



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Metallialtistuksen hormeettinen vaikutus lintujen oksidatiiviseen stressiin

Oona Poranen

Ekologia ja evoluutiobiologia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

Ohjaajat:

Tapio Eeva

Miia Rainio

17.6.2022

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Biologia

Tekijä: Oona Poranen

Otsikko: Metallialtistuksen hormeettinen vaikutus lintujen oksidatiiviseen stressiin

Ohjaajat: Tapio Eeva, Miia Rainio

Sivumäärä: 36 sivua + liitteet 1 sivu

Päivämäärä: 17.6.2022

Metallien määrä ympäristössä on lisääntynyt merkittävästi ihmistoiminnan myötä. Monet metallit ovat eliöille myrkyllisiä, koska ne lisäävät vapaiden happiradikaalien tuotantoa soluissa ja vahingoittavat elimistön antioksidanttipuolustusta. Tämä voi johtaa oksidatiiviseen stressiin ja vaurioihin kudoksissa ja solurakenteissa. Antioksidanttientsyymit valmistuvat soluissa ja muuntavat vapaita happiradikaaleja vaarattomaan muotoon. Niiden aktiivisuutta voidaan käyttää oksidatiivisen stressin biomarkkerina tutkittaessa metallisaastuneisuuden vaikutuksia eliöihin. Myrkyllisillä metalleilla voi olla pieninä pitoisuuksina myös hyödyllisiä vaikutuksia, mikäli ne stimuloivat antioksidanttipuolustusta parantaen yksilön kelpoisuutta ja stressinsietokykyä. Tämä on esimerkki hormoneista. Hormeesi on kaksivaiheinen prosessi, jossa pienellä annoksella on elion fysiologialle stimuloivia tai suotuisia ja korkealla annoksella ehkäiseviä tai myrkyllisiä vaikutuksia.

Tässä työssä tutkin onko metalleilla hormeettista vaikutusta kirjosiepon (*Ficedula hypoleuca*) ja talitiaisen (*Parus major*) poikasten oksidatiivisen stressin biomarkkereihin. Aineisto on kerätty Harjavallan metallisulaton ympäristöstä ja Turun Ruissalosta vuosina 2004–2015 ($n = 799$ poikasta). Biomarkkereina ovat verestä määritetyt antioksidanttientsyymit glutationiperoksidaasi (GP), katalaasi (CAT) ja superoksididismutaasi (SOD), ja niiden aktiivisuutta selittävinä muuttujina lintujen ulosteesta mitatut arseenin (As), kadmiumin (Cd) kuparin (Cu), nikkelin (Ni) ja lyijyn (Pb) pitoisuudet sekä poikasten paino ja poikuekoko. Sovitin aineistoon yleistetyn lineaarisen sekamallin, jonka avulla tarkastelin metallien yhteisvaikutusta kuhunkin antioksidanttientsyymiin yksitellen ja kummallekin lajille erikseen.

Tulosten perusteella ympäristön metallipitoisuudella on hormeettinen vaikutus talitiaisen poikasten GP-aktiivisuuteen: alhainen metallipitoisuus aktivoi GP:tä, mutta kasvavassa metallipitoisuudessa GP-aktiivisuus vähenee. Samanlainen vaste näkyy kirjosiepon SOD-aktiivisuudessa. Saamani tulokset viittaavat siis siihen, että ympäristön metallipitoisuudella on hormeettinen vaikutus antioksidanttientsyymiaktiivisuuksiin ja mahdollisesti lintujen oksidatiivisen stressin tasoon. Tutkimusta olisi hyvä jatkaa mittaamalla entsyymiaktiivisuuksien lisäksi mm. oksidatiivisesta stressistä aiheutuneita solu- ja kudosaivuriota, jolloin olisi mahdollista saada parempi käsitys lintujen metalliensietokyvystä.

Avainsanat: antioksidanttientsyymi, biomarkkeri, *Ficedula hypoleuca*, hormoneesi, linnut, metallit, oksidatiivinen stressi, *Parus major*

Master's thesis

Subject: Biology

Author: Oona Poranen

Title: Hormetic effects of metal exposure on oxidative stress in birds

Supervisors: Tapio Eeva, Miia Rainio

Number of pages: 37 pages

Date: 17.6.2022

Human activity has significantly increased the amount of toxic heavy metals in the environment. Heavy metals are toxic for the living organisms, mostly because they intensify the production of reactive oxygen species (ROS) and disturb the antioxidant defence system. If the production of ROS is increased above normal level and cannot be handled by antioxidant defence, it can lead to oxidative stress and cellular damage. Since antioxidant enzymes detoxify harmful compounds, they can be used as biomarkers of oxidative status of organisms in metal polluted areas. However, in low doses these same metals can play important roles by stimulating antioxidant defence and therefore improve the fitness and stress tolerance of individuals. This is an example of phenomenon called hormesis defined as a biphasic dose response where only a high dose leads to toxic or inhibitory response whereas a low dose causes beneficial or stimulatory response.

In this study, I examined whether there is a hormetic effect of metal exposure on oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) and great tit (*Parus major*) nestlings. The study was conducted in Harjavalta, close to a metal smelter complex and in Turku (Ruissalo) in 2004–2015 ($n = 799$ nestlings). Three antioxidant enzymes measured from the blood of the nestlings represent oxidative stress biomarkers: glutathione peroxidase (GP), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Concentrations of five metals common in Harjavalta, arsenic (As), cadmium (Cd), copper (Cu), nickel (Ni) and lead (Pb), were determined from nestlings' faeces. To find out how metals link to antioxidant enzymes, a linear mixed model was built separately for both species with antioxidant enzymes as response variables and metals, brood size and body mass of the nestlings as explanatory variables.

The results suggest that there is an association between metal exposure and antioxidant defence. In great tit nestlings a low exposure increases GP activity but in a higher exposure GP activity decreases. The same response takes place in SOD activity of pied flycatcher nestlings. Thus, environmental metal exposure may have hormetic effects on antioxidant enzymes as biomarkers of oxidative stress. To validate or reject these assumptions further and to gain a better overall picture of the role of hormesis in metal tolerance of birds, actual oxidative damages (e. g. lipid peroxidation) in tissues and cells should be studied more.

Key words: antioxidant enzymes, biomarkers, birds, *Ficedula hypoleuca*, heavy metal, hormesis, oxidative stress, *Parus major*

SISÄLLYS

1.	JOHDANTO	1
1.1	<i>Metallit ympäristömyrkkynä</i>	1
1.2	<i>Oksidatiivinen stressi ja antioksidanttipuolustus</i>	4
1.3	<i>Hormeesi</i>	7
1.4	<i>Tutkimuskysymykset</i>	9
2.	AINEISTO JA MENETELMÄT	10
2.1	<i>Tutkimusalue</i>	10
2.2	<i>Tutkimuslajit</i>	11
2.3	<i>Aineiston keruu</i>	12
2.4	<i>Tilastollinen analyysi</i>	16
3.	TULOKSET	18
4.	TULOSTEN TARKASTELU	23
5.	JOHTOPÄÄTÖKSET	27
6.	KIITOKSET	28
	LÄHTEET.....	29
	LIITEET	

1. JOHDANTO

Metallien määrä ympäristössä on lisääntynyt merkittävästi ihmistoiminnan, kuten metalli-, kaivos-, ja kemianteollisuuden, liikenteen sekä fossiilisten polttoaineiden käytön myötä (Walker ym. 2012). Vaikka metallipäästöt ovat viime vuosikymmeninä olleet monin paikoin laskussa ja ovat Suomessa yleisesti ottaen alhaisia, esiintyy korkeita metallipitoisuuksia edelleen paikallisesti (Poikolainen ym. 2004). Metallipäästöt päätyvät ilmasta kuiva- ja märkälaskeumana maaperään ja vesistöihin, edelleen kasveihin ja selkärangattomiin ja lopulta niitä ravintona käyttäviin petoihin (Eeva & Lehikoinen 1996; Méndez-Rodríguez & Alvarez-Castañeda 2016; Ruiz ym. 2019). Vaikka jotkin metallit, esimerkiksi sinkki ja kupari, ovat eliöille välttämättömiä hivenaineita, on osa metalleista, kuten arseeni, kadmium ja lyijy, yleensä jo hyvin pieninä pitoisuuksina myrkyllisiä (Scheuhammer 1987; Valko ym. 2005). Myrkyvaikutukset johtuvat ennen kaikkea metallien taipumuksesta lisätä vapaiden happiradikaalien tuotantoa soluissa ja vahingoittaa elimistön antioksidanttipuolustusta. Tämä voi johtaa oksidatiiviseen stressiin ja edelleen oksidatiiviseen vaurioon kudoksissa ja solurakenteissa (Halliwell & Gutteridge 2007). Hyvin pieninä pitoisuuksina myrkyllisillä metalleilla voi olla hyödyllisiäkin vaikutuksia, mikäli ne stimuloivat antioksidanttipuolustusta, parantavat eliön kelpoisuutta ja lisäävät stressinsietokykyä. Tällaista stressitekijän aiheuttamaa kaksivaiheista ilmiötä, jossa pienellä altistumisella on suotuisia ja vasta korkealla annoksella myrkyllisiä vaikutuksia, kutsutaan hormeesiksi (Calabrese ym. 2007; Mattson 2008).

1.1 Metallit ympäristömyrkyinä

Ympäristön metallipitoisuudet ovat Suomessa muiden Pohjoismaiden, Baltian ja Skotlannin ohella Euroopan alhaisimpia tiukan lainsäädännön ja kehittyneen teknologian vuoksi. Sammaleista mitatut metallipitoisuudet ovat laskeneet Suomessa vuodesta 1985 lähtien, mutta paikoitellen, kuten Satakunnassa sijaitsevan Harjavallan metallisulaton lähellä, pitoisuudet ovat edelleen muuta Suomea selvästi korkeammat. Esimerkiksi vuosina 1985–1990 sammalten kuparipitoisuus oli koko Suomessa keskimäärin alle 5,0 µg/g, mutta Harjavallassa kuparipitoisuuden keskiarvo oli 30 µg/g maksimin ollessa yli 200 µg/g (Poikolainen ym. 2004). Harjavallan teollisuusalueen pitkä historian vuoksi – alueella jo vuodesta 1944 lähtien – metalleja on ehtinyt kertyä maaperään, josta niitä päätyy edelleen ravintoverkon eri trofiatasoille.

Osalla metalleista, kuten arseenilla (As), kadmiumilla (Cd), kromilla (Cr), kuparilla (Cu), lyijyllä (Pb), elohopealla (Hg), nikkelillä (Ni) ja sinkillä (Zn) tiedetään olevan myrkyllisiä vaikutuksia eliöihin. Usein näistä metalleista puhutaan raskasmetalleina, joka on epävirallinen ja epätarkka nimitys sellaisille metalleille, joilla on suuri tiheys (yli 5 g/cm^3), massa ja järjestysluku (Duffus 2002). Ekotoksikologiassa käsite on vakiintunut tarkoittamaan ympäristölle haitallisten metallien, mutta myös tiettyjen puolimetallien ja epämetallien joukkoa. Koska käsite on harhaanjohtava – esimerkiksi arseeni on puolimetalli – olisi sen käyttöä tieteellisessä kirjallisuudessa perusteltua välttää. Pourret ja Hursthouse (2019) ehdottavat, että tilalla käytettäisiin termiä ”*Potentially Toxic Elements*” (PTEs). Tässä tutkielmassa käytän termiä ”metallit” tarkoittaessani tutkimuksessa mukana olevia myrkyllisiä metalleja tai puolimetalleja: kadmiumia, kuparia, nikkeliä, lyijyä ja arseenia.

Metallien myrkyllisyys perustuu niiden reaktiivisuuteen eli kykyyn muodostaa sidoksia muiden yhdisteiden, kuten proteiinien ja DNA:n kanssa (Valko ym. 2005). Metallit voivat myös lisätä vapaiden happiradikaalien määrää kiihdyttämällä happiradikaalien tuotantoa tai vahingoittamalla elimistön puolustuksesta huolehtivia antioksidantteja ja antioksidanttientsyymejä (Ercal ym. 2001; Pinto ym. 2003; Koivula & Eeva 2010). Toimintansa mukaan metallit voidaan jakaa redox-aktiivisiin ja redox-inaktiivisiin metalleihin. Redox-aktiiviset metallit, esimerkiksi kupari ja rauta, katalysoivat Fentonin reaktiota, jossa happiradikaaleja muodostuu. Redox-inaktiiviset metallit, kuten lyijy, kadmium, elohopea ja arseeni puolestaan kuluttavat antioksidantteja, esimerkiksi sitoutumalla glutationin tioliiryhmään, tai inaktivoivat antioksidanttientsyymejä kiinnittymällä niiden aktiiviseen kohtaan. Nikkelillä on molempien ryhmien ominaisuuksia, sillä se sekä osallistuu Fentonin reaktioon että kykenee sitoutumaan glutationiin (Stohs & Bagchi 1995; Ercal ym. 2001; Valko ym. 2005; Rana 2008; Jozefczak ym. 2012; Valko ym. 2016).

Arseeni (As) on myrkyllinen ja karsinogeeninen puolimetalli, jota esiintyy maa- ja kallioperässä sekä pohjavedessä. Arseenin, kuten myös muiden myrkyllisten metallien pääasiallisia päästölähteitä ovat metalli- ja kaivosteollisuus sekä fossiilisten polttoaineiden poltto. Lisäksi arseenia käytetään kasvi- ja hyönteistorjunnassa (Loukola-Ruskeeniemi & Lahermo 2004). Toistuva altistus pienillekin arseenimäärille on eliöille haitallista. Talitiaisen (*Parus major*) poikasten selviytymistodennäköisyyttä riittää heikentämään vain $0,2 \mu\text{g}$ annos epäorgaanista natriumarseniittia painogrammaa ja vuorokautta kohden (Sánchez-Virosta ym. 2018). Toisaalta tutkittaessa ihmisalkion keuhkojen sidekudosta on havaittu, että natriumarseniitti saattaa hyvin pieninä pitoisuuksina ehkäistä syövän syntyä

ja vähentää happiradikaalien muodostumista (Yang ym. 2007). Orgaanista arseenia käytetään yhtenä ainesosana siipikarjan kasvua lisäävässä roksarsoni-yhdisteessä (Hileman 2007).

Lyijyn (Pb) päästölähteitä ovat teollisuuden ja energiantuotannon lisäksi liikenne ja metsästy. Lyijy häiritsee hermoston, verenmuodostuksen, maksan ja erityselimistön toimintaa, ja myrkyllisyyttä lisää sen taipumus kertyä ravintoketjussa (Flora ym. 2012). Lyijy säilyy maaperässä pitkään, joten se on uhka ympäristölle vuosikymmeniä vapautumisensa jälkeen (Berglund ym. 2009). Pohjois-Ruotsissa kirjosiieppojen (*Ficedula hypoleuca*) ulosteista löydettiin suuria lyijypitoisuuksia, $23 \pm 27 \mu\text{g/g}$, vielä viisi vuotta lyijykaivos-toiminnan loppumisen jälkeen (Berglund ym. 2010). Talitiaisilla vain $1 \mu\text{g}$ lyijyä poikaisen painogrammaa kohti riitti häiritsemään niiden vitamiiniaineenvaihduntaa (Ruiz ym. 2016). Silti lyijyllä on havaittu olevan myös hormeettisia vaikutuksia. Nain ja Smiths (2011) altistivat tarhattuja japaninviiriäisiä (*Coturnix coturnix japonica*) lyijyä sisältävälle juomavedelle. Kokeen altistustasot, $5 \mu\text{g/g}$ ja $50 \mu\text{g/g}$, eivät aiheuttaneet immunotoksikologisia vaikutuksia, vaan sen sijaan ne alensivat lintujen kuolleisuutta ja paransivat selviytymistodennäköisyyttä kontrolliryhmään verrattuna.

Karsinogeeninen kadmium (Cd) kerääntyy luustoon ja sisäelimiin, erityisesti munuaisiin, maksaan ja kiveksiin (Scheuhammer 1987). Myrkkyyvaikutuksia esiintyy jo suhteellisen alhaisissa pitoisuuksissa, sillä esimerkiksi huuhkajalla (*Bubo bubo*) veren kadmiumpitoisuuden ollessa yli $0,3 \mu\text{g/dl}$, estyi kahden tutkitun antioksidanttientsyymin, katalaasin (CAT) ja glutationiperoksidaasin (GP), toiminta (Espín ym. 2014a). Rotilla glutationin (GSH) pitoisuus sekä superoksididismutaasin (SOD) ja glutationi-S-transferaasin (GST) aktiivisuuden on havaittu pienenevän kadmiumin vaikutuksista altistustason ollessa 2 mg kadmiumkloridia (CdCl_2) painokiloa kohden. Lisäksi kadmium aiheutti rotilla oksidatiivisesta vauriosta kertovaa lipidien peroksidaatiota, eli hapettumista, aivokudoksessa ja kiveksissä sekä kolmen että kuuden viikon altistumisen jälkeen (El-Missiry & Shalaby 2000).

Kupari (Cu) on pieninä pitoisuuksina eliöille välttämätön hivenaine. Kuparia tarvitaan kymmenien proteiinien, kuten superoksididismutaasin (SOD) toimintaan (El Kazaz & Hafez Hafez 2019), mutta korkeina pitoisuuksina se aiheuttaa esimerkiksi vaurioita maksaan ja lisää vapaiden happiradikaalien määrää (Krumnschnabel ym. 2005). Myös nikkelin (Ni) on todettu olevan välttämätön hivenaine ainakin bakteereille, arkeoneille, leville,

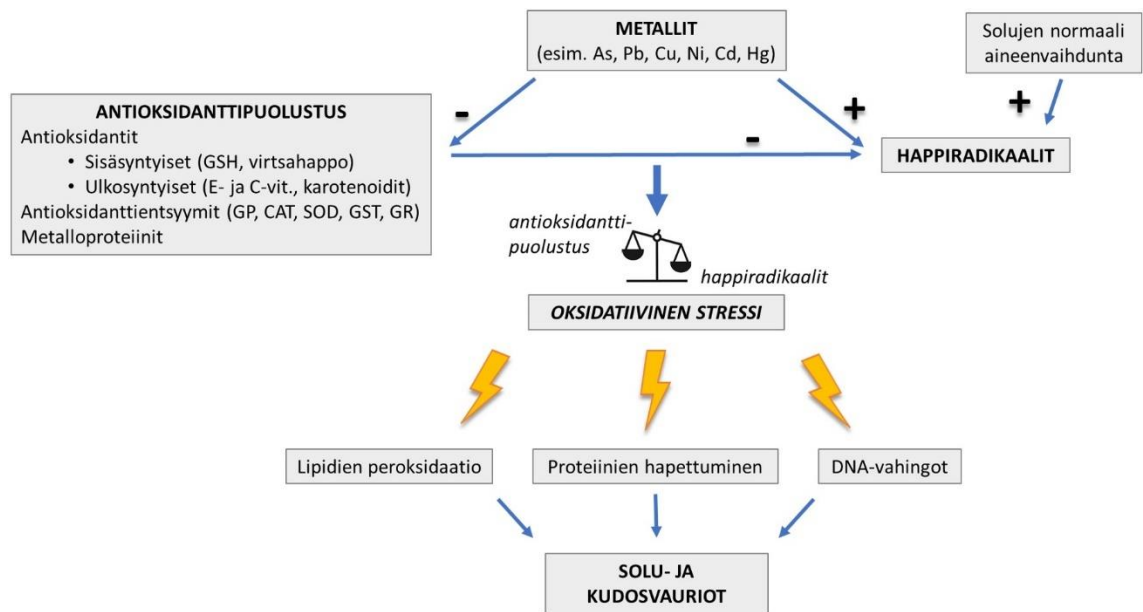
kasveille ja muutamille eläimille, kuten rotille ja kanoille (Rana 2008; Song ym. 2017). Korkeat nikkelpitoisuudet johtavat kuitenkin hermostollisiin-, geneettisiin-, immunologisiin- tai maksan vaurioihin (Das ym. 2008).

Metallisaastumisen vaikutuksia on tutkittu linnuilla kattavasti. Tutkimuksia on tehty esimerkiksi vesilinnuista (Hoffman 2002; Harding 2008), merilinnuista (Espín ym. 2016b; Laranjeiro ym. 2020), petolinnuista (Espín ym. 2014b; Descalzo ym. 2021) ja pienistä varpuslinnuista (Belskii ym. 2005; Isaksson ym. 2009; Berglund ym. 2010; Rainio ym. 2013). Lintujen käyttö metallisaastuneisuuden bioindikaattoreina on yleistä useasta syystä. Ensinnäkin kesäisin monet lintulajit ruokailevat pienellä alueella pesänsä lähistöllä ja altistuvat metalleille pääasiassa ravintonsa kautta. Jonkin verran altistumista tapahtuu myös juomaveden, hengitysilman ja höyhenpuvun sukimisen myötä (Dauwe ym. 2004; Sanderfoot & Holloway 2017). Toiseksi linnuilta on helppo kerätä näytteitä niitä vahingoittamatta (munat, höyhenet ja uloste). Kolmanneksi linnut ovat kokoonsa nähden pitkäikäisiä, mikä mahdollistaa aikasarjan keräämisen (Dauwe ym. 2004). Neljänneksi useat lintulajit pesivät ihmisen tekemissä pöntöissä, jolloin niitä on helppo tarkkailla ja mitata (Cramp and Perrins 1993; Sánchez-Virosta ym. 2018).

Linnuilla ympäristön korkeiden metallipitoisuuksien on raportoitu mm. heikentävän poikasten kasvua ja selviytymistodennäköisyyttä, häiritsevän luuston mineralisaatiota, huonontavan lisääntymismenestystä ja poikastuottoa, aiheuttavan geneettisiä muutoksia, haalistavan höyhenpuvun väritystä, huonontavan saatavilla olevan ravinnon laatua, pienentävän lintujen populaatiotiheyttä ja lajidiversiteettiä sekä lisäävän oksidatiivista stressiä (Eeva ym. 2003; Eeva ym. 2006; Eeva ym. 2008; Gangoso ym. 2009; Koivula ym. 2011; Eeva ym. 2012; Rainio ym. 2013; Berglund ym. 2014; Sánchez-Virosta ym. 2018; Pacyna ym. 2018; Sánchez-Virosta ym. 2020).

1.2 Oksidatiivinen stressi ja antioksidanttipuolustus

Oksidatiivinen stressi on biokemiallinen solunsisäinen tila, jossa antioksidanttipuolustuksen ja vapaiden happiradikaalien välillä vallitsee epätasapaino jälkimmäisten hyväksi (Kuva 1). Tämä voi johtaa oksidatiiviseen vaurioon solun rakenteissa (Sies 1993; Finkel & Holbrook 2000). Vapaat happiradikaalit ovat solujen normaalissa toiminnassa, kuten soluhengityksessä, fotosynteesissä ja biotransformaatioissa muodostuvia happiyhdisteitä (Finkel & Holbrook 2000). Vapaiden happiradikaalien muodostuminen kiihtyy lisäänty-



Kuva 1. Oksidatiivisen stressin mekanismi. Myrkylliset metallit lisäävät vapaiden happiradikaalien tuotantoa ja heikentävät elimistön antioksidanttipuolustusta. Kun happiradikaalien määrä elimistössä on suurempi kuin antioksidanttipuolustuksen kyky ehkäistä niiden aiheuttamaa vauriota, on seurauksena oksidatiivinen stressi. Tämä voi johtaa solu- ja kudonvaurioihin (kuva ideoitu Rainion (2013) ja Sánchez-Virostan (2019) väitöskirjojen kuvien pohjalta).

neen metabolisen aktiivisuuden aikana, kuten alkioiden ja poikasten nopeassa kasvussa, fyysisessä aktiivisuudessa, korkeassa lämpötilassa ja eläimen siirtyessä horroksesta valvetilaan, sekä joidenkin ympäristömyrkyjen vaikutuksesta (Costantini 2013). Happiradikaaleihin kuuluvat esimerkiksi superoksidiradikaali $O_2^{\cdot-}$, hydroksyyli-radikaali $\cdot OH$ ja typpioksidi NO (Valko ym. 2005). Pieni määrä happiradikaaleja on tärkeässä roolissa soluviestinnässä (Dröge 2002), mutta suurina määrinä ne voivat häiritä fysiologisia prosesseja sekä vahingoittaa kudoksia, DNA:ta ja solujen proteiini- ja lipidirakenteita (Halliwell & Gutteridge 2007).

Antioksidantit ja antioksidanttientsyymit ovat molekyyliä, jotka estävät tai ehkäisevät happiradikaalien aiheuttamaa oksidatiivista stressiä (Halliwell & Gutteridge 2007). Antioksidanteja saadaan esimerkiksi ravinnosta (karotenoidit, vitamiinit ja flavonoidit) tai solujen itse valmistamina (glutathioni eli GSH ja virtsahappo) (Sies 1993). Antioksidanteista tärkein on glutathioni sen nopean metalliensitomiskyvyn vuoksi. Se on löydetty lähes kaikilta tutkituilta eliölajeilta (Swiergosz-Kowalewska ym. 2006). Antioksidanttientsyymit valmistuvat soluissa ja toimivat katalyytteinä monissa tärkeissä antioksidatiivisissa reaktioissa muuntaen vapaita happiradikaaleja vaarattomaan muotoon. Tärkeimmät antioksidanttientsyymit ovat glutathioniperoksidaasi (GP), glutathionireduktaasi (GR), glutathioni-S-transferaasi (GST), katalaasi (CAT) ja superoksididismutaasi (SOD). SOD muut-

taa superoksidianionin vetyperoksidiksi ja CAT vetyperoksidin edelleen hapeksi ja vedeksi. GP katalysoi glutationin pelkistyneen muodon (GSH) hapettamista kahden glutatationin muodostamaksi glutationidisulfidiksi (GSSG). Samalla vetyperoksidi hajoaa vedeksi. GR pelkistää GSSG:n takaisin aktiiviseen GSH-muotoon. Biotransformaatioentsyymi GST katalysoi glutationin ja muiden yhdisteiden välisiä reaktioita (Pinto ym. 2003; Halliwell & Gutteridge 2007; Rainio 2013).

Antioksidanttipuolustus toimii eri lajeilla eri tavalla ja jopa läheiset lajit, kuten talitiainen ja sinitiaainen (*Cyanistes caeruleus*), eroavat toisistaan tavassaan eliminoida happiradikaaleja (Rainio 2013; Berglund ym. 2014). Koska antioksidanttiensyymien päätehtävä on katalysoida happiradikaalien hajoamista, voi tehostunut antioksidanttipuolustus kertoa lisääntyneestä happiradikaalien määrästä. Entsyymiaktiivisuutta voidaankin käyttää oksidatiivisen stressin biomarkkerina tutkittaessa esimerkiksi ympäristön saastuneisuuden vaikutuksia eliöihin (Pinto ym. 2003; Koivula & Eeva 2010). Muita yleisesti käytettyjä oksidatiivisen stressin biomarkkereita ovat antioksidantit (glutationi ja virtsahappo), metalli-ioneita sitovat proteiinit eli metallotioniinit (Koivula & Eeva 2010), kudsvauriot, kuten proteiinikarbonylaatio ja lipidien peroksidaatio (Isaksson ym. 2009; Rainio ym. 2015; Espín ym. 2020) sekä veriseerumista mitattavat reaktiiviset aineenvaihduntatuotteet (*reactive oxygen metabolites*) ja -antioksidantit (*serum reactive antioxidant barrier*) (Costantini & Dell’Omo 2006; Stier ym. 2012). Myös todellista happiradikaalien määrää voidaan mitata, mutta happiradikaalien nopean puoliintumisajan takia se on hankalaa (Halliwell & Gutteridge 2007).

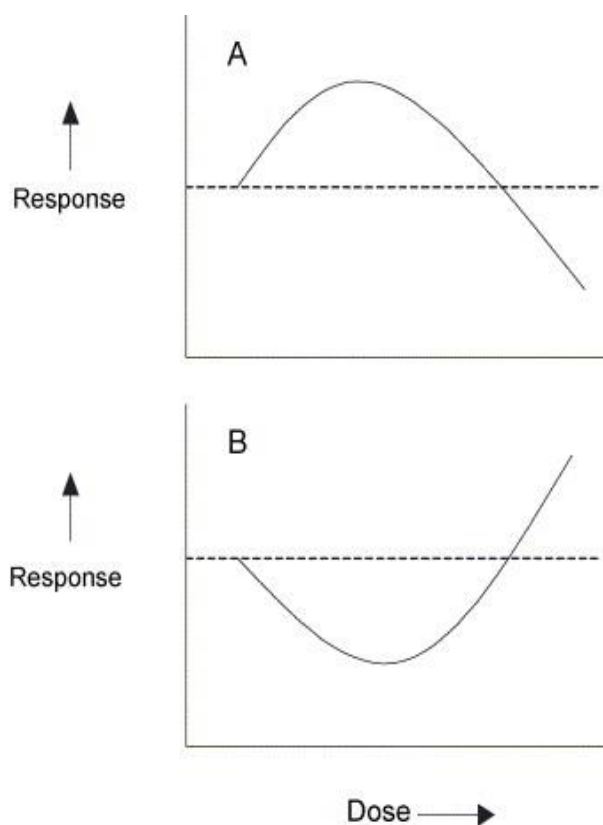
Metallien on tutkittu vaikuttavan antioksidanttiensyymien aktiivisuuksiin muun muassa siten, että oksidatiivisessa stressissä veren antioksidanttiensyymien määrä on normaali-tilannetta korkeampi ja pelkistyneen ja hapettuneen glutationin suhde (GSH:GSSG) matalampi (Isaksson ym. 2005; Rainio ym. 2013; Espín ym. 2017; Ruiz ym. 2019). Esimerkiksi Pohjois-Ruotsin metallisaastuneella alueella CAT- ja GR-aktiivisuudet ovat olleet kirjosiepolla selvästi kohonneita (Berglund ym. 2007). Toisaalta hyvin suuri annos tiettyä stressitekijää ja suuri happiradikaalien määrä voivat vahingoittaa antioksidanttiensyymejä tai niihin liittyvää geenitoimintaa, jolloin tehostumisen sijaan entsyymiaktiivisuus laskee. Costantinin ja Verhulstin (2009) mukaan antioksidanttien tai antioksidanttiensyymien määrä ei sellaisenaan riitäkään kertomaan eliön oksidatiivisen stressin tasosta, vaan samanaikaisesti tulisi aina tutkia myös todellisia oksidatiivisia vaurioita. Lisäksi on huomioitava, että ympäristön metallipitoisuus voi vaikuttaa oksidatiiviseen stressiin

myös välillisesti, sillä saastumattomassa ympäristössä linnuilla on enemmän ravintoa ja se on parempilaatuista, minkä seurauksena niiden kunto on hyvä, antioksidanttipuolustus toimiva ja oksidatiivisen stressin taso alhainen (Koivula ym. 2011).

1.3 Hormeesi

Elimistön toimintaa häiritsevien stressitekijöiden vaikutus ei ole aina suorassa suhteessa niiden pitoisuuteen. Hormeesiteorian mukaan erilaiset kemialliset (esim. metallit), biotiset (esim. saalistus, kilpailu) ja fysikaaliset tekijät (esim. lämpötila, ilman happipitoisuus) voivat pieninä määrinä vaikuttaa eliöiden fysiologiaan päinvastaisesti kuin erittäin suurina määrinä. Altistuminen pienelle määrälle haitallista stressitekijää saa aikaan epätasapainoa korjaavan adaptiiviseen vasteen, joka aktivoi solujen puolustusmekanismeja, kuten antioksidanttientsyymien tuotantoa suojellen soluja ja parantaen eliön toimintakykyä (Calabrese & Blain 2005). Hormeesi on kaksivaiheinen prosessi, jossa alhainen annos aiheuttaa eliön fysiologialle stimuloivia tai suotuisia ja korkea annos ehkäiseviä tai myrkyllisiä vaikutuksia (Mattson 2008). Annoksen vaikutus vasteeseen näkyy U:n tai J:n tai ylösalaisen U:n tai J:n muotoisena käyränä (Kuva 2).

Hormeesista on raportoitu sadoissa tutkimuksissa eri lajeilla aina pienistä selkärangattomista suuriin nisäkkäisiin (kootusti mm. Calabrese 2005 ja Berry & López-Martínez 2020). Metalleilla on havaittu olevan hormeettista vaikutusta mm. sukkulamatoihin (As – Schmeisser ym. 2013), sammakoihin (Cd – James & Little 2003; Gross ym. 2007), viherleviin (Pb, Al (alumiini) Saçan ym. 2007), etanoihin (Pb, Zn, Cd – Lefcort ym. 2008), simpukoihin (Hg, Zn – Gould ym. 1989) kärpäsiin (Cd – Nascarella ym. 2003), hiiriin (Cd – Thijssen ym. 2007), nisäkäsoluihin (Schmidt ym. 2004), kasveihin (Calabrese & Blain 2009) sekä kasvien bakteereihin ja sieniin (Morkunas ym. 2018). Vaikutus on havaittu tutkituissa lajeissa esimerkiksi parantuneena immunitettina, tehostuneena aineenvaihduntana tai lisääntyneenä kasvuna ja jälkeläistuottona. Esimerkiksi Harding (2008) tutki hiilikaivoksilta huuhtoutuvan seleenin vaikutuksia punaolkaturpiaalin (*Agelaius phoeniceus*) munintaan. Pieni määrä seleeniä tehosti munintaa ja poikasten kuoriutumista, kun taas sekä korkea että hyvin matala seleenialtistus heikensivät kuoriutumisen onnistumista. Tuloksissa poikasten kuoriutuneisuus suhteessa ympäristön seleenipitoisuuteen näkyi hormeesin tavoin ylösalaisen U:n muotoisena vasteena.



Kuva 2. A) Hormeesin osoittava vastekäyrä on ylösalaisen U:n mallinen, kun alhaisella altistumisella stressitekijälle on stimuloivia ja korkealla altistumisella estäviä vaikutuksia esimerkiksi kasvuun, hedelmällisyyteen tai pitkäikäisyyteen. B) Hormeesin osoittava vastekäyrä on U:n mallinen, kun alhaisella altistumisella on vähentäviä ja korkealla altistumisella lisääviä vaikutuksia esimerkiksi karsinogeneesiin, mutageneesiin tai tautien esiintyvyyteen (Calabrese 2005).

Useat tutkimukset osoittavat, että hormoneesi voidaan kytkeä myös oksidatiivisen stressin tasoon (Yang ym. 2007; Zhang ym. 2009). Esimerkiksi sukkulamadoilla (*Caenorhabditis elegans*) alhainen arseenialtistus kiihdytti vapaiden happiradikaalien tuotantoa, mikä puolestaan aktivoi antioksidanttipuolustuksen ja edelleen pidensi matojen elinikää (Schmeisser ym. 2013). Tunkiolieroilla (*Eisenia fetida*) alhainen kadmiumpitoisuus lisäsi CAT- ja SOD-aktiivisuutta, mutta korkea pitoisuus inaktivoi entsyymejä (Zhang ym. 2009). Losdatin ym. tutkimuksessa (2018) talitiaisen poikasia altistettiin 11 päivän iässä parakvattirikkasvimyrylle tarkoituksena lisätä lintujen oksidatiivista stressiä. Kun vuodenikäisiä tiaisia jälleen tutkittiin, havaittiin myryllylle altistetuilla linnuilla oksidatiivisten vaurioiden tason (lipidien peroksidaation) olevan alhaisempi ja höyhenpuvun kirkkaampi kuin kontrolliryhmän linnuilla. Tässä tapauksessa hormoneesi ilmeni poikasten kokeman stressin tuomana suotuisana vaikutuksena aikuisiän selviytymiseen eli niin kutsuttuna pohjavaiikutuksena (*priming effect* tai *conditioning effect*, Calabrese ym. 2007; Costantini ym. 2010). Myös rikkakasvimyrykky dikvattibromidin on tutkittu johtavan aikuisilla koiras

seeprapeipoilla (*Taeniopygia guttata*) tummempaan höyhenpukuun ja parantuneeseen antioksidanttitasoon (Rodríguez-Martínez & Galván 2020). Galván ym. (2014) puolestaan havaitsi tutkiessaan useita lintulajeja eri etäisyyksillä Tšernobylistä, että alueen linnut olivat sopeutuneet radioaktiiviseen säteilyyn: lintujen glutationin määrä lisääntyi ja kunto parani, mutta oksidatiivinen stressi ja DNA:n vauriot vähenivät säteilytason kasvaessa. Adaptiivista vastetta on löydetty myös kaupunkiympäristössä eläviltä mustarastailta (*Turdus merula*), joilla krooninen lyijyaltistus pidensi elinikää ja paransi selviytymistodennäköisyyttä, mutta toisaalta heikensi lisääntymismenestystä (Fritsch ym. 2019). Huomioitava kuitenkin on, että edellä mainitut seeprapeippon, Tšernobylin lintujen ja mustarastaiden tutkimukset olivat ei-kokeellisia, eli saatuihin tuloksiin ovat voineet vaikuttaa muutkin tutkimusalueiden ympäristötekijät.

Vaikka hormoneista on runsaasti todisteita, tunnetaan se tiedemaailmassa edelleen huonosti ja sitä harvoin tutkitaan systemaattisesti – hormoneesi paljastuu tutkijalle pikemmin odottamattomien tulosten seurauksena (Calabrese & Baldwin 2002). Tutkijat eivät välttämättä tunnista ilmiötä, vaan käsittelevät julkaisuissaan epälineaarisia (*nonlinear*) tai kaksivaiheisia (*biphasic*) vasteita, tai tulkitsevat hormonein pelkäksi aineiston taustahälyksi. Ongelmia aiheuttaa myös se, että ekotoksikologian koeasetelmissä eri annoksia on tyypillisesti vain muutama. Tämä saattaa jättää tulosten taustalla olevan epälineaarisen vasteen näkymättömäksi ja johtaa sen vuoksi väärin johtopäätöksiin (Calabrese 2005).

1.4 Tutkimuskysymykset

Tässä työssä tutkin näkykö metallien hormoneittinen vaikutus kirjosisiepon ja talitiaisen poikasten oksidatiivisen stressin biomarkkereissa Harjavallasta ja Ruissalosta kerätyssä aineistossa ($n = 799$). Satakunnassa sijaitsevan Harjavallan teollisuusalueen läheisyydessä on tutkittu lintujen oksidatiivista stressiä vuodesta 2004 ja saastumisen vaikutuksia vuodesta 1991 lähtien. Useita haitallisia metallipäästöjen vaikutuksia on raportoitu viime vuosiin asti (esim. Rainio ym. 2013; Berglund ym. 2014; Sánchez-Virosta ym. 2020; Mäkinen ym. 2021). Metallien mahdollista hormoneittista vaikutusta lintujen oksidatiiviseen stressiin ei Harjavallassa ole kuitenkaan kattavasti tutkittu. Tutkimukseni biomarkkereina ovat antioksidanttientsyymit GP, CAT ja SOD, jotka kertovat antioksidanttipuolustuksen tehokkuudesta eli siitä, miten hyvin ko. entsyymit pystyvät ehkäisemään oksidatiivisen stressin syntyä (Halliwell & Gutteridge 2007). Selittävinä muuttujina ovat poikasilta kerätyistä ulosteista mitatut arseenin, kadmiumin, kuparin, nikkelin ja lyijyn pitoisuudet.

Ulosteen metallipitoisuuksien on todettu ilmentävän ravinnon kautta saatavaa metallialtistusta (esim. Eeva & Lehikoinen 1996) ja kertovan todenmukaisesti ympäristön metallipitoisuudesta (Dauwe ym. 2004). Arseeni, kadmium ja lyijy ovat mukana korkean myrkyllisyytensä vuoksi, nikkeli ja kupari runsaan alueellisen esiintymisensä vuoksi. Tärkeimmät tutkimuskysymykset ovat:

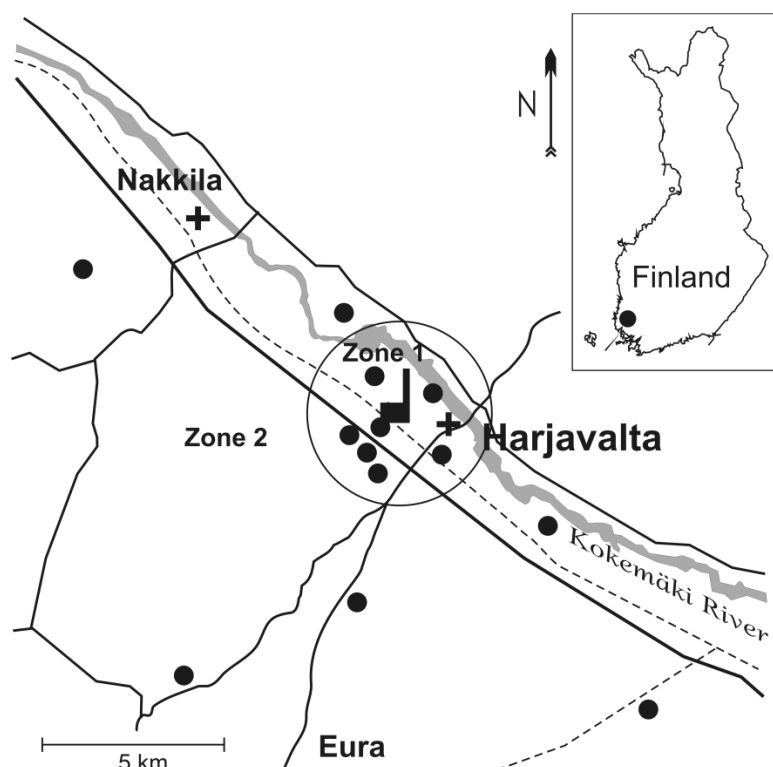
1. *Onko ympäristön metallipitoisuuksien ja antioksidanttientsyymien välillä hormoneihin viittaavaa epälineaarista yhteyttä?*
2. *Onko yhteys erilainen eri lajeilla ja eri antioksidanttientsyymeillä?*

Aikaisempiin tutkimuksiin nojaten (mm. Zhang ym. 2009; Schmeisser ym. 2013; Berry & López-Martínez 2020) oletan löytäväni merkkejä hormoneista ja metallien kaksivaiheisesta yhteydestä antioksidanttientsyymien aktiivisuuteen. Hormeettinen yhteys todennäköisesti vaihtelee lajeittain ja entsyymeittäin, sillä näin on todettu antioksidanttientsyymien ja metallien suhteenkin olevan (Rainio ym. 2013; Berglund ym. 2014).

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimusalue

Tutkimusalue sijaitsee Harjavallan kaupungissa (61°21' N, 22°10' E) ja sen ympäristössä (Kuva 3). Harjavalta on yksi metallisaastuneimmista alueista Suomessa ja siellä sijaitsee Harjavallan Suurteollisuuspuisto, joka sai alkunsa vuonna 1944, kun Outokummun kuparisulatto siirrettiin Imatralta sodan jaloista Länsi-Suomeen. Kymmenen vuotta myöhemmin alueella aloitettiin myös nikkelin valmistus (Harjavallan Suurteollisuuspuisto: Historian vuosikymmenet 2010). Teollisuusalueen keskeisimmät päästöt ovat nikkeli ja kupari, mutta myös mm. arsenia, sinkkiä, lyijyä ja rikkioksideja vapautuu ympäristöön merkittäviä määriä (Kiikkilä 2003), vaikkakin alueen päästöjen määrä on vähentynyt merkittävästi viimeisten vuosikymmenten aikana (Kubin ym. 2000; Poikolainen ym. 2004; Kozlov ym. 2009). Koealoista seitsemän (vuonna 2004 kuusi) sijaitsee alle 2,5 kilometrin päässä Harjavallan tehdasalueelta ja ne edustavat näin ollen saastunutta aluetta (Kuva 3). Saastumattomia vertailualueita edustavat kuusi 4,5–11 kilometrin päässä tehdasalueelta sijaitsevaa tutkimuspaikkaa. Vuonna 2011 aineistoa kerättiin myös Turun

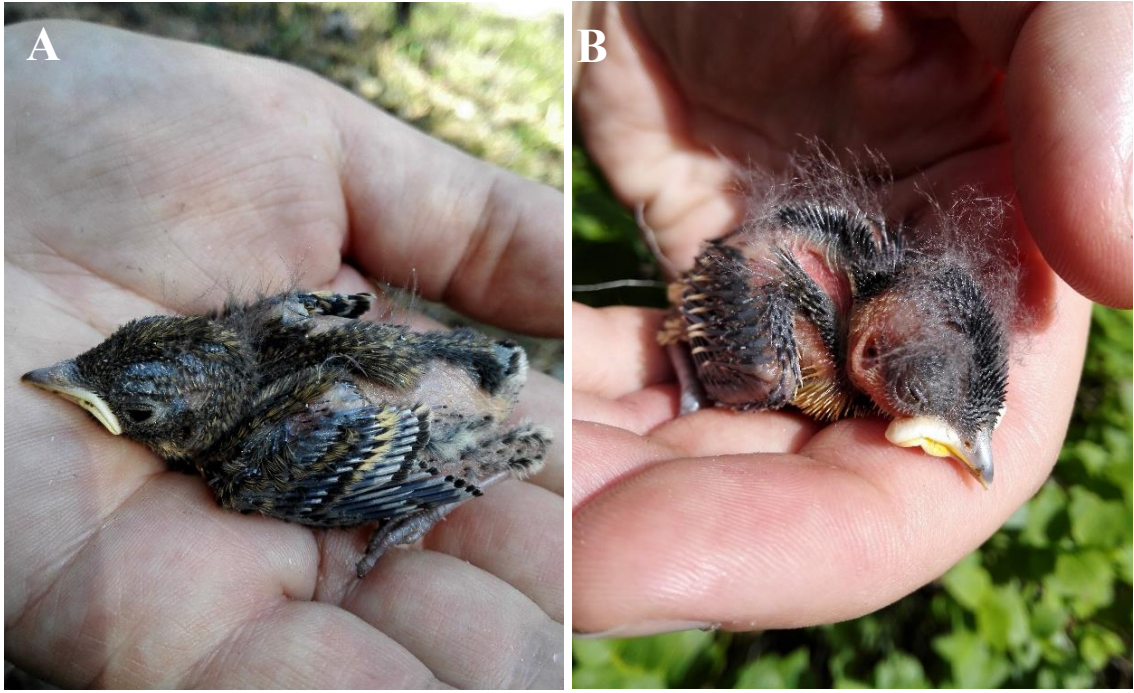


Kuva 3. Harjavalan tutkimusalue. Mustat pisteet kuvaavat koaloja ja ympyrä tehtaan ympärillä 2,5 km säteellä olevaa saastunutta aluetta (Rainio ym. 2013).

Ruissalosta (60°26' N, 22°10' E), joka sijaitsee Harjavallasta noin 100 kilometrin etäisyydellä. Kasvillisuudeltaan Harjavalan tutkimusalueen metsät ovat männyn (*Pinus sylvestris*) hallitsemaa kangasmetsää, jossa sekapuuna kasvaa myös kuusta (*Picea abies*) ja koi-vua (*Betula sp.*). Ruissalossa kasvaa myös tammia (*Quercus robur*).

2.2 Tutkimuslajit

Tutkitut lintulajit ovat kirjosiippo ja talitiainen. Kirjosiippo (Kuva 4A) on pieni (10–17 g) ja runsaslukuinen hyönteissyöjä, joka pesii koko maassa pohjoisimpaan Lappiin asti ja muuttaa talveksi Lounais-Afrikkaan. Kirjosiippokoiraat ovat useimmiten paikkauskollisia ja palaavat kevään tullen tutulle reviirilleen. Lintu pesii koloissa, viihtyy valoisissa lehti- ja sekametsissä ja havumetsissä, ja munii tyypillisesti 5–7 munaa (Lundberg & Alatalo 1992). Muuttolintuna kirjosiippo aloittaa pesintänsä keskimäärin 20 päivää myöhemmin kuin talitiainen (Cramp & Perrins 1993). Talitiainen (Kuva 4B) on koko maassa tavattava osittaismuuttaja, jonka ravintona ovat sekä hyönteiset että siemenet. Se painaa 15–23 grammaa ja pesii koloissa monenlaisissa metsäympäristöissä – myös ihmisasutuksen lähellä. Talitiainen munii tyypillisesti 6–12 munaa ja toinen pesintä saman kauden



Kuva 4. Harjavallassa kuvattu rengastusikäinen A) kirjosiippo (*Ficedula hypoleuca*) ja B) talitiainen (*Parus major*) (kuvat Oona Poranen).

aikana on tavallista (Cramp & Perrins 1993). Molempia lajeja hyödynnetään usein ekologisissa tutkimuksissa, sillä ne pesivät myös ihmisen tekemissä pöntöissä. Lajit ruokailivat kesäisin hyönteisravinnolla ja suhteellisen pienellä alueella, mistä syystä niitä on perusteltua käyttää tutkittaessa paikallista saastuneisuutta (Sánchez-Virosta ym. 2018). Kirjosiippoja on tässä aineistossa 189 poikasta ja talitiaisia 610 poikasta.

2.3 Aineiston keruu

Aineisto on kerätty Harjavallasta vuosina 2004, 2008, 2011, 2014 ja 2015 ja lisäksi Ruisalosta vuonna 2011. Alkuperäiset oksidatiiviseen stressiin liittyvät julkaisut ja niiden keskeiset löydöt on esitetty kootusti Taulukossa 1. Näistä julkaisuista löytyvät myös tarkemmat kuvaukset kaikista näytteiden ottoon ja analysointiin liittyvistä menetelmistä. Tutkimuspaikkojen lintuja tutkittiin kahden metrin korkeudelle ja 35–40 metrin päähän toisistaan asennetuista puisista pesäpöntöistä (sisätilan korkeus × pituus × leveys: 20–22 × 12 × 12 cm, aukon halkaisija 3,2 cm; tarkempi kuvaus ks. Lambrechts ym. 2010). Tutkimuskesinä pesäpöntöillä vierailtiin säännöllisesti pesimäkauden alusta aina poikasten lentoonlähttöön asti. Näin saatiin selville mm. munien määrä, poikasten kuoriutumispäivä sekä kuoriutuneiden poikasten ja lentopoikasten määrät.

Taulukko 1. Tutkielman alkuperäinen aineisto (P = poikaset, N = naaraat), tässä työssä mukana olevien havaintojen määrä (n) sekä aiemmat keskeiset löydöt ja julkaisut.

AINEISTO	KESKEISET LÖYDÖT	JULKAISU
<p>2004 Harjavalta <i>P. major</i> (P) (n = 118)</p>	<p>Ympäristön metallipitoisuudella ei ole suoraa yhteyttä oksidatiiviseen stressiin tai antioksidanttientsyymien aktiivisuuteen, mutta talitaisen poikasten koko on saastuneella alueella pienempi ja glutationiperoksidaasin aktiivisuus korkeampi.</p>	<p>Koivula MJ, Kanerva M, Salminen JP, Nikinmaa M, Eeva T (2011) Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (<i>Parus major</i>) nestlings. <i>Environ. Res.</i> 111: 362–370.</p>
<p>2008 Harjavalta <i>P. major</i> (P) (n = 93) <i>C. caeruleus</i> (P) (n = 0) <i>F. hypoleuca</i> (P) (n = 102)</p>	<p>Poikasten oksidatiivisen stressin biomarkkereiden yhteys ympäristön metallipitoisuuteen on heikko ja lajispesifinen.</p>	<p>Rainio MJ, Kanerva M, Salminen JP, Nikinmaa M, Eeva T (2013) Oxidative status in nestlings of three passerine species exposed to metal pollution. <i>Sci. Total Environ.</i> 454–455: 466–473.</p>
<p>2008 Harjavalta <i>P. major</i> (N) <i>C. caeruleus</i> (N) <i>F. hypoleuca</i> (N) (n = 0)</p>	<p>Metallipitoisuudella on negatiivinen vaikutus lisääntymiseen, mutta ei suoraa yhteyttä pesivien naaraiden oksidatiiviseen stressiin. Antioksidanttipuolustus vaihtelee linnun lajin ja iän mukaan.</p>	<p>Berglund ÅMM, Rainio MJ, Kanerva M, Nikinmaa M, Eeva T (2014) Antioxidant status in relation to age, condition, reproductive performance and pollution in three passerine species. <i>J. Avian Biol.</i> 45: 235–246.</p>
<p>2011 Harjavalta/ Ruissalo <i>P. major</i> (P) (n = 161)</p>	<p>Lyijyaltistus ei merkittävästi lisää oksidatiivista stressiä talitaisen poikasilla, mutta Harjavallan kontrolliryhmällä antioksidanttientsyymien pitoisuudet olivat korkeampia kuin Ruissalon kontrolliryhmällä.</p>	<p>Rainio MJ, Eeva T, Lilley T, Stauffer J, Ruuskanen S (2015) Effects of early-life lead exposure on oxidative status and phagocytosis activity in great tits (<i>Parus major</i>). <i>Comp Biochem Phys C</i> 167: 24–34.</p>
<p>2014 Harjavalta <i>F. hypoleuca</i> (P) (n = 87)</p>	<p>Kalsiumin saatavuus ja ympäristön saastuneisuus vaikuttavat oksidatiivisen stressin kautta kirjosiemon poikasten selviytymiseen.</p>	<p>Espín S, Ruiz S, Sánchez-Virosta P, Lilley T, Eeva T (2017) Oxidative status in relation to metal pollution and calcium availability in pied flycatcher nestlings – A calcium manipulation experiment. <i>Environ. Pollut.</i> 229: 448–458.</p>
<p>2014 Harjavalta <i>P. major</i> (P) (n = 120)</p>	<p>Kalsiumin saatavuus saattaa parantaa talitaisen poikasten selviytymismahdollisuutta stimuloimalla antioksidanttien tuotantoa ja pienentämällä metallien haittavaiikutuksia.</p>	<p>Sánchez-Virosta P, Espín S, Ruiz S, Stauffer J, Kanerva M, García-Fernández AJ, Eeva T (2019) Effects of calcium supplementation on oxidative status and oxidative damage in great tit nestlings inhabiting a metal-polluted area. <i>Environ. Res.</i> 171: 484–492.</p>
<p>2015 Harjavalta <i>P. major</i> (P) (n = 118)</p>	<p>Arseenilla on haitallinen vaikutus poikastuottoon ja poikasten kasvuun, mutta ei selkeää yhteyttä oksidatiivisen stressin biomarkkeereihin.</p>	<p>Sánchez-Virosta P, Espín S, Ruiz S, Panda, B, Ilmonen P, Schultz SL, Karouna-Renier N, García-Fernández AJ, Eeva T (2020) Arsenic-related oxidative stress in experimentally dosed wild great tit nestlings. <i>Environ. Pollut.</i> 259: 113813.</p>

Poikaset rengastettiin kuuden tai seitsemän päivän ikäisinä. Myöhemmin jokaisesta pesästä valittiin satunnaisesti kaksi poikasta (aivan pienimpiä lukuun ottamatta), joilta otettiin ulostenäyte (2004: 7 pv; 2008: 9 pv (*F. hypoleuca*), 11 pv (*P. major*); 2011: 7 pv; 2014: 7 pv; 2015: 8 pv) ja verinäyte (2004: 9 pv; 2008: 9 pv; 2011: 7 pv; 2014: 12 pv (*F. hypoleuca*), 14 pv (*P. major*); 2015: 14 pv) sekä mitattiin kunnan arvioimiseksi paino ja siiven pituus (2004: 8 pv; 2008: 9 pv (*F. hypoleuca*), 11 pv (*P. major*); 2011: 7 pv; 2014: 12 pv (*F. hypoleuca*), 14 pv (*P. major*); 2015: 14 pv). Kirjosieppo kasvaa talitiaista nopeammin (Cramp & Perrins 1993), minkä vuoksi kirjosiepon poikaset mitattiin pääsääntöisesti nuorempina kuin talitiaisen poikaset. Lintujen käsittely ja näytteenotot toteutettiin Luonnontieteellisen keskusmuseon rengastusluvan, ELY-keskuksen lupien sekä Etelä-Suomen Aluehallintoviraston eläinkoelautakunnan (ELLA) myöntämien eläinkoelupien alaisena (lup numerot löytyvät Taulukon 1 julkaisuista).

Verinäyte, josta antioksidanttientsyymit GP, CAT ja SOD määritettiin, otettiin poikasilta olkavarsilaskimosta käyttäen 75 µl heparinisoituja kapillaariputkia. Punasolut laimennettiin 0,9 % suolaliuokseen (NaCl) ja näytteet sentrifugoitiin (5 min/4000 rpm) plasman ja punasolujen erottamiseksi. Punasolut varastoitiin maastossa nestetyypeen ja siirrettiin myöhemmin pakastimeen (-80 °C) kunnes antioksidanttientsyymipitoisuudet analysoitiin. Analysoinnissa käytettiin kuoppalevylukijaa (EnVision, Perkin-Elmer Wallac, Turku, Finland). Entsyymien aktiivisuudet mitattiin triplikaattina, jonka sisäinen vaihtelukoefficientti oli < 10 % joko 96-kuoppalevyä (CAT) tai 384-kuoppalevyä (GP, SOD) käyttäen. Levykontrolleina käytettiin kolmea kontrollinäytettä levyjen välisen vaihtelun analysoimiseksi ja sen varmistamiseksi, että mittaukset olivat onnistuneet ja eri levyjen ja päivien mittaukset olivat vertailukelpoisia (vaihteluväli 0,8–1,2). Koska verinäytteet olivat pieniä, mittaukset optimoitiin pienemmälle määrälle näytettä kuin mitä kitin ohjeessa oli suositeltu. GP:n aktiivisuus mitattiin Sigman kitillä (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA) ja SOD:n aktiivisuus Flukan kitillä (Fluka, Buchs, Germany) (Rainio ym. 2015). CAT:n aktiivisuutta analysoitaessa käytettiin omia reagensseja, joiden kuvaus löytyy julkaisusta Rainio ym. (2015). GP:n ja CAT:n aktiivisuus on ilmaistu tässä tutkimuksessa entsyymin reaktionopeutena minuutissa proteiinimilligrammaa kohden (GP: nmol/min/mg proteiinia, CAT: µmol/min/mg proteiinia) ja SOD inhiboitumisprosentteina, jossa suuri arvo kuvaa suurta aktiivisuutta ja pieni alhaista aktiivisuutta (tarkempi kuvaus ks. Stauffer ym. 2018).

Ulostenäytteet, joista arseeni, kupari, nikkeli ja lyijy määritettiin, kerättiin poikasilta suoraan Eppendorf-putkiin. Saman pesän näytteet yhdistettiin ja kuivattiin (50 °C, 72 h). Kuivatut näytteet punnittiin 0,15–0,20 gramman tarkkuudella ja supra-puhdasta typpi-happoa (HNO₃) ja vetyperoksidia (H₂O₂) lisättiin teflonastioissa oleviin näytteisiin, jotka uutettiin mikroaaltosysteemillä (Milestone High Performance Microwave Digestion Unit MLS 1200 mega). Sen jälkeen näytteet laimennettiin 50 millilitraan deionisoidulla vedellä ja niiden metallipitoisuudet analysoitiin ICP-MS tai ICP-OES -menetelmällä (tarkempi kuvaus ks. Rainio ym. 2015 ja Espín ym. 2016a). Havaitsemisraja metalleille oli noin 1 ng/l.

Yllä kuvattujen menetelmien lisäksi eri vuosina tehtiin linnuille myös muita kokeita, jotka voivat mahdollisesti vaikuttaa tämänkin tutkimuksen tuloksiin. Vuonna 2004 toteutettiin Harjavallassa talitiaisten poikasille karotenoidikoe, jossa koeryhmälle ($n = 60$ pesää) syötettiin tislattuun veteen sekoitettua luteiinia (5 mg/ml) ja kontrolliryhmälle tislattua vettä. Kokeen seurauksena koeryhmän poikasten plasman luteiinipitoisuus nousi 2,1-kertaiseksi, mutta pysyi silti luonnollisen vaihtelun rajoissa. Vaikka luteiini on antioksidantti, sillä ei havaittu olevan yhteyttä oksidatiivisen stressin biomarkkereihin tai metallipitoisuuteen (Eeva ym. 2008; Koivula ym. 2011).

Vuonna 2011 osa Turun Ruissalon talitiaisten poikasista altistettiin oraalisesti lyijyasetatille (korkea altistus poikasen massaa kohden 4 µg/g [$n = 15$ pesää] ja alhainen altistus 1 µg/g [$n = 15$ pesää]) tai tislatulle vedelle (kontrolliryhmä ja Harjavallan poikaset) yhteensä 12 päivän ajan. Annos kasvoi asteittain poikasten kasvaessa 60–240 mikrolitraan. Korkeimmatkin lyijypitoisuudet vastasivat silti niitä pitoisuuksia, joille linnut voivat luontaisestikin saastuneilla alueilla altistua (Rainio ym. 2015) ja toisaalta olivat paljon alhaisempia kuin myrkkyyvaikutuksia osoittavissa laboratoriotutkimuksissa (esim. Yousef ym. 1996: 20 tai 40 µg lyijyä painogramma kohden; Müller ym. 2008: 28 µg lyijyä ruskuaispussiin injektoituna). Lisäksi lyijyaltistuksella ei havaittu olevan merkittäviä tai pitkäaikaisia vaikutuksia talitiaisten fysiologiaan (Rainio ym. 2015).

Vuonna 2014 tutkittiin kalsiumin saatavuuden vaikutusta oksidatiiviseen stressiin. Kalsiumia linnut tarvitsevat munankuoren muodostamiseen, luiden kasvuun ja se myös osallistuu moniin biokemiallisiin reaktioihin (Reynolds ym. 2004). Kokeessa osalle Harjavallan talitiaisista ($n = 29$ pesää) ja kirjosisiepoista ($n = 35$ pesää) tarjottiin pesäpönttöön 5 g lisäkalsiumia (simpukan ja ostereiden kuoria) ennen munintaa ja aina siihen asti, kunnes

poikaset olivat joko 12 (kirjosieppo) tai 14 (talitiainen) päivän ikäisiä. Lisäkalsiumilla havaittiin olevan vain vähän vaikutusta veren antioksidanttitasoihin, tosin CAT:n aktiivisuus oli korkeampi lisäkalsiumryhmän poikasilla (Espín ym. 2017; Sánchez-Virosta ym. 2019).

Vuonna 2015 toteutettiin arseenialtistuskoe, jossa saastumattoman alueen talitiaisten poikasia altistettiin 11 päivän ajan joko tislattulle vedelle (kontrolli) tai natriumarseniitille (NaAsO_2 , alhainen altistus poikasen massaa kohden $0,2 \text{ mg/g/vrk}$ [$n = 17$ pesää] ja korkea altistus 1 mg/g/vrk [$n = 16$ pesää]) ja saastuneen alueen poikasia vedelle (teollisuuskontrolli). Arseenialtistuksella oli vain vähän vaikutusta oksidatiivisen stressin biomarkkereihin lukuun ottamatta sitä, että korkein arseenialtistus vähensi CAT:n aktiivisuutta. Kokeen korkeimmatkin arseenipitoisuudet vastasivat kuitenkin niitä pitoisuuksia, joille tiaiset voivat saastuneessa ympäristössä muutoinkin altistua (Sánchez-Virosta ym. 2020).

2.4 Tilastollinen analyysi

Ennen varsinaisia tilastollisia menetelmiä muokkasin eri vuosien aineistojen yksiköt vastaamaan toisiaan ja yhdistin mittaukset yhdeksi taulukoksi Excelissä. Jätin pois sellaiset linnut, joilta joko kaikki antioksidanttientsyymipitoisuudet tai kaikki metallipitoisuudet olivat tuloksettomia (mittaus tekemättä tai epäonnistunut). Jätin pois myös vuonna 2008 mitatut aikuiset naaraat ja sinitiaiset, vuonna 2014 mitatut aikuiset naaraat, sekä Grubbin testillä (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) selkeästi poikkeaviksi havaitut yksittäiset antioksidanttientsyymi- tai metallimittaukset (yhteensä kahdeksan kappaletta, tilastollinen merkitsevyystaso $p < 0,05$). Lisäksi poistin kokonaan yhden talitiaisen vuodelta 2004 usean poikkeavan havainnon vuoksi. Mukana olevan aineiston muuttujille laskin keski- ja hajontaluvut sekä vertailin saastunutta aluetta ($< 2,5 \text{ km}$ tehdasalueelta) ja vertailualueita ($4,5\text{--}11 \text{ km}$) toisiinsa yksisuuntaisella varianssianalyysillä (One-way ANOVA), jota ennen tein entsyymeille ja metalleille \log_{10} -muunnoksen normaalisuusoletuksen täyttymiseksi. Vertailun selvyuden vuoksi talitiaisella varianssianalyysissä ei ole mukana vuoden 2011 Ruissalon lyijykokeen havaintoja ($n = 115$) eikä vuonna 2015 Harjavallan saastumattomalla alueella tehtyjä arseenikokeita ($n = 62$). Mallinnuksessa nämäkin havainnot ovat mukana.

Tilastollisen analyysin suoritin SAS Enterprise Guide (versio 7.12) -ohjelmalla. Tein yleistetyn lineaarisen sekamallin (*Generalized Linear Mixed Model*, proc GLIMMIX)

molemmille lintulajeille erikseen, sillä antioksidanttientsyymien aktiivisuuksien on osoitettu olevan lajispesifisiä (Rainio ym. 2013; Berglund ym. 2014). Vastemuuttujina toimivat kukin antioksidanttientsyymi (GP, CAT, SOD) vuorollaan. Koska Tukeyn testin mukaan (Taulukko 4, ks. myös L1) eri vuodet eroavat systemaattisesti toisistaan mittausten suhteen, standardoin antioksidanttientsyymit ennen mallinnusta vuosikeskiarvojen mukaan. Standardoinnissa jokaisesta yksittäisestä antioksidanttientsyymiarvosta on vähennetty kyseisen vuoden arvojen keskiarvo ja lisätty koko aineiston keskiarvo – tällöin antioksidanttientsyymien keskiarvot ovat jokaiselle vuodelle samat. Tämä poistaa todennäköisesti lähinnä menetelmien eroista johtuvat vuosien väliset tasoerot, jotka eivät ole tämän tutkimuksen kannalta olennaisia.

Tutkimuksen selittävinä muuttujina olivat metallit As, Cd, Cu, Ni ja Pb. Koska Harjavalan teollisuusalueelta vapautuu ympäristöön eri metalleja vaihtelevia määriä, on niiden aiheuttamia vaikutuksia vaikea yhdistää vain yhteen metalliin (Eeva ym. 2014). Siksi muodostin mukana olevista metalleista mallinnusta varten pääkomponentin. Pääkomponentin muodostamista tukee myös se, että metallit korreloivat positiivisesti keskenään (kirjosiepolla $r_s = 0,387-0,893$; kaikissa $p < 0,0001$ ja talitiaisella $r_s = 0,331-0,831$; kaikissa $p < 0,0001$). Ensimmäinen pääkomponentti (PC1) selitti metallien vaihtelusta talitiaisella 59 % (eigenvalue 2,94) ja kirjosiepolla 66 % (eigenvalue 3,28), joten se kuvastaa hyvin metallialtistuksen yleistä tasoa. PC1 on malleissa mukana sekä ensimmäisen että toisen asteen terminä epälineaarisen yhteyden havaitsemiseksi. Lisäksi malleissa on mukana poikasten paino ja poikuekoko. Poikasten painon on todettu olevan kytköksissä antioksidanttientsyymien aktiivisuuteen (Koivula ym. 2011; Rainio ym. 2015). Poikuekoko eli poikasten pesäkohtainen määrä verenottohetkellä on mukana mallissa sisarusten välisen kilpailun vuoksi (Koivula ym. 2011). Satunnaismuuttujina huomioin mittausvuoden sekä sen, että samasta pesästä on mitattu useampi poikanen. Mallien jakaumana oli lognormaali, sillä antioksidanttientsyymien alkuperäiset arvot eivät noudata normaalijakaumaa ja mittauksissa oli paljon erittäin pieniä arvoja. Vaikka edellä kuvatun standardoinnin seurauksena osa havainnoista jäi mallien ulkopuolelle, kokonaisuudessa aineisto kuitenkin noudatti lognormaalijakaumaa paremmin kuin esim. gammajakaumaa. Vapausasteiden laskemiseen käytin Kenward-Roger 2 -menetelmää ja normaalisuusoletuksen täyttymisen tarkistin jäännösvaihtelusta. Ei-merkitsevät muuttujat poistin malleista yksi kerrallaan (alkaen interaktiotermitä), kunnes jäljellä oli vain merkitseviä muuttujia tai muuttujat loppuivat kesken. Merkitsevyytaso oli kaikissa analyyseissa $p < 0,05$.

3. TULOKSET

Aineistosta lasketut aluekohtaiset keski- ja hajontaluvut, varianssianalyysin tulokset sekä poikastuotto (lentopoikasten määrä/kuoriutuneiden poikasten määrä x 100) näkyvät Taulukosta 2 (kirjosieppo) ja 3 (talitiainen). Molemmilla lajeilla ulosteiden metallipitoisuudet (As, Cd, Cu, Ni, Pb) olivat saastuneella alueella vertailualueetta merkitsevästi suurempia (kaikissa $p < 0,0001$). Esimerkiksi kirjosiepolla nikkelpitoisuuden keskiarvo oli saastuneella alueella lähes kymmenkertainen vertailualueeseen nähden (Taulukko 2).

Kirjosiepon entsyymiaktiivisuudet eivät eronneet merkitsevästi toisistaan alueiden välillä. Talitiaisella GP:n aktiivisuus oli saastuneella alueella vertailualueetta korkeampi ($F_{df} = 23,64_{1,392}$, $p < 0,0001$), mutta muutoin entsyymiaktiivisuuksissa ei ollut alueiden välillä merkitsevää eroa (Taulukko 3). Molemmilla lajeilla poikuekoko ja lentopoikasten määrä (Taulukot 2 ja 3), sekä talitiaisella siiven pituus, paino ja munien määrä olivat saastumattomalla alueella merkitsevästi suurempia kuin vertailualueella (Taulukko 3). Poikastuotto eli pesinnän onnistuneisuus oli molemmilla lintulajeilla vertailualueella parempi (Taulukot 2 ja 3). Antioksidanttientsyymien (GP, CAT, SOD) mittaukset erosivat useimpien vuosien välillä merkittävästi (Tukeyn testi: Taulukko 4; L1). Ainoastaan vuosien 2014 ja 2015 entsyymimittaukset eivät eronneet toisistaan kummallakaan lajilla.

Yleistetyn lineaarisen mallin tulokset ovat nähtävissä Taulukossa 5. Tulokset eroavat tutkittujen lintulajien välillä. Talitiaisella alhainen ympäristön metallipitoisuus vaikutti GP-aktiivisuuteen positiivisesti mutta metallipitoisuuden kasvaessa vaikutus muuttui negatiiviseksi, muodostaen ylösalaisen U:n mallisen vastekäyrän (Kuva 5, Taulukko 5). GP-aktiivisuus laski myös poikasen painon ($9,88_{1;37,65}$, $p = 0,0033$) ja poikuekokoon kasvaessa ($F_{df} = 11,66_{1;61,82}$, $p = 0,0011$). Myös talitiaisien SOD-aktiivisuus laski, kun poikasen paino ($F_{df} = 17,67_{1;138,2}$, $p < 0,0001$) tai poikuekoko ($F_{df} = 7,44_{1;163,6}$, $p = 0,0071$) kasvoi (Taulukko 5). Talitiaisien CAT-aktiivisuuteen ei tutkituilla muuttujilla ollut vaikutusta (Taulukko 5).

Taulukko 2. Kirjosiepon muuttujien tunnusluvut (ka = keskiarvo, s = keskihajonta) ja alueiden vertailu varianssianalyysillä (Harjavalta, $n = 189$). Merkitsevät testitulokset on tummennettu (Mulu = munien määrä, Kuor = kuoriutuneiden poikasten määrä, Poik = poikuekoko näytteenottohetkellä, Lent = lentopoikasten määrä, Poikast. = poikastuotto). Varianssianalyysia varten entsyymi- ja metalliarvot on \log_{10} -muunnettu.

<i>Ficedula hypoleuca</i>		vertailualue ($n = 93$)	saastunut ($n = 96$)	ANOVA	
Muuttuja	Yksikkö	ka \pm s min–max	ka \pm s min–max	$F_{1,166}$	p
GP	nmol/min/mg	6,19 \pm 5,22 0,47–22,85	6,70 \pm 4,91 0,00–20,23	1,31	0,254
CAT	μ mol/min/mg	3,46 \pm 7,13 0,00–29,00	3,05 \pm 11,19 0,00–96,68	0,65	0,422
SOD	inhibiitio %	46,00 \pm 29,22 4,22–88,57	48,77 \pm 28,17 2,43–86,85	0,23	0,633
As	μ g/g	0,76 \pm 0,38 0,07–1,83	7,12 \pm 5,27 2,59–35,34	494,79	< 0,0001
Cd	μ g/g	3,41 \pm 1,51 0,99–6,33	5,17 \pm 2,25 1,05–10,86	33,75	< 0,0001
Cu	μ g/g	103,95 \pm 40,83 47,69–214,62	259,03 \pm 149,49 74,87–906,10	164,49	< 0,0001
Ni	μ g/g	4,03 \pm 1,98 1,34–10,44	39,42 \pm 36,13 10,09–200,91	580,55	< 0,0001
Pb	μ g/g	2,36 \pm 2,12 0,53–13,20	10,19 \pm 11,55 1,97–74,97	193,90	< 0,0001
Siipi	mm	37,24 \pm 5,60 28,00–48,00	36,26 \pm 7,46 18,00–50,00	1,19	0,277
Paino	g	12,64 \pm 1,31 9,20–15,00	12,36 \pm 1,46 6,50–15,00	1,54	0,216
Mulu	kpl	6,12 \pm 0,64 4,00–7,00	6,09 \pm 0,91 4,00–8,00	0,15	0,703
Kuor	kpl	5,39 \pm 0,97 3,00–7,00	5,21 \pm 1,13 3,00–8,00	1,70	0,194
Poik	kpl	4,84 \pm 1,35 1,00–7,00	4,26 \pm 1,42 1,00–8,00	8,50	0,004
Lent	kpl	4,43 \pm 1,37 1,00–7,00	3,65 \pm 1,61 0,00–7,00	12,23	0,001
Poikast.	%	82,57 \pm 20,62 16,67–100	71,11 \pm 27,51 0–100	9,62	0,002

Taulukko 3. Talitiaisen muuttujien tunnusluvut (ka = keskiarvo, s = keskihajonta) ja alueiden vertailu varianssianalyysillä (Harjavalta, $n = 433$)¹⁾. Merkitsevät testitulokset on tummennettu (Mulu = munien määrä, Kuor = kuoriutuneiden poikasten määrä, Poik = poikuekoko näytteenottohetkellä, Lent = lentopoikasten määrä, Poikast. = poikastuotto). Varianssianalyysiä varten entsyymi- ja metalliarvot on log₁₀-muunnettu.

Muuttuja	Yksikkö	Parus major	saastunut	ANOVA	
		vertailualue ($n = 206$)	($n = 227$)	$F_{1, 392}$	p
		ka ± s min-max	ka ± s min-max		
GP	nmol/min/mg	3,99 ± 3,53 0,00–17,83	7,97 ± 7,25 0,00–37,11	23,64	< 0,0001
CAT	µmol/min/mg	50,08 ± 37,44 10,01–173,16	54,45 ± 41,37 0,00–202,65	0,22	0,637
SOD	inhibiitio %	24,65 ± 13,49 0,00–52,58	26,18 ± 13,73 0,00–66,66	1,41	0,235
As	µg/g	1,14 ± 1,04 0,01–5,13	8,69 ± 8,17 1,28–62,06	479,79	< 0,0001
Cd	µg/g	1,81 ± 1,74 0,26–14,98	3,39 ± 2,44 0,70–14,16	108,93	< 0,0001
Cu	µg/g	92,01 ± 72,27 17,01–626,74	169,02 ± 105,31 53,73–759,85	140,36	< 0,0001
Ni	µg/g	5,29 ± 3,72 1,33–22,19	26,70 ± 20,26 4,77–126,04	693,16	< 0,0001
Pb	µg/g	2,29 ± 1,92 0,44–16,07	6,77 ± 6,90 1,01–33,61	185,59	< 0,0001
Siipi	mm	36,29 ± 11,69 9,50–54,00	30,47 ± 11,85 11,00–52,00	18,06	< 0,0001
Paino	g	15,06 ± 2,93 4,70–22,50	13,23 ± 3,11 5,40–20,20	32,57	< 0,0001
Mulu	kpl	8,83 ± 1,24 5,00–12,00	8,47 ± 1,43 5,00–13,00	5,19	0,023
Kuor	kpl	7,55 ± 1,55 3,00–10,00	7,28 ± 1,76 2,00–12,00	2,40	< 0,122
Poik	kpl	6,17 ± 1,70 1,00–10,00	5,21 ± 1,58 2,00–9,00	32,47	< 0,0001
Lent	kpl	5,32 ± 1,94 0,00–10,00	4,00 ± 1,81 0,00–7,00	46,75	< 0,0001
Poikast.	%	72,18 ± 25,21 0,00–100	57,45 ± 26,74 0,00–100	30,35	< 0,0001

¹⁾ Mukana ei ole vuoden 2011 Ruissalon havaintoja ($n = 115$) eikä vuonna 2015 Harjavallan saastumattomalla alueella tehtyjä arseenikokeita ($n = 62$).

Taulukko 4. Vuosien parittainen vertailu Tukeyn testillä GP:n, CAT:n ja SOD:n mittauksille. Katkoviivojen yläpuoliset p -arvot ovat talitiaiselle ja alapuoliset kirjosiepolle. Toisistaan eroavien vuosien p -arvot on tummennettu ($p < 0,05$). Ennen testiä entsyymi-arvot on \log_{10} -muunnettu.

GP	2004	2008	2011	2014	2015
2004		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2008			< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2011				0,001	0,059
2014		< 0,0001			0,736
2015					

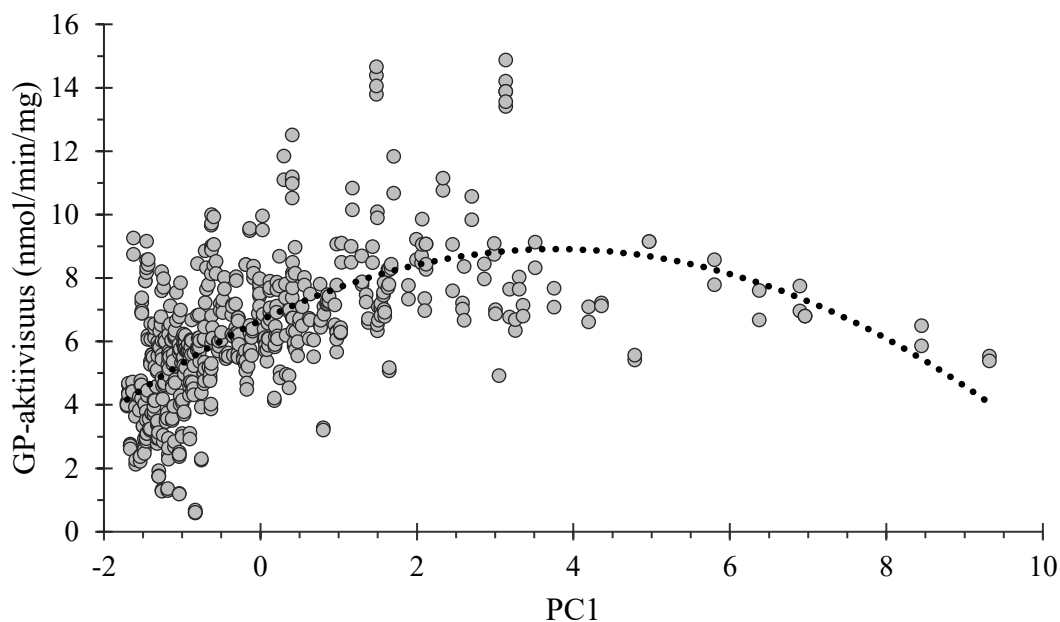
CAT	2004	2008	2011	2014	2015
2004		0,103	0,960	< 0,0001	< 0,0001
2008			0,017	< 0,0001	< 0,0001
2011				< 0,0001	0,0001
2014		< 0,0001			0,056
2015					

SOD	2004	2008	2011	2014	2015
2004		< 0,0001	0,039	0,0002	< 0,0001
2008			< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2011				< 0,0001	< 0,0001
2014		< 0,0001			0,860
2015					

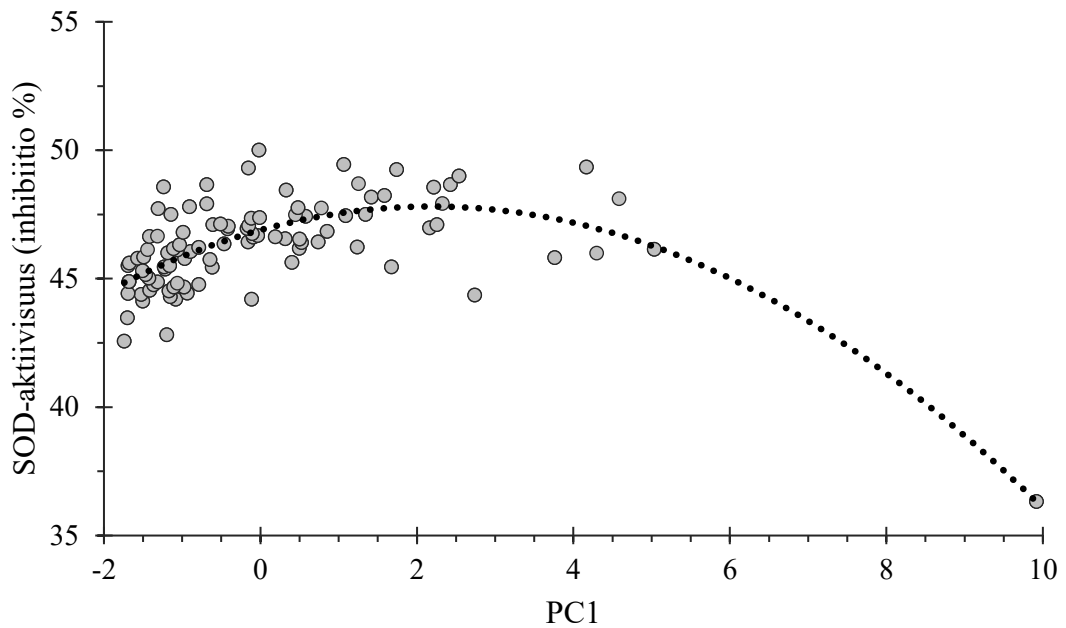
Kirjosiepolla GP-aktiivisuus oli merkitsevästi korkeampi painavimmilla poikasilla ($F_{df} = 4,381; 141,2, p = 0,04$), mutta muut tutkitut muuttujat eivät olleet siihen yhteydessä (Taulukko 5). Alhaisella ympäristön metallipitoisuudella oli SOD-aktiivisuutta stimuloivia vaikutuksia, mutta korkea metallipitoisuus sen sijaan laski entsyymien aktiivisuutta (Kuva 6, Taulukko 5). Kirjosiepon CAT-aktiivisuudella ja tutkituilla muuttujilla ei analyysin perusteella ole yhteyttä ja tällä lajilla CAT-aktiivisuudet olivat ylipäätään alhaisia.

Taulukko 5. Talitiaisen ja kirjosiemon antioksidanttientsyymien (GP, CAT, SOD) aktiivisuuden suhde ympäristön metallipitoisuuteen (PC1), painoon ja poikuekokoon. Lopulliseen malliin jääneet muuttujat on esitetty tummennettuina estimaattien (E) ja keskivirheiden (se) kanssa. Mallissa mukana olevia havaintoja oli talitiaisella 568 (GP), 549 (CAT), 597 (SOD), kirjosiepolla 183 (GP), 108 (CAT) ja 176 (SOD).

Laji	Malli	GP		CAT		SOD	
		F _{df} (E ± se)	p	F _{df} (E ± se)	p	F _{df} (E ± se)	p
<i>Ficedula hypoleuca</i>	PC1	0,47 _{1; 88,07}	0,49	0,03 _{1; 54,03}	0,85	1,83_{1; 79,2} (0,019 ± 0,014)	0,18
	PC1×PC1	1,02 _{1; 81,24}	0,31	0,38 _{1; 52,44}	0,54	4,03_{1; 74,16} (-0,004 ± 0,002)	0,048
	Paino	4,38_{1; 141,2} (0,065 ± 0,031)	0,04	0,33 _{1; 95,14}	0,57	0,89 _{1; 113,5}	0,35
	Poikuekoko	0,06 _{1; 88,6}	0,81	0,67 _{1; 57,79}	0,42	0,64 _{1; 53,59}	0,43
<i>Parus major</i>	PC1	14,29_{1; 232,7} (0,13 ± 0,034)	0,0002	1,59 _{1; 245,3}	0,21	0,41 _{1; 287,1}	0,52
	PC1×PC1	7,90_{1; 267,4} (-0,018 ± 0,006)	0,0053	0,13 _{1; 252,3}	0,72	0,57 _{1; 279,9}	0,45
	Paino	9,88_{1; 37,65} (-0,042 ± 0,013)	0,0033	0,16 _{1; 112,1}	0,69	17,67_{1; 138,2} (-0,036 ± 0,012)	< 0,0001
	Poikuekoko	11,66_{1; 61,82} (-0,073 ± 0,021)	0,0011	0,00 _{1; 131}	0,98	7,44_{1; 163,6} (-0,032 ± 0,012)	0,0071



Kuva 5. Talitiaisen ennustettu GP-aktiivisuus (nmol/min/mg) suhteessa metallipitoisuuteen (pääkomponentti PC1).



Kuva 6. Kirjosiepon ennustettu SOD-aktiivisuus (inhibiitio %) suhteessa metallipitoisuuteen (pääkomponentti PC1).

4. TULOSTEN TARKASTELU

Vaikka Harjavallan teollisuusalueen päästöt ovat pienentyneet huomattavasti viime vuosikymmenten aikana (Kubin ym. 2000; Poikolainen ym. 2004; Kozlov ym. 2009), osoittavat tulokset ympäristön metallipitoisuuden olevan teollisuusalueen läheisyydessä edelleen selvästi korkeampi kuin kauempana sijaitsevilla vertailualueilla (Taulukot 2 ja 3). Saastuneella alueella lintujen pesimätulos oli selkeästi vertailualueetta huonompi (Taulukot 2 ja 3). Aiemmissä tutkimuksissa on todettu saastuneen alueen huonomman pesimätuloksen olevan kytköksissä alueen vähäiseen ja heikkolaatuiseen ravintoon, kuten paljon karotenoideja sisältävien toukkien vähyteen, eli olevan seurausta metallipäästöjen sekundaarisista vaikutuksista (Sánchez-Virosta ym. 2018; Eeva ym. 2014; Eeva ym. 2008). Saastuneen alueen talitiaisten kasvanut GP-aktiivisuus voi viitata metallien vaikutuksesta lisääntyneeseen happiradikaalien määrään. Tällöin myös hapetus-pelkistystasapaino (GSH:GSSG) voi olla muuttunut ja oksidatiivinen stressi kasvanut (Taulukko 3). Koska alueet eivät eronneet toisistaan kaikkien entsyymien osalta (Taulukot 2 ja 3), ei päästöjen määrä (ts. etäisyys päästölähteestä) ole yksiselitteinen syy lintujen erilaisiin antioksidanttientsyymiprofiileihin.

Molemmilla lintulajeilla poikasten ulosteiden metallipitoisuudet olivat saastuneella alueella vertailualueen arvoja korkeampia. Silti saastuneenkin alueen metallipitoisuuksia voidaan pitää suhteellisen alhaisina, kun niitä verrataan muihin vastaaviin tutkimuksiin (Espín ym. 2020). Esimerkiksi talitiaisilla lyijypitoisuuden keskiarvo oli saastuneella alueella 6,77 µg/g, vaikka vielä 90-luvun alussa se oli Harjavallassa 28 µg/g (Eeva & Lehkoinen 1996) ja vuonna 2000 Belgian Antwerpenin metallisulaton ympäristössä 61 µg/g (Dauwe ym. 2004). Metallipitoisuuksien vertailu tutkimusten välillä on kuitenkin vaikeaa, sillä käytetyt mittausmenetelmät ja työn alkuperäinen tarkoitus eivät välttämättä ole yhteneviä (Koivula ym. 2011). Lisäksi eri metallit voivat joko lisätä tai vähentää toistensa myrkyllisyyttä. Tietty metalli voi siis aiheuttaa myös turvallisena pidetyllä pitoisuudella myrkyvaikutuksia esiintyessään muiden metallien kanssa (Walker ym. 2012). Metallien yhteisvaikutusta saattaa esiintyä myös Harjavallassa. On myös havaittu, että ulosteen metallipitoisuudessa on paljon vaihtelua saman pesän poikasten välillä, joten keskiarvo pesälle tulisi laskea vähintään neljän poikasen perusteella (Eeva ym. 2020b). Myös linnun sukupuoli ja laji vaikuttavat siihen, miten metalleja kertyy yksilön elimistöön ja miten ne vaikuttavat linnun fysiologiaan (Burger 2007). Esimerkiksi kirjosiippoihin metalleja kertyy talitiaisia enemmän (Eeva & Lehkoinen 1996, 2004; Berglund ym. 2011). Tässäkin tutkimuksessa metallipitoisuudet olivat saastuneella alueella elävillä kirjosiipoilla korkeampia kuin talitiaisilla – arseenia lukuun ottamatta (Taulukot 2 ja 3).

Tutkimusvuosien vertailu toisiinsa paljasti, että entsyymiaktiivisuusmittauksissa on eroja vuosien välillä (Taulukko 4, L1). Mahdollisena syynä voi olla näytteiden käsittelyn, säilytysajan ja laboratoriomenetelmien erot siitä huolimatta, että mittauksissa on pyritty käyttämään vertailukelpoisia menetelmiä. Vuosien välillä on hyvin todennäköisesti myös erilaisista ympäristöolosuhteista, kuten pesimäkauden sääolosuhteista, johtuvia eroja. On osoitettu, että kylmä sää heikentää kirjosiipon pesintämenestystä muun muassa ravinnon saatavuuden kautta erityisesti saastuneella alueella (Eeva ym. 2020a). Lisäksi tiedetään, että lämpötila, fyysinen aktiivisuus ja ravinto vaikuttavat vapaiden happiradikaalien määrään ja edelleen entsyymiaktiivisuuksiin (Koivula ym. 2011; Rainio ym. 2013; Costantini 2014). Mallinnusta varten tehdyn antioksidanttientsyymien standardoinnin voi kuitenkin olettaa poistaneen vuosien välisen vaihtelun.

Tuloksissa oli eroa lintulajien välillä (Taulukko 5) – aivan kuten aiemmissakin tutkimuksissa Harjavallasta (mm. Rainio ym. 2013; Berglund ym. 2014). Kirjosiepolla paino vai-

kutti GP-aktiivisuuteen siten, että painavien poikasten GP-aktiivisuus oli kevyempiä poikasia suurempaa. Tämä voi kertoa siitä, että painavammilla poikasilla entsyymipuolustus toimii tehokkaammin tai siitä, että painavammilla poikasilla jo antioksidanttientsyymien perustaso on korkeampi niiden paremmasta kunnosta johtuen (Koivula ym. 2011). Ympäristön metallipitoisuus vaikutti kirjosiieppojen SOD-aktiivisuuteen siten, että alhaisella metallipitoisuudella oli entsyymiaktiivisuutta lisääviä vaikutuksia ja vasta korkeammalla pitoisuudella aktiivisuutta laskevia vaikutuksia (Taulukko 5, Kuva 6). Näin ollen mallissa mukana oleva metallipitoisuuden toisen asteen termi voi viitata hormeettiseen yhteyteen metallipitoisuuden ja SOD-aktiivisuuden välillä. Epälineaarinen vaste oli nähtävissä myös ilman yhtä selkeästi muista mittauksista poikkeavaa havaintoa.

Talitiaisella GP-aktiivisuuteen vaikuttivat poikasten paino, poikuekoko ja metallipitoisuus, SOD-aktiivisuuteen puolestaan paino ja poikuekoko (Taulukko 5). Sekä GP- että SOD-aktiivisuus olivat alhaisempia painavammilla poikasilla, mikä on todettu aiemmissakin tutkimuksissa (Koivula ym. 2011; Rainio ym. 2015). Toisin sanoen hyvin kasvavilla poikasilla antioksidanttipuolustuksen taso on alhaisempi kuin huonosti kasvavilla. Syynä tähän voi olla se, että pienemmillä ja usein myös huonokuntoisemmilla poikasilla antioksidanttipuolustuksen täytyy olla tehostunut oksidatiivisen stressin torjumiseksi. Toisaalta antioksidanttipuolustuksen tehostuminen on myös energiaa kuluttavaa. Vaikka painavimmat poikaset löytyvät nimenomaan vertailualueelta (jossa ympäristön metallipitoisuus on matalampi) osoittaa mallinnuksen tulos, että painolla on metallipitoisuudesta riippumatonta selitysvoimaa.

Poikuekoon negatiivinen vaikutus sekä GP- että SOD-aktiivisuuteen voi selittyä poikasten keskinäisellä kilpailulla. Suurissa poikueissa poikasten välillä esiintyy energiaa vaativaa kilpailua esimerkiksi ravinnosta, mikä näkyy poikasten huonompana kuntona (Neuenschwander ym. 2003). Painon ja poikuekoon yhteys ei näytä tässä aineistossa kuitenkaan olevan erityisen voimakas, joten poikuekoon ja antioksidanttipuolustuksen suhteessa voi olla kyse jostain muusta kuin poikasten painosta. Iso sisarusparvi voi jo sinänsä olla stressitasoa nostava tekijä.

Tulosten perusteella ympäristön metallipitoisuudella on epälineaarinen hormeettinen vaikutus talitiaisen poikasten GP-aktiivisuuteen, toisin sanoen alhainen metallipitoisuus aktivoi GP:tä, mutta kasvavassa metallipitoisuudessa GP:n aktiivisuus vähenee. Koska me-

tallipitoisuus (PC1) toisen asteen terminä vaikutti talitaisen GP-aktiivisuuteen negatiivisesti (Taulukko 5), on kuvaaja alaspäin aukeava paraabeli (Kuva 5, vrt. Kuva 2). Kun ympäristön metallipitoisuus kasvaa, kasvaa myös GP-aktiivisuus ja elimistön puolustautuminen oksidatiivista stressiä vastaan tehostuu. Mikäli samassa tilanteessa tarkasteltaisiin metallipitoisuuden ja oksidatiivisen vaurion suhdetta, olisi kuvaaja mahdollisesti ylöspäin aukeava paraabeli tai J:n muotoinen käyrä, jossa oksidatiivinen vaurion määrä aluksi vähenisi tai pysyisi matalalla tasolla ja vasta metallipitoisuuden edelleen kasvaessa lisääntyisi. Hormeesin kannalta olennaisinta on se, mitä tapahtuu ennen paraabelin huippua. Mikäli oksidatiivinen stressi lisääntyy alusta asti yhtä matkaa metallipitoisuuden kanssa, ei hormoneesia esiinny. Mutta mikäli pienillä metallipitoisuuksilla oksidatiivinen stressi on vähäistä tai sen määrä lähtötilanteeseen nähden jopa laskee, voi metallipitoisuudella katsoa olevan hormoneettisia vaikutuksia. Jotta oksidatiivista stressiä voisi varmuudella havainnoida, täytyisi olla tietoa myös solun hapetus-pelkistys tasapainosta (GSSG:GSH), solujen ja kudosten oksidatiivisista vaurioista sekä tutkittavien lajien entsyymiaktiivisuuksien perustasoista, jolloin metallipitoisuuden muuttamia entsyymiaktiivisuuksia voitaisiin verrata entsyymien perustasoihin.

Metallipitoisuuden jatkaessa kasvuaan tulee vastaan lakipiste, jonka jälkeen GP vähitellen inaktivoituu, oksidatiivinen stressi lisääntyy ja oksidatiivisten vaurioiden määrä kasvaa. Tämä johtuu entsyymien tai entsyymiä koodaavien geenien vahingoittumisesta joko suoraan metallien tai metallien johdosta lisääntyneiden happiradikaalien vaikutuksesta (Halliwell & Gutteridge 2007). Alhainen entsyymiaktiivisuus voi viitata myös linnun heikkoon fysiologiseen tilaan ja lisääntynyt entsyymiaktiivisuus puolestaan lisääntyneeseen happiradikaalien määrään (Rainio ym. 2015). Kuten Costantini ja Verhust (2009) ja Espín ym. (2014b) toteavat, saadakseen todellisen käsityksen elion oksidatiivisen stressin tilasta, olisi tarpeellista mitata antioksidanttipuolustuksen aktiivisuuden lisäksi vähintään yhtä oksidatiivisen vaurion biomarkkeria, kuten lipidiperoksidaatiota.

Hormeesi-ilmiö voi helposti peittyä muiden vaikutusten alle. Vaikka metallipitoisuuden suhde talitaisen GP-aktiivisuuteen ja kirjosiepon SOD-aktiivisuuteen viittaavat Taulukon 5 ja Kuvien 5 ja 6 perusteella hormoneetin olemassaoloon, ei ole poissuljettua, etteikö hormoneesia voisi esiintyä myös muiden entsyymien ja metallipitoisuuksien välillä. Kokonaiskuvan hahmottaminen on hankalaa, kun tarkastelussa on monta metallia yhtä aikaa, entsyymiaktiivisuuksien perustasoa ei tiedetä ja oksidatiivinen stressi on ilmiönä moni-

ulotteinen. Eri metallien hormeettinen vaikutus voi näkyä eri tavoin myös ajallisesti (Calabrese 2005). Usein hormoneesia tutkitaan laboratoriossa ja tarkalla annostuksella, jolloin tutkimus on toistettavissa ja ajallisesti kontrolloitu (esim. Schmeisser ym. 2013). Luonnonpopulaatioissa eri alueiden poikaset ovat jo lähtökohdiltaan erilaisessa asemassa muun muassa ravinnon laadun suhteen: toisilla antioksidanttipuolustus toimii tehokkaammin ja oksidatiivisen stressin sietokyky on korkeampi. Hormeesin tutkiminen luonnonpopulaatiolla, jonka yksilöt altistuvat useille eri metalleille samanaikaisesti ja jatkuvasti, on haastavaa. Hormeesi voi jäädä havaitsematta, jos entsyymiaktiivisuus ja metallipitoisuus mitataan linnuilta vain yhden kerran eli tutkimus tehdään ilman ajallista hajauttamista. Esimerkiksi Losdatin ym. (2018) tutkimuksessa 11 päivän iässä rikkakasvimyrkyllä altistettuja talitiaisen poikasia tutkittiin uudestaan poikasten ollessa vuoden ikäisiä. Tällöin havaittiin, että myrkyllä altistettujen lintujen oksidatiivisen stressin taso oli alhaisempi kuin vertailuryhmän stressitaso.

Yllättävää on, ettei tutkituilla muuttujilla havaittu olevan mitään vaikutusta CAT-aktiivisuuteen. Kirjosiepoilla CAT-aktiivisuus näyttää kuitenkin olevan luontaisesti hyvin alhainen. Esimerkiksi 67 prosentilla poikasista CAT-aktiivisuus oli alle havaitsemisrajan (0,97 nmol/min/mg). Kyseisellä antioksidanttientsyymillä ei siis ehkä ole keskeistä roolia tämän lintulajin antioksidanttipuolustuksessa. Voi myös olla, etteivät metallipitoisuudet olleet riittävän suuria CAT:n aktivoitumiseen. Toisaalta, CAT:lla on havaittu olevan suuri rooli vasta korkeissa vetyperoksidipitoisuuksissa, kun sen sijaan GP hajottaa vetyperoksidia jo matalissa pitoisuuksissa (Halliwell & Gutteridge). Lisäksi on mahdollista, että eri metallit vaikuttavat entsyymeihin eri tavoin, jopa toisiinsa nähden päinvastaisesti. Vasteen puuttuminen voi johtua myös siitä, että ulosteiden metallipitoisuus ei kerro tarkasti elimistön metallipitoisuuksista, sillä metalleja on voinut kertyä linnun sisäelimiin, jolloin todellinen metallialtistus voi poiketa mitatusta.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä tutkin ympäristön metallipitoisuuden hormeettista vaikutusta talitiaisen ja kirjosiepon poikasten antioksidanttipuolustuksesta huolehtiviin antioksidanttientsyymeihin. Metalleilla on todettu olevan hormeettisia vaikutuksia oksidatiivisen stressin tasoon, siten, että pienet pitoisuudet saattavat vaikuttaa positiivisesti ja suuret negatiivisesti lajin selviytymiseen, poikastuottoon ja elinikään (esimerkiksi Zhang ym. 2009; Schmeisser ym. 2013; Losdat ym. 2018). Tutkimuksessa käytetyn viiden vuoden aineiston perusteella

saadut tulokset viittaavat siihen, että ympäristön metallipitoisuudella on hormeettinen vaikutus talitiaisen poikasten GP-aktiivisuuteen ja mahdollisesti lintujen oksidatiivisen stressin tasoon. Kirjosiepon poikasilla metallipitoisuuden hormeettinen vaikutus näkyy SOD-aktiivisuudessa. Toisin sanoen, kun ympäristön metallipitoisuus kasvaa hieman, lisääntyy näiden entsyymien aktiivisuus, jolloin elimistön puolustautuminen oksidatiivista stressiä vastaan tehostuu. Suurempi altistus puolestaan alkaa heikentää puolustusvastetta.

Vaikka Harjavalta on yksi Suomen metallisaastuneimmista alueista, ei linnunpoikasten altistus nouse siellä niin suureksi, etteikö niiden antioksidanttipuolustus pystyisi estämään oksidatiivista stressiä melko tehokkaasti. Tutkimusta olisi kuitenkin hyvä jatkaa mittaamalla entsyymiaktiivisuuksien lisäksi antioksidantteja sekä oksidatiivisesta stressistä aiheutuneita solu- ja kudsvaurioita. Tällöin metallipitoisuuden ja antioksidanttipuolustuksen suhdetta voisi verrata oksidatiiviseen vaurioon ja siten saada parempi käsitys lintujen metalliensietokyvystä ja sen hormeettisesta luonteesta. Mielenkiintoista olisi myös tietää, ovatko muutokset pysyviä ja periytyvätkö ne epigeneettisesti seuraaville sukupolville. Olisi myös antoisaa tutkia hormonein pohjavaikutusta eli sitä, parantaako poikasiässä tapahtunut metallialtistuminen aikuisiän selviytymistä. Kaiken kaikkiaan hormonein ansiosta mahdollisesti parantunut sietokyky voi olla useilla lajeilla merkittävässä roolissa nopeasti muuttuvissa elinympäristöissä.

6. KIITOKSET

Kiitän ohjaajiani Tapio Eevaa ja Miia Rainiota tutkimusaiheeseen ja -alueeseen perehdyttämisestä sekä kärsivällisestä ja perusteellisesta ohjaamisesta. Osoitan kiitokseni myös kaikille aineistoa keräämässä ja analysoimassa olleille tutkijoille sekä opiskelijoille.

LÄHTEET

Belskii E, Lugas'kova N, Karfidova AA (2005) Reproductive parameters of adult birds and morphophysiological characteristics of chicks in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca* Pall.) in technogenically polluted habitats. *Russian Journal of Ecology* 36: 329–335.

Berglund ÅMM, Rainio MJ, Kanerva M, Nikinmaa M, Eeva T (2014) Antioxidant status in relation to age, condition, reproductive performance and pollution in three passerine species. *Journal of Avian Biology* 45: 235–246.

Berglund ÅMM, Koivula MJ, Eeva T (2011) Species- and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environmental Pollution* 159: 2368–74.

Berglund ÅMM, Ingvarsson PK, Danielsson H, Nyholm, NEI (2010) Lead exposure and biological effects in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) before and after the closure of a lead mine in northern Sweden. *Environmental Pollution* 158: 1368–1375.

Berglund ÅMM, Klaminder J, Nyholm NEI (2009) Effects of reduced lead deposition on pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings: tracing exposure routes using stable lead isotopes. *Environmental Science & Technology* 43: 208–213.

Berglund ÅMM, Sturve J, Förlin L, Nyholm NE (2007) Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. *Environmental Research* 105: 330–9.

Berry R 3rd, López-Martínez G (2020) A dose of experimental hormesis: When mild stress protects and improves animal performance. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 242: 110658.

Burger J (2007) A framework and methods for incorporating gender related issues in wildlife risk assessment: Gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study. *Environmental Research* 104: 153–162.

Calabrese EJ (2005) Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138: 378–411.

Calabrese EJ, Blain RB (2009) Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution* 157: 42–8.

Calabrese, EJ, Bachmann, KA, Bailer, AJ, Bolger, PM, Borak, J, Cai, L, Cedergreen, N, Cherian, MG, Chiueh, CC, Clarkson, TW, Cook, RR, Diamond, DM, Doolittle, DJ, Dorato, MA, Duke, SO, Feinendegen, LE, Gardner, DE, Hart, RW, Hastings, KL, Hayes, AW, Hoffmann, GR, Ives, JA, Jaworowski, Z, Johnson, TE, Jonas, WB, Kaminski, NE, Keller, JG, Klaunig, JE, Knudsen, TB, Kozumbo, WJ, Lettieri, T, Liu, S, Maisseu, A, Maynard, KI, Masoro, EJ, McClellan, RO, Mehendale, HM, Mothersill, CE, Newlin, DB, Nigg, HN, Oehme, FW, Phalen, RF, Philbert, MA, Rattan, SI, Riviere, JE, Rodricks, JV, Sapolsky, RM, Scott, BR, Seymour, CB, Sinclair, DA, Smith-Sonneborn, J, Snow, ET, Spear, LP, Stevenson, DE, Thomas, Y, Tubiana, M, Williams, GM, & Mattson, MP (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222: 122–8.

Calabrese E, Blain R (2005) The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: An overview. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202: 289–301.

- Calabrese E, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 21, 91–97.
- Costantini D (2014) *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. A marriage between mechanistic and evolutionary approaches*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 348 s.
- Costantini D (2013) Oxidative stress and hormetic responses in the early life of birds. Teoksessa Laviola G, Macri S (toim.) *Adaptive and maladaptive aspects of developmental stress. Current topics in neurotoxicity* 3. Springer, New York. s. 257–273.
- Costantini D, Metcalfe NB, Monaghan P (2010) Ecological processes in a hermetic framework. *Ecology Letters* 13: 1435–1447.
- Costantini D, Verhulst S (2009) Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* 23: 506–509.
- Costantini D, Dell’Omo G (2006) Environmental and genetic components of oxidative stress in wild kestrel nestlings (*Falco tinnunculus*). *Journal of Comparative Physiology B* 176: 575–579.
- Cramp S, Perrins CM (1993) *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. Flycatchers to shrieks*, Vol. VII. Oxford University Press. 610 s.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian journal of medical research* 128: 412–25.
- Dauwe T, Janssens E, Bervoets L, Blust R, Eens M (2004) Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food. *Environmental Pollution* 131: 373–80.
- Descalzo E, Camarero P, Sánchez-Barbudo I, Martínez-Haro M, Ortiz-Santaliestra M, Moreno-Opo R, Mateo R (2021) Integrating active and passive monitoring to assess sublethal effects and mortality from lead poisoning in birds of prey. *Science of The Total Environment* 750: 142260.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 83: 47–95.
- Duffus JH (2002) “Heavy metals” – a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74: 793–807.
- Eeva T, Espín S, Sánchez-Virosta P, Rainio M (2020a) Weather effects on breeding parameters of two insectivorous passerines in a polluted area. *Science of The Total Environment* 729: 138913.
- Eeva T, Raivikko N, Espín S, Sánchez-Virosta P, Ruuskanen S, Sorvari J, Rainio M (2020b) Bird feces as indicators of metal pollution: pitfalls and solutions. *Toxics* 8: 124.
- Eeva T, Rainio M, Berglund Å, Kanerva M, Stauffer J, Stöwe M, Ruuskanen S (2014) Experimental manipulation of dietary lead levels in great tit nestlings: limited effects on growth, physiology and survival. *Ecotoxicology* 23: 914–928.
- Eeva T, Belskii E, Gilyazov A, Kozlov M (2012) Pollution impacts on bird population density and species diversity at four non-ferrous smelter sites. *Biological Conservation* 150: 33–41.
- Eeva T, Sillanpää S, Salminen J, Nikkinen L, Tuominen A, Toivonen E, Pihlaja K, Lehikoinen E (2008) Environmental pollution affects the plumage color of great tit nestlings through carotenoid availability. *EcoHealth* 5: 328–337.

- Eeva T, Belskii E, Kuranov B (2006) Environmental pollution affects genetic diversity in wild bird populations. *Mutation Research* 608: 8–15.
- Eeva T, Lehikoinen E (2004) Rich calcium availability diminishes heavy metal toxicity in Pied Flycatcher. *Functional Ecology* 18: 548–553.
- Eeva T, Lehikoinen E, Nikinmaa M (2003) Pollution-induced nutritional stress in birds: An experimental study of direct and indirect effects. *Ecological Applications* 13: 1242–1249.
- Eeva T, Lehikoinen E (1996) Growth and mortality of nestling great tits (*Parus major*) and pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a heavy metal pollution gradient. *Oecologia* 108: 631–639.
- El-Kazaz SE, Hafez MH (2019) Evaluation of copper nanoparticles and copper sulfate effect on immune status, behavior, and productive performance of broilers. *Journal of advanced veterinary and animal research* 7: 16–25.
- El-Missiry MA, Shalaby F (2000) Role of β -carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14: 238–243.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529–539.
- Espín S, Sánchez-Virosta P, Ruiz S & Eeva T (2020) Female oxidative status in relation to calcium availability, metal pollution and offspring development in a wild passerine. *Environmental Pollution* 260: 113921.
- Espín S, Ruiz S, Sánchez-Virosta P, Lilley T, Eeva T (2017) Oxidative status in relation to metal pollution and calcium availability in pied flycatcher nestlings – A calcium manipulation experiment. *Environmental Pollution* 229: 448–458.
- Espín S, Ruiz S, Sánchez-Virosta P, Eeva T (2016a) Effects of calcium supplementation on growth and biochemistry in two passerine species breeding in a Ca-poor and metal-polluted area. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 9809–9821
- Espín S, Martínez-López E, Jiménez P, María-Mojica P, García-Fernández AJ (2016b) Interspecific differences in the antioxidant capacity of two Laridae species exposed to metals. *Environmental Research* 147: 115–24.
- Espín S, Martínez-López E, León-Ortega M, Martínez JE, García-Fernández AJ (2014a) Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environmental Research* 131: 134–44.
- Espín S, Martínez-López E, Jiménez P, María-Mojica P, García-Fernández AJ (2014b) Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environmental Research* 129: 59–68.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.
- Flora G, Gupta D, Tiwari A. (2012) Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5:47–58.
- Fritsch C, Jankowiak Ł, Wysocki D (2019) Exposure to Pb impairs breeding success and is associated with longer lifespan in urban European blackbirds. *Scientific Reports* 9: 486.

- Galván I, Bonisoli-Alquati A, Jenkinson S, Ghanem G, Wakamatsu K, Mousseau TA, Møller AP (2014) Chronic exposure to low-dose radiation at Chernobyl favours adaptation to oxidative stress in birds. *Functional Ecology* 28: 1387–1403.
- Gangoso L, Alvarez-Lloret P, Rodriguez-Navarro A, Mateo R, Hiraldo F, Donazar J (2009) Long term effect of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. *Environmental Pollution* 157: 569–574.
- Gould E, Fowler BA, Engel DW (1989) Metal-exposed sea scallops: a review and update of the effects of copper, cadmium and zinc. *Marine Environmental Research* 28: 219–220.
- Gross JA, Chen TH, Karasov WH (2007) Lethal and sublethal effects of chronic cadmium exposure on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1192–1197
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York. 851 s.
- Harding LE (2008) Non-linear uptake and hormesis effects of selenium in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Science of the Total Environment* 389: 350–366.
- Harjavallan suurteollisuuspuisto: Historian vuosikymmenet (2010) http://www.suurteollisuuspuisto.com/Tiedostot/HistorianVuosikymmenet_20072010_A4_small.pdf (Viitattu 17.1.2019)
- Hileman, B (2007) Arsenic in chicken production. *Chemical & Engineering News* 85: 34–35.
- Hoffman, DJ (2002) Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquatic Toxicology* 57: 11–26.
- Isaksson C, Sturve J, Almroth BC, Andersson S. (2009) The impact of urban environment on oxidative damage (TBARS) and antioxidant systems in lungs and liver of great tits, *Parus major*. *Environmental Research* 109: 46–50.
- Isaksson C, Örnberg J, Stephensen E, Andersson S (2005) Plasma Glutathione and Carotenoid Coloration as Potential Biomarkers of Environmental Stress in Great Tits. *EcoHealth* 2: 138–146.
- James SM, Little EE (2003) The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 377–380.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3145–3175.
- Kiikkilä O (2003) Heavy-metal pollution and remediation of forest soil around the Harjavalta Cu-Ni smelter, in SW Finland. *Silva Fennica* 37: 399–415.
- Koivula MJ, Kanerva M, Salminen JP, Nikinmaa M, Eeva T (2011) Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings. *Environmental Research* 111: 362–370.
- Koivula M, Eeva T (2010) Metal related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution* 158: 2359–2370.
- Kozlov MV, Zvereva EL, Zverev VE (2009) *Impacts of point polluters on terrestrial biota: comparative analysis of 18 contaminated areas*. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 466 s.

Krumschnabel G, Manzl C, Berger C, Hofer B (2005) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 209: 62–73.

Kubin E, Lippo H, Poikolainen J (2000) Heavy metal loading. Teoksessa: *Forest condition in changing environment – the Finnish case* (Mälkönen E, toim.), s. 60–71. Springer, Netherlands.

Lambrechts MM, Adriaensen F, Ardia DR, Artemyev AV, Atienzar F, Banbura J, Barba E, Bouvier JC, Camprodon J, Cooper CB, Dawson RD, Eens M, Eeva T, Faivre B, Garamszegi LZ, Goodenough AE, Gosler AG, Gregoire A, Griffith SC, Gustafsson L, Johnson LS, Kania W, Keiss O, Llambias E, Mainwaring MC, Mand R, Massa B, Mazgajski TD, Moller AP, Moreno J, Naef-Daenzer B, Nilsson JA, Norte AC, Orell M, Otter KA, Park CR, Perrins CM, Pinowski J, Porkert J, Potti J, Remes V, Richner H, Ryttonen S, Shiao MT, Silverin B, Slagsvold T, Smith HG, Sorace A, Stenning MJ, Stewart I, Thompson CF, Tryjanowski P, Torok J, van Noordwijk AJ, Winkler DW and Ziane N (2010) The design of artificial nestboxes for the study of secondary hole-nesting birds: a review of methodological inconsistencies and potential biases. *Acta Ornithologica* 45: 1–26.

Laranjeiro MI, Alves L, Silva J, Calado J, Norte A, Paiva V, Lemos M, Ramos J, Novais S, Ceia F (2020) Assessment of environmental health based on a complementary approach using metal quantification, oxidative stress and trophic ecology of two gull species (*Larus michahellis* & *Larus audouinii*) breeding in sympatry. *Marine Pollution Bulletin* 159: 111439.

Lefcort H, Freedman Z, House S, Pendleton M (2008) Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: Is a little bit of pollution good? *EcoHealth* 5: 10–17.

Losdat S, Blount JD, Marri V, Maronde L, Richner H, Helfenstein F (2018) Effects of an early-life paraquat exposure on adult resistance to oxidative stress, plumage colour and sperm performance in a wild bird. *The Journal of Animal Ecology* 87: 1137–1148.

Loukola-Ruskeeniemi K, Lahermo P (2004) *Arseeni Suomen luonnossa: ympäristövaikutukset ja riskit*. Geologian tutkimuslaitos, Espoo. 173 s.

Lundberg A, Alatalo R (1992) *The pied flycatcher*. Poyser, London. 267 s.

Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Research Reviews* 7: 1–7.

Méndez-Rodríguez LC, Alvarez-Castañeda ST (2016) Assessment of trace metals in soil, vegetation and rodents in relation to metal mining activities in an arid environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97: 44–49.

Morkunas I, Woźniak A, Mai VC, Rucińska-Sobkowiak R, Jeandet P (2018) The role of heavy metals in plant response to biotic stress. *Molecules* 23: 2320.

Müller YMR, Rivero LBD, Carvalho MC, Kobus K, Farina M, Nazari EM (2008) Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. *Archives of Toxicology* 82: 445–451.

Mäkinen H, van Oers K, Eeva T, Ruuskanen S (2021) The effect of experimental lead pollution on DNA methylation in a wild bird population Epigenetics (ahead-of-a-print).

Nain S, Smiths JEG (2011) Subchronic lead exposure, immunotoxicology and increased disease resistance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 787–792.

- Nascarella MA, Stoffolano JG, Stanek EJ, Kostecki PT, Calabrese EJ (2003) Hormesis and stage specific toxicity induced by cadmium in an insect model, the queen blowfly, *Phormia regina* Meig. *Environmental Pollution* 124: 257–262.
- Neuenschwander S, Brinkhof M, Kölliker M, Richner H (2003) Brood size, sibling competition, and the cost of begging in great tits (*Parus major*). *Behavioral Ecology* 14: 457–462.
- Pacyna A, Ruman M, Mazerski J, Polkowska Ż (2018) Biological responses to environmental contamination. How can metal pollution impact signal honesty in avian species? *Ecology and Evolution* 8: 7733–7739.
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OS, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39: 1008–1018.
- Poikolainen J, Kubin E, Piispanen J, Karhu J (2004) Atmospheric heavy metal deposition in Finland during 1985–2000 using mosses as bioindicators. *Science of The Total Environment* 318: 171–185.
- Pourret O, Hursthouse A (2019) It's time to replace the term “heavy metals” with “potentially toxic elements” when reporting environmental research. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 4446.
- Rainio M (2013) *Metal-induced oxidative stress and antioxidant defence in small passerine birds*. Turun yliopiston julkaisu A II 278. 52 s.
- Rainio MJ, Eeva T, Lilley T, Stauffer J, Ruuskanen S (2015) Effects of early-life lead exposure on oxidative status and phagocytosis activity in great tits (*Parus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 167: 24–34.
- Rainio MJ, Kanerva M, Salminen JP, Nikinmaa M, Eeva T (2013) Oxidative status in nestlings of three passerine species exposed to metal pollution. *Science of the Total Environment* 454–455: 466–473.
- Rana SVS (2008) Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22: 262–284.
- Reynolds SJ, Mänd R, Tilgar V (2004) Calcium supplementation of breeding birds: directions for future research. *Ibis* 146: 601–614.
- Rodríguez-Martínez S, Galván I (2020) A source of exogenous oxidative stress improves oxidative status and favors pheomelanin synthesis in zebra finches. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 228: 108667.
- Ruiz SR, Eeva T, Kanerva M, Blomberg A, Lilley TM (2019) Metal and metalloid exposure and oxidative status in free-living individuals of *Myotis daubentoniid*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169: 93–102.
- Saçan MT, Oztay F, Bolkent S (2007) Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminium toxicity and effects on ultrastructure. *Biological Trace Element Research* 120: 264–272.
- Sánchez-Virosta P (2019) *Effects of arsenic on nestling development survival and physiology of passerines and the protective role of calcium*. Väitöskirja. Turun yliopisto. 118 s.
- Sánchez-Virosta P, Espín S, Ruiz S, Panda, B, Ilmonen P, Schultz SL, Karouna-Renier N, García-Fernández AJ, Eeva T (2020) Arsenic-related oxidative stress in experimentally dosed wild great tit nestlings. *Environmental Pollution* 259: 113813.

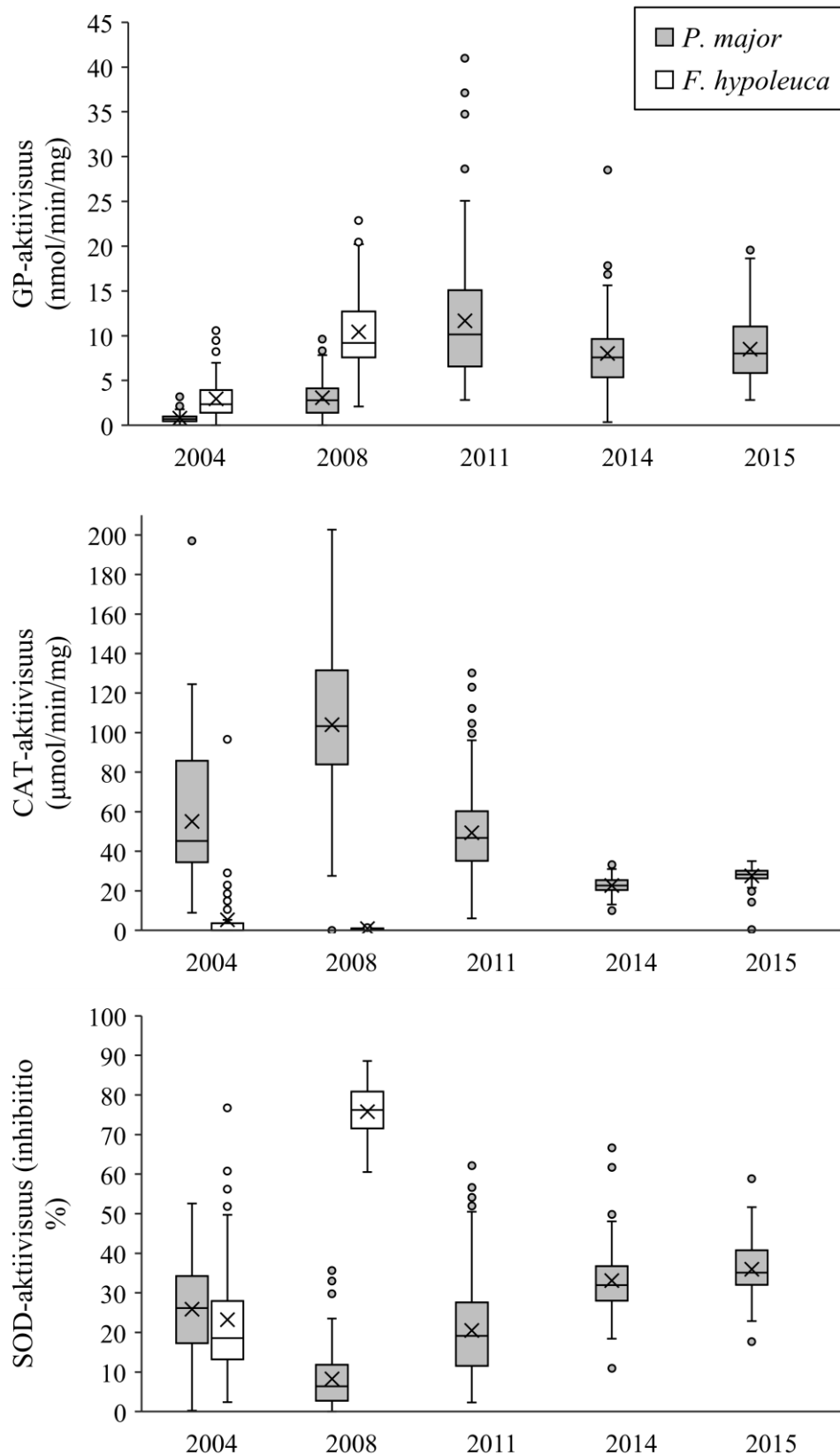
- Sánchez-Virosta P, Espín S, Ruiz S, Stauffer J, Kanerva M, García-Fernández AJ, Eeva T (2019) Effects of calcium supplementation on oxidative status and oxidative damage in great tit nestlings inhabiting a metal-polluted area. *Environmental Research* 171: 484–492.
- Sánchez-Virosta P, Espín S, Ruiz S, Salminen JP, García-Fernández AJ, Eeva T (2018) Experimental manipulation of dietary arsenic levels in great tit nestlings: Accumulation pattern and effects on growth, survival and plasma biochemistry. *Environmental Pollution* 233: 764–773.
- Sanderfoot OV, Holloway T (2017) Air pollution impacts on avian species via inhalation exposure and associated outcomes. *Environmental Research Letters* 12: 8.
- Scheuhammer AM (1987) The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: a review. *Environmental Pollution* 46: 263–295.
- Schmeisser S, Schmeisser K, Weimer S, Groth M, Priebe S, Fazius E, Kuhlow D, Pick D, Einax JW, Guthke R, Platzer M, Zarse K, Ristow M (2013) Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension. *Aging Cell* 12: 508–517.
- Schmidt C, Cheng C, Marino A, Konsoula R, Barile FA (2004) Hormesis effect of trace metals on cultured normal and immortal human mammary cells. *Toxicology and Industrial Health* 20: 57–68.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215: 213–219.
- Song X, Kenston SSF, Kong L, Zhao J (2017) Molecular mechanisms of nickel induced neurotoxicity and chemoprevention. *Toxicology* 392: 47–54.
- Stauffer J, Panda B, Ilmonen P (2018) Telomere length, sibling competition and development of antioxidant defense in wild house mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 169: 45–52.
- Stier A, Reichert S, Massemin S, Bize P, Criscuolo F (2012) Constraint and cost of oxidative stress on reproduction - correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Frontiers in Zoology* 9: 37.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 321–336.
- Swiergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A (2006) Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere* 65: 963–974.
- Thijssen S, Cuypers A, Maringwa J, Smeets K, Horemans N, Lambrichts I, Van Kerkhove E (2007) Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology* 236: 29–41.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology* 90: 1–37.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161–1208.
- Walker CH, Sibly RM, Hopkin SP, Peakall DB (2012) *Principles of Ecotoxicology*. 4. painos CRC Press, Boca Raton. 386 s.

Yang P, He XQ, Peng L, Li AP, Wang XR, Zhou JW, Liu QZ (2007) The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 70: 976–983.

Youssef SAH, El Sanousi AA, Afifi NA, El Brawy AMA (1996) Effect of subclinical lead toxicity on the immune response of chickens to Newcastle disease virus vaccine. *Research in Veterinary Science* 60: 13–16.

Zhang Y, Shen G, Yu Y, Zhu H (2009) The hormetic effect of cadmium on the activity of anti-oxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 157: 3064–3068.

LIITEET



- L1.** Vuosittaisten entsyymiaktiivisuuksien jakaumat lintulajeittain. Laatikossa ovat keskimäiset 50 prosenttia havainnoista ja loput havainnoista ovat janojen sisällä – lukuun ottamatta poikkeavia havaintoja, jotka on merkitty ympyröillä. Havainto katsotaan poikkeavaksi, mikäli sen etäisyys laatikosta on yli 1,5-kertainen verrattuna laatikon korkeuteen. Laatikon sisällä oleva poikkiviiva esittää mediaania ja rasti keskiarvoa.