $p=0,30$ ; joonis 1). Ühtlasi oli pesakonna suuruse manipulatsioonil sarnane mõju mõlemas biotoobis (manipulatsioon\*biotoop:  $F_{2,92}=0,25$ ,  $p=0,78$ ; joonis 1). Mõlemas biotoobis lennudevõimestus vähendatud pesakondades oluliselt vähem poegi kui kontroll pesakondades (okasmetsas:  $8,06\pm 1,84$  (keskmine $\pm$ SD) vs.  $9,88\pm 1,27$ ; *post-hoc*  $p=0,02$ ; lehtmetsas:  $8,24\pm 1,71$  vs.  $10,45\pm 1,23$ , *post-hoc*  $p=0,001$ ; joonis 1) ja suurendatud pesakondades (okasmets:  $10,50\pm 2,93$ , *post-hoc*  $p<0,001$ ; lehtmets:  $11,36\pm 1,74$ , *post-hoc*  $p<0,001$ ; joonis 1). Samas mõlemas biotoobis ei erinenud lennudevõimestunud poegade arv kontroll ja suurendatud pesakondade vahel (okasmets: *post-hoc*  $p=0,26$ ; lehtmets: *post-hoc*  $p=0,17$ ; joonis 1). Poegade lennudevõimestumisedukus ei erinenud manipulatsiooni gruppide ( $F_{2,94}=0,99$ ,  $p=0,38$ ) ega biotoopide ( $F_{1,94}=0,73$ ,  $p=0,40$ ) vahel (okasmets: vähendatud pesakondades 0,98, kontroll pesakondades 0,91, suurendatud pesakondades 0,84; lehtmets: vähendatud pesakondades 0,94, kontroll pesakondades 0,92, suurendatud pesakondades 0,92).

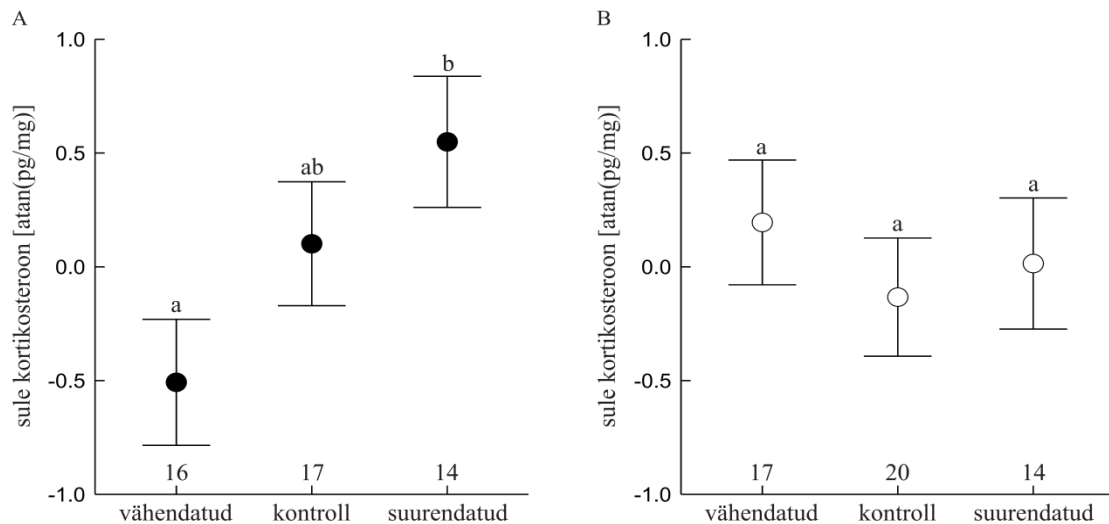


**Joonis 1.** Lennudevõimestunud poegade arv okas- (A; ●) ja lehtmetsas (B; ○). Lennudevõimestunud poegade arv on esitatud originaalandmetena (vt Meetodid). Eri tähed (a, ab, b) tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi manipulatsiooni gruppide keskmiste vahel ( $p<0,05$ ). Numbrid x-teljel tähistavad valimite suuruseid. Vurrud tähistavad standarddviaga (SE) ja punktid keskvaartusi.

Poegade kasvukiirus erines manipulatsiooni gruppide ( $F_{2,92}=3,47$ ,  $p=0,035$ ; joonis 2), kuid mitte biotoopide vahel ( $F_{1,92}=2,85$ ,  $p=0,09$ ; joonis 2). Ühtlasi oli pesakonnasuuruse manipulatsiooni mõju poegade kasvukiirusele sarnane mõlemas biotoobis (manipulatsioon\*biotoop:  $F_{2,92}=0,48$ ,  $p=0,62$ ; joonis 2). Siiski näitas *post-hoc* analüüs, et okasmetsas oli vähendatud pesakondade poegadel suurem kasvukiirus, kui suurendatud pesakondades ( $p=0,049$ , joonis 2A), kuid vähendatud ja kontroll pesakondade poegade ( $p=0,18$ ; joonis 2A) ning kontroll ja suurendatud pesakondade poegade ( $p=0,76$ ; joonis 2A) kasvukiirus ei erinenud. Lehtmetsas ei erinenud pesapoegade kasvukiirus manipulatsiooni gruppide vahel (vähendatud vs kontroll: *post-hoc*  $p=0,46$ ; vähendatud vs suurendatud: *post-hoc*  $p=0,56$ ; kontroll vs suurendatud: *post-hoc*  $p=1,00$ ; joonis 2B). Poegade lennuvõimestumise eelne jooksmine ja tiiva pikkus ei erinenud manipulatsiooni gruppide (vastavalt  $F_{2,92}=0,79$ ,  $p=0,46$ ;  $F_{2,92}=1,00$ ,  $p=0,37$ ) ja biotoopide (vastavalt  $F_{1,92}=1,19$ ,  $p=0,28$ ;  $F_{1,92}=1,58$ ,  $p=0,21$ ) vahel. Ühtlasi oli manipulatsiooni mõju poja jookse ja tiiva pikkusele sarnane mõlemas biotoobis (manipulatsioon\*biotoop; vastavalt  $F_{2,92}=0,38$ ,  $p=0,68$ ;  $F_{2,92}=0,75$ ,  $p=0,47$ ).



**Joonis 2.** Poegade kasvukiirus manipulatsioonigruppides okas- (A; ●) ja lehtmetsas (B; ○). Kasvukiirus on esitatud, kui 2 ja 15 päevaste poegade masside regressiooni standardiseeritud jäägid (vt Meetodid). Eri tähed (a, ab, b) tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi manipulatsiooni gruppide keskmiste vahel ( $p<0,05$ ). Numbrid x-teljel tähistavad valimite suuruseid. Vurrud tähistavad standardviga (SE) ja punktid keskväärtsi.

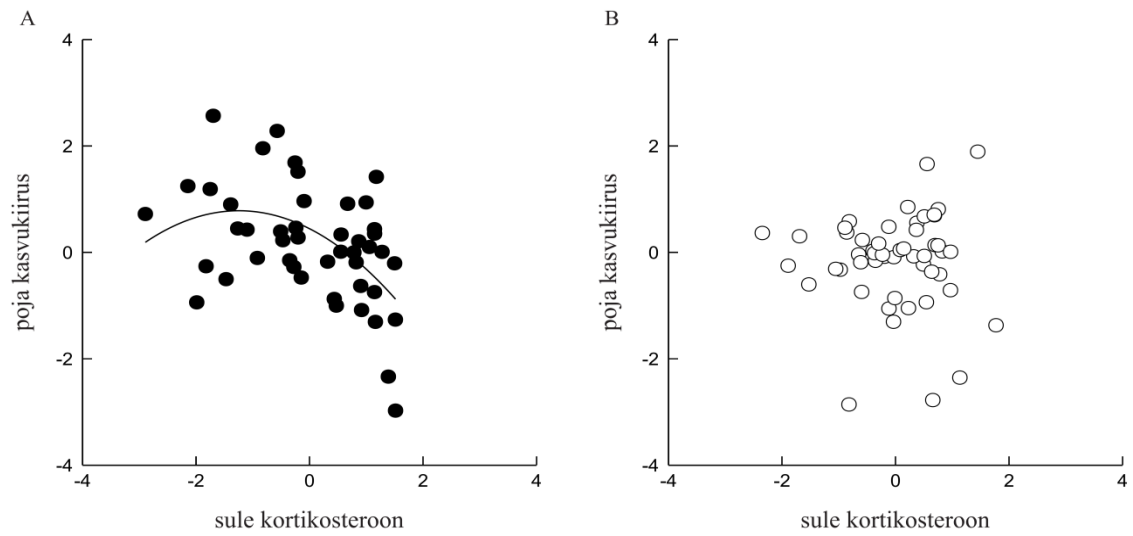


**Joonis 3.** Poegade sule kortikosterooni tase manipulatsioonigruppides okas- (A; ●) ja lehtmetsas (B; ○). Kortikosterooni tase on esitatud mudeli standardiseeritud jääkidenäitajana (vt Meetodid). Eri tähed (a, ab, b) tähistavad statistiliselt olulisi erinevusi manipulatsiooni gruppide keskmiste vahel ( $p < 0,05$ ). Numbrid x-teljel tähistavad valimite suuruseid. Vurrud tähistavad standardvigat (SE) ja punktid keskväärtsusi.

Poegade sule kortikosterooni tase ei erinenud manipulatsiooni gruppide ( $\chi^2=1,23$ ,  $df=2$ ,  $p=0,54$ ) ega biotoopide vahel ( $\chi^2=0,64$ ;  $df=1$ ;  $p=0,43$ ). Samas erines pesakonna suuruse manipulatsiooni mõju biotoobiti (manipulatsioon\*biotoop:  $\chi^2=8,22$ ;  $df=2$ ;  $p=0,016$ ). Okasmetsas oli vähendatud grupi poegadel sule kortikosterooni tase oluliselt madalam kui suurendatud grupi poegadel (*post hoc*  $p=0,005$ ; joonis 3A). Siiski ei leitud erinevust vähendatud ja kontrollgrupi poegade (*post hoc*  $p=0,12$ ; joonis 3A) ning suurendatud ja kontrollgrupi poegade (*post hoc*  $p=0,34$ ; joonis 3A) sule kortikosterooni tasemete vahel. Lehtmetsas ei erinenud poegade sule kortikosterooni tase manipulatsiooni gruppide vahel (vähendatud vs kontroll: *post-hoc*  $p = 0,52$ ; vähendatud vs suurendatud: *post-hoc*  $p=0,84$ ; kontroll vs suurendatud: *post-hoc*  $p=0,88$ ; joonis 3B).

Poegade kasvukiirus seostus negatiivselt nende sule kortikosterooni tasega ( $\chi^2=4,80$ ;  $df=1$ ;  $p=0,028$ ). Ühtlasi erines viimati nimetatud seos eri biotoopides (kortikosteroon\*biotoop:  $\chi^2=7,02$ ;  $df=1$ ;  $p=0,008$ ). Okasmetsas oli poegade kasvukiiruse ja sule kortikosterooni vahel teise astme polünoomne seos (kortikosteroon:  $t=-3,82$ ,  $p < 0,001$ ; kortikosteroon<sup>2</sup>:  $t=-2,04$ ,  $p=0,047$ ;  $n=47$  pesakonda; joonis 4A), seevastu lehtmetsas nimetatud seost ei leitud ( $t=-0,067$ ;  $p=0,95$ ;  $n=51$  pesakonda; joonis 4B).





**Joonis 4.** Poegade sule kortikosterooni seos nende kasvukiirusega okas- (A; ●; n = 47 pesa) ja lehtmetsas (B; ○; n = 51 pesa). Sule kortikosteroon ja poja kasvukiirus on esitatud standardiseeritud mudeli jääkidena (vt Meetodid).

## 4. ARUTELU

Käesoleva töö tulemused on teadaolevalt esimesed, mis näitavad, et vabalt elava värvulise poegadel muutub sule kortikosterooni tase plastiliselt vastuseks kasvutingimustele ning nimetatud hormoon seostub poegade kasvukiirusega piki allostaatilise koormuse gradienti. Siiski eelnimetatud tulemused olid tugevalt sõltuvad elupaigast, milles pojad kasvasid.

Glükokortikoidid on ühed tähtsamad hormoonid, mis reguleerivad selgroogsete adaptiivset kasvu plastilisust läbi erinevate signaalsüsteemide stimuleerimise või inhibeerimise, sõltuvalt keskkonnatingimustest (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Magee, Neff & Knapp 2006; Pravosudov & Kitaysky 2006; Crossland *et al.* 2010; Mazziotti & Giustina 2013). Baastaseme juures on glükokortikoididel kasvu ja normaalset arengut stimuleeriv funktsioon (Breuner & Orchinik 2001; Schultner *et al.* 2013), mis on vahendatud nii läbi otseste kui kaudsete füsioloogiliste mõjude. Otsene glükokortikoidide mõju tuleneb näiteks läbi närvisüsteemi, luustiku, kopsu-, maksa-, neeru-, soole- ja lihaskoe normaalse arengu vahendamise (Fowden, Li & Forhead 1998; Eijken *et al.* 2006; Lupien *et al.* 2009; Kim *et al.* 2014). Glükokortikoidide kaudne mõju kasvukiirusele tuleneb läbi GH-IGF-1 signaalsüsteemi regulatsiooni (Mazziotti & Giustina 2013). Nimelt on glükokortikoidid baastaseme kontsentratsioonidel vajalikud normaalseks kasvuhormooni eritamiseks, mis koostoimes teiste GH-IGF-1 telje hormoonidega (nt IGF-1) on vajalikud kasvuks ja arenguks (Mazziotti & Giustina 2013). Krooniliselt kõrge plasmata glükokortikoidide tasemel on normaalset arengut ja kasvu pidurdav toime, mis on samuti vahendatud nii läbi otseste kui ka kaudsete füsioloogiliste mõjude (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Romero 2004). Esiteks, suurematel plasmata kortikosterooni tasemetel seondub hormoon enam glükokortikoidi retseptoritega ning vahendatavad füsioloogilised funktsioonid kalduvad enam olema kataboolsed ja energeetiliselt kulukaid protsesse inhibeeriva mõjuga (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Romero 2004). Teiseks, krooniliselt kõrge plasmata glükokortikoidide tase inhibeerib GH-IGF-1 telje aktiivsust (Mazziotti & Giustina 2013). Nimelt, kõrge glükokortikoidide tase põhjustab kasvuhormooni inhibiitori somatostatiini taseme tõusu ja kasvuhormooni vabastava hormooni taseme languse, mille tulemusena väheneb kasvuhormooni ja IGF-1 tase (Giustina & Wehrenberg 1992). Eelnevate uuringutega on näidatud, et pesakonna suuruse manipulatsioon mõjutab vanemliku hoole intensiivsust ja poja kohta toodava toidu kogust

(Tinbergen 1987; Sanz & Tinbergen 1999; Bulit, Barrionuevo & Massoni 2014) ning viimane mõjutab otseselt poegade kortikosterooni taset – vähem toitu saavate poegade kortikosterooni baastase kaldub olema kõrgem (Kitaysky *et al.* 1999; Corbel & Groscolas 2008). Käesolevas töös oli okasmetsa vähendatud pesakondade poegadel tõenäoliselt väiksem allostaatiline koormus ning viimaselt lähtuvalt madalam sule kortikosterooni tase ja suurem kasvukiirus, võrreldes vastavate suurendatud pesakondade poegadega. Tõenäoliselt tugineb eelkirjeldatud muster vanemlindude toitumiskäitumise plastilisusele okasmetsas, kus vanemlinnud suutsid vähendatud pesakondade poegi *per capita* intensiivsemalt toita, kui suurendatud pesakondades. Samas tuleb märkida, et poegade jooksmise ja tiiva pikkus ei erinenud manipulatsiooni gruppide ega biotoopide vahel. Oluline on toonitada, et antud töös hinnati poegade allostaatilise koormuse suurust sulgedes sisalduva kortikosterooni taseme järgi. Erinevalt vereproovide abil kortikosterooni mõõtmisest, ei ole sulgedest kortikosterooni mõõtmisel ohtu uurijapoolse stressivastuse tekkeks (Bortolotti *et al.* 2009). Ühtlasi annab nimetatud hormooni mõõtmine sulgedest poegade sulistumisperioodi keskmise kortikosterooni taseme, mis kajastab suurema tõenäosusega bioloogiliselt relevantsemalt poegade allostaatilise koormuse keskmist suurust pesaperioodil (Bortolotti *et al.* 2009; Bortolotti 2010; Fairhurst *et al.* 2013).

Pesakonnasuuruse manipulatsioonil ei olnud käesolevas töös olulist mõju poegade kasvukiirusele ja sule kortikosteroonile lehtmetsas. Nimelt on näidatud, et rasvatihased eelistavad pesitsemiseks just lehtmetsi, kuna neil kaldub olema seal suurem pesitsustihedus, varajasem munemise algus ning suuremad munad ja kurnad (Mänd *et al.* 2005; Mägi *et al.* 2009; Mänd *et al.* 2009). Samas esineb tendents, et okasmetsas lennuõimestub rasvatihasel rohkem poegi, kes on paremas konditsioonis võrreldes lehtmetsade liigikaaslastega (Mänd *et al.* 2005; Mägi *et al.* 2009). Okasmetsades on tõenäoliselt rasvatihastele suhteline toidu kättesaadavus ühe isendi kohta suurem kui lehtmetsas, mis koos pesakastide lisamisega, vähendamaks pesitsuskohtade limiteeritust, muutsid okasmetsa rasvatihaste jaoks eelistatud elupaigaks (Mänd *et al.* 2005). Ühtlasi on okasmetsa rasvatihaste jaoks suhteliselt uudne elukeskkond, kuna nad normaalselt ei pesitse seal, siis tõenäoliselt on isendid kohanenud erinevalt ekspluateerimaks nimetatud elupaiga ressursse (Mänd *et al.* 2005). Tulenevalt eelnevast võib eeldada, et pesakonnasuuruse manipulatsioonil oli tõenäoselt suurem mõju poegade kasvukiirusele ja sule kortikosteroonile okasmetsas, kuna vanemlindude vanemhool ja toitumiskäitumine olid suurema plastilisusega uudsemas keskkonnas. Eelnimetatud vanemlindude käitumuslik

plastilisus vahendab otseselt poegade ulatuslikumat gradienti sule kortikosterooni tasemetes (varieeruvus okasmetsas -2,46 kuni 1,37 (SD=1,15) standardiseeritud ühikutes ja lehtmetsas -2,18 kuni 1,25 (SD=0,85) ühikut) ja kasvukiirustes (varieeruvus okasmetsas -3,00 kuni 2,96 (SD=1,11) standardiseeritud ühikutes ja lehtmetsas -3,16 kuni 1,58 (SD=0,87) ühikut). Lehtmetsas on tõenäoliselt absoluutses skaalas suurem toidu kättesaadavus, kuid nimetatud biotoobis on oluliselt suurem rasvatihaste pesitsustihedus. Viimasele tuginevalt võib oletada, et suurem liigisisene ja liikide vaheline konkurents ning toiduobjektide üle ekspuaterimine (Newton 1998; Sanz 2001; Mänd *et al.* 2009) limiteerivad tugevalt vanemlindude toitumiskäitumise plastilisust. Seega, pesakonna suuruse muutmine antud töös ei olnud tõenäoliselt piisav, et lehtmetsas tekitada poegade kasvukiiruste ja sule kortikosterooni tasemete diferentseerumist eri manipulatsiooni gruppide vahel. Viimast sellepärast, et intensiivsema ressursikonkurentsi tõttu suhteliselt halvemate keskkonnatingimuste juures olid vanemlinnud lähemal enda füsioloogilise võimekuse maksimumile ega olnud võimelised tõstma endi vanemhoole intensiivsust, võimaldamaks vähendatud pesakondade poegadel suuremat kasvukiirust ja madalamat sule kortikosterooni taset, võrreldes suurendatud pesakondade poegade (Sanz & Tinbergen 1999).

Antud töös leiti poja sule kortikosterooni ja kasvukiiruse vahel unimodaalne seos, kus keskmistel hormooni kontsentratsioonidel oli poegade kasvukiirus suurim (joonis 4A). Nimetatud muster on seletatav läbi interaktsiooni poegade konditsiooni ja kortikosterooni signalisatsiooniraja aktiivsuse vahel (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Schultner *et al.* 2013). Kui isendid on suhteliselt heas toitumuslikus seisundis, kaldub olema kortikosterooni baastase madalam ning hormooni, valdavalt anaboolsed ja energia mobilisatsiooni ning käitumist (sh mangumist) stimuleerivad funktsioonid on valdavalt vähendatud läbi mineralokortikoidi retseptorite (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Breuner & Orchinik 2001; Romero 2004; Breuner 2011; Schultner *et al.* 2013). Samas kui pojad on suhteliselt halvemas konditsioonis siis ühes allostaatilise koormuse tõusuga suureneb ka plasma kortikosterooni tase ning suurem osa nimetatud hormooni poolt vähendatud füsioloogilistest funktsioonidest, mis on kalduvad enam olema kataboolsed ja energeetiliselt kulukaid protsesse inhibeerivad, on peamiselt vähendatud glükokortikoidi retseptorite poolt (Sapolsky, Romero & Munck 2000; Romero 2004). Eelnevalt kirjeldatud mustrit toetab fakt, et glükokortikoidid reguleerivad kontsentratsioonist sõltuvalt läbi unimodaalse seose kasvuhormooni sünteesi – suurim kasvuhormooni sünteesi aktiivsus

kaldub olema keskmistel glükokortikoidi tasemetel (Mazziotti & Giustina 2013) – mis iseseisvalt või läbi IGF-1 on üheks olulisemaks postnataalse kasvukiiruse mediaatoriks (Ross & Buchanan 1990; Stratikopoulos *et al.* 2008; Lodjak, Mägi & Tilgar 2014). Siiski, seos kasvukiiruse ja sule kortikosterooni vahel leiti ainult okasmetsas. Viimase võimalik seletus võib olla, et okasmetsas oli poegade kasvukiirus fenotüübiliselt plastilisem (vt eespool), mis viitab, et kirjeldatud duaalne kortikosterooni retseptorite signalisatsioon oli reljeefsem just okasmetsas võrreldes lehtmetsaga.

Käesoleva uurimuse tulemused näitasid, et sule kortikosterooni tase vabalt elava värvulise poegadel muutub plastiliselt vastuseks kasvutingimustele ning on tõenäoliselt oluline kasvukiiruse mediaator. Siiani on sule kortikosterooni kasutatud vähestes töödes, mis on uurinud lindude kasvukiirust, kuid antud tulemused näitasid, et sule kortikosteroon on tõenäoliselt usaldusväärne pikaajalise füsioloogilise stressitaseme mõõt, mida kasutada edasistes uuringutes.

## KOKKUVÕTE

Isendi kasvukiirus on oluline elukäigutunnus, mis seostub otseselt kohasusega läbi ellujäämise ja sigimisedukuse edasises elus. Kui kiiresti on isend võimeline kasvama, oleneb tugevalt teda ümbritsevatest keskkonnatingimustest (nt toidu kättesaadavusest). Glükokortikoidid (kortisool ja kortikosteron) on ühed tähtsamad füsioloogilised mediaatorid, mis vahendavad keskkonnatingimuste stohhastilisusest tulenevat kasvu plastilisust ja seeläbi reguleerivad isendi poolt kasvu investeeritud ressursside hulka ja ajalist dünaamikat.

Poegade allostaatilise koormuse kaudseks muutmiseks viidi rasvatihasega (*Parus major*) läbi pesakonna suuruse manipulatsioon, mis tekitab vanemlindude poolt poegadele *per capita* toodava toidu ja vanemhoole intensiivsuse gradiendi. Antud töös näidati, et okasmetsas oli vähendatud grupi poegade kasvukiirus suurem ja sule kortikosterooni tase madalam, kui suurendatud grupi poegadel. Tõenäoliselt tugineb eelkirjeldatud muster vanemlindude plastilisemale toitumiskäitumisele, kus vähendatud pesakondade pojad, keda suudeti intensiivsemalt toita, lennuvõimestusid paremas konditsioonis, kui pojad suurendatud pesakondades. Siiski eelkirjeldatud seosed puudusid lehtmetsas, tõenäoliselt kuna suurema pesitsustiheduse tõttu võib oletada, et sealne suurem liigisisene ja liikide vaheline konkurents ning toiduobjektide üle ekspluateerimine limiteerivad tõenäoliselt vanemlindude toitumiskäitumise plastilisust ning seeläbi ei tekkinud manipulatsiooni gruppide vahel poegade kasvukiiruse ja sule kortikosterooni taseme differentseerumist. Lisaks leiti okasmetsas poegade kasvukiiruse ja sule kortikosterooni vahel unimodaalne seos – keskmistel kortikosterooni tasemetel oli poegade kasvukiirus suurim. Seos on seletatav läbi interaktsiooni poegade konditsiooni ja kortikosterooni signalisatsiooniraja regulatsiooni vahel – suhteliselt paremas toitumuslikus seisundis poegadel on madalam sule kortikosterooni tase ning hormoonil on kasvu pigem stimuleeriv toime; suhteliselt halvemas toitumuslikus seisundis poegadel on kõrgem sule kortikosterooni tase ning hormoonil on kasvu pigem inhibeeriv toime. Eelnevalt kirjeldatud seos ei ilmnenud lehtmetsas, kuna poegade kasvukiiruse väiksem varieeruvus viitab, et kortikosterooni signalisatsiooni kahesuunaline mõju nende kasvule ei olnud nii kontrastne kui okasmetsas.

Käesolevas uurimuses näitasime esmakordselt, et sule kortikosterooni tase vabalt elava värvulise poegadel muutub plastiliselt vastuseks kasvutingimustele ning on tõenäoliselt oluline kasvukiiruse mediaator. Ühtlasi viitavad antud töö tulemused, et sule kortikosteron on bioloogiliselt relevantne pikaajalise füsioloogilise stressitaseme indikaator, kasutamaks edasistes uuringutes.

## SUMMARY

### **Feather corticosterone and nestling growth rate: brood size manipulation with great tit (*Parus major*)**

Changes in food availability and parental care have strong effects on the growth rates of young vertebrates, thereby affecting individual fitness through age-specific survival and fecundity. Glucocorticoids (cortisol and corticosterone) are among the main hormones mediating the plasticity of growth rate in stochastic environmental conditions and thereby regulating the dynamics and the amount of energy invested into growth.

In order to indirectly change the allostatic load of nestlings, brood size manipulation with great tits (*Parus major*) was carried out. Latter experiment is well described to create a gradient of parental *per capita* food provisioning resulting subsequent differentiation of nestling fledging condition. In the present study, nestlings of reduced broods in coniferous forest had higher growth rate and lower feather corticosterone levels, than those in enlarged broods. The described pattern could most likely be explained through the plasticity of parental food provisioning behavior, where parents were able to feed their young more in reduced broods, when compared to those in enlarged broods. However, absence of described patterns in deciduous forest might be the result of higher intra- and interspecific competition and overexploitation of food resources, caused by higher breeding densities in named habitat. It is likely that latter factors limited the plasticity of parental food provisioning behavior, resulting from absence of differentiation of nestling growth rate and feather corticosterone levels. In addition, unimodal association was found between nestling growth rate and feather corticosterone – nestlings had highest growth rate on medium corticosterone levels. Named pattern could be explained through the interaction between nestling condition and regulation of corticosterone signaling pathway – nestlings in relatively better condition tend to have lower levels of corticosterone, which subsequently mediates stimulating physiological effects on postnatal growth; when nestlings are in relatively bad condition, increasing levels of corticosterone levels tend to mediate inhibiting effects on growth. However, previously described pattern was not found among nestlings in deciduous forest, most likely because due to less plastic

parental provisioning behavior, the described corticosterone dual receptor signaling had not as pronounced effect on growth rate of nestlings than in coniferous forest, indicated by smaller variance in the latter trait.

In conclusion, this is the first study to show that nestling feather corticosterone levels change plastically in relation to nestling nutritional conditions and that corticosterone is most likely an important mediator of nestling growth rate. In addition, our results strongly suggest that feather corticosterone is a biologically relevant indicator for estimating long-term physiological stress that could be used in further studies.



## **TÄNUAVALDUSED**

Sooviksin tänada kõiki loomaökoloogia töörühma liikmeid, kes töö valmimisele kaasa aitasid ja ennekõike oma juhendajat Jaanis Lodjakut, kes juhendas kannatlikult ja asjatundlikult kõikvõimalikes küsimustes. Antud uurimuse valmimist rahastas Eesti Haridus ja Teadus ministeerium (sihtfinantseerimisteema SF0180004s09 ja grant nr 8985) ja Euroopa Regionaalarengu Fond (teaduse tippkeskus FIBIR). Uurimus on kooskõlas Eesti Vabariigis kehtivate seadustega ja heakskiidetud loomkatsete komisjoni poolt (luba nr 108).

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. (2010) lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package. *Version 0.999375–34. Institute for Statistics and Mathematics, University of Economics and Business, Vienna.*
- Boonstra, R. (2005) Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Mammalogy*, **86**, 236-247.
- Bortolotti, G.R. (2010) Flaws and pitfalls in the chemical analysis of feathers: bad news-good news for avian chemoecology and toxicology. *Ecol Appl*, **20**, 1766-1774.
- Bortolotti, G.R., Marchant, T., Blas, J. & Cabezas, S. (2009) Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *Journal of Experimental Biology*, **212**, 1477-1482.
- Bortolotti, G.R., Marchant, T.A., Blas, J. & German, T. (2008) Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, **22**, 494-500.
- Breuner, C. & Orchinik, M. (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *Journal of Endocrinology*, **175**, 99-112.
- Breuner, C.W. (2011) Stress and Reproduction in Birds. *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol 4: Birds*, 129-151.
- Breuner, C.W., Delehanty, B. & Boonstra, R. (2013) Evaluating stress in natural populations of vertebrates: total CORT is not good enough. *Functional Ecology*, **27**, 24-36.
- Breuner, C.W. & Orchinik, M. (2001) Seasonal regulation of membrane and intracellular corticosteroid receptors in the house sparrow brain. *Journal of Neuroendocrinology*, **13**, 412-420.
- Breuner, C.W. & Orchinik, M. (2009) Pharmacological characterization of intracellular, membrane, and plasma binding sites for corticosterone in house sparrows. *General and Comparative Endocrinology*, **163**, 214-224.
- Bulit, F., Barrionuevo, M. & Massoni, V. (2014) Insights into life history theory: a brood size manipulation on a southern hemisphere species, *Tachycineta leucorrhoa*, reveals a fast pace of life. *Journal of Avian Biology*, **45**, 225–234.

- Butler, M.W., Leppert, L.L. & Dufty, A.M. (2010) Effects of Small Increases in Corticosterone Levels on Morphology, Immune Function, and Feather Development. *Physiological and Biochemical Zoology*, **83**, 78-86.
- Close, D.A., Yun, S.S., McCormick, S.D., Wildbill, A.J. & Li, W.M. (2010) 11-Deoxycortisol is a corticosteroid hormone in the lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13942-13947.
- Corbel, H. & Groscolas, R. (2008) A role for corticosterone and food restriction in the fledging of nestling White storks. *Hormones and Behavior*, **53**, 557-566.
- Crespi, E.J., Williams, T.D., Jessop, T.S. & Delehanty, B. (2013) Life history and the ecology of stress: how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals? *Functional Ecology*, **27**, 93-106.
- Crossland, H., Constantin-Teodosiu, D., Greenhaff, P.L. & Gardiner, S.M. (2010) Low-dose dexamethasone prevents endotoxaemia-induced muscle protein loss and impairment of carbohydrate oxidation in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology-London*, **588**, 1333-1347.
- Dantzer, B. & Swanson, E.M. (2012) Mediation of vertebrate life histories via insulin-like growth factor-1. *Biological Reviews*, **87**, 414-429.
- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S. & Joëls, M. (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, **22**, 422-426.
- Denver, R.J. (2009) Structural and Functional Evolution of Vertebrate Neuroendocrine Stress Systems. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* (eds H. Vaudry, E.W. Roubos, G.M. Coast & M. Vallarino), pp. 1-16.
- Dufty Jr, A.M., Clobert, J. & Moller, A.P. (2002) Hormones, developmental plasticity and adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 190-196.
- Eijken, M., Koedam, M., van Driel, M., Buurman, C.J., Pols, H.A.P. & van Leeuwen, J. (2006) The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **248**, 87-93.
- Fairhurst, G.D., Marchant, T.A., Soos, C., Machin, K.L. & Clark, R.G. (2013) Experimental relationships between levels of corticosterone in plasma and feathers in a free-living bird. *The Journal of experimental biology*, **216**, 4071-4081.
- Fairhurst, G.D., Navarro, J., Gonzalez-Solis, J., Marchant, T.A. & Bortolotti, G.R. (2012a) Feather corticosterone of a nestling seabird reveals consequences of sex-specific parental investment. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **279**, 177-184.

- Fairhurst, G.D., Treen, G.D., Clark, R.G. & Bortolotti, G.R. (2012b) Nestling corticosterone response to microclimate in an altricial bird. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, **90**, 1422-1430.
- Fowden, A.L., Li, J. & Forhead, A.J. (1998) Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proceedings of the Nutrition Society*, **57**, 113-122.
- Giustina, A. & Wehrenberg, W.B. (1992) The role of glucocorticoids in the regulation of growth-hormone secretion - mechanisms and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **3**, 306-311.
- Hayward, L.S. & Wingfield, J.C. (2004) Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *General and Comparative Endocrinology*, **135**, 365-371.
- Heath, J.A. & Dufty, A.M. (1998) Body Condition and the Adrenal Stress Response in Captive American Kestrel Juveniles. *Physiological Zoology*, **71**, 67-73.
- Jacobs, J.D. & Wingfield, J.C. (2000) Endocrine Control of Life-Cycle Stages: A Constraint on Response to the Environment? *The Condor*, **102**, 35-51.
- Jiang, C.L., Liu, L. & Tasker, J.G. (2014) Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Frontiers in Neuroendocrinology*, **35**, 72-75.
- Kenagy, G.J. & Place, N.J. (2000) Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: Effects of reproduction and capture and handling. *General and Comparative Endocrinology*, **117**, 189-199.
- Kim, M.Y., Eiby, Y.A., Lumbers, E.R., Wright, L.L., Gibson, K.J., Barnett, A.C. & Lingwood, B.E. (2014) Effects of Glucocorticoid Exposure on Growth and Structural Maturation of the Heart of the Preterm Piglet. *PLoS ONE*, **9**.
- Kitaysky, A.S., Kitaiskaia, E.V., Wingfield, J.C. & Piatt, J.F. (2001) Dietary restriction causes chronic elevation of corticosterone and enhances stress response in red-legged kittiwake chicks. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, **171**, 701-709.
- Kitaysky, A.S., Piatt, J.F., Wingfield, J.C. & Romano, M. (1999) The adrenocortical stress-response of Black-legged Kittiwake chicks in relation to dietary restrictions. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, **169**, 303-310.

- Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C. & Piatt, J.F. (2001) Corticosterone facilitates begging and affects resource allocation in the black-legged kittiwake. *Behavioral Ecology*, **12**, 619-625.
- Landys, M.M., Ramenofsky, M. & Wingfield, J.C. (2006) Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and Comparative Endocrinology*, **148**, 132-149.
- Lattin, C.R., Reed, J.M., DesRochers, D.W. & Romero, L.M. (2011) Elevated corticosterone in feathers correlates with corticosterone-induced decreased feather quality: a validation study. *Journal of Avian Biology*, **42**, 247-252.
- Lenth, R. (2013) lsmeans: Least-squares means. *R package version*, 1.06-05.
- Lodjak, J., Mägi, M. & Tilgar, V. (2014) Insulin-like growth factor 1 and growth rate in nestlings of a wild passerine bird. *Functional Ecology*, **28**, 159-166.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R. & Heim, C. (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, **10**, 434-445.
- Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V. & Efstratiadis, A. (2001) Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental Biology*, **229**, 141-162.
- Magee, S.E., Neff, B.D. & Knapp, R. (2006) Plasma levels of androgens and cortisol in relation to breeding behavior in parental male bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Hormones and Behavior*, **49**, 598-609.
- Martnez-Padilla, J., Mougeot, F., Garcia, J.T., Arroyo, B. & Bortolotti, G.R. (2013) Feather corticosterone levels and carotenoid-based coloration in common buzzard (*Buteo buteo*) nestlings. *Journal of Raptor Research*, **47**, 161-173.
- Mazziotti, G. & Giustina, A. (2013) Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion. *Nature Reviews Endocrinology*, **9**, 265-276.
- McEwen, B.S. & Wingfield, J.C. (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, **43**, 2-15.
- Meitern, R., Sild, E., Lind, M.A., Manniste, M., Sepp, T., Karu, U. & Horak, P. (2013) Effects of endotoxin and psychological stress on redox physiology, immunity and feather corticosterone in greenfinches. *PLoS ONE*, **8**.
- Mägi, M., Mänd, R., Tamm, H., Sisask, E., Kilgas, P. & Tilgar, V. (2009) Low reproductive success of great tits in the preferred habitat: A role of food availability. *Ecoscience*, **16**, 145-157.

- Mänd, R., Leivits, A., Leivits, M. & Rodenhouse, N.L. (2009) Provision of nestboxes raises the breeding density of Great Tits *Parus major* equally in coniferous and deciduous woodland. *Ibis*, **151**, 487-492.
- Mänd, R., Tilgar, V., Lõhmus, A. & Leivits, A. (2005) Providing nest boxes for hole-nesting birds - Does habitat matter? *Biodiversity and Conservation*, **14**, 1823-1840.
- Newton, I. (1998) *Population Limitation in Birds*. Academic Press, San Diego, CA.
- Ovejero, R., Novillo, A., Soto-Gamboa, M., Mosca-Torres, M.E., Cuello, P., Gregorio, P., Jahn, G. & Carmanchahi, P. (2013) Do cortisol and corticosterone play the same role in coping with stressors? Measuring glucocorticoid serum in free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*). *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology*, **319**, 539-547.
- Pravosudov, V.V. & Kitaysky, A.S. (2006) Effects of nutritional restrictions during post-hatching development on adrenocortical function in western scrub-jays (*Aphelocoma californica*). *General and Comparative Endocrinology*, **145**, 25-31.
- R Development Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roff, D.A. (1992) *Evolution of life histories: theory and analysis*. Springer.
- Romero, L.M. (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 249-255.
- Romero, L.M., Meister, C.J., Cyr, N.E., Kenagy, G.J. & Wingfield, J.C. (2008) Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **294**, 614-622.
- Romero, L.M. & Reed, J.M. (2005) Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **140**, 73-79.
- Romero, L.M., Soma, K.K. & Wingfield, J.C. (1998) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis changes allow seasonal modulation of corticosterone in a bird. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **274**, 1338-1344.
- Ross, R.J. & Buchanan, C.R. (1990) Growth hormone secretion: its regulation and the influence of nutritional factors. *Nutrition research reviews*, **3**, 143-162.
- Saether, B.E. (1994) Food provisioning in relation to reproductive strategy in altricial birds - a comparison of 2 hypotheses. *Evolution*, **48**, 1397-1406.
- Saino, N., Romano, M., Ferrari, R.P., Martinelli, R. & Moller, A.P. (2005) Stressed mothers lay eggs with high corticosterone levels which produce low-quality offspring. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology*, **303A**, 998-1006.

- Sanz, J.J. (2001) Experimentally increased insectivorous bird density results in a reduction of caterpillar density and leaf damage to Pyrenean oak. *Ecological Research*, **16**, 387-394.
- Sanz, J.J. & Tinbergen, J.M. (1999) Energy expenditure, nestling age, and brood size: an experimental study of parental behavior in the great tit *Parus major*. *Behavioral Ecology*, **10**, 598-606.
- Sapolsky, R.M. (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Experimental Gerontology*, **34**, 721-732.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. & Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, **21**, 55-89.
- Schmidt, K.L., Malisch, J.L., Breuner, C.W. & Soma, K.K. (2010) Corticosterone and cortisol binding sites in plasma, immune organs and brain of developing zebra finches: Intracellular and membrane-associated receptors. *Brain Behavior and Immunity*, **24**, 908-918.
- Schmidt, K.L. & Soma, K.K. (2008) Cortisol and corticosterone in the songbird immune and nervous systems: local vs. systemic levels during development. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **295**, 103-110.
- Schoech, S.J., Rensel, M.A. & Heiss, R.S. (2011) Short- and long-term effects of developmental corticosterone exposure on avian physiology, behavioral phenotype, cognition, and fitness: A review. *Current Zoology*, **57**, 514-530.
- Schoech, S.J., Romero, L.M., Moore, I.T. & Bonier, F. (2013) Constraints, concerns and considerations about the necessity of estimating free glucocorticoid concentrations for field endocrine studies. *Functional Ecology*, **27**, 1100-1106.
- Schultner, J., Kitaysky, A.S., Welcker, J. & Hatch, S. (2013) Fat or lean: adjustment of endogenous energy stores to predictable and unpredictable changes in allostatic load. *Functional Ecology*, **27**, 45-55.
- Spencer, K.A., Buchanan, K.L., Goldsmith, A.R. & Catchpole, C.K. (2003) Song as an honest signal of developmental stress in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Hormones and Behavior*, **44**, 132-139.
- Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. OUP, Oxford.

- Stratikopoulos, E., Szabolcs, M., Dragatsis, I., Klinakis, A. & Efstratiadis, A. (2008) The hormonal action of IGF1 in postnatal mouse growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 19378-19383.
- Tilgar, V., Mänd, R. & Leivits, A. (1999) Effect of calcium availability and habitat quality on reproduction in Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* and Great Tit *Parus major*. *Journal of Avian Biology*, **30**, 383-391.
- Tinbergen, J.M. (1987) Costs of reproduction in the great tit - intraseasonal costs associated with brood size. *Ardea*, **75**, 111-122.
- Wada, H. (2008) Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, **156**, 441-453.
- Wada, H. & Breuner, C.W. (2008) Transient elevation of corticosterone alters begging behavior and growth of white-crowned sparrow nestlings. *Journal of Experimental Biology*, **211**, 1696-1703.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Uku Rooni

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Sule kortikosteron ja poegade kasvukiirus: pesakonna suuruse manipulatsioon rasvatihasel (*Parus major*)“,

mille juhendaja on Jaanis Lodjak,

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, 26.05.2014