

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT

**Molekulaarsed meetodid kalade vähitekke tõenäosuse ja
vähi esinemissageduse hindamiseks reostunud ja puhtas
keskkonnas**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Laura Atspol

Juhendaja PhD Richard Meitern

TARTU 2025

Sisukord

Sissejuhatus.....	4
Kasvajad ja nende tekitajad.....	5
Saasteained.....	7
Mikroplast.....	7
Raskemetallid.....	8
Orgaanilised saasteained.....	9
Pestitsiidid.....	10
DNA kahjustuste tekkemehhanismid.....	10
Molekulaarsed meetodid.....	13
Komeedi test.....	13
Fluorestsents in situ hübridisatsioon ehk FISH.....	15
Komeet -FISH.....	16
Planeerimata DNA kahjustuste parandus süntees.....	17
32P-järelmärgistamise meetod.....	19
Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR.....	20
Eksoomi sekveneerimine.....	21
Täisgenoomi sekveneerimine (WGS).....	23
Üksiku nukleotiidi polümorfism ehk SNP.....	24
Võrdlev genoomne hübridisatsioon.....	25
Koopianumbrite arv (CNV).....	26
RNA sekveneerimine.....	27
SSH meetod.....	28
Epigeneetika ja DNA metülatsioon.....	29
Proteoomika.....	30
Metabooloomika.....	31
Järeldused.....	33
Kokkuvõte.....	34
Summary.....	37
Viited.....	39

Infoleht

Vähk on kogum ebanormaalsetest paljunevatest rakkudest. Vähhkasvajad kurnavad peremeesorganismi ja haigus võib viia surmani. Erinevad kantserogeensed ühendid suurendavad vähiriski ja soodustavad selle haiguse tekkimist. Ka kaladel esineb vähhkasvajaid. Lisaks tavapärastele mudelorganismide uurimisele oleks väärtuslik uurida ka vabalt elavaid kalu, kuna neis võib leida vähikaitse mehhanisme, mis on teadusele seni tundmatud. Väहितekke tõenäosust saab hinnata mitmesuguste molekulaarsete meetoditega.

Erinevad meetodid aitavad mõista, kuidas erinevad mutageenid mõjutavad vähi teket ja arengut. Meetodite valik sõltub uuringu eesmärgist, organismist ja ressursside saadavusest. Lihtsamalt sooritavad testid sobivad suuremamahulistele uuringutele, keerukamad aga täpsemateks mehhanismide tuvastamiseks.

Vähk, mutageenid, vähk kaladel, molekulaarsed meetodid vähi tuvastamiseks.

B280, Loomaökoloogia

Cancer is a mass of abnormally proliferating cells. Cancers debilitate host organisms and the disease can lead to death. Various carcinogenic compounds increase the likelihood of getting cancer and promote the development of this disease. Cancers also occur in fishes. In addition to studying conventional model organisms, feral fish species could also have valuable input for research e.g for discovering new cancer defence mechanisms that are not yet known to science. A variety of molecular methods can be used to study the probability of getting cancer. These methods help to understand how changes in different parts of the genome influence cancer development and progression. The choice of methods depends on the purpose of the study, the organism and the availability of resources. Simpler tests are more suitable for larger studies, while more complex tests are more appropriate for precisely pinpointing the responsible targets.

Cancer, mutagens, cancer in fishes, molecular methods to detect cancer.

B280, Animal ecology

Sissejuhatus

Vähk on haigus, kus ühe koe rakud hakkavad kontrollimatult jagunema ning tungivad naaberkudedesse, häirides sellega organismi tavapärast talitlust. Rasketel juhtudel võib see lõppeda surmaga (Weinberg, 1996). Vähktõbe esineb mitte ainult inimestel, vaid ka metsikutel loomadel, sealhulgas kaladel. Veekeskkonnas elades puutuvad kalad pidevalt kokku vette lahustunud mutageenidega, mis võivad neis soodustada kasvajate teket. Kaladel on oluline roll toiduahelas ja veekeskkonna ökoloogilises tasakaalus. Seetõttu on nende tervislik seisund võtmetähtsusega kogu ökosüsteemi funktsioneerimisel.

Vähk kujuneb tavaliselt välja mitmete omavahel põimuvate ja komplekssete tegurite koostoimel, mis soodustavad rakkude ebanormaalsset ja kontrollimatut proliferatsiooni. Käesolevas töös antakse ülevaade vähi olemusest ning käsitletakse peamisi tegureid, mis võivad soodustada selle haiguse arengut.

Vähi uurimine kaladel on vajalik, et seda haigust paremini mõista (Schartl, 2014). Kalad on head mudelorganismid. Eriti palju on uuritud sebrakala (*Danio rerio*), mis on hea mudelorganism ka inimhaiguste uurimiseks (Schartl, 2014). Paljud teadustööd piirduvad kala kasvajate uurimisel inimese neoplaasia mudelitega, keskendudes peamiselt melanoomi seirele. Nendes uuringutes on mudelorganismideks tihtipeale safiir-mõõksaba (*Xiphophorus xiphidium*) hübriidid ja sebrakala (Ferraro *et al.*, 2024). Vähi uurimisel on tähtis kaalutletud ja läbimõeldud mudelorganismi valik. Valides uurimisobjektiks metsikult elavad loomad ja kalad, avaneb võimalus uurida vähi arengut looduslikes tingimustes ning avastada haiguse senitundmatuid aspekte. Eriti aktuaalne on see keskkondades, kus saastetase on kõrge, sest sellistes tingimustes elavad organismid võivad olla vähi suhtes suuremas ohus (Madhuri *et al.*, 2012). Seetõttu on oluline analüüsida, kuidas vähkkasvajad mõjutavad metsikute looma- ja kalapopulatsioonide tervist ning ökoloogilist tasakaalu.

Selleks, et aru saada, kuidas vähk organismis tekib, on vaja mõista, mis võis seda haigust põhjustada. DNA, RNA ja valguliste muudatuste tuvastamine ning nende mutatsioonide mõistmine on selle haiguse mõistmisel võtmetähtsusega. Lisaks, kui kasvajakasv on juba olemas ja tuvastatud, on vaja kindlaks teha, kuidas need rakud erinevad tervetest rakkudest. Selle lahknevuse eristamiseks on võimalik kasutada erinevaid molekulaarseid meetodeid.

Käesoleva töö eesmärk on välja selgitada, milliste molekulaarsete meetoditega oleks võimalik tuvastada vähkkasvajaid ja vähkkasvajaid soodustavaid aspekte vabalt elavatel kaladel. Täpsemalt on töö uurimisküsimuseks leida millised neist meetoditest sobivad paremini suuremahulistesse ökoloogilistesse uuringutesse, võttes arvesse meetodite praktilisust, kuluefektiivsust ja vajamineva proovi hulka. Molekulaarsed meetodid, mis kulutavad vähem materjali ja võimaldavad seda koguda ilma metslooma laborisse toomata või vigastamata, võiksid olla eelistatavad, kuna need on otstarbekamad ja kuluefektiivsemad. Samas selleks, et teadustöö oleks reaalselt väärtuslik ja pakuks õiget informatsiooni, on vajalik piisavalt suur valim (Andrade, 2020). See võib tähendada sadu kuni tuhandeid katse kordusi. Selle töö eesmärk ongi võrrelda erinevate analüütiliste lähenemisviiside tugevusi ja piiranguid, et teha kindlaks kõige sobivamad ja paremini rakendatavad meetodid metsikute organismide vähiuuringuteks suuremahuliste valimite puhul.

Kasvajad ja nende tekitajad

Kasvajaks saab pidada ebanormaalseks muutunud rakkude kogumikke, mis paljunevad kontrollimatult ja levivad teistesse keha kudedesse (Sharma *et al.*, 2025). Vähi korral on rakuline tasakaal proliferatsiooni ja programmeeritud rakusurma vahel häiritud. Defektid apoptootilistel radadel võimaldavad geneetiliste kõrvalekalletega rakkudel ellu jääda (Sjöström ja Bergh, 2001) Mutatsioonide järjestikune kuhjumine soodustab vähktõbe. Osa neist mutatsioonidest, nagu kasvaja supressorgeeni esimese koopia inaktiveerimine, võib-olla esmalt neutraalse mõjuga. Mõned mutatsioonid, mille tulemuseks on onkogeenide aktiveerimine, võivad rakkudele anda selektiivse kasvueelise (Poulsgaard *et al.*, 2023).

Vähkkasvaja tekkimiseks peavad mutatsioonid enamasti esinema vähemalt kuues või enam raku jagunemist kontrollivas geenis. Muutused geneetilise materjali terviklikuses võivad esile kutsuda protoonkogeenide muundumise onkogeenideks, põhjustades rakkude piiramatut jagunemist. Kasvajate supressorgeenide mahasurumine või nende funktsiooni kaotus aitab kaasa neoplaasia tekkele (Weinberg, 1996). Kemikaalid võivad põhjustada vähi avaldumist organismis. Eelkõige mõjutades tüvirakkude jagunemiste arvu, suurendades mutatsioonide tekkimise tõenäosust ja kiirendades aega millega ebanormaalsed rakud arenevad tuvastatavateks kasvajateks (Harrison ja Doe, 2021). Halvaloomuliseks kasvajakaks peetakse organismi erinevatest rakutüüpidest lähtunud, oma välimuselt ebaloomulikke, kiiresti paljunevaid rakke, mis ei allu enam organismi kontrollile. Erinevalt healoomulistest kasvajatest on vähkkasvajatele omane kiire kasv, tungimine teistesse kudedesse ja levimine organismis siirete ehk metastaaside kaudu (Labotkin, 2004). Lisaks inimestele esineb neoplaasia ehk rakkude kontrollimatut vohamist ka metsikutel loomadel. Vabalt elavate loomade haiguste seire on oluline ka inimeste tervise seisukohalt, sest sageli asustatakse samu elupaiku (Pesavento *et al.*, 2018). Neoplaasia võib avaldada mõnele liigile märkimisväärset mõju. Vähk võib vähendada looduslikele populatsioonidele sigimisedukust ja ellujäämisvõimet. Inimtekkelised otsesed mõjud, nagu reostus ja populatsiooni killustamise kaudu vähenenud geneetiline mitmekesisus, võivad suurendada vähktõve levimust eluslooduses (McAloose ja Newton, 2009). Metsikutel loomadel on vähki keeruline varajases staadiumis tuvastada, kuna puuduvad head mitteinvasiivsed meetodid. Lisaks varieerub liikide vastuvõtlikkus haigusele, mis teeb keerulisemaks mudelliigi valiku (Giraudeau *et al.*, 2024). Samuti võib vähk luua soodsaid tingimusi muude probleemide jaoks, nagu sekundaarsed parasiidid ja patogeensed infektsioonid. Seetõttu võivad vähki põdevad loomad surra enne, kui ilmnevad ilmselged kliinilised sümptomid (Hendricks *et al.*, 2020). Paljud

uuringud näitavad, et keskkonnasaasteainetel on loomade vähkkasvajate arengule märgatav mõju (Brown *et al.*, 1973, Browning *et al.*, 2015 Martineau *et al.*, 2002).

Saasteained suurendavad neoplaasia esinemissagedust mitmete mehhanismide kaudu. Peamisteks häiritud protsessideks võivad olla DNA parandusmehhanismid, immuunsüsteemi ja hormoonsüsteemi talitlus (Rogers *et al.*, 2013). Lisaks võivad saasteained aidata kaasa infektsioonist põhjustatud onkogeneesile (Giraudeau *et al.*, 2018). Vähktõve tekkimise tõenäosust mõjutavad individuaalselt paljud tegurid, mida saab pidada, kas välisteks (nt keskkonnatingimused) või isendile omasteks (nt geneetilised tegurid) (Hendricks *et al.* 2020).

Viimastel aastakümnetel on kalad kui mudelorganismid pälvinud üha suuremat tähelepanu keskkonnatingimustest välja arenenud vähiuuringutes. Paljusid erinevaid liike on uuritud mitteimetajatest selgroogsete mudelitena kantserogeensete ainete testimisel. Võrreldes imetajatega tekivad kaladel kasvajakergemini, kuna reostatud veekeskkonnas on kalad pidevalt kontaktis kantserogeenidega (Sharma, 2012). Paljusid kalaliike on kasutatud surrogaatidena vähi mehhanismide paremaks mõistmiseks. Lisaks on kalad head ökoloogilise saastatuse indikaatorid vees ja toiduahelas. Põhjalise eluviisiga kalad võivad olla eriti haavatavad. Eelkõige seetõttu, et neil liikidel on suurem krooniline kokkupuude vette sattunud saasteainetega ja need liigid võivad toiduks tarbida saastunud selgroogseid (McAloose ja Newton, 2009).

Saasteained

Veeökosüsteemid on omavahel väga tihedalt seotud. Vees ja atmosfääris kulgevate transporditeed muudavad veeökosüsteemid haavatavaks potentsiaalse reostuse suhtes. Suurte saasteainete koguste eraldumine võib põhjustada veeorganismide ulatusliku äkksurma. Madalamat saastetaset ja mitmete saasteainete segunemist on keerulisem seirata ning see võib põhjustada patoloogiaid organismides peale pikaajalist kuhjumist. Looduskaitsest seisukohast võimaldab vähijuhtumite peamise põhjuste mõistmine paremini ennustada looduslike populatsioonide haavatavust onkogeensete saasteainete suhtes (Baines *et al.*, 2021).

Mikroplast

Mikroplastid on alla 5 mm pikkused plasttükid, mis tekivad keskkonnas kui see on reostatud plastikmaterjalidega (Padervand *et al.*, 2020). Mikroplastid on valmistatud mitmesugustest polümeeridest, mida on täiendatud erinevate lisanditega. Neid materjale kasutatakse paljude toodete valmistamiseks. Mikroplasti leidub erinevates värvides. Keskkonnas võib mikroplast absorbeerida suurel hulgal keemilisi saasteaineid, sealhulgas raskmetalle ja püsivaid orgaanilisi saasteaineid (Rochman *et al.*, 2019). Keskkonna saastumine mikroplastiga on kasvav probleem, mis kujutab ohtu loomade ja inimeste tervisele. Mikroplastid võivad oma olemasoluga mõjutada geeniekspressiooni ja epigeneetilist kontrolli. Mikroplastid võivad põhjustada kehas põletikulisi reaktsioone, häirida redoks-tasakaalu ja mõjutada negatiivselt rakutsükli regulatsiooni. Lisaks võivad need matkida hormoone, nagu östrogeen ja androgeen soodustades sellega vähirakkude teket ja arengut (Goswami *et al.*, 2024). Mikroplasti kogunemine on probleem nii maismaa- kui ka veekeskkondades. Üldiselt peetakse plaste biokeemiliselt inertseteks materjalideks, mis ei interakteeru endokriinsüsteemiga molekuli suure suuruse tõttu. Nende suur suurus takistab plasti tungimist läbi rakumembraani. Merekeskkonnas leiduvad plastjätmed kannavad enda küljes väiksema molekulmassiga kemikaale ($MW < 1000$). Neil kemikaalidel on võime tungida rakkudesse, häirida bioloogiliselt oluliste molekulide funktsioone ja kahjustada endokriinsüsteemi tööd (Teuten *et al.*, 2009).

Mikroplasti osakesed satuvad loomade organismi erinevatel viisidel. Paljud linnud, kalad, kilpkonnad ja mereimetajad peavad ekslikult plastikut toiduks. Mingil määral võib plastik sattuda loomade seedesüsteemidesse ka plastikust toitunud saakloomade söömisel (Teuten *et al.*, 2009). Mikroplastist põhjustatud kahjustused võivad varieeruda. Füsioloogiliselt võib mikroplasti kogunemine seedesüsteemis rikkuda kalade metabolismi, kuna see pole kaladele seeditav toiduallikas. Mikroplastist toitumine põhjustab alakaalulisust ja see võib kalade organismis ladestuda olulistes organistes nagu lõpused, soolestik, magu ja lihased. Säärane mikroplasti kogunemine võib põhjustada kasvupeetust, hormonaalseid ja metaboolseid häireid, oksüdatiivset stressi, immunoloogilisi ja neuroloogilisi häireid. Lisaks võib mikroplastide kogunemine seedetraktis põhjustada füüsilisi kahjustusi ja ummistusi (Bhuyan, 2022). Eriti haavatavateks mikroplasti suhtes peetakse filter toidulisi kalu, nende mitteselektiivse toitumiskäitumise tõttu (Bhuyan, 2022).

Raskemetallid

Raskemetallide sattumine veekeskkonda on tõsine saasteprobleem (Aziz *et al.*, 2023). Mõned raskemetallid, sealhulgas vask, koobalt, kroom, mangaan, tsink, nikkel ja raud, on elusorganismide jaoks olulised ja mängivad tähtsat rolli erinevates protsessides. Samas on teised elusorganismide jaoks ebavajalikud. Arseen, kaadmium, plii ja elavhõbe on toksilise toimega (Bibi *et al.*, 2023). Organismi jaoks vajalike metallide puudus põhjustab haigusi ja organismi nõrgenemist. Raskemetallidel puudub bioloogiline otstarve ja need on ksenobiootikumid ehk kehavõõrad ühendid. Suuremates kontsentratsioonides on neil genotoksilised ja mutageensed omadused (Tae *et al.*, 2020). Raskemetallidel on omadus akumuleeruda toiduahelas. Seetõttu, mida kõrgemal asetseb elusolend toiduahelas, seda tõenäolisemalt on organismil kokkupuude nende kahjulike metallidega. Erinevatel kalaliikidel on erinevad elupaigad ja seetõttu on nende kehasse sattuvate raskemetallide kogus erinev. Eriti haavatavad on põhjalise eluviisi ja toitumisega kalad, kuna setetesse sadeneb kogu veesambas sisalduvad ained (Li *et al.*, 2015)

Orgaanilised saasteained

Eksisteerivad ka orgaanilistest ainetest koosnevad saasteained. Üheks oluliseimaks neist on polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud ehk PAH-id. Neid ühendeid esineb looduslikult kivisöes, toornaftas ja mujal ning need vabanevad söe, nafta, gaasi ja puidu põletamisel. PAH-id võivad seonduda õhus olevate osakestega ja kanduda mujale (CDC, 2024). Oma keemilise koostise tõttu suudavad PAH-ühendid kergesti läbida bioloogilisi membraane ja akumulieruda organismis. PAH-id on olulised keskkonnareostajad, kuna need on laialdaselt levinud ja neil on kantserogeensed omadused (Feng *et al.*, 2025). Kõik PAH-id on vees tahked ja keemiliselt mitteaktiivsed oma suure molekulaarstruktuuri tõttu ning päikese ultraviolettkiirguse olemasolul on paljud neist molekulidest tugevalt mürgised. Veekeskkonda sattudes seonduvad need ühendid kiiresti orgaaniliste ja anorgaaniliste tahkete osakestega, mis omakorda sadenevad veekogu põhja (Tuvikene, 1995). PAH-id satuvad veekeskkonda peamiselt naftareostuse, jõgede äravoolu ning linna- ja tööstusreovee kaudu. Madala molekulmassiga (LMW) PAH-d püsivad pärast vabanemist tõenäolisemalt vees, kus veeorganismid võivad need alla neelata või sisse hingata. Kõrge molekulmassiga (HMW) PAH-id vajuvad setetesse ja püsivad seal kaua, kuna need ühendid ei oksüdeeru fotokeemiliselt ega lagune bioloogiliselt (Singh *et al.*, 2023). Hapnikvaestes tingimustes

sattudes võivad PAH-ühendid seal pikk aega püsida. Saastunud toitu ja vett tarbides ning reostunud setetega kokku puutudes võivad kalad ja teised veeloomad kergesti PAH-ühendeid omastada. Mida rohkem leidub vees orgaanilisi ühendeid, seda paremini saavad PAH-id seal levida. PAH-id on toksilised biotransformatsiooni tõttu. See muudab ühendid toksilisteks metaboliitideks, mis suudavad kovalentselt seonduda erinevate makromolekulidega nagu shDNA, RNA ja valgud. Valdav osa PAH-i metaboliitidest on vees lahustuvad ja neid saab eritada sapipõie või uriini kaudu. Krooniline kokkupuude PAH-idega pärsib immuunsüsteemi tööd, sealhulgas melano-makrofaagide keskuste arvu vähenemist maksas ja T-lümfotsüütide proliferatiivsete reaktsioonide pärssimist. Lisaks on PAH-idel potentsiaalne negatiivne mõju kalade paljunemisele (Tuvikene, 1995).

Pestitsiidid

Pestitsiide kasutatakse laialdaselt põllumajandussektoris, et tõsta põllukultuuride saagikust väiksema tööjõukuluga (Ullah ja Zorriehzahra, 2015). Pestitsiidide füüsikalised ja keemilised omadused varieeruvad sõltuvalt ainetest (Amenyogbe *et al.*, 2021). Tahtmatu kokkupuude pestitsiididega põhjustab toksilisust paljudes elusolendites. Suurematel kontsentratsioonidel võivad pestitsiidid suurendada suremust, samas kui subletaalsetes kogustes võivad need ained põhjustada erinevaid rakulisi muutusi (Ullah ja Zorriehzahra, 2015). Veesüsteemides settivad pestitsiidid enamasti põhjasetetesse ja mõjutavad oma toksiliste omadustega sealset elustikku. Pestitsiidide kuhjumine veekogudesse põhjustab mitmesuguseid tagajärgi. Bioakumulatsiooni tõttu on toiduahela tipus olevad liigid haavatavamad. Kalades mõjutavad need ühendid esmalt maksa, neerusid, aju ja lõpuste tegevust. Pidev ja üleliigne fungitsiidide, herbatsiidide ja insektitsiidide kasutamine on seostatud kalade populatsioonide vähenemisega. Lisaks mõjuvad pestitsiidid negatiivselt endokriinsüsteemile, põhjustades kasvuhäireid, vähki, hingamisteede haigusi ja negatiivseid neuroloogilisi mõjusid (Amenyogbe *et al.*, 2021).

DNA kahjustuste tekkemehhanismid

Vee ökosüsteemis võivad kalad kokku puutuda erinevate saasteainetega, mis võivad põhjustada reaktiivsete hapniku osakeste (ROS) ülemäärast hulka. Oksüdatiivne stress on olukord, kus ROS kontsentratsioon on krooniliselt suurenenud, häirides seeläbi rakkude metabolismi ja regulatsiooni ning kahjustades raku koostisosi (Lushchak, 2011). Oksüdatiivne stress avaldab kahjulikku mõju rakkude makromolekulidele (Hamed *et al.*, 2020). Pikaajaline

oksüdatiivne stress võib põhjustada enneaegset rakulist vananemist, põletikku, vähki või muid haigusi (National Cancer Institute, 2024). Paljud eelpool nimetatud saateained on muuhulgas ka oksüdatiivse stressi esilekutsujad (Lushchak, 2011). Siiski, lisaks kemikaalide ja raskemetallide toksilistele omadustele mõjutavad kalade redokstasakaalu ka teised neid ümbritsevad tegurid, sealhulgas hapniku hulk vees, pH ja temperatuur (Chowdhury ja Saikia, 2020).

Reaktiivsed hapnikuühendeid peetakse normaalseks osaks elusolendite metabolismis, aga on oluline, et neid ühendeid ei oleks organismis liiga palju. Loomadel on evolutsiooni käigus välja arenenud erinevad kaitsesüsteemid oksüdatiivse stressi kahjulike mõjude neutraliseerimiseks. Liiga paljude reaktiivsete hapnikuühendite olemasolu võib kahjustada teisi rakuliselt hädavajalike biomolekule valke, lipiide ja DNA-d ning põhjustada raku üldiste funktsioonide kahjustusi. Oksüdatiivne stress võib DNA kahjustuste kaudu põhjustada apoptoosi ning ülemäärane programmeeritud rakusurm nõrgestab organismi, muutes elusolendi haavatavamaks teistele teguritele (Cheng *et al.*, 2018). Kahjustatud DNA-ga rakkudel on suurem risk muutuda vähirakkudeks. DNA kahjustuseks võib pidada muutusi DNA põhistruktuuris, mida ei replitseerita, kuid millelt toimub DNA replikatsioon (Bernstein *et al.*, 2013). DNA kahjustustel on erinevaid vorme, näiteks: ühe ahela katkestused, kaheaahelalised katkestused, kovalentselt seotud keemilised DNA aduktid, oksüdatiivsest stressist indutseeritud kahjustused ja DNA-DNA või DNA-valgu ristsidemed (Barnes *et al.*, 2018). Kahjustunud alusega DNA ahelal võib replikatsiooni käigus komplementaar ahelasse vea ülekanda ja sealt omakorda viga edasi toota. Lisaks võib DNA kaheaahelaliste katkestuste parandamisel esineda ebatäpsused. Mutatsioone saab vältida, kui DNA parandussüsteem tunnevad ära ebanormaalsused ja parandavad need enne replikatsiooni (Bernstein *et al.*, 2013). DNA replikatsioon on olemuselt kolmeosaline protsess, mis koosneb DNA lahtipakkimisest, komplementaarse ahela loomisest ja mittevastavuste parandamisest. Pärast seda protsessi parandatakse kõik allesjäänud ebakõlad ning keskkonnatingimustest põhjustatud kahjustused. Vigade ilmnemisel on DNA parandamine ülioluline kaitseprotsess. DNA kahjustuste parandamine supresseerib kasvajate teket ning takistab mutatsioonidega rakkude vohamist (Brumer ja Shakhnovich, 2004). DNA kahjustused esinevad nii paljunevates proliferatiivsetes rakkudes kui ka diferentseerunud, mittejagunevates rakkudes (Iyama ja Wilson, 2013). Somaatilistes rakkudes on vead DNA parandamisel mutatsioonide peamine allikas. Vähirakkude kiire proliferatsioon kiirendab DNA mutatsioonide kuhjumist (Wang-Michelitsch ja Michelitsch, 2015). Lisaks võivad mutatsioonid aktiveerida onkogeene

või inaktiveerida kasvaja supressorgeene (Bernstein *et al.*, 2013). Mõned DNA kahjustused on peamiselt mutageensed, teised aga tsütotoksilised või tsütostaatilised. Paljud DNA kahjustused võivad olla mõlemat, olenevalt kahjustuste asukohast ja arvust, rakutüübist ning rakutsükli ja diferentseerumise staadiumist (Hoeijmakers, 2009). Mutatsioonide akumulatsioon rakus võib põhjustada genoomset ebastabiilsust, mis omakorda võib viia vähitekkeni (Feitsma ja Cuppen, 2008). Vähhkasvajad tekivad üldjuhul mutatsioonide kogumi tõttu, mis annab sellistele rakkudele paljunemisel eelise. Kui mutatsioonidel on geenid normaalse DNA struktuuriga, siis ei saa neid DNA parandamise protsessidega ära tunda ega eemaldada (Bernstein *et al.*, 2013).

Lisaks otsestele mutatsioonidele DNA ahelas esineb ka epigeneetilisi muutusi, mis kohati sarnanevad mutatsioonidega (Zhao ja Shilatifard, 2019). Kasvaja supressorgeenide epigeneetiline vaigistamine on funktsionaalselt samaväärne mutatsioonide ja deletsioonidega ning mängib olulist rolli vähi arengus (Grønbaek *et al.*, 2007). Epigeneetiliste modifikatsioonide kuhjumine aja jooksul võib suurendada vastuvõtlikkust haigustele ja häiretele. Vähi puhul on epigeneetilised muutused, DNA metülatsoonimustrite muutused, justkui eelnev märk DNA mutatsioonilistele muutustele. See näitab epigeneetiliste ja geneetiliste muutuste vastastikmõju vähi progresseerumisel (Granada *et al.*, 2018). Epigeneetilised muutused kanduvad tavaliselt rakujagunemisel edasi tütar-kromosoomidesse. Enamikul epigeneetilistest muutustest on oluline osa raku diferentseerumises, mis võimaldab eri tüüpi rakkudel täita erinevaid rolle, kuna enamus geene ei ole korraga aktiivsed epigeneetiliste modifikatsioonide tõttu. Sellegipoolest leidub ka ebanormaalseid, programmeerimata epigeneetilisi muutuseid, mis mõjutavad rakkude toimimist; selliseid muutusi nimetatakse epimutatsioonideks (Bernstein *et al.*, 2013).

Keskkonnasaastest põhjustatud DNA kahjustuste teket on näidatud Göteborgi sadamast pärit emakatel (*Zoarces viviparus*, Frenzilli *et al.*, 2004). Kolm nädalat pärast õlireostust oli reostunud piirkonnast pärit kaladel rohkem DNA kahjustusi ja suurem PAH-i metaboliitide sisaldus sapis kui saastumata piirkonnas püütud kaladel. Märkimisväärset taastumist õlireostusest täheldati alles 5 kuud pärast intsidenti ja, sedagi vaid otse lekkekohast pärit isendite puhul. Göteborgi sadama keskosas püütud kalade näitajad olid jätkuvalt kõrged ka pärast 5 kuud (Frenzilli *et al.*, 2004).

Põhja-Ameerika kõrgelt linnastunud ja tööstuslikult arenenud piirkondade metsikute kalade populatsioonides on tuvastatud erakordselt kõrge maksakasvajate, preneoplastiliste ja

mitteneoplastiliste maksakahjustuste esinemissagedus. Maksakasvajaid esines Atlandi pisitursal (*Microgadus tomcod*) saastunud Hudsoni jõe suudmes, Atlandi ookeani rannikul, rohkem kui Connecticutist suhteliselt saastamata jõesuudmest pärit kaladelt. Hudsoni jõe suudmes esines maksakasvajaid 44% üheaastastel kaladel ja 93% kaheaastastel kaladel. Connecticutis Pawcatucki jões oli üheaastastel kaladel maksakasvajaid 3% ja kaheaastastel kaladel 10%. Kahjustused kalade maksades olid levinumad suurematel isenditel, mis viitab seosele kasvukiiruse ja kasvaja arenemise tõenäosuse vahel. Maksarakkude keemiline analüüs paljastas kõrge pestitsiidide hulga ning suurtes kogustes raskemetalle. Hudsoni jõe suudmealade kudemispiirkondade keemiline saastumine koos suviste kõrgete temperatuuridega võib põhjustada täheldatud maksakahjustuste kõrget taset (Dey *et al.*, 1993).

Tööstuste poolt saastatud Black Riveril Põhja-Ameerikas on maksakasvajate sagedus tõusnud harilikul kasssägäl (*Ameiurus nebulosus*). Maksakasvajad, peamiselt kolangiokartsinoomid, suurenesid Black Riveri harilikel kasssägadel vanusega oluliselt, esinedes 28–44% 4-aastastel kaladel. Orgaaniliste saasteainete tase oli Black Riveri harilikes kasssägades kõrgem kui Buckeye järve omades. Polünukleaarsete aromaatsete süsivesinike tase oli eriti kõrge, sealhulgas leitud kantserogeene nagu bens[*a*]antratseen ja bensopüreen (Baumann *et al.*, 1987).

Põhjalise eluviisiga kaladel nagu Norra tursik (*Trisopterus esmarkii*), ameerika ebalest (*Pseudopleuronectes americanus*) ja *Pleuronectes vetulus* on näidatud hepatotsellulaarete kartsinoomide, kolangiokartsinoomide, s ja epidermaalseid kasvujate esinemisageduse korreleerumist saasteainete hulgaga põhjasetes. (Wirgin ja Waldman, 1998). Seejuures demonstreeriti laborikatsetes erinevaid molekulaarseid meetodeid kombineerides saasteainete mõju nii DNA terviklikusele kui ka geeniekspressioonile.

Molekulaarsed meetodid

Komeedi test

Üherakuline geelelektroforees ehk komeedi analüüs on välja kujunenud standardseks DNA kahjustuste hindamise meetodiks, kuna see on võrdlemisi lihtne ja soodne meetod erinevate ainete genotoksilisuse hindamiseks (Dhawan *et al.*, 2009). Komeedi analüüsiga uuritakse enamasti loomset päritolu rakke. Neid rakke kasvatatakse, kas kultuuris või

isoleeritakse soovitud organismist. Võimalik on uurida ka taimerakke, kuid enne testi sooritamist tuleb eemaldada tselluloosist rakusein, sest see takistab DNA vabanemist ja komeedi saba moodustumist (Santos *et al.*, 2015). Analüüsi saab sooritada eri päritolu rakkudega, sealhulgas vere-, maksa-, neeru-, aju-, põrna-, luuüdi- ja spermarakkudega (Gajski *et al.*, 2019). Komeedi testi sooritamiseks on vaja elusrakke, mis lüüsitakse (Çiftçi *et al.*, 2016). Lüüsiga eemaldatakse rakkudelt membraanid, tsütoplasma ja nukleoplasma (Tice *et al.*, 2000). Seda tehakse, et vabastada rakus olev DNA ja võimaldada edasine pärilikusmaterjali analüüs geelelektroforeesiga (Çiftçi *et al.*, 2016). Komeedi testil on kaks varianti – aluseline ja neutraalne. Mõlemad on piisavalt tundlikud, et tuvastada ka alla 1 grey kiirguse poolt põhjustatud DNA katkestusi (Afanasieva ja Sivolob, 2018). Leeliselises keskkonnas toimub DNA ahelate lahtikeerumine ning komeedi sabas olev DNA muutub granulaarsemaks. Aluseline keskkond muudab sabad paremini nähtavaks ja aitab kahjustusi paremini tuvastada, kuid see ei suurenda testi tundlikkust, vaid parandab loetavust (Collins, 2004). DNA kahjustused mõjutavad, kas DNA liigub komeedi saba suunas või jääb peapiirkonda – see toimub sõltumatult pH-st. Mõlema testi abil on võimalik tuvastada nii ühe- kui kaheaahelalisi katkestusi. Kahjustuste tõsiduse suurenedes suureneb sabas DNA värvumise intensiivsus, kuid mitte saba pikkus, mis sõltub DNA silmuste lõdvendamisest (Collins *et al.*, 2008). Komeedi testi eeliseks on see, et tööks piisab väikesest kogusest rakkudest, lisaks ei ole vaja eelnevat mitootilist stimulatsiooni. Testida saab erinevat tüüpi rakke ja mõõta täpselt eri tüüpi DNA kahjustusi (Afanasieva ja Sivolob, 2018). Siiski ei ole meetod kuigi standardiseeritud – eri laborid kasutavad erineva koostise ja kestusega lüüsilahuseid ning elektroforeesi kestus võib varieeruda 20–60 minuti vahel (Collins, 2004). Sellised erinevused võivad mõjutada mutageenide toimet, DNA parandamise hinnangut ja teatud haigustega seotud kahjustuste tõlgendust (Afanasieva ja Sivolob, 2018). Tavapärase komeedi analüüsi piiranguks on elektroforeesiplatvormi suurusest tingitud vähene proovide arv. Läbilaskevõime suurendamiseks on välja töötatud suurendatud võimekusega versioonid, näiteks geelide suuruse vähendamine (Azqueta *et al.*, 2013). Lisaks on arendatud kõrge läbilaskevõimega versioon – mitmekambriline plaat (MCP), millel on 96 süvendit. See võimaldab töödelda kuni 400 proovi päevas, viies neis samaaegselt läbi kogu protsessi: lüüs, DNA lahtikerimine, elektroforees, neutraliseerimine ja värvimine (Stang ja Witte, 2009).

Fluorestsents in situ hübridisatsioon ehk FISH

Fluorestsents in situ hübridisatsioon ehk FISH on laialdaselt kasutatav meetod spetsiifilise geneetiliste järjestuse leidmiseks. Seda kasutatakse geneetiliste haiguste diagnoosimisel ja geenide kaardistamisel (Bishop, 2010). Lisaks on võimalik selle meetodiga tuvastada geneetilisi kõrvalekaldeid, mis soodustavad erinevate vähitüüpide teket. FISH-testi põhiidee seisneb interfaasiliste rakkude või metafaasis olevate kromosoomide tuuma DNA hübridiseerumises nukleiinhappesondiga. Sonde ehk märgistatud ahela kohti saab luua ja markeerida erinevatel viisidel, kas kaudselt haptteeniga või otseselt fluorofoori lisamisega (Shakoori, 2017). Märgistatud sond ja sihtmärk-DNA pannakse kokku pärast DNA denatureerimist, see võimaldab sondil paremini seostuda komplementaarse DNA järjestusega. Kaudselt märgistatud, see tähendab mitte fluorestseeruva haptteeniga visualiseerimisel, on haptteeni visualiseerimiseks vaja ensümaatilist või immunoloogilist lisaetappi. FISH-testi lõpuks hinnatakse fluorestseeruvaid signaale fluorestsentsmikroskoobi abil (Shakoori, 2017). FISH-testi genoomsel DNA analüüsil võivad sondid kasutada märklauana unikaalseid DNA järjestusi, korduvaid DNA järjestusi, terveid kromosoomi harusid või terveid kromosoomide. Ainulaadsete järjestuste sondid on kasulikud spetsiifiliste geenide või genoomsete piirkondade muutuste jälgimiseks (Tsuchiya, 2011). Lisaks saab neid kasutada ka genoomsete ümberkorralduste, näiteks translokatsioonide tuvastamiseks. Korduva järjestusega sonde kasutatakse põhiliselt tsentromeersete või peritsentromeersete piirkondade uurimiseks. Sonde, mis on suutelised hübridiseeruma osa kromosoomi haruga või lausa terve kromosoomiga, saab kasutada kromosomaalsete ümberkorralduste iseloomustamiseks (Tsuchiya, 2011). FISH-testi sooritamiseks on vaja vaadelda vähemalt 200 rakku (Wolff *et al.*, 2007). FISH-testi saab kasutada paljude tahkete, pehmete kudede, vereloome-, lümfoidsete- ja kesknärvisüsteemi kasvajate puhul. Alkoholiga fikseeritud või õhu käes kuivatatud tsütoloogilised proovid sobivad eriti hästi, kuna neis rakkudes on väiksem tuumade kattuvus (Savic ja Bubendorf, 2016). FISH-test kombineerib molekulaarseid ja tsütoloogilisi meetodeid. Sellega on võimalik sooritada nii DNA analüüsi kui ka kromosoomiuringuid üherakulisel tasandil. FISH on laialdaselt kasutusel erinevates uurimisvaldkondades nagu kliiniline geneetika, neuroteadus, reproduktiivmeditsiin, toksikoloogia, mikroökobioloogia, evolutsioonibioloogia, võrdlev genoomika, rakugenoomika ja kromosoomibioloogia (Volpi ja Bridger, 2018). Algse FISH protokolliga muutmine ja tänapäevasemate protseduuride lisamine on loonud palju spetsiifilisemaid FISH-i rakendusi (Volpi ja Bridger, 2018). FISH-testi negatiivseks aspektiks võib pidada keerukaid protokolle, mis sisaldavad mitmeid fikseerimis-,

inkubeerimise- ja pesemisetappe. Kõik need sammud hõlmavad erinevaid lahuseid ja tööks vajalikke temperatuure ning on seetõttu üldiselt aja- ja töömahukad (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2020). Meetodi keerukus, suhteliselt kõrge hind, fluorestseeruvad sondid ja lugemiseks vajalik kõrgekvaliteediline mikroskoopia muudavad kogu protsessi kulukaks ja piiravad selle laialdast kasutust. Testi kiibipõhiseks muutmine pole seni veel korralikult õnnestunud (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2020).

Komeet-FISH

Molekulaarne meetod, millega saab mõõta DNA kahjustusi ja samaaegselt tuvastada kindlaid geneetilisi järjestusi, on komeet-FISH meetod. See test on kasutatav üldiste ja piirkonnaspetsiifiliste DNA kahjustuste tuvastamiseks ja hindamiseks üksikutes rakkudes (Rapp *et al.*, 2005). Komeet-FISH test ühendab kaks meetodit: komeedi-testi ja FISH tehnikat. Kui komeedi test võimaldab eraldada DNA fragmente fragmenteerimata DNA-st, siis FISH test aitab tuvastada nii huvipakkuvaid spetsiifilisi märgistatud DNA regioone kui ka terveid kromosome. Kahe tehnika kombinatsiooni kasutatakse eelkõige kohaspetsiifiliste katkestuste tuvastamisel DNA piirkondades, kus on teada järjestused erinevate haiguste avaldumiseks (Glei *et al.*, 2009). Komeet-FISH-i abil uuritava piirkonna suurus võib varieeruda ühest geenist kuni terve kromosoomini. Komeet testiga analüüsitakse 10 kuni 800 kb suuruseid fragmente, väiksemad lõigud võivad aga kaduda agarosgeeli sisse. Lisaks ei saa rutiinses FISH-is kasutada alla 10 kb suuruseid DNA sonde. Komeet-FISH-i tulemuste hindamine hõlmab fluorestseeruvate signaalide arvu rohkuse tuvastamist ja nende lokaliseerimist komeedil. Testiga saab uurida ka DNA parandusmehhanismide tööd. Fluorestseeruvate signaalide ümberpaigutumine pärast inkubatsiooniperioodi komeedi sabast peasse, näitab DNA kahjustuste parandusmehhanismide tööd. Lisaks on fluorestseeruvad signaalid mõõdetavad ja nende taset saab väljastada protsendina, seeläbi on DNA kahjustuste ja paranduse tase konkreetselt mõõdetav. Komeet-FISH-i tulemusi on keerulisem lugeda kui standardset FISH testi. Komeet-FISH test paikneb agarosgeelil ja see on kolmedimensionaalne; tavaline FISH testi on kultuur kinnitunud lamedale klaasile. Seetõttu on komeet-FISH tulemuste lugemist keerulisem automatiseerida. Enne komeet-FISH-i laialdasemat kasutust arvati, et üherakulise geelelektroforeesi korral on kahjustamata DNA jäänused komeedi peas ja kahjustunud osad liiguvad komeedi sabasse. FISH-iga sooritatud katsed aga osutasid, et komeedi saba suunalise liikumise korral on olulised ka muud tegurid lisaks DNA katkestustele (Hovhannisyán, 2010). Olulisteks teguriteks on veel kromatiini

kahjustuste olemus ja struktuur. Lisaks ei liigu leeliselistes tingimustes replitseeruv DNA tavaliselt komeedi sabasse. See tähendab, et FISH-testi lisamine aitab välja selgitada, et DNA piirkonnad, millel on suur geneetiline tihedus on vähem liikuvad ja mitte lihtsalt DNA kahjustustele vastupidavamad (Hovhannisyán, 2010). FISH-i ja komeedi testi kombineerimine pakub võimaluse hinnata geenide ja kromosoomide kahjustusi ning nende kahjustuste paranemist üldises genoomis. Lisaks võimaldab komeet-FISH test mõõta transkriptsiooniga seotud DNA parandusi (Hovhannisyán, 2010).

Planeerimata DNA kahjustuste parandus süntees

Planeerimata DNA sünteesi test (unscheduled DNA synthesis, UDS) mõõdab raku võimet parandada nukleotiide DNA järjestuses (Kelly ja Latimer, 2005). Analüüs toimub, kui elusate rakkude DNA-sse viiakse sisse märgistatud alus ning rakke töödeldakse ultraviolettkiirguse (UV) või kemikaalidega. Testis kasutatavad UV-kiirguse doosid jäävad vahemikku 5–50 J/m². UV-kiirgus (254 nm) kutsub esile DNA kahjustusi ja UV-indutseeritud DNA 6-4 fotoprodukte, mida rakk peab parandama. See analüüs on rakkude endi parandusvõimel põhinev test (Kelly ja Latimer, 2005). Keemiliselt indukseeritud DNA parandamise UDS-test on keemiliste ainete genotoksilisuse indikaatoritest (Diekmann *et al.*, 2004). UDS testis peab rakk peab ära tundma DNA spiraalis oleva kahjustuse. Mõlemal pool kahjustatud DNA lõiku tehakse sisselõiked ja vigane piirkond eemaldatakse. Replikatsioon ja ligatsioon toimuvad ahela struktuuri taastamiseks. Eemaldatud ahela uue juppi süntees toimub radioaktiivse tümidiini juuresolekul. Seeläbi on radioaktiivse tümidiini hulk DNAs otseses korrelatsioonis DNA paranduste arvuga (Kelly ja Latimer, 2005). In vitro UDS analüüsi on laialdaselt kasutatud ka potentsiaalsete genotoksiliste kantserogeenide tuvastamiseks. Testiga saab uurida kantserogeenideid aineid, mis ei põhjusta koheselt DNA kahjustusi, vaid stimuleerivad rakkude proliferatsiooni. Normaalsetes rakkudes on võimalik tuvastada replikatiivse DNA sünteesi taustase, mis kaasneb normaalse rakku jagunemisega. Kantserogeenide ainetega indukseeritud rakkude kiiremat jagunemist saab mõõta samade autoradiograafiliste meetoditega, mida kasutatakse UDS-i puhul (Sherman *et al.*, 1998). UDS testi kasutatakse peamiselt roti hepatotsüütide rakkudes. Testimine teiste loomarakkude kultuuridega on olnud keeruline (Madle *et al.*, 1994). UDS testi tuleks kasutada siis kui soovetakse tuvastada ja uurida ainult maksarakkude DNA parandamise võimet, sest teistest kudedest pole õnnestunud saada sobivaid rakuliine (EFSA Scientific Committee *et al.*, 2017). Kuigi UDS testi saab teha ka väljakujunenud transformeeritud rakkude liinil, on nende kultuuride genereerimine

täiskasvanud normaalsest koest keeruline. Lisaks võib pikaldane töö rakkukultuuridega muuta paljusid rakkude algseid omadusi. Sealhulgas rakkude võimet DNA kahjustustusi parandada, muutes need vähirakkudele sarnasemaks (Kelly ja Latimer, 2005). Analüüsi tulemuste tõlgendamiseks on kaks meetodit: autoradiograafia või stsintillatsiooniloendus.

Autoradiograafia on eelistatum, sest see on vähem töömahukas, kuna selle jaoks on spetsiaalselt loodud tarkvarapaketi. Lisaks eemaldab tarkvara kasutamine inimliku subjektiivsuse. Samas on võimalik ka rakkude käsitsi lugemine. Kohati võib inimsilm olla parem tumedalt värvunud tuumade ja muude objektide erinevuste määramisel, kuid see võib raskendada haruldaste rakkude leidmist (Kelly ja Latimer, 2005). Stsintillatsiooniloendamine on autoradiograafilise analüüsi lihtsustatud vorm. See loodi hindamiseks mutageensete kemikaalide mõju hepatotsüütidele (Kelly ja Latimer, 2005). UDS-testi täpsuse tagamiseks tuleb eemaldada kõik S-faasis olevad rakud. S-faasis olevad raku tuumad sisaldavad sadu kordi rohkem radioaktiivseid määrgiseid kui mitte-S-faasis olevatel rakkudel, sest selles faasis toimub DNA süntees. Selle faasi kõrvaldamiseks kultuurist lisatakse hüdroksüureat. Siiski ka hüdroksüurea juuresolekul, võib kuni 40% rakkudest olla S-faasis, mis mõjutab oluliselt tulemusi ja muudab need ebatäpseks (Kelly ja Latimer, 2005).

32P-järelmäärgistamise meetod

32P-järelmäärgistamise meetod (32P-postlabeling technique) loodi, et paremini analüüsida DNA lõike, mis on kovalentselt seondunud vähki põhjustavate kemikaalidega (Klaene *et al.*, 2013). 32P-järelmäärgistamise meetod on hea valik DNA aduktide uurimiseks, kuna see võimaldab tuvastada ühe probleemse aluspaari 1 kb DNA kohta, kasutades selleks alla 10 µg DNA-d. Meetodit on laialdaselt kasutatud nii inimeste kui ka loomadega seotud teadustöös (Klaene *et al.*, 2013). Testiga on võimalik analüüsida erinevatest kudedest pärit proove. Sobivad nii valgeverre-, kopsu-, südame- kui ka maksarakud (Binkova *et al.*, 1994). 32P-järelmäärgistamise testi kasutatakse kantserogeenide, DNA aduktide ja muud tüüpi modifitseeritud nukleotiidide tuvastamiseks (Phillips, 1997). Selline seondumine võib soodustada vähi teket ning seondumiste avastamine võib aidata kaasa haiguse varajasele diagnoosimisele ja ravile (Klaene *et al.*, 2013). 32P-järelmäärgistamine toimib nii, et DNA lõhustatakse ensümaatiliseks nukleotiidideks. Seejärel määrgistatakse nukleotiidide 5' ots isotoopmäärgistatud fosfaatrühmaga (Phillips, 1997). Peale seda määrgistatakse DNA kahjustused ehk aduktid radioaktiivse fosfaadirühmaga. Protsessi viib läbi ensüüm T4 polünukleotiidkinaas, mis kannab radioaktiivse 32P-ortofosfaadi [γ -32P]ATP-st aduktidele.

Märgistatud aduktid eraldatakse seejärel, kas kromatograafia või elektroforeesi abil, et võimaldada nende radioaktiivsuse mõõtmist (Funk *et al.*, 2013). Meetodi kasutamist suuremahulistes uuringutes piirab asjaolu, et analüüsida saab korraga ainult ühte ³²P-märgistatud proovi. See tähendaks, et suurema hulga DNA proovide analüüsimiseks kuluks palju aega ja see oleks väga töömahukas (Terashima *et al.*, 2002).

³²P-järelmärgistamise meetodi piirav asjaolu on see, et kõik 3'-nukleosiidmonofosfaadid, nii DNA kui ka RNA, on sobilikud substraadid T4 polünukleotiidkinaasile. Seetõttu sõltub testi edukas ja korrektne läbiviimine võimest eemaldada reaktsioonisegust aduktidest vabad nukleotiidid. Eelnev puhastus enne märgistamisreaktsiooni läbiviimist vähendab modifitseerimata nukleotiidide esinemist lõpptulemuses. Lisaks kasutatakse ³²P-järelmärgistamise meetodis radioaktiivset isotoopi, mis võib ebakorrekse käsitlemise korral olla ohtlik tervisele ja keskkonnale, ning radioaktiivsete jäätmete nõuetekohane kõrvaldamine võib osutuda kulukaks. Test ei paku ka informatsiooni DNA struktuuri kohta, mis enne struktuuripõhiste meetodite loomist võis põhjustada ebaselgusi DNA aduktide täpsema identifitseerimise kohta. Seetõttu ei sobi see meetod suurte valimimahtude analüüsimiseks (Klaene *et al.*, 2013).

Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR

Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR võimaldab spetsiifiliselt tuvastada ja toota suuri koguseid DNA-d (Garibyan ja Avashia, 2013). PCR-meetod on väga tundlik väikese arvu vähirakkude tuvastamisel. PCR-meetoditega saab uurida geenide füüsilisi muutusi nagu mutatsioone, deletsioone, translokatsioone ja amplifikatsioone. Lisaks saab tuvastada ka onkogeensete viiruste olemasolu ning vähi ja metastaaside spetsiifilist geeniekspressiooni. PCR-analüüsiga on võimalik tuvastada üksik rakk 10-100 miljoni lümfotsüüdi hulgast, kui see ekspresseerib huvipakkuvat kasvajamarkerit (Raj *et al.*, 1998). PCR-põhiseid analüüse on kasutatud vähirakkude avastamiseks tahketes kudedes. Peamised uuritavad koed on olnud lümfisõlmed, luuüdi, perifeerne veri ja muud kehavedelikud (Raj *et al.*, 1998).

PCR-meetodiga on võimalik kiirelt ja väga tundlikult läbi viia kvantitatiivseid ja genoomseid uuringuid. PCR-i test on olemuselt ensümaatiline test, mis võimaldab amplifitseerida spetsiifilist DNA fragmenti DNA kogumikust. Testi sooritamiseks piisab DNA mikrokogustest, et luua piisavalt palju koopiaid, mida saab edasi uurida teiste meetoditega. Kuna meetod on väga tundlik, võib proovi igasugune saastumine, isegi mikrokogustes DNA-ga anda tulemustes eksitavaid tulemusi. Lisaks eeldab PCR genoteegi olemasolu.

Seetõttu saab PCR-i rakendada ainult teadaoleva järjestuse amplifitseerimiseks. Täiendavalt PCR-i jaoks kasutatavad praimerid võivad mittespetsiifiliselt liituda järjestustega, mis on sihtmärk-DNA-ga sarnased, kuid mitte täielikult identsed, ning seeläbi toota valesid järjestusi. Lisaks võib DNA polümeraas lisada valesid nukleotide PCR-järjestusse (Garibyan ja Avashia, 2013) PCR-teste on kasutatud ökoloogilistes uuringutes keskkonna DNA (eDNA) analüüsimiseks. EDNA on geneetiline materjal, mis on saadud otse keskkonnaproovidest (muld, sete, vesi jne), millel puuduvad ilmsed bioloogilise lähtematerjali tunnused analüüsimiseks. Järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate lisamine PCR-ile on märkimisväärselt hõlbustanud suuremahuliste bioloogilise mitmekesisuse uuringute läbiviimist (Thomsen ja Willerslev, 2015). Välja on töötatud PCR-i edasiarendusi, mis võimaldavad ka vähi tuvastamist. Pöördtranskriptsioon-PCR (RT-PCR) põhineb mRNA analüüsil, et hinnata muutusi, mis on toimunud rakkude geeniekspressioonis. RT-PCR-i kasutatakse sageli erinevate vähivormide tuvastamiseks ja tsirkuleerivate kasvajakarude (CTC) avastamiseks. Alleelispetsiifiline PCR (ARMS-PCR) analüüsib ühenukleotiidseid polümorfisme. See võimaldab kindlaks teha, kas DNA-s esineb konkreetseid ühenukleotiidseid mutatsioone, mis põhjustavad vähki. Meetodis kasutatakse alleelispetsiifilisi primereid, mis võimaldavad amplifitseeritud produktide otsest tuvastamist. Droplet Digital PCR (ddPCR) on meetod, mis on välja töötatud erinevate vähkkasvajate muteerunud DNA järjestuste täpseks kvantifitseerimiseks, pakkudes kõrget tundlikkust ja spetsiifilisust. DdPCR kasutab kvantifitseerimise saavutamiseks traditsioonilise lõpp-punkti PCR-i ja kvantitatiivse reaalaaja PCR funktsioone kombineeritult. Meetod ei vaja standardset kalibreerimist, mistõttu on protseduur kiirem, täpsem ja korratavam. DdPCRi testiga saab määrata väikestes kogustes rakuvabade kasvajakarude DNA-d (ctDNA) võimaldades nende rakkude sekveneerimist. Tehnikat kasutatakse peamiselt spetsiifiliste mutatsioonide, heterogeensuse kao, koopiite arvu varieerumise ja ühe nukleotiidi variatsioonide tuvastamiseks. Järjestustevaheline kordus- (ISSR) PCR meetod põhineb ideel, et praimerid valitakse korduva DNA järjestuse (mikrosatelliitide) spetsiifilistest piirkondadest, mis on levinud kogu genoomis, et luua kindel sõrmejalg. ISSR-PCR on ühe primeriga PCR-reaktsioon. See on suunatud mitmele genoomsele lookusele. Primeritena on kasutusel 16–25 aluspaari pikkused mikrosatelliidid, et toota erinevate suurustega SSR-idevahelisi järjestusi. ISSR-PCR-i kasutatakse genoomse ebastabiilsuse mõõtmiseks. ISSR-PCR on väärtuslik tehnika vähi varaseks avastamiseks. Genoomilise ebastabiilsuse analüüs on oluline kasvajakarude arusaamiseks, kuna selle protsessi mõistmine aitab selgitada tuumorogeneesi protsessi (Ahmad *et al.*, 2022). Reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon ehk qPCR võimaldab

lisaks DNA järjestuse tuvastamisele ja tootmisele tuvastada ka spetsiifiliste geenide hulka. QPCR-i abil on võimalik kindlaks teha kui ka kvantifitseerida PCR-i toodetud DNA ahelaid reaalsajas. Selle saavutamiseks kasutatakse fluorestseeruvaid värve, mis seonduvad mittespetsiifiliselt kaheahelalise DNA-ga. Lisaks kasutatakse järjestusspetsiifilisi DNA sonde, mis on molekulid, mis annavad fluorestsentsi abil märku sihtmärgi olemasolust. Sihtmärkide tuvastamine on võimalik ainult pärast sondide hübridiseerumist komplementaarse DNA järjestusega (Garibyan ja Avashia, 2013).

Eksoomi sekveneerimine

Eksoomide sekveneerimine (WES) on DNA sekveneerimise vorm, milles sekveneeritakse vaid valke kodeerivad genoomi piirkonnad (Bao *et al.*, 2014). Selle meetodiga on võimalik saada informatsiooni koopiaarvu muutuste, biomarkerite täpse määramise, kasvaja mutatsioonikoormuse, homoloogse rekombinatsiooni parandamise puudulikkuse ja mikrosatelliidi ebastabiilsuse kohta (Menzel *et al.*, 2023). Eksoomide kaardistamisel on WES keskendunud hästi uuritud mudelliikidele. WES võimaldab kiiret järjestuse variantide tuvastamist genoomi kodeerivates piirkondades (Jackson *et al.*, 2021). Järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad on muutnud eksoomi sekveneerimise protsessi kiiremaks, suurendanud sekveneerimise sügavust ja muutnud selle testi tundlikumaks. Kulude vähenemine testi sooritamiseks on muutnud WES-i ja kogu genoomi sekveneerimise kliinilise rakendamise teostatavamaks (Schwarze *et al.*, 2018).

Esimene samm WES-i testi sooritamiseks on kvaliteetse genoomse DNA hankimine bioloogilistest proovidest. Levinumad ekstraheerimismeetodid on traditsiooniline DNA väljasoolamine ja spin-koloni põhised meetodid (Seaby *et al.*, 2016). Seejärel lõigatakse ekstraheeritud DNA fragmentideks (Klein *et al.*, 2014). Soovitav fragmentide pikkus on 250–350 bp (Xiao *et al.*, 2021). Need fragmendid isoleeritakse ja amplifitseeritakse individuaalselt, mille tulemusel luuakse genoteek. Paljud üksikud amplifitseeritud fragmendid sekveneeritakse samaaegselt. Pärast iga järjestatud fragmendi sekveneerimist tuleb need DNA jupid uuesti kokku panna ja järjestused tuvastada (Klein *et al.*, 2014). Paljud somaatiliste kasvaja eripärasused on seotud spetsiifiliste bioloogiliste mehhanismidega, mis võivad need põhjustada, näiteks puudulik DNA aluste parandamine ja keskkonnamõjud, nagu kantserogeensed ained ja ultravioletvalgus. Kogu genoomi või kogu eksoomi sekveneerides on võimalik paremini mõista somaatiliste kasvaja variatsioonide tagamaid (Guan *et al.*, 2023). WES testi on otstarbekas läbi viia siis, kui populatsioonist võetakse proove väiksemalt

arvult isenditelt. Eriti juhtudel, kus populatsioonis on levinud suur heterogeensus ja kui võrdlusgenoom sarnaselt liigilt on olemas. See teeb WES-ist hea meetodi adaptiivse variatsiooni uurimiseks (Lorenzana *et al.*, 2024). WES-i saab kasutada vähem uuritud liikidel, kui mõne selle liigi eksoom on juba sekveneeritud. See muudab tööprotsessi lihtsamaks ja odavamaks ka nende liikide puhul, mille kohta puuduvad laialdased eelteadmised. Sebrakala on hästi uuritud mudelliik; tema genoomi on põhjalikult uuritud. Sealt saadud genoomsed andmeid saab kasutada abivahendina sarnastele vähe uuritud liikide eksoomi koostamisel (Jackson *et al.*, 2021). Täisgenoomi sekveneerimisega võrreldes on WES kuluefektiivsem. WES-il on kõrgem lugemite kordusarv, üle saja korra, Täisgenoomi sekveneerimisel on see alla 100 kuna seda meetodit on kallim läbi viia (Xiao *et al.*, 2021). Eksoomi on võimalik uurida ka üherakulise proovi põhjal. Puhastatud eukarüootse DNA-ga töötamisel on testi sooritamiseks tarvis >1 ng DNA-d. WES testi läbiviimiseks võib kasutada ka kehas ringlevatest kasvajakaradest saadud puhastatud DNA-d. Väikeste koguste kasutamisel oleks kindlasti vaja proove amplifitseerida, et saada piisavalt geneetilist materjali edasiseks analüüsiks (Andreou *et al.*, 2024).

Täisgenoomi sekveneerimine (WGS)

Vähki põhjustavate genoomsete muutuste põhjalikuks uurimiseks saab kasutada täisgenoomi sekveneerimist (WGS). WGS aitab paremini mõista haigust esile kutsuvaid mutatsioone. Meetodit kasutades saab välja selgitada uurimata genoomsete piirkondade ja mutatsioonide vahelisi seoseid. Kogu genoomi järjestades on võimalik kindlaks teha mittekodeerivad mutatsioonid, struktuurseid variandid, kaasa arvatud koopiate arvu muutused, mitokondriaalseid mutatsioonid, patogeenide tuvastamine ning ka valke kodeerivaid mutatsioone (Nakagawa ja Fujita, 2018). Suure nõudluse, arvutusressursside ja salvestusruumi tõttu on meetodi rakendamine olnud piiratud, eriti väheste genoomsete ressurssidega mittemudelliikide puhul (Fuentes-Pardo ja Ruzzante, 2017). WGS-i kuluefektiivsus on aastate jooksul paranenud. Järjestuse ja andmeanalüüsi kulude vähenemine koos haiguste varajase avastamise ja ennetamise potentsiaaliga muudab WGS-i väärtuslikuks investeeringuks tervishoiusektoris. WGS-il on oluline roll onkoloogias, farmakogenoomikas ja personaalmeditsiinis. See võimaldab onkoloogidel tuvastada vähipatsientidel spetsiifilisi geneetilisi mutatsioone, võimaldades seeläbi sihipäraste ravimeetodite valikut parimate ravitulemuste saavutamiseks (Brlek *et al.*, 2024). Terve genoomi järjestamine on näidanud potentsiaali sebrakala mutatsioonide tuvastamise kiirendamisel (Bowen *et al.*, 2012).

Veebisaidid Annovar ja Ensembl sisaldavad paljusid erinevate liikide genoomseid järjestusi. Mutatsioonide uurimine ja neist arusaamine kalades aitab neid muutusi paremini mõista ka inimestes. Kaladel põhinevad mudelid on osutunud eriti otstarbekaks nahavähi uurimisel (Sarasamma *et al.*, 2018). Üks moodus, kuidas saada rohkem informatsiooni vähiga seotud geenide kohta, on sekveneerida terve genoom nii vähiga haigestunud loomal kui ka terve looma genoom võrdluseks. Kalade kasvajaid alla suruvad mehhanismid peaksid hõlmama enamikku imetajate mehhanismidest, kuid sisaldama ka kaladele ainuomaseid, varem avastamata mehhanisme (Baines *et al.*, 2022). Ensemble'i andmebaaside andmeid kasutades on võimalik luua vastavusi tuumorsupressor- ja onkogeenide omavaheliste seoste kohta. Täieliku genoomi järjestustega kalaliikide arv on veel väike ning seos geenikoopiate arvu ja vähi vahel põhineb sageli inimestelt kogutud andmetel (Baines *et al.*, 2022). WGS-i genoteegi valmistamiseks piisab 5 ng DNAST. Uuemad sekveneerimise genoteegi ettevalmistamise komplektid nõuavad väikestes koguses sisend-DNA-d (Bassaganyas *et al.*, 2018). Suuremahulised WGS-projektid võivad üksikute genotüüpide täpseks määramiseks vajalikel lugemissügavustel olla ülemäära kallid, kuid kulutõhusama variandina saab alternatiivselt kasutada madalama katvusega kogu genoomi sekveneerimist (lcWGS). Madalam kattuvus võib siiski olla piisav informatsiooni hankimiseks genoomsete analüüside jaoks (DeSaix *et al.*, 2024). LcWGS-i kasutatakse üha enam looduskaitse programmides genoomi uurimiseks. Meetodi eeliseks on see, et lcWGS suurendab kogu genoomi skaneerimisega informatiivsete SNP-de tuvastamise tõenäosust. (Beemelmanns *et al.*, 2025). Lisaks suudab lcWGS avastada kasvaja geneetilisi muutuseid ilma eelnevate teadmisteta (Puranachot, 2024).

Üksiku nukleotiidi polümorfism ehk SNP

Genoomsel skaalal on üksiku nukleotiidi polümorfismid ehk SNP-d kasulikud vahendid geneetilise ülessehituse uurimiseks. SNP analüüs võimaldab tuvastada proovis spetsiifilisi allele. See meetod hübriidiseerib fragmenteeritud DNA, et tuvastada SNP positsioone (Rasal *et al.*, 2024). Tüüpilised SNP protokollid koosnevad kolmest komponendist. Esmalt suurendatakse valitud DNA lõigu koopiate arvu. Selleks võib kasutada näiteks PCR-i. Teine etapp on kindlate alleelide tuvastamine proovis. Alleelide eristamiseks kasutatakse DNA polümeraase ja DNA ligaase. Alleelide eristamise mehhanism määrab suuresti meetodi täpsuse ja spetsiifilisuse. Viimasena on vaja tuvastada hübriidiseeritud DNA. Selleks saab kasutada erinevaid meetodeid. Massispektromeetria tuvastab ja identifitseerib alleelispetsiifilised produktid molekulmassi järgi, DNA sekveneerimine aga eraldab tooted

suuruse ja fluorestsentsmärgiste järgi. Hübridiseeritud DNA tuvastamiseks on võimalik kasutada ka selliseid meetodeid nagu fluorestsentsresonantsenergia ülekanne (FRET), fluorestsentsi polarisatsioon (FP), luminescents, neeldumine ja sulamistemperatuur (Chen ja Sullivan, 2003). Ülegenoomsel SNP analüüsil on suur potentsiaal looduslike populatsioonide ökoloogia ja säilimise uuringutes, kuna see võimaldab tuvastada genoomi variatsioone (Seddon *et al.*, 2005). Kaladest on genotüpiseerimise platvormidel saadaval näiteks säga (*Ictalurus punctatus*) ja atlandi lõhe (*Salmo salar*) (Rasal *et al.*, 2017). SNPd annavad hea ülevaate kalade genoomsetele muutustele, kalapopulatsiooni fülogeneesile ja aitavad seostada omavahel markereid ja tunnuseid (Rasal *et al.*, 2017). Unikaalseid äratuntavaid järjestusi leidub rohkesti enamikus uuritud genoomides ning genotüpiseerimise veamäärad on madalad. Need omadused suurendavad testi läbilaskevõimet ning selle kasutamine on suhteliselt odav. Lisaks on SNP genotüpiseerimine laborites kergesti standardiseeritav (Anderson ja Garza, 2006).

Võrdlev genoomne hübridisatsioon

Võrdlev genoomne hübridisatsioon (CGH, Comparative genomic hybridization) töötati välja molekulaarse tsütogeneetilise tehnikana, et kompenseerida tavapärase tsütogeneetika ja FISH analüüsiga kaasnevaid kitsaskohti. See meetodika võimaldab vaadelda kogu genoomi korraga, et tuvastada kromosomaalse materjali koopiaarvu muutusi. Traditsioonilise CGH protseduuride korral märgistatakse test- ja võrdlusproovidest eraldatud genoomne DNA vastavalt punase ja roheline fluorestseeruva värvainega. Punaste ja roheliste fluorestseerivate signaalide suhteid paarisproovides mõõdetakse mööda kromosoomi pikitelge. Testitava DNA deletsiooni või amplifikatsiooniga seotud kromosomaalsed piirkonnad on vastavalt punased või rohelised, kuid kromosoomipiirkonnad, mis on testitavas ja võrdlus-DNA-s võrdselt esindatud, on kollased (Inazawa *et al.*, 2004). Test- ja võrdlusrakkude signaalide erinevused on ideaalis proportsioonis nende järjestuste suhtelise koopiaarvuga. Normaalse võrdlusgenoomi korral intensiivsuse suhte suurenemine või vähenemine näitab otseselt DNA koopiate arvu varieerumist. Kui rakkudele lisada eristvaid mägiseid, on võimalik samaaegselt võrrelda ka rohkem kui kahte genoomi (Pinkel ja Albertson, 2005).

CGH oli esimene efektiivne meetod DNA koopiate arvu variatsiooni digitaliseerimiseks kogu genoomis (Pinkel ja Albertson, 2005). Kasvajad on geneetiliselt ebastabiilsed ja neil võib esineda mitmeid tüüpi muutusi, milleks võivad olla punktmutatsioonid, kromosoomide

ümberkorraldused ja epigeneetilised muutused nagu metüülimine. Selliseid kõrvalekaldeid võivad avalduda üksi või koos ning need võivad muuta rakukomponente ja ekspresioonitasemeid. Kõrvalekaldeid, mis olid olulised kasvaja tekkes selle arengu varajases staadiumis, võivad pidevate muutuste korral kaduda või muutuda ebafunktsionaalseks. CGH analüüsil, kus analüüsitakse korraga DNA-d paljudest erinevatest proovidest, võib paljastada vähki tekitanud algsed mutatsioonid ning aidata mõista haiguse tekke põhjust (Pinkel ja Albertson, 2005). Selektiivses keskkonnas, *in vivo*, võivad osad kasvajate genoomid jääda suhteliselt stabiilseks (Pinkel ja Albertson, 2005). Testi läbiviimiseks sobivad mitmesugused vähirakud. Kasutatud on lümfoblastoidrakke, fibroblaste ja blastomeere (Johnson *et al.*, 2006). CGH meetod on vähem rakendatav katsetes mittemudelorganismidega. Peamiselt seetõttu, et mittemudelorganismide genoomid on sageli järjestamata. Sellest tulenevalt on sondide sihtmärkide järjestused teadmata (Jonker *et al.*, 2014). CGH testi on võimalik läbi viia ka väikese algmaterjali kogustega, kasutades alla 1 µg amplifitseerimata proove. Spectral Chip 2600 platvorm kasutab 1 µg DNA-d. Kõrge eraldusvõimega testide läbiviimine on aga märkimisväärselt kallim kui madala eraldusvõimega platvormidega (Coe *et al.*, 2007). CGH peamiseks eeliseks on selle võime analüüsida kogu genoomi samaaegselt ja objektiivselt. Traditsioonilise CGH praktilisus on piiratud eraldusvõime tõttu 3–10 Mb. Eraldusvõime sõltub sondide arvust proovis, mida rohkem sonde, seda detailsem on ülevaade. Puudust saab vältida kui kasutada hübriidiseerimiseks tervet genoomi katvate DNA sihtmärkide massiivi (CGH massiiv või CGH maatriks) (Nagarajan *et al.*, 2017). Massiiv CGH, või ka maatriks-CGH, oli algselt kasutatud, et tuvastada kromosoomide segmentide muutusi. Mikrokiibi tehnoloogia kaasamine meetodisse tõstis CGH eraldusvõime 10 Mb-lt kuni 75-130 kb-dini (Davies *et al.*, 2005). Massiivi võrdlev genoomne hübriidisatsioon (aCGH) on molekulaarne analüüsimeetod, millega on võimalik kogu genoomi ulatuses tuvastada kromosoomi segmentide koopiite arvu variatsioone. ACGH rakendamine on kliinilises diagnostikas muutunud üha levinumaks ning sellest on kujunemas standardne tööriist geneetiliste kõrvalekallete avastamisel. Üha enam kasutatakse aCGH-d traditsiooniliste tsütogeneetiliste meetodite asemel, kuna aCGH pakub oluliselt täpsemat ja detailsemat teavet genoomsete muutuste kohta (Shinawi ja Cheung, 2008). ACGH testiga on meditsiinis võimalik tuvastada submikroskoopilisi kromosomaalseid kõrvalekaldeid. ACGH peamine eelis on selle võime tuvastada, mis tahes kvantitatiivseid muutusi DNA-s. Sõltuvalt sihtmärgi suurusest ning sondide katvusest ja tihedusest on aCGH test 10–10 000 korda detailsem kui tavaline karütüüp (Syrmou *et al.*, 2013).

Koopianumbrite arv (CNV)

DNA koopiate arvu variatsioonid ehk CNV-d on geneetilise variatsiooni oluline komponent. CNV-d on struktuursete variatsioonidega DNA piirkonnad, kus on kindlaks tehtud koopiate arvu erinevusi kahe või enama genoomi vahel. Kui duplitseerunud piirkonnad on suuremad kui 1 kilobait (kb), võivad need põhjustada genoomse DNA pikkuse suurenemist või kadu (Shlien ja Malkin, 2009). CNV-d võivad olla healoomulised polümorfseid variandid või olla seotud haigusega, sealhulgas vähi eelsoodumusega. Haruldased mitte polümorfseid CNV-d ehk DNA kahjustused, mis põhjustavad geenide deletsioone, inversioone ja/või fusioone, võivad suurendada vähiriski. Vähk võib olla põhjustatud erinevatest teguritest ning haigust soodustavatest pärilikest teguritest, näiteks kasvaja supressorgeenide kadumine (Kuiper *et al.*, 2010). Esimene CNV tuvastamise tehnika oli tsütogeneetiline meetod, mis põhines kromosoomide visuaalsel kontrollil. Nüüd võimaldab molekulaarbioloogiliste meetodite, sealhulgas DNA mikrokiipidel põhinevate meetodite ja massiivse paralleelse sekveneerimise kasutuselevõtt analüüsida CNV-sid kogu genoomi ulatuses (Pös *et al.*, 2021). Uuematel molekulaarbioloogilistel meetoditel, nagu Southern blot hübriidatsioonil ja sekveneerimisel, on suurem eraldusvõime kui tsütogeneetikal. Southern blot analüüsi põhimõte seisneb DNA fragmenteerimisel restriksiooniendonukleasidiga ja fragmentide eraldamiseks kasutatakse geelelektroforeesi. Koopiate arvu muutused on nähtavad hübriidatsiooni intensiivsuse erinevuste või fragmentide muutunud liikuvuse tulemusel. Southern blotting on pikka aega olnud standardmeetod deletsioonide ja amplifikatsioonide tuvastamiseks vahemikus 5–500 kb. Meetod on töömahukas ja aeganõudev ning selleks on vaja suures koguses kvaliteetset DNA-d (Pös *et al.*, 2021). Nende põhjuste tõttu on selle meetodi kasutamine piiratud suuremahuliste kliiniliste laboritega (Tang *et al.*, 2006).

RNA sekveneerimine

RNA sekveneerimine on üha enam kasutatust leidev meetod järgmise põlvkonna sekveneerimis tehnoloogiate tõttu. RNA sekveneerimisega on võimalik uurida, kuidas keskkonnamuutused, nagu soolsuse muutused, pH, vee temperatuuri kõikumine, stressorite olemasolu ja hapniku kontsentratsioon vees, mõjutavad kudede geeniekspressiooni mustreid (Oomen ja Hutchings, 2017). RNA sekveneerimisega on võimalik määrata konkreetses keskkonnas ekspresseeritud gene. Lisaks on RNA sekveneerimisega võimalik eristada nii kvantitatiivseid diferentsiaalseid ekspresioonitasemeid kui ka kvalitatiivseid ehk järjestuse variatsioone.

Nende võimaluste tõttu on uuringutes võimalik eristada transkriptsioonide hulga, alleelsete variatsioonide ja alternatiivse splicingu suhtelist panust fenotüübi muutusesse. Transkriptsiooni järjestusi saab kasutada ka SNP-ide tuvastamiseks kodeeritavates piirkondades nii *de novo*, kui ka võrdlusgenoomi korral, kui on olemas piisav kattuvus (Oomen ja Hutchings, 2017). Kui RNA sekveneerimine sooritatakse referentsgenoomiga, on analüüsi lihtsam läbi viia, aga see võib piirata uute transkriptide avastamist. Ilma referentsgenoomita RNA-d sekveneerides tuleb esmalt ise luua transkriptom *de novo* koostamise teel. Mõlemal juhul saab hinnata geeniekspressiooni taset kuid meetodika ja täpsus varieeruvad (Conesa *et al.*, 2016). Lisaks võib mRNA järjestus paljastada olulist teavet valkude struktuuride ja funktsioonide osas (Oomen ja Hutchings, 2017). RNA sekveneerimine, eriti ühe raku RNA sekveneerimine võib anda informatsiooni üksiku kasvaja raku kohta. Selle abil on võimalik tuvastada erinevaid mutatsioone, mis põhjustasid kasvaja tekke (Hong *et al.*, 2020). RNA sekveneerimise kulud on aastate jooksul järsult langenud (Hou *et al.*, 2015). Üks levinumaid RNA sekveneerimise kasutusvaldkondi on diferentsiaalse geeniekspressiooni analüüs. Erineva päritoluga kudesid või liike saab sekveneerida ning nendes ekspresseeritud geenid võivad paljastada nende rakkude funktsioone. Seeläbi hõlbustab diferentsiaalne geeniekspressiooni analüüs potentsiaalsete vähi biomarkerite tuvastamist. Lisaks saab RNA sekveneerimist koos immunohistokeemia ja Western blot analüüsiga kasutada, teatud valkude tuvastamiseks vähi biomarkeritena (Hong *et al.*, 2020). RNA sekveneerimisega on võimalik tuvastada nii varaseid mutatsioone kui ka kõrge mutatsiooni riskiga järjestusi (Hong *et al.*, 2020). RNA sekveneerimine hõlmab kolme etappi: genoteegi koostamine, sekveneerimine järgmise põlvkonna platvormil ja bioinformaatiline analüüs (Qian *et al.*, 2014). RNA sekveneerimist saab suuremahulistes uuringutes kasutada MARS-sekveneerimist (automaatne massiliselt paralleelne RNA sekveneerimisraamistik). Selle tehnikaga on võimalik analüüsida tuhandeid *in vivo* rakku proove. MARS-sekveneerimisel saab kasutada erinevaid organeid ja kudesid. Selle meetodiga saab uurida üksikute rakkude geeniekspressiooni. Seda testi on kasutatud uurimaks hiire põrna, kus 4000 üksikuraku RNA sekveneeriti, et tuvastada põrnarakude ja duktaalse kartsinoomi rakkude mitmekesisust (Ahmed *et al.*, 2022).

SSH meetod

Supressiivne subtraktiivne hübridisatsioon (SSH) on suure läbilaskevõimega geeniekspressiooni analüüsimeetod. See meetod ei eelda eelnevaid teadmisi uuritavate

geenide kohta. SSH on erinevalt ekspresseeritud järjestuste selektiivse võimendamise meetod (Mottaghi-Dastjerdi *et al.*, 2014). SSH-meetodi eeliseks on väike kogus algmaterjali. Meetodiga pole vaja füüsiliselt eraldada ühe- ja kaheaahelalisi molekule; see ühtlustab mRNA järjestuste kogused katses ning meetod sobib haruldaste transkriptide tuvastamiseks (Mottaghi-Dastjerdi *et al.*, 2014). Testi sooritamine võib alata PCR-ga amplifitseeritud cDNA-dest. Seega sobib see eriti hästi bioloogilistesse uuringutesse, kus ekspresseeritakse spetsiifilisi geene ja tööks saadaval on väike kogus RNA-d (Bui, *et al.*, 2005). SSH on kasutusel leidmaks erinevusi kahe DNA või RNA lõigu vahel. Sellega saab analüüsida nii cDNAd kui ka genoomset DNA-d, et luua genoteek. Metoodika töötab põhimõttel, kus esmalt proov normaliseeritakse, see tähendab, et DNA fragmentide arv võrdsustatakse. Teises etapis jäetakse kõrvale järjestused, mis on identsed mõlemas proovis. Selle tulemusena jäävad alles vaid haruldased ja spetsiifilisemad järjestused. Selline tegevus muudab geneetilise materjali analüüsi tõhusamaks, eriti juhtudel, kus huvipakkuvad haruldased geenid või väiksemad erinevused (Rebrikov *et al.*, 2004).

SSH-metood on rakendatav paljudele võrdlevatele ja funktsionaalsetele geneetika uuringutele. Sellega on võimalik tuvastada haigusi ning koe spetsiifiliselt ekspresseeritud geene. (Lukyanov *et al.*, 2007). SSH-meetodit on laialdaselt kasutatud erinevates loomudelites, et tuvastada koe spetsiifilisi või erinevalt ekspresseeritud geene huvipakkuvate populatsioonide vahel. Näiteks on SSH-meetodit kasutatud kuld- merikogre (*Sparus aurata*) mikrokiibi koostamiseks, aidates sellega kaasa Vahemere kõrgelt hinnatud merekala genoomsete ressursside säilitamisele (Calduch-Giner *et al.*, 2010). SSH on sobiv meetod erinevalt ekspresseeritud geenide amplifitseerimiseks. Võimendatakse sihtjärjestusi, geene, mis on teatud tingimustes rohkem või vähem aktiivsed ja surutakse alla mittesihtjärjestused, geene, mille ekspressioon ei muutu, või mida ei soovita uurida. Vaatamata järgmise põlvkonna sekveneerimise meetodite olemasolule on SSH endiselt populaarne tehnika. Meetod paistab silma suhteliselt madala hinna, väikese lähtematerjali koguse ja valepositiivsete tulemuste suhteliselt madala määra tõttu. Küll aga on SSH meetodi kasutamine raskendatud uuringutes, kus on vaja testi läbi viia tuhandeid kordi, kuna meetod muutub kiirelt üsna töömahukaks ja kulukaks (Bisaga *et al.*, 2017).

Epigeneetika ja DNA metülatsioon

Epigeneetilised muutused, kaasa arvatud muutused DNA-s, mis toimuvad metüleerimise kaudu, on ühed kasvaja algstaadiumi indikaatorid. Suureulatuslik DNA metülatsioon ja hüpometüleerimine mõjutab negatiivselt ka rakkude lõpliku diferentseerumist (Granada *et al.*, 2018). See loob omakorda tingimused, mis võivad viia genoomi ebastabiilsuseni, kromosoomide ümberkorraldusteni ja transposoonide aktiveerimiseni. Sellised muutused soodustavad mutatsioonide teket tuumorsupressor geenides, suurendades seeläbi ka vähiriski (Mirbahai *et al.*, 2011). Keskkonnamuutujad, mis võivad põhjustada epigeneetilisi muutusi, on kõige sagedamini pH, hapnik, temperatuur, toit või toitained ja raskmetallid. Viimased pärinevad sageli agrotööstuse, olme- ja kaevandusjäätmetest (Welengane *et al.*, 2025). Kogu genoomi bisulfaat sekveneerimine (WGBS) on muutumas üha laialdasemalt kasutatavaks meetodiks epigeneetiliste muutuste tuvastamiseks. WGBS-i rakendatakse uurimaks, kuidas epigeneetilised protsessid toimivad erinevates organismides või arenguprotsessides ning kuidas metülatsioon mõjutab vähki, neuroloogilisi haigusi või autoimmuunseid seisundeid. DNA vesiniksulfiidi (BS) sekveneerimine on DNA metüülimise analüüsi kuldstandard. Kuna järgmise põlvkonna sekveneerimise kulud pidevalt vähenevad, muutub WGBS meetodika üha kättesaadavamaks (Olova *et al.*, 2018). Kuigi WGBS on suurte proovide arvuga katsete jaoks liiga kallis meetod, saab madala katvusega WGBS täpselt kindlaks määrata globaalse metüülimise ja kustutamise sama hinnaga kui kõrge jõudlusega vedelikkromatograafia (HPLC) või ensüümiga seotud immunosorbentanalüüs (ELISA). Lisaks saab madala katvusega WGBS-iga töötada väiksema arvu rakkudega (<100 rakku) (Ortega-Recalde *et al.*, 2021). Eksisteerib ka RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) meetod. See võimaldab sekveneerida vähendatud fraktsiooni genoomist, mis eeldatavasti on rikastatud CpG-dega (Kamouh *et al.*, 2024). RRBSi on kasutatud kulutõhusa meetodina DNA metüülimismustrite uurimiseks, peamiselt geenipromootorites ja CpG saartel. Meetodi protokollid eeldavad tavaliselt üheksat PCR amplifikatsioonitsüklit, et saada piisav kogus DNAd sekveneerimiseks. Vajaliku algmaterjali jaoks piisab 100 ng genoomsest DNA-st (Nakabayashi *et al.*, 2023).

Proteoomika

Funktsionaalse proteoomika eesmärk on tuvastada valkude roll rakuliste protsesside läbiviimisel molekulaarsel ja mehaanilisel tasandil (Mohanty *et al.*, 2019). Valgu ekspressiooni tasandil ilmnevad kindlapiirilised muutused terve raku muutumisel

neoplastiliseks rakuks. Need muutused hõlmavad muutunud valkude funktsiooni, erinevaid valkude modifikatsioone, valkude tootmise muutustest kuni ebanormaalse avaldumise kohani. Nende muutuste tuvastamine ja mõistmine on vähi proteoomika algpunktiks. Selliste muutunud biomarkerite tuvastamine on kasulik nii vähi varajaseks avastamiseks kui ka ravi määramiseks (Srinivas *et al.*, 2001).

Western blotting (WB), tuntud kui immunoblotanalüüs, on molekulaarbioloogia meetod, mida kasutatakse valkude mitmete omaduste uurimiseks. WB idee seisneb valkude eraldamises molekulmassi ja laengu alusel (Begum *et al.*, 2022). WB arenes välja DNA (Southern) blotimisest ja RNA (Northern) blotimisest. WB töötab läbi valkude ülekande naatriumdodetsüülsulfaadi polüakrüülamiidgeelilt adsorbeerivale membraanile. Meetod on tõhus paljude valkude tuvastamiseks ja iseloomustamiseks, eriti selliste valkude jaoks, mida leidub proovis vähe (Kurien ja Scofield, 2006). Teatud koele omased või denatureeritud valgud eraldatakse geelfroteesiga. Seejärel kantakse need üle valku siduvale membraanile, kus sihtvalk tuvastatakse spetsiifilise antikeha abil. Sihtvalk tuvastatakse kolorimeetriliste, fluorestsents- või luminescentsmeetodite abil. Antikehad on WB-s tähtsal kohal, tagades meetodi täpsuse, korratavuse ja spetsiifilisuse. WB levinuim rakendus viis on proovis olevate valkude suuruse ja koguse tuvastamine, kuigi meetodit on võimalik kasutada ka muude aspektide uurimiseks. WB on võimalik diagnoosida autoimmuunhaigusi, vähki ja prioonhaiguseid. WB peamine piirang on see, et kõik antikehad ei suuda tuvastada denatureeritud ja immobiliseeritud antigene, mis on esitatud immunoblotidel (Meftahi *et al.*, 2021). WB läbiviimiseks on tavaliselt vaja märkimisväärset kogust algmaterjali, ligikaudu miljon rakku (Li *et al.*, 2023). Lisaks on meetodi läbiviimine aeganõudev ja raskesti korratav. Siiski võiks WB automatiseerimine säästa aega ja suurendada tundlikkust (Sormunen *et al.*, 2023).

Metaboloomika

Metaboloomika on uurimisvaldkond, mis keskendub kõigi rakkude, kudede, süsteemis või organismis leiduvatele metaboliitidele ehk ainevahetussaadustele, millel on lai valik funktsioone. Metaboloomika võib anda teavet vähi arengu ja progresseerumise ajal toimuvate muutuste kohta (Subramani *et al.*, 2022). Vähi metaboloomi hulka kuuluvad ka metaboliidid, mis on otseselt onkoloogiliste protsesside produktid, sealhulgas organismi reaktsioon kasvajatele (Subramani *et al.*, 2022). Metaboloomilised uuringud võivad anda hea ülevaate

loomade füsioloogiast ning pakkuda uusi teadmisi organismi biokeemiast. Metaboloomilisi teste on kasutatud imetajate ökotoksikoloogias ja kalade tervise hindamiseks. Muutusi metaboliitide profiilides on kasutatud ka laboratoorsetes katsetes kaladega, et uurida põllumajandusreostuse mõju merekaladele (Long *et al.*, 2020). Iga muutus geenis muudab lõpuks organismi metaboolset profiili. Metaboliitide hulga muutusi saab kasutada diagnostiliste markeritena, prognostiliste markeritena ja ka terapeutiliste sihtmärkidena vähi ravis (Subramani, 2022). Metaboliitide kontsentratsioone on keeruline mõõta nende suure keemilise mitmekesisuse tõttu. Praktilised metaboolikas kasutatavad meetodid on MS ja tuumamagnetresonants (NMR). NMR abil on võimalik saada nii kvantitatiivset kui ka struktuurset teavet mitmesugustest metaboliitidest. Üheks NMR-i kitsaskohaks võib pidada selle meetodi madalat tundlikkust, mis tähendab, et testi töötamiseks on vaja kõrget metaboliitide kontsentratsiooni. Lisaks võib raskendavaks asjaoluks pidada kompleksete lahuste korral NMR-spektrite tõlgendamist ja nende spektrite seostamist spetsiifiliste metaboliitidega. Bioloogilist päritolu vedelike ja koeproovide saab analüüsida kõrge eraldusvõimega NMR-i ja kõrglahutusega maagilise nurgaga pöörleva NMR-iga (HR-MAS-NMR) meetoditega, mis ei hävita proove ja võimaldavad sooritada paralleelanalüüse teiste meetoditega. Hüperpolariseeritud NMR-iga on võimalik jälgida metaboliitide taset *in vivo* ning seda meetodit on kasutatud vähi kliinilisel diagnoosimisel (Vermeersch ja Styczynski, 2013). Metaboloomsete uuringute sooritamiseks saab kasutada ka teist tehnoloogiat - massispektromeetriat (MS). MS määrab massi ja laengu suhte (m/z). Massispektromeetrist kogutud teave saadakse gaasifaasi ionide analüüsist. Massispektromeetril on kolm põhikomponenti: ionisatsiooniallikas, massianalüsaator ja detektor. Massianalüsaatoreid saab rakendada ka molekulide struktuurse teabe kogumiseks (Glish ja Vachet, 2003). MS võimaldab vahetult analüüsida kõiki bioloogilisi molekule, mis on vastuvõtlikud ionisatsioonile. MS on rutiinselt kasutuses kliinilistes laborites peamiselt toksikoloogiliseks testimiseks ja terapeutiliste ravimite seireks. Kliinilistes laborites kasutatakse kvantitatiivseks analüüsiks kõige sagedamini kolmekordsed kvadрупoolsed massispektromeetrid (TQMS) (Crutchfield *et al.*, 2016). MS-i saab kasutada, et identifitseerida eri päritolu molekule plasmast, uriinist ja süljest. MS-i üldine töövoog on töömahukas ja nõuab palju käsitsitööd. Meetodiga töötamine eeldab kõrgelt koolitatud tehnilisi töötajaid igapäevaste toimingute tegemiseks, korrapäraseks tõrkeotsinguks, analüüsides arendamiseks ja kinnitamiseks (Zhang ja Rockwood 2015).

Järeldused

Vähkkasvajate tekkepõhjused kaladel on mitmetahulised. Mutageenid iseenesest ei tekita otseselt vähki, vaid need põhjustavad DNA kahjustusi, mis võivad vallandada kasvajalise protsessi. Kaladel ja metsikutel loomadel tuvastatud kõrgeenenud kasvajate esinemissagedus võib olla oluline märk keskkonnasaastatusest või muust keskkonnastressist. Molekulaarsed meetodid võimaldavad varakult avastada rakkudes vähiriskiga seotud muutusi, mis viitavad suurenenud vähitekke tõenäosusele. Kuna erinevad molekulaarsed meetodid keskenduvad erinevate rakuliste aspektide uurimisele, siis mitmete meetodite kombineerimisel need täiendavad üksteist. Töös käsitletud meetodid, olgu need seotud genoomi, geeniekspressiooni, DNA kahjustuste või metülatsiooniga, võimaldavad vaadelda vähiga seotud protsesse eri nurkade alt. Paljud neist meetoditest võivad olla kasulikud metsikute kalapopulatsioonide seirel, kuna haiguse põhjuseid tuleb otsida komplekssest ja muutlikust keskkonnast. Molekulaarsetest meetoditest, millega saab uurida geneetilist materjali ja genoomi struktuuri, võiks ökoloogias sobivaimaks pidada SNP-analüüsi, kuna selle läbiviimine on võrdlemisi odav ja lihtne (Pruvost *et al.*, 2012). Meetodi kasutamine on aga piiratud teadaolevate järjestustega. PCR-test sobib kontrollima teatud kindlaid järjestusi. PCR- ja SNP-testid on laialdaselt kasutusel ökoloogilistes ja evolutsioonibioloogilistes uuringutes (Natesh *et al.*, 2019). CGH- ja FISH-testid leiavad rohkem kasutust pigem meditsiinidiagnostikas (Wan ja Ma, 2012). WGS pakub kõige laiaulatuslikumat informatsiooni. Southern blot on töömahukas ja aeganõudev meetod, mistõttu on see kasutusel peamiselt kliinilistes laborites (Podzorski *et al.*, 2006).

Kaudselt on genoomis toimunud muutusi võimalik hinnata ka transkriptoomiliste või epigeneetiliste muutuste kvantifitseerimise kaudu. Nii RNA sekveneerimisega kui ka SSH meetodiga on võimalik uurida, millised geenid on rakkudes aktiivsed. Seejuures ei sõltu nende meetodite läbiviimine varasema genoomse informatsiooni kättesaadavusest. Samas vajavad mõlemad suurt sekveneerimisvõimekust. Lisaks genoomse informatsiooni muutusele saab kalade vähi uurimiseks kasutada ka meetodeid, mis hindavad DNA kahjustusi nagu komeet ja komeet-FISH ja UDS. Kuigi need testid ei vaja referentsgenoomi, vajavad need siiski elusaid rakke ning nende läbiviimine on tihtipeale aeglane ja töömahukas.

Komeet-FISH ja UDS ei ole praktilised sadade või tuhandete proovide analüüsiks, seetõttu sobivad need testid pigem väiksema mahuga uuringutesse. Komeedi testil saab sooritada sadu katseid päevas, mis teeb selle paremaks DNA kahjustuste hindamise meetodiks rohkete

proovi koguste korral. Metülatsioonimustrite analüüsiks sobib odavama hinna tõttu paremini RRBS kui WGBS. Metaboliitide tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks on võimalik kasutada nii NMR-i kui ka MS-i. NMR on mittedestruktiivne ja sellega on võimalik sooritada struktuurset ja kvantitatiivset metaboliitide analüüsi. Küll aga on NMR meetodi tundlikus piiratud ning spektrite tõlgendamine võib olla keeruline. MS on tundlikum ja sellel meetodil on laiem analüütiline ulatus. Samas on MS-analüüsi teostamine tehniliselt keeruline ja igasuguste metaboolimustrite sidumine vähitekke tõenäosusega eeldab keeruliste statistiliste ja bioinformaatiliste meetodite rakendamist ning ranget valideerimisprotokolli (Kumar ja Misra, 2019)

Kokkuvõte

Vähk on rakkude kontrollimatu jagunemine. Vähhkasvajad võivad areneda erinevatest kudedest mitmesuguste mutatsioonide tulemusel. Geneetilised kõrvalekalded, mis võivad haigust esile kutsuda, võivad tekkida erinevatel põhjustel. Neoplasia esineb lisaks inimestele ka loomadel. Ka kaladel arenevad mutatsioonide tulemusel vähhkasvajad, mis takistavad nende normaalset elukäiku ning võivad osutada hukatuslikuks. Kalade sagedaseimad mutageenid on erinevad saasteained, DNA oksüdatiivne stress, raskemetallid, orgaanilised saasteained ja pestitsiidid. Mutageenid ei tekita vähki, kuid neil on potentsiaal kahjustada DNA-d ja seeläbi suurendada vähi väljakujunemise tõenäosust.

Molekulaarsete meetodite abil on võimalik tuvastada kõrvalekaldeid rakkudes, mis suurendavad vähiriski. Erinevate molekulaarsete meetoditega saab uurida erinevaid rakulisi ja molekulaarseid aspekte. Vähi uurivates teadustöödes on genoomipõhised lähenemisviisid olulised, kuna need aitavad leida konkreetseid muutusi DNA järjestustes, mutatsioone või kooptiivsete muutusi, mis kõik võivad olla haiguse vallandumise põhjuseks. Neid erisusi tuvastades võib leida vastused küsimustele, kuidas ja miks vähk tekib. Genoomi järjestustel põhinevad meetodid on WGS, WES, SNP, PCR, CGH, Southern blot ja FISH testid. SNP-analüüs ja PCR on üsna lihtsad soortatavad ja soodsad ning seetõttu sobivad need hästi suuremateks ökoloogilisteks uuringuteks. WGS ja WES pakuvad kõige põhjalikumat ülevaadet DNA-st, kuid need testid nõuavad läbiviimiseks rohkelt ressursse ja eelteadmisi DNA järjestusest. Southern blot ja FISH on küll informatiivsed, kuid aeganõudvad ja keerukad, mistõttu neid kasutatakse pigem spetsiifilistes laboritingimustes.

Lisaks genoomile on võimalik analüüsida ka geeniekspressiooni. Nii RNA sekveneerimine kui ka SSH-abil on võimalik uurida, millised geenid on rakkudes aktiivsed ja kui tugevalt neid ekspresseeritakse. RNA sekveneerimine annab põhjaliku ja kvantitatiivse ülevaate raku transkriptomist. SSH toimib pigem sõelumismeetodina, keskendudes ainult nende geenide leidmisele, mis on kahes proovis erinevalt ekspresseeritud. Meetodid ei eelda referentsgenoomi ja seetõttu sobivad need hästi ka mittemudelorganismide uurimiseks. Proteoomika seevastu annab veel täpsemat teavet selle kohta, millised valke toodetakse ja kui palju neid leidub. WB on täpne ja suunatud meetod, mille abil saab kindlaks määrata, kas teatud konkreetne valk esineb proovis ning kui seda on siis palju. WB kasutab antikehi ja sobib hästi väiksemamahulisteks analüüsideks.

Lisaks geneetilistele muutustele võivad DNA kahjustused mängida olulist rolli vähkkasvajate arengus, ohustades genoomi stabiilsust. DNA kahjustuste uurimiseks saab kasutada mitmeid molekulaarseid meetodeid, nagu komeet test ja komeet-FISH. UDS testis uuritakse raku aktiivset võimet parandada kahjustusi. 32P järelmärgistamise testis, kui palju leidub DNA-s modifitseeritud nukleotiide. Need meetodid ei otsi otseselt DNA järjestusi ega mutatsioone, vaid keskenduvad DNA kahjustuste olulisusele. Need meetodite läbiviimine sageli aeganõudev ja töömahukas protsess.

Metabloomika võimaldab mõista kuidas organismi biokeemia reageerib erinevatele muutustele. Metabloomikat saab kasutada vähi puhul, kuna kasvajate tekkega kaasnevad muutused raku ainevahetuses. Nii NMR kui ka MS on otstarbekad tööriistad metaboliitide mõõtmiseks. Mõlemad meetodid vajavad spetsiifilisi tingimusi ja teadmisi nende edukaks sooritamiseks. Meetodid on tehniliselt keerukad, kuid nende potentsiaal haiguse varajaseks avastamiseks ja raviks on suur.

Kõik ülaltoodud meetodid aitavad paremini aru saada, millised tegurid võivad vähki põhjustada. Seda teades on võimalik vähki paremini avastada ja ravida. Sobiva meetodi valik sõltub alati sellest, millist organismi uuritakse ja mis on uurimistöö eesmärk. Siiski kui võtta arvesse meetodite praktilisust, kuluefektiivsust ja vajamineva proovi hulka võiks suuremahulistesse ökoloogilistesse uuringutesse kõige paremini sobida PCR põhine SNP-analüüs.

Summary

Molecular methods for assessing the probability of cancer development and cancer prevalence in fish populations in polluted and clean environments.

Laura Atspol

Cancer is a complex disease of uncontrollably proliferating cells; it can result from a variety of causes such as DNA mutations or DNA damage. While mutagens themselves do not directly cause cancer, they can increase its likelihood. Environmental pollutants, oxidative stress, heavy metals, organic contaminants, and pesticides have been found to be carcinogenic to living organisms in aquatic environments.

Molecular methods are useful tools for early detection of cellular changes that signal an increased cancer risk. Different molecular methods detect different cellular functions ranging from DNA sequence alterations to changes in gene expression and epigenetic regulation. Combining methods could be optimal for understanding cancer. Monitoring cancer in feral fishes could be complicated, especially because cancer in wild fishes is often brought on by a variety of environmental factors.

The molecular methods that are used for determining genetic code, SNP analysis could be considered a practical choice for large scale studies due to its cost effectiveness and simple procedures. However, the use of this test is limited to known sequences. The PCR method is also well-suited for targeted gene validation. This test has been widely used in ecological and environmental studies. Methods such as CGH and FISH are more commonly applied in medical diagnostics because of their complexity and large amount of resources needed to perform the tests. Whole-genome sequencing (WGS) and Whole-exome sequencing (WES) is capable of providing the most extensive data on DNA. But it also needs the most resources to perform and it only works with a known reference.

Using gene expression analysis like RNA sequencing and suppression subtractive hybridization (SSH) makes it possible to detect active genes and assess the differences in their expression levels. RNA sequencing and SSH methods do not require a reference genome, which makes these methods suitable for studying non-model organisms. Studying proteomic aspects can provide further insights into the functional state of cells. Western blotting (WB) is suitable for small-scale analysis of specific proteins in samples.

Changes in gene expression can also be affected by epigenetic modifications, such as DNA methylation. Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) could be considered a cost-effective method for determining DNA methylation in CpG-rich regions. On account of these points the RRBS method is better suited for large-scale research. Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) gives a more complete view of the genome, but it is more expensive and technically challenging to perform.

In addition to sequence and expression changes, it is possible to measure DNA damage. Methods that can assess this are the comet assay, Comet-FISH. UDS test focuses on cells ability to repair DNA. 32P-postlabeling test assesses how many modified nucleotides DNA sample has. These approaches do not require prior knowledge of the DNA sequence but they are and are generally quite labor-intensive. Comet assay, Comet-FISH and UDS tests also depend on live cells. These reasons limit the usage of those tests in large-scale studies or in field studies.

Metabolomics enables understanding of how an organism biochemically responds to various changes. Metabolomics can be applied to cancer research, as tumor development is accompanied by alterations in cellular metabolism.. Studying these changes could be useful in early detection of the disease. Nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) could be used to study metabolomics. NMR can offer structural information while being non-destructive to the sample, however it lacks sensitivity. MS offers high precision and resolution but it requires more complex sample preparation.

Overall, these molecular methods could improve scientific understanding of the reasons behind cancer. Choosing the most appropriate method depends on the organism under study, the nature of data required and the amount of available resources. When applied, these methods could detect the early beginnings of cancer. However, when considering factors such as practicality, cost-effectiveness, and sample throughput, PCR-based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis emerges as particularly suitable for large-scale ecological investigations.

Viited

- Afanasieva, K., Sivolob, A., (2018). Physical principles and new applications of comet assay. *Biophysical Chemistry*, 238, 1-7, doi: 10.1016/j.bpc.2018.04.003
- Ahmad, E., Ali, A., Sharma, A. K., ... Saluja, S. S. (2022). Molecular approaches in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 537, 60-73, doi: 10.1016/j.cca.2022.09.027
- Ahmed, R., Zaman, T., Chowdhury, F., Mraiche, F., Tariq, M., Ahmad, I. S., Hasan, A. (2022). Single-cell RNA sequencing with spatial transcriptomics of cancer tissues. *International journal of molecular sciences*, 23:6, 3042, doi: 10.3390/ijms23063042
- Amenyogbe, E., Huang, J.- sheng, Chen, G., Wang, Z. (2021). An overview of the pesticides' impacts on fishes and humans. *International Journal of Aquatic Biology*, 9:1, 55–65, doi: 10.22034/ijab.v9i1.972
- Anderson, E. C., Garza, J. C. (2006). The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics*, 172:4, 2567-2582, doi: 10.1534/genetics.105.048074
- Andrade, C. (2020). Sample size and its importance in research. *Indian journal of psychological medicine*, 42:1, 102-103, doi: 10.4103/IJPSYM.IJPSYM_504_19
- Andreou, I., Storbeck, M., Hahn, P., Rulli, S., Lader, E. (2024). Exome Sequencing Starting from Single Cells. *Current Protocols*, 4:9, e70017, doi: 10.1002/cpz1.70017
- A NSW Government veebilehekülg (2023). Vaadatud 5.11.2023
<https://www.cancer.nsw.gov.au/about-cancer/cancer-basics/what-is-cancer>
- Aziz, K. H. H., Mustafa, F. S., Omer, K. M., Hama, S., Hamarawf, R. F., Rahman, K. O. (2023). Heavy metal pollution in the aquatic environment: efficient and low-cost removal approaches to eliminate their toxicity: a review. *RSC advances*, 13:26, 17595-17610, doi: 10.1039/D3RA00723E
- Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Priestley, C. C., Meier, S., Walker, J. S., Brunborg, G., Collins, A. R. (2013). A comparative performance test of standard, medium-and

high-throughput comet assays. *Toxicology in vitro*, 27:2, 768-773, doi:
10.1016/j.tiv.2012.12.006

Baines, C., Lerebours, A., Thomas, ... Sepp, T. (2021). Linking pollution and cancer in aquatic environments: A review. *Environment International*, 149, 106391, doi:
10.1016/j.envint.2021.106391

Baines, C., Meitern, R., Kreitsberg, R., Sepp, T. (2022). Comparative study of the evolution of cancer gene duplications across fish. *Evolutionary Applications*, 15:11, 1834-1845, doi: 10.1111/eva.13481

Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W. A., Jiang, H., Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*, 13, CIN-S13779, doi:
10.4137/CIN.S13779

Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46:5, 1213-1224, doi:
10.1042/BST20180519

Bassaganyas, L., Freedman, G., Vaka, D., ... Kwok, P. Y. (2018). Whole exome and whole genome sequencing with dried blood spot DNA without whole genome amplification. *Human mutation*, 39:1, 167-171, doi: 10.1002/humu.23356

Bassaganyas, L., Freedman, G., Vaka, D., Wan, E., Lao, R., Chen, F., Kwok, P. Y. (2018). Whole exome and whole genome sequencing with dried blood spot DNA without whole genome amplification. *Human mutation*, 39:1, 167-171, doi:
10.1002/humu.23356

Baumann, P. C., Smith, W. D., Parland, W. K. (1987). Tumor frequencies and contaminant concentrations in brown bullheads from an industrialized river and a recreational lake. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116:1, 79-86, doi:
10.1577/1548-8659(1987)116<79:TFACCI>2.0.CO;2

- Beemelmans, A., Bouchard, R., Michaelides, S., ... Moore, J. S. (2025). Development of SNP Panels From Low-Coverage Whole Genome Sequencing (lcWGS) to Support Indigenous Fisheries for Three Salmonid Species in Northern Canada. *Molecular Ecology Resources*, 25:3, doi: 10.1111/1755-0998.14040
- Begum, H., Murugesan, P., Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*, 73:1, 58-69, doi: 10.2144/btn-2022-0003
- Bernstein, C., Prasad, A. R., Nfonsam, V., Bernstein, H., (2013). *New Research Directions in DNA Repair*. Rijeka: InTech.
- Bernstein, C., Prasad, A. R., Nfonsam, V., Bernstein, H. (2013). *DNA damage, DNA repair and cancer* (pp. 413-465). Rijeka, Croatia: InTech, doi: 10.5772/53919
- Bhuyan, M. S. (2022). Effects of microplastics on fish and in human health. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 827289, doi: 10.3389/fenvs.2022.827289
- Bibi, M., Samiullah, F. B., Saba Afzal, S. (2023). Essential and non-essential heavy metals sources and impacts on human health and plants. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 12:2, 835-847, doi: 10.19045/bspab.2023.120083
- Biemar, F., Foti, M. (2013). Global progress against cancer—challenges and opportunities. *Cancer biology & medicine*, 10:4, 183-186, doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2013.04.001
- Binkova, B., Dobiáš, L., Wolff, T., Šrám, R. J. (1994). 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in tissues of rats exposed to coke-oven emissions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307:1, 355-363, doi: 10.1016/0027-5107(94)90309-3
- Bisaga, M., Lowe, M., Hegarty, M., Abberton, M., Ravagnani, A. (2017). Deep sequencing of suppression subtractive hybridisation drought and recovery libraries of the non-model crop *Trifolium repens* L. *Frontiers in Plant Science*, 8, 213, doi: 10.3389/fpls.2017.00213

- Bishop, R. (2010). Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, 3:1, 85-95, doi: 10.1093/biohorizons/hzq009
- Brllek, P., Bulić, L., Bračić, M., Projić, P., Škaro, V., Shah, N., Shah, P., Primorac, D. (2024). Implementing whole genome sequencing (WGS) in clinical practice: advantages, challenges, and future perspectives. *Cells*, 13:6, 504, doi: 10.3390/cells13060504
- Brown, E. R., Hazdra, J. J., Keith, L., Greenspan, I., Kwapinski, J. B. G., Beamer, P. (1973). Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to nonpolluted Canadian waters. *Cancer Research*, 33:2, 189-198.
- Browning, H. M., Gulland, F. M., Hammond, J. A., Colegrove, K. M., Hall, A. J. (2015). Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370:1673, doi: 10.1098/rstb.2014.0228
- Brumer, Y., Shakhnovich, E. I. (2004). Importance of DNA repair in tumor suppression. *Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 70:6, 061912, doi: 10.1103/PhysRevE.70.061912
- Bui, L. C., Leandri, R. D., Renard, J. P., & Duranthon, V. (2005). SSH adequacy to preimplantation mammalian development: scarce specific transcripts cloning despite irregular normalisation. *BMC genomics*, 6, 1-9, doi: 10.1186/1471-2164-6-155
- Calduch-Giner, J. A., Davey, G., Saera-VilaDavey, A., Houeix, B., Talbot, A., Prunet, P., Cairns, M., T., Pérez-Sánchez, J. (2010). Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC genomics*, 11, 1-18, doi: doi.org/10.1186/1471-2164-11-193
- Centers for Disease Control and Prevention, National Biomonitoring Program (2024). Vaadatud 20.02.2024 https://www.cdc.gov/biomonitoring/PAHs_FactSheet.html
- Chen, X., Sullivan, P. F. (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The pharmacogenomics journal*, 3:2, 77-96, doi: 10.1038/sj.tpj.6500167

- Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., Wang, A. L., (2018). Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 190-198, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045
- Chowdhury, S., Saikia, S. K. (2020). Oxidative stress in fish: a review. *Journal of Scientific Research*, 12:1, 145-160, doi: 10.3329/jsr.v12i1.41716
- Coe, B. P., Ylstra, B., Carvalho, B., Meijer, G. A., MacAulay, C., Lam, W. L. (2007). Resolving the resolution of array CGH. *Genomics*, 89:5, 647-653, doi: 10.1016/j.ygeno.2006.12.012
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23:3, 143-151, doi: 10.1093/mutage/gem051
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26:3, 249-261, doi: 10.1385/MB:26:3:249
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S.,... Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17, 1-19, doi: 10.1186/s13059-016-0881-8
- Crutchfield, C. A., Thomas, S. N., Sokoll, L. J., Chan, D. W. (2016). Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clinical proteomics*, 13, 1-12, doi: 10.1186/s12014-015-9102-9
- Çiftçi, G. Y., Şenkuytu, E., Incir, S. E., Yuksel, F., Ölçer, Z., Yıldırım, T., Kılıç, A., Uludağ, Y. (2016). First paraben substituted cyclotetraphosphazene compounds and DNA interaction analysis with a new automated biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 331-338, doi: 10.1016/j.bios.2016.01.061
- Davies, J. J., Wilson, I. M., Lam, W. L. (2005). Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome research*, 13, 237-248, doi: 10.1007/s10577-005-2168-x

- DeSaix, M. G., Rodriguez, M. D., Ruegg, K. C., Anderson, E. C. (2024). Population assignment from genotype likelihoods for low-coverage whole-genome sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*, 15:3, 493-510, doi: 10.1111/2041-210X.14286
- Dey, W. P., Peck, T. H., Smith, C. E., Kreamer, G. L. (1993). Epizootology of hepatic neoplasia in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) from the Hudson River estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50:9, 1897-1907, doi: 10.1139/f93-212
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009). The comet assay: a versatile tool for assessing DNA damage, doi: 10.1039/9781847559746-00003
- Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R. (2004). On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic toxicology*, 68:1, 27-37, doi: 10.1016/j.aquatox.2004.01.019
- EFSA Scientific Committee, Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., ... Schlatter, J. (2017). Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA Journal*, 15:12, doi: 10.2903/j.efsa.2017.5113
- El Kamouh, M., Brionne, A., Sayyari, A., Lallias, D., Labbé, C., Laurent, A. (2024). Strengths and limitations of reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) in the perspective of DNA methylation analysis in fish: a case-study on rainbow trout spermatozoa. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-16, doi: 10.1007/s10695-024-01326-5
- Feitsma, H., Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a cancer model. *Molecular Cancer Research*, 6:5, 685-694., doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2167
- Feng, Y., Li, Z., Li, W. (2025). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Environmental Persistence and Human Health Risks. *Natural Product Communications*, 20:1, doi: 10.1177/1934578X241311451

- Ferraro, E., Harrison, S. H., Duke, E., Troan, B., Boddy, A., Abegglen, L. M., Harrison, T. M. (2024). Retrospective study of the prevalence, histopathology, therapy, and survival time of neoplastic disease in fish. *Animals*, 14:3, 464, doi: 10.3390/ani14030464
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C., Struve, J., (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 522, 1-2, 187-195, doi: doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.018
- Fuentes-Pardo, A. P., Ruzzante, D. E. (2017). Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: Advantages, limitations and practical recommendations. *Molecular ecology*, 26:20, 5369-5406, doi: 10.1111/mec.14264
- Funk, D., Sorg, B. L., Lindner, S. C., Schmeiser, H. H. (2010). 32P-postlabeling analysis of DNA adducts formed by leukotriene A4 (LTA4). *Environmental and molecular mutagenesis*, 51:4, 338-343, doi: 10.1007/978-1-62703-529-3_21
- Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., ... Collins, A. (2019). The comet assay in animal models: From bugs to whales—(Part 2 Vertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 130-164, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.04.002
- Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:3, 1-4, doi: 10.1038/jid.2013.1
- Giraudeau, M., Sepp, T., Ujvari, B., Ewald, P. W., Thomas, F. (2018). Human activities might influence oncogenic processes in wild animal populations. *Nature Ecology & Evolution*, 2:7, 1065-1070, doi: 10.1038/s41559-018-0558-7
- Giraudeau, M., Vincze, O., Dupont, ... Thomas, F. (2024). Approaches and methods to study wildlife cancer. *Journal of Animal Ecology*, 93:10, 1410-1428, doi: 10.1111/1365-2656.14144
- Glei, M., Hovhannisyan, G., Pool-Zobel, B., (2009). Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 631:1, 33-43, doi: 10.1016/j.mrrev.2008.01.006

- Glish, G., Vachet, R. (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 140–150, doi: 10.1038/nrd1011
- Goswami, S., Adhikary, S., Bhattacharya, S., Agarwal, R., Ganguly, A., Nanda, S., Rajak, P. (2024). The alarming link between environmental microplastics and health hazards with special emphasis on cancer. *Life Sciences*, 122937, doi: 10.1016/j.lfs.2024.122937
- Granada, L., Lemos, M. F., Cabral, H. N., Bossier, P., Novais, S. C. (2018). Epigenetics in aquaculture—the last frontier. *Reviews in Aquaculture*, 10:4, 994-1013, doi: 10.1111/raq.12219
- Grønbaek, K., Hother, C., Jones, P. A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *Apmis*, 115:10, 1039-1059, doi: 10.1111/j.1600-
- Guan, Z., Begg, C. B., Shen, R. (2023). Predicting cancer risk from germline whole-exome sequencing data using a novel context-based variant aggregation approach. *Cancer Research Communications*, 3:3, 483-488, doi: 10.1158/2767-9764.CRC-22-0355
- Hamed, M., Soliman, H. A., Osman, A. G., Sayed, A. E. D. H. (2020). Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 14581-14588, doi: 10.1007/s11356-020-07898-y
- Harrison, D. J., Doe, J. E. (2021). The modification of cancer risk by chemicals. *Toxicology Research*, 10:4, 800-809, doi: 10.1093/toxres/tfab064
- Hendricks, S.A., Storfer, A., Hohenlohe, P.A. (2020). Population Genomics of Wildlife Cancer. In: Hohenlohe, P.A., Rajora, O.P. (eds) *Population Genomics: Wildlife. Population Genomics*. Springer, Cham. doi: 10.1007/13836_2020_81
- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England journal of medicine*, 361:15, 1475-1485, doi: 10.1056/NEJMra0804615
- Hong, M., Tao, S., Zhang, L., Diao, L. T., Huang, X., Huang, S., Xie, S., J., Xiao, S., J., Zhang, H. (2020). RNA sequencing: new technologies and applications in cancer

research. *Journal of hematology & oncology*, 13, 1-16, doi:
10.1186/s13045-020-01005-x

Hou, Z., Jiang, P., Swanson, S. A., Elwell, A. L., Nguyen, B. K. S., Bolin, J. M., Stewart, R., Thomson, J. A. (2015). A cost-effective RNA sequencing protocol for large-scale gene expression studies. *Scientific reports*, 5:1, 9570 , doi: 10.1038/srep09570

Hovhannisyan, G, G,. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*, 3:17, doi: doi: 10.1186/1755-8166-3-17

Inazawa, J., Inoue, J., Imoto, I. (2004). Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer science*, 95:7, 559-563, doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb02486.x

Iyama, T., Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12:8, 620-636, doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015

Jackson, T., Ishengoma, E., Rhode, C. (2021). Cross-species exon capture and whole exome sequencing: application, utility and challenges for genomic resource development in non-model species. *Marine Biotechnology*, 23:4, 560-575, doi:
10.1007/s10126-021-10046-

Johnson, J. D., Andrews, J. E., Allard, S. (2001). A model for understanding and affecting cancer genetics information seeking. *Library & Information Science Research*, 23:4, 335-349, doi: 10.1016/S0740-8188(01)00094-9

Johnson, N. A., Hamoudi, R. A., Ichimura, K., Liu, L., Pearson, D. M., Collins, V. P., Du, M. Q. (2006). Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Laboratory investigation*, 86(9), 968-978, doi: 10.1038/labinvest.3700441

Jonker, M. J., de Leeuw, W. C., Marinković, M., ... Breit, T. M. (2014). Absence/presence calling in microarray-based CGH experiments with non-model organisms. *Nucleic acids research*, 42:11, doi: 10.1093/nar/gku343

- K. AL Tae, S., Al-Mallah, K., Kh. Ismail, H. (2020). Review On Some Heavy Metals Toxicity On Freshwater Fishes. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 5:3, 78-86. doi: 10.21608/javv.2020.100157
- Kelly, C. M., Latimer, J. J. (2005). Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Methods in molecular biology*, 291, 303-320, doi: 10.1385/1-59259-840-4:303
- Klaene, J. J., Sharma, V. K., Glick, J., Vouros, P. (2013). The analysis of DNA adducts: The transition from ³²P-postlabeling to mass spectrometry. *Cancer letters*, 334:1, 10-19, doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.007
- Klein, H. G., Bauer, P., Hambuch, T. (2014). Whole genome sequencing (WGS), whole exome sequencing (WES) and clinical exome sequencing (CES) in patient care. *LaboratoriumsMedizin*, 38:4, 221-230, doi: 10.1515/labmed-2014-0025
- Kuiper, R. P., Ligtenberg, M. J., Hoogerbrugge, N., van Kessel, A. G. (2010). Germline copy number variation and cancer risk. *Current opinion in genetics & development*, 20:3, 282-289, doi: 10.1016/j.gde.2010.03.00
- Kumar, A., Misra, B. B. (2019). Challenges and opportunities in cancer metabolomics. *Proteomics*, 19:21-22, 1900042, doi: 10.1002/pmic.201900042
- Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38:4, 283-293, doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007
- Labotkin, R. (2004). Vähk on avastatav ja ravitav. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Li, C., Guan, J., Li, Y., ... Zhao, M. (2023). Protocol for high-sensitivity western blot on murine hematopoietic stem cells. *STAR protocols*, 4:4, 102578, doi: 10.1016/j.xpro.2023.102578
- Li, P., Zhang, J., Xie, H., Liu, C., Liang, S., Ren, Y., Wang, W. (2015). Heavy metal bioaccumulation and health hazard assessment for three fish species from Nansi

Lake, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94, 431-436, doi: 10.1007/s00128-015-1475-y

Long, S. M., Tull, D. L., De Souza, D. P., Kouremenos, K. A., Dayalan, S., McConville, M. J., Hassell, K. L., Pettigrove, V. J., Gagnon, M. M. (2020). Metabolomics provide sensitive insights into the impacts of low level environmental contamination on fish health—a pilot study. *Metabolites*, 10:1, 24, doi: 10.3390/metabo10010024

Lorenzana, G. P., Figueiró, H. V., Coutinho, L. L., Villela, P. M., Eizirik, E. (2024). Comparative assessment of genotyping-by-sequencing and whole-exome sequencing for estimating genetic diversity and geographic structure in small sample sizes: insights from wild jaguar populations. *Genetica*, 152:4, 133-144, doi: 10.1007/s10709-024-00212-5

Lukyanov, S. A., Rebrikov, D., Buzdin, A. A. (2007). Suppression subtractive hybridization. *Nucleic acids hybridization modern applications*, 53-84. Dordrecht: Springer Netherlands.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101:1, 13-30, doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006

Macklin, A., Khan, S., Kislinger, T. (2020). Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clinical proteomics*, 17, 17, doi: 10.1186/s12014-020-09283-w

Madhuri, S., Pandey, G., Bhandari, R., Shrivastav, A. B. (2012). Fish cancer developed by environmental pollutants. *International Research Journal of Pharmacy*, 3:10, 17-19.

Madle, S., Dean, S. W., Andrae, ... Mori, H. (1994). Recommendations for the performance of UDS tests in vitro and in vivo. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312:3, 263-285, doi: 10.1016/0165-1161(94)00013-1

Martineau, D., Lemberger, K., Dallaire, A., Labelle, P., Lipscomb, T. P., Michel, P., Mikaelian, I. (2002). Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. *Environmental health perspectives*, 110:3, 285-292, doi: 10.1289/ehp.02110285

- Matsuda, K. (2017). PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. *Advances in clinical chemistry*, 80, 45-72, doi: 10.1016/bs.acc.2016.11.002
- McAloose, D., Newton, A. (2009) Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nat Rev Cancer*, 9, 517–526, doi:10.1038/nrc2665
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49:4, 509-517, doi: 10.1002/bmb.21516
- Menzel, M., Ossowski, S., Kral, S., ... Stenzinger, A. (2023). Multicentric pilot study to standardize clinical whole exome sequencing (WES) for cancer patients. *NPJ Precision Oncology*, 7:1, 106, doi: 10.1038/s41698-023-00457-x
- Mirbahai, L., Yin, G., Bignell, J. P., Li, N., Williams, T. D., Chipman, J. K. (2011). DNA methylation in liver tumorigenesis in fish from the environment. *Epigenetics*, 6:11, 1319-1333, doi: 10.4161/epi.6.11.17890
- Mohanty, B. P., Mohanty, S., Mitra, T., Mahanty, A., Ganguly, S., Singh, S. (2019). Omics technology in fisheries and aquaculture. *Advances in fish research*, 7, 1-30
- Mottaghi-Dastjerdi, N., Soltany-Rezaee-Rad, M., Sepehrizadeh, Z., Roshandel, G., Ebrahimifard, F., Setayesh, N. (2014). Genome expression analysis by suppression subtractive hybridization identified overexpression of Humanin, a target gene in gastric cancer chemoresistance. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 1-7, doi: 10.1186/2008-2231-22-14
- Nagarajan, P., Tetzlaff, M. T., Curry, J. L., Prieto, V. G. (2017). Use of new techniques in addition to IHC applied to the diagnosis of melanocytic lesions, with emphasis on CGH, FISH, and mass spectrometry. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 108:1, 17-30, doi: 10.1016/j.adengl.2016.05.030

- Nakabayashi, K., Yamamura, M., Hasegawa, K., Hata, K. (2023). Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). In: Hatada, I., Horii, T. (eds) Epigenomics. Methods in Molecular Biology, vol 2577. Humana, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-0716-2724-2_3
- Nakagawa, H., Fujita, M. (2018). Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer science*, 109:3, 513-522, doi: 10.1111/cas.13505
- Natesh, M., Taylor, R. W., Truelove, N. K., Hadly, E. A., Palumbi, S. R., Petrov, D. A., Ramakrishnan, U. (2019). Empowering conservation practice with efficient and economical genotyping from poor quality samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:6, 853-859, doi: 10.1111/2041-210X.13173
- National Cancer Institute at the National Institutes of Health kodulehekülg (2024). Vaadatud 16.02.2024
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/oxidative-stress#top>
- Olova, N., Krueger, F., Andrews, S., Oxley, D., Berrens, R. V., Branco, M. R., & Reik, W. (2018). Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. *Genome biology*, 19, 1-19, doi: 10.1186/s13059-018-1408-2
- Oomen, R. A., Hutchings, J. A. (2017). Transcriptomic responses to environmental change in fishes: insights from RNA sequencing. *Facets*, 2:2, 610-641, doi: 10.1139/facets-2017-0015
- Ortega-Recalde, O., Peat, J.R., Bond, D.M., Hore, T.A. (2021). Estimating Global Methylation and Erasure Using Low-Coverage Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS). In: Bogdanovic, O., Vermeulen, M. (eds) TET Proteins and DNA Demethylation. Methods in Molecular Biology, vol 2272. Humana, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-0716-1294-1_3

- Padervand, M., Lichtfouse, E., Robert, D., Wang, C. (2020). Removal of microplastics from the environment. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 18:3, 807-828, doi: 10.1007/s10311-020-00983-1
- Pesavento, P. A., Agnew, D., Keel, M. K., & Woolard, K. D. (2018). Cancer in wildlife: patterns of emergence. *Nature Reviews Cancer*, 18:10, 646-661, doi: 10.1038/s41568-018-0045-0
- Phillips, D. H. (1997). Detection of DNA modifications by the 32P-postlabelling assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 378, 1:2, 1-12, doi: 10.1016/S0027-5107(97)00092-4
- Pinkel, D., Albertson, D. G. (2005). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature genetics*, 37: 6, 11-17, doi: 10.1038/ng1569
- Podzorski, R.P., Loeffelholz, M., Hayden, R.T. (2006). Detection and Characterization of Molecular Amplification Products: Agarose Gel Electrophoresis, Southern Blot Hybridization, Restriction Enzyme Digest Analysis, and Enzyme-Linked Immunoassay. In: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer, Boston, MA, doi: 10.1007/0-387-32892-0_15
- Poulsen, G. A., Sørensen, S. G., Juul, R. I., Nielsen, M. M., Pedersen, J. S. (2023). Sequence dependencies and mutation rates of localized mutational processes in cancer. *Genome Medicine*, 15:1, 63, doi: 10.1186/s13073-023-01217-z
- Pös, O., Radvanszky, J., Styk, J., Pös, Z., Buglyó, G., Kajsik, M., Budis, J., Nagy, B., Szemes, T. (2021). Copy number variation: methods and clinical applications. *Applied Sciences*, 11:2, 819, doi: 10.3390/app11020819
- Pruvost, M., Reissmann, M., Benecke, N., Ludwig, A. (2012). From genes to phenotypes—Evaluation of two methods for the SNP analysis in archaeological remains: Pyrosequencing and competitive allele specific PCR (KASPar). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194:1, 74-81, doi: 10.1016/j.aanat.2011.10.007

- Puranachot, P. (2024). *Next-Generation Sequencing Analysis of Cell-Free DNA Identifies Actionable Alterations and Genomic Features in Pediatric Cancers* (Doctoral dissertation) doi: 10.11588/heidok.00030987
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., & Zhong, G. (2014). RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics: a journal of integrative biology*, 18:2, 98-110, doi: 10.1089/omi.2013.0110
- Raj, G. V., Moreno, J. G., Gomella, L. G. (1998). Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 82:8, 1419-1442, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19980415)82:8<1419::AID-CNCR1>3.0.CO;2-4
- Rapp, A., Hausmann, M., Greulich, K. O. (2005). The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. *Molecular Toxicology Protocols*, 107-119, doi: 10.1385/1-59259-840-4:107
- Rasal, K. D., Chakrapani, V., Pandey, A. K., Rasal, A. R., Sundaray, J. K., Ninawe, A., Jayasankar, P. (2017). Status and future perspectives of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers in farmed fishes: Way ahead using next generation sequencing. *Gene Reports*, 6, 81-86, doi: 10.1016/j.genrep.2016.12.004
- Rasal, K. D., Kumar, P. V., Asgolkar, P., ... Nagpure, N. (2024). Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) array: an array of hope for genetic improvement of aquatic species and fisheries management. *Blue Biotechnology*, 1:1, 3, doi: 10.1186/s44315-024-00004-8
- Rebrikov, D. V., Desai, S. M., Siebert, P. D., & Lukyanov, S. A. (2004). Suppression subtractive hybridization. *Gene Expression Profiling: Methods and Protocols*, 258, 107-134, doi:10.1385/1-59259-751-3:107
- Rochman, C. M., Brookson, C., Bikker, J., ... Hung, C. (2019). Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental toxicology and chemistry*, 38:4, 703-711, doi: 10.1002/etc.4371

- Rodriguez-Mateos, P., Azevedo, N. F., Almeida, C., Pamme, N. (2020). FISH and chips: a review of microfluidic platforms for FISH analysis. *Medical microbiology and immunology*, 209:3, 373-391, doi: 10.1007/s00430-019-00654-1
- Rogers, J. A., Metz, L., Yong, V. W. (2013). Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular immunology*, 53:4, 421-430, doi: 10.1016/j.molimm.2012.09.013
- Santos, C. L., Pourrut, B., Ferreira de Oliveira, J. M. (2015). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*, 6, 216, doi: 10.3389/fgene.2015.00216
- Sarasamma, S., Lai, Y. H., Liang, S. T., Liu, K., Hsiao, C. D. (2018). The power of fish models to elucidate skin cancer pathogenesis and impact the discovery of new therapeutic opportunities. *International journal of molecular sciences*, 19:12, 3929, doi: 10.3390/ijms19123929
- Savic, S., Bubendorf, L. (2016). Common fluorescence in situ hybridization applications in cytology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140:12, 1323-1330, doi: 10.5858/arpa.2016-0202-RA
- Schartl, M. (2014). Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Disease models & mechanisms*, 7:2, 181-192, doi: 10.1242/dmm.012245
- Schwarze, K., Buchanan, J., Taylor, J. C., Wordsworth, S. (2018). Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genetics in Medicine*, 20:10, 1122-1130, doi: 10.1038/gim.2017.247
- Seaby, E. G., Pengelly, R. J., & Ennis, S. (2016). Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Briefings in functional genomics*, 15:5, 374-384, doi: 10.1093/bfgp/elv054
- Seddon, J. M., Parker, H. G., Ostrander, E. A., Ellegren, H. (2005). SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology*, 14:2, 503-511, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02435.x

- Shakoori, A.R. (2017). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. *Chromosome Structure and Aberrations*, 343–367, doi: 10.1007/978-81-322-3673-3_16
- Sharma, M. (2012). Certain Fish Species Used as Models in Cancer Research. Jigyasa, 6. Vaadatud 05.11.2023
https://www.researchgate.net/profile/Govind-Pandey/publication/343381546_Certain_fish_species_used_as_models_in_cancer_research/links/5f2669d1299bf134049a4481/Certain-fish-species-used-as-models-in-cancer-research.pdf
- Sharma, P., Pal, D., Gill, A. R., SinghTuli, H. (2025). Baicalein, a natural flavonoid in gastrointestinal cancers treatment: recent trends and future perspectives. *Medical Oncology*, 42:1, 1-9, doi: 10.1007/s12032-024-02587-z
- Sherman, J. H., Nair, R. S., Steinmetz, K. L., Mirsalis, J. C., Nestmann, E. R., Barter, J. A. (1998). Evaluation of unscheduled DNA synthesis (UDS) and replicative DNA synthesis (RDS) following treatment of rats and mice with p-dichlorobenzene. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 18:6, 309-318, doi: 10.1002/(SICI)1520-6866(1998)18:6<309::AID-TCM5>3.0.CO;2-P
- Shinawi, M., Cheung, S. W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*, 13:(17-18), 760-770, doi: 10.1016/j.drudis.2008.06.007
- Shlien, A., Malkin, D. (2009). Copy number variations and cancer. *Genome medicine*, 1, 6:62, doi: 10.1186/gm62
- Singh, V., Negi, R., Jacob, M., ... Qureshi, Q. (2023). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in aquatic ecosystem exposed to the 2020 Baghjan oil spill in upper Assam, India: Short-term toxicity and ecological risk assessment. *Plos one*, 18:11, doi: 10.1371/journal.pone.0293601
- Sjöström, J., Bergh, J. (2001). How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *Bmj*, 322:7301, 1538-1539, doi: 10.1136/bmj.322.7301.1538

- Sormunen, A., Koivulehto, E., Alitalo, K., Saksela, K., Laham-Karam, N., Ylä-Herttuala, S. (2023). Comparison of automated and traditional Western blotting methods. *Methods and Protocols*, 6:2, 43, doi: 10.3390/mps6020043
- Srinivas, P. R., Srivastava, S., Hanash, S., Wright Jr, G. L. (2001). Proteomics in early detection of cancer. *Clinical chemistry*, 47:10, 1901-1911, doi: 10.1093/clinchem/47.10.1901
- Stang, A., Witte, I. (2009). Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 675,1:2, 5-10, doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.01.007
- Subramani, R., Poudel, S., Smith, K. D., Estrada, A., & Lakshmanaswamy, R. (2022). Metabolomics of breast cancer: A review. *Metabolites*, 12:7, 643, doi: 10.3390/metabo12070643
- Syrmou, A., Tzetis, M., Fryssira, H., Kosma, K., Oikonomakis, V., Giannikou, K., Makrythanasis, P., Kitsiou-Tzeli, S., Kanavakis, E. (2013). Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. *Pediatric research*, 73:6, 772-776, doi: 10.1038/pr.2013.41
- Tang, Y. W., Stratton, C. W., Podzorski, R. P., Loeffelholz, M., Hayden, R. T. (2006). Detection and characterization of molecular amplification products: agarose gel electrophoresis, southern blot hybridization, restriction enzyme digest analysis, and enzyme-linked immunoassay. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*, 243-263, doi: 10.1007/0-387-32892-0_15
- Terashima, I., Suzuki, N., Shibutani, S. (2002). 32P-Postlabeling/polyacrylamide gel electrophoresis analysis: application to the detection of DNA adducts. *Chemical research in toxicology*, 15:3, 305-311, doi: 10.1021/tx010083c
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, ... Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 364:1526, 2027-2045, doi: 10.1098/rstb.2008.0284

- Thompson, C. T., Gray, J. W. (1993). Cytogenetic profiling using fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). *Journal of Cellular Biochemistry*, 53:S17G, 139-143, doi: 10.1002/jcb.240531127
- Thomsen, P. F., Willerslev, E. (2015). Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, 4-18, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35:3, 206-221, doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Tsuchiya, K, D., (2011). Fluorescence In Situ Hybridization. *Elsevier Inc*, 31, 525–542, doi: 10.1016/j.cll.2011.08.011
- Tuvikene, A. (1995). Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici*, 32:3, 295–309. <http://www.jstor.org/stable/23735700>
- Ullah, S., Zorriehzahra, M. J. (2015). Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3:1, 40-57, doi: 10.14737/journal.aavs/2015/3.1.40.57
- Vermeersch, K. A., Styczynski, M. P. (2013). Applications of metabolomics in cancer research. *Journal of carcinogenesis*, 12, 9, doi: 10.4103/1477-3163.113622
- Volpi, E; V., Bridger, J, M. (2018). FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*, 45:4, doi: 10.2144/000112811
- Wan, T. S., Ma, E. S. (2012). Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung medical journal*, 35:2, 96-110, doi: 10.4103/2319-4170.106161
- Wang-Michelitsch, J., Michelitsch, T. M. (2015). Cell transformation in tumor-development: a result of accumulation of Misrepairs of DNA through many generations of cells. *arXiv preprint arXiv:1505.01375*, doi: 10.48550/arXiv.1505.01375
- Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*, 275:3, 62-70.

- Welengane, E., da Silva Frade, L. F., Pinon, L. B. S., dos Santos, C. E. V., Cardoso, A. L., do Nascimento, L. A. S., Noronha, R. C. R. (2025). DNA Methylation in Fish of the Cichlid Family: A Systematic Review. *Heliyon*, doi: doi: 10.1016/j.heliyon.2025.e42626
- Wirgin, I., Waldman, J. R. (1998). Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399:2, 193-219, doi: 10.1016/S0027-5107(97)00256-X
- Wolff, D. J., Bagg, A., Cooley, L. D., Dewald, G. W., Hirsch, B. A., Jacky, P. B., Rao, K. W., Nagesh, Rao, P., American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. (2007). Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *The Journal of molecular diagnostics*, 9:2, 134-143, doi: 10.2353/jmoldx.2007.060128
- Xiao, W., Ren, L., Chen, Z., ... Shi, L. (2021). Toward best practice in cancer mutation detection with whole-genome and whole-exome sequencing. *Nature biotechnology*, 39:9, 1141-1150, doi: 10.1038/s41587-021-00994-5
- Zhang, Y. V., Rockwood, A. (2015). Impact of automation on mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 450, 298-303, doi: 10.1016/j.cca.2015.08.027
- Zhao, Z., Shilatifard, A. (2019). Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome biology*, 20, 1-16, doi: 10.1186/s13059-019-1870-

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Atspol ,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Molekulaarsed meetodid kalade vähitekke tõenäosuse ja vähi esinemissageduse hindamiseks reostunud ja puhtas keskkonnas ,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja(d) on Richard Meitern ,
(*juhendaja nimi*)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tartus
Laura Atspol
24.05.2025