

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Kaitsemehhanismid reostunud elupaigas Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*)  
näitel**

Magistritöö

30 EAP

Maiken Abel

Juhendajad PhD Tuul Sepp

PhD Jon Andres Eriksson

PhD Richard Meitern

TARTU 2022

## **INFOLEHT**

### **Kaitsemehhanismid reostunud elupaigas Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) näitel**

Antud töö eesmärk on anda ülevaade reostunud elupaikades elutsevate elusorganismide kaitsemehhanismidest ning võimalikest kohastumustest. Töö eksperimentaalosas kasutati loodusliku eksperimendina ära Purtse jõe tugev reostustase alamjooksul. Kontrollpopulatsioonina oli kaasatud puhtama Kunda jõe alamjooksu populatsioon. Kaitsemehhanismide markeritena kasutati antioksidant glutatiooni kontsentratsiooni maksas, tsütokroom P450 perekonna (CYP1A) ensüümide aktiivsust ning erinevusi geeniekspressioonis. Tulemustest ilmnnes, et reostunud Purtse jõe alamjooksu populatsioonil on kõrgem antioksidant glutatiooni kontsentratsioon. CYP1A ensüümide aktiivsused on kõrgemad puhta Kunda jõe kontrollpopulatsioonis. Geeniekspressiooni tulemused näitasid, et reostus mõjutab üldisemalt gene mis on seotud põletikuliste protsessidega, transkriptsiooni regulatsiooniga, kaasasündinud immuunsüsteemiga, raua homöostaasiga, oksüdatiivse stressiga, lipiidide biosünteesiga ning DNA ja kudede kahjustustega.

Märksõnad: vereostus, kohastumine, geeniekspressioon, kaitsemehhanismid, harilik trulling

CERCS klassifikaatorid: B260 Hüdrobioloogia, mere-bioloogia, veeökoloogia, limnoloogia

### **Defense mechanisms in polluted habitat: a study of Purtse river stone loaches**

The aim of this thesis is to give an overview of the defense mechanisms and potential adaptations of living organisms who live in polluted habitats. In the experimental part of the thesis Purtse rivers heavily polluted lower course was used as a natural experiment. Cleaner Kunda rivers lower course's stone loach population was used as a control population. The defense mechanism markers that were used to study the problem were antioxidant glutathione concentration in liver, cytochrome P450 family (CYP1A) enzyme activity levels and differences in gene expression. The results showed that polluted Purtse river lower course population have higher glutathione concentrations compared to populations with lesser pollution burden. CYP1A enzyme activities were higher in cleaner habitat Kunda river population compared to Purtse river populations. Gene expression differences showed that pollution affects genes that are related to inflammation, transcription regulation, innate immune system, iron homeostasis, oxidative stress and more.

Keywords: aquatic pollution, adaptation, gene expression, defense mechanisms, stone loach

CERCS classifications: Hydrobiology, marine biology, aquatic ecology, limnology

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Antropogeense reostuse mõju elusloodusele ja inimesele.....	6
1.2 Ülevaade Purtse jõest.....	7
1.3 Reostusega seotud kaitsemehhanismide geeniekspressioon kui potentsiaalne indikaator reostusega kohastumisele .....	8
1.4 Reostunud elupaigas elavate populatsioonide genoom ja selle uurimine.....	12
1.5 Glutatiooni roll antioksidantide poolt vahendatud kaitsemehhanismides .....	16
1.6 Biomarker etoksüresorufiini-O-detülaas (EROD).....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid .....	19
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Välitööde meetodid.....	20
2.2.2 Glutatiooni kontsentratsiooni mõõtmine .....	20
2.2.3 Etoksüresorufiin-O-deetülaas (EROD) aktiivsuse mõõtmine.....	21
2.2.4 RNA eraldamine maksast ja sekveneerimine .....	22
2.3 Tulemused .....	23
2.3.1 Glutatiooni ja etoksüresorufiin-O-detülaasi tulemused .....	23
2.3.2 Geeniekspressiooni erinevuste tulemused .....	27
2.4 Arutelu .....	35
KOKKUVÕTE .....	39
RESÜMEE .....	40
TÄNUSÕNAD .....	41
KASUTATUD ALLIKAD .....	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	49
LIHTLITSENTS.....	50

## KASUTATUD LÜHENDID

AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) – arüülsüsivesiniku retseptor

CYP1A (*Cytochrome P450 1A*) – tsütokroom P450 1A

DMSO (*dimethyl sulfoxide*) – dimetüülsulfoksiid

DNTB (*5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*)

EROD (*ethoxyresorufin-O-deethylase*) – etoksüresorufiin-O-detülaas

GPx (*glutathione peroxidase*) – glutatioon peroksidaas

GR (*glutathione reductase*) – glutatiooni reduktaas

GST (*glutathione-S-transferase*) – glutatioon-S-transferaa

GSH (*glutathione*) - glutatioon

HAH (*halogenated aromatic hydrocarbons*) – halogeenitud aromaatsed süsivesinikud

KAJ – Kunda alamjooks

KPE (*Potassium phosphate EDTA buffer*) – kaaliumfosfaat puhver

PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) – polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud

PAJ – Purtse alamjooks

PCB (*polychlorinated biphenyls*) – polüklooritud bifenüülid

PÜJ – Purtse ülemjooks

XAR (*xenobiotic-activated receptor*)

## SISSEJUHATUS

Rahvusvahelise Looduskaitseliidu (IUCN – *International Union for Conservation of Nature*) punase nimekirja andmetel on hetkel liike, mida ohustab väljasuremine rohkem kui 40 000 ning ohustatud liigid moodustavad 28% kõigist hinnatud liikidest. Bioloogiline mitmekesisus on üks elu optimaalse funktsioneerimise alustalasid, kus keegi sõltub alati kellestki teisest. Antropogeenset päritolu reostus on üks faktoritest, mis paneb proovile elusorganismide püsijäämise looduslikes kooslustes. Liikide kadumine võib olla katastroofiliste tagajärgedega, sest looduse poolt loodud süsteemide seotuse tõttu ei ole kannatajateks ainult üks kindel populatsioon.

Liigirikkust mõjutavad mitmesugused antropogeensed stressorid nagu keskkonnareostus. Muutused populatsioonides, näiteks vanuselises või soolises struktuuris ja arvukuses, on esimeseks indikaatoriks, et mõju liigile on kestnud piisavalt pikalt ja tugevalt, et võib mõjutada ka liigisisest mitmekesisust ja liigi säilimist. Üheks potentsiaalseks võimaluseks probleemi lahendamiseks on uurida „looduslike laboritena“ reostunud elupaikades elavaid elusorganisme, kes suudavad suunata oma kaitsemehhanismidega ideedeni, mis aitavad tagada mitmekesisuse säilimise ja palju muudki.

Antud töö keskendub reostunud Purtse jões elavatele populatsioonidele. Purtse jõe reostatus on põhjustatud möödunud sajandi alguses Eesti põlevkivitööstuse poolt, kui lähedal olevatesse veekogudesse hakati suunama heitvett. Selle tulemusena oli kunagi ühe tähtsama lõhejõena tuntud jõgi praktiliselt elutu. Tänapäevaks on jões mitmekesisus tõusnud, ning alustatud on ka jõe puhastamistöodega. See on loonud unikaalse võimaluse uurida reostuse poolt põhjustatud evolutsiooniprotsesse, kuna jões elutsevad populatsioonid võivad omada potentsiaali reostuse vastaste kaitsemehhanismide tekkes kohastumuste ja kohanemise näol.

Töö eesmärk oli uurida Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) populatsioonide näitel võimalikke reostuse vastasteid kaitsemehhanismide evolutsiooni. Eeldati, et reostunud alamjooksul elava nn asustajapopulatsiooni hulka kuuluvad trullingud omavad tugevamaid kaitsemehhanisme reostuse vastu võrreldes puhtamal ülemjooksul elava nn allikapopulatsiooniga. Kontrollpopulatsioonina oli kaasatud puhtama Kunda jõe alamjooksu populatsioon. Meetoditena kasutati uurimiseks glutatiooni kontsentratsioonide tasemeid maksas, biomarkerite tsütokroom P450 perekonna (CYP1A) ensüümide aktiivsust ning erinevusi geeniekspressioonis.

Töö koostati Tartu Ülikooli Zooloogia osakonna loomaökoloogia õppetoolis.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Antropogeense reostuse mõju elusloodusele ja inimesele

Üle kahe kolmandiku planeet Maa pinnast on vee ökosüsteemide all, need süsteemid tagavad globaalse kliima stabiilsuse ja inimkonnale eluks vajalikud ressursid. Sellisteks ressursideks on näiteks toit ja puhas joogivesi, kuid ka kaupade transport läbi veeteede ning puhkus ja vaba aja veetmine (Häder et al., 2020). Inimtegevuse tulemusena on veekeskkonda jõudnud palju reoaineid ning praeguse seisuga on tehtud kahju vähendamise ja edasise kahju vältimisega seotud tegevused vaid osaliselt edukad (Weiner & Matthews, 2003). Veereostus ei ole ainult lokaalne probleem, kuna kaugkande teel levivad soovimatud mõjud ka teiste liikideni ja populatsioonideni ning ka inimesteni, lisaks tuleb võtta arvesse teatud antropogeensete reoainete püsivust looduses, mille kahju mõju ulatub mitmete generatsioonideni (Li et al., 2019). Kusjuures pärast reoainete kadumist keskkonnast kandub mõju generatsioonidele ka läbi epigeneetika, mida on näidanud uuringud vähilaadse kammkiivriku (*Daphnia pulex*) peal (Harney et al., 2022). Sisemaa veekogud omavad suurt rolli nii indiviidi, ühiskonna kui ka keskkonna tasandil. Sisemaa veekogude kalade populatsioonid on osa toidu kindlustatusest just arenguriikides. Lisaks tagavad sisemaa veekogude ressursid majandusliku kindlustatuse läbi kalandussektori ja seotud tootmisprotsesside ning seeläbi mõjutavad inimeste toimetulekut madalate sissetulekuga riikides. (Lynch et al., 2016). Samuti on sisemaa veekogud on elupaikadeks mitmetele liikidele ning omavad võtmerolli toitainete ringluses ja veepuhastusprotsessides (Euroopa Komisjoni Teadusuuringute Ühiskeskus, 2019).

Reoaineid on nii looduslikke kui inimtekkelisi - kui looduslikku päritolu toksiliste ühendite mõjude vähendamiseks on elusorganismidel evolutsiooni jooksul arenenud mitmeid kaitsekohastumusi, siis antropogeenset päritolu toksiliste ühendite puhul on nende kohastumuste efektiivsus väiksem ning see suurendab nende toksilisust (Hamilton et al., 2017). Isegi kui populatsioonid suudavad toime tulla väga toksiliste ühenditega, võib nende elujõulisus väheneda, sest kohanemise ja kohastumise eest tuleb tihtipeale hinda maksta elukäigu- või füsioloogiliste lõivsuhetena, näiteks tehes kompromisse tervise suhtes. Füsioloogilised lõivsuhted võivad seisneda näiteks oksüdatiivse stressi taseme suurenemises, muudatustes endokriinsüsteemis ja maksa kui reoainetega peamiselt tegeleva organi ainevahetuses, kuid ka lihtsalt väiksemas kehasuuruses (Giang et al., 2019). Need on ainult mõningad näited reostuse kahjulikust mõjust.

## 1.2 Ülevaade Purtse jõest

Antud töös on uurimisküsimus seotud Purtse jõe reostusega. Enne põlevkivitööstuse algust oli Purtse jõgi üks olulisemaid lõhejõgesid, nimelt Narva jõe järel teisel kohal. Põlevkivitööstuse algusega hakati suunama reovett lähedal olevatesse veekogudesse ning seetõttu oli jõgi kuni 1990. alguseni praktiliselt elutu kuni 2004. aastal teatati esimesest püütud lõhest. Aasta hiljem asustati jõkke 28 800 lõhet (Eesti Mereinstituut, 2018).

AS Maves poolt 2008. aastal Keskkonnaministeeriumi tellimusel tehtud Purtse jõe põhjasetete ohtlike ainete uuringu andmetel mõjutab Purtse jõge tänapäeval kolme kaevanduse kaevandusveed, kahe suletud kaevanduse väljavoolud, valgala läheduses olevad tööstused ning jõe lisajõed (Kohtla ja Erra jõgi), mis on samuti reostunud ning kannavad reostust Purtse jõkke. Purtse jõest ja sinna suubuvatest jõgedest võetud proovid võeti mitmetest uuringupunktidest ning näitasid, et jõe reostatus on mosaiikne, leidub punkte, kus visuaalselt on jõgi reostamata, kuid laborianalüüsid näitavad reoainete sisaldust, ning leidub ka punkte, kus reostus on visuaalselt näha. Uuringu raportis kirjeldatakse kümnekilomeetrist lõiku, kus on visuaalselt nähtavad tahkestunud naftasaaduste jäägid. Lisaks kirjeldatakse kõige tugevamalt reostunud lõike, mis jäävad lisajõgede suubumiskohtade lähedusse, ning Purtse jõe suudmeni on sängisetted/kaldaserva pinnas reostunud. Keemilistest ühenditest esinevad antud uuringu andmetel jões aluselised fenoolid, polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH), naftasaadused (C10 – C40) ja raskmetallid. Peab ära mainima, et orgaaniliste reoainete kontsentratsioonid ei ole aastate jooksul ühtlased, selle põhjus on muutuv veehulk, põhjasetetest välja lahustuvate ainete erinevad kogused ja lisajõgede muutuv veekeemia (AS Maves, 2008).

2020. aastal sai alguse Purtse jõe osaline puhastamine põlevkivitööstuse jääkreostusest, mille tulemusena tingimused kalade jaoks mõnevõrra paranesid. Puhastamine jätkus etappidena järgnevatel aastatel. Purtse jõe puhastatava osa pikkus oli 1,4 km, puhastamine toimus lõikude kaupa. Jõe puhastamiseks on plaanis eemaldada ligikaudu 7200 m<sup>3</sup> reostunud muda ja pinnast (Keskkonnaministeerium, 2018). Purtse jõe kalastiku seisund eelkõige jõe alamjooksul on jõgede hüdrobioloogilise seire andmetel alusel halb, põhjuseks on nii jõe pikaajaline saastus ja rändetõkked. Ülemjooksu seisund on parem kui alamjooksul, peamised reostusallikad asuvad ülemjooksust allpool (Keskkonnaministeerium, 2016).

Purtse jõe reostuse mõju seal elavatele loomadele pole varem põhjalikult uuritud, kuid on tehtud katse sealt pärit setetega. Kreitsberg et al., 2013 uurisid Purtse jõe reostunud setete ja hapnikuvaeguse mõjusid hõbekokrede (*Carassius auratus gibelio*) näitel. Katses loodi mitu akvaariumit: reostunud Purtse jõe setetega, puhtama Selja jõe setetega ning kunstlikult PAH-idega rikastatud setetega, kõiki setteid uuriti nii hapnikuvaeguses kui ka hapnikukülluses, lisaks oli kontrollgrupp puhaste setetega ja hapnikuküllusega. Purtse jõe setetel ja hapnikülluse tingimustes kalad surid reostunud setetega kokkupuutel enne esimese nädala lõppu. Kaladel esines märgatavaid probleeme: inaktiivsus, eelistasid olla põhjas, tasakaaluprobleemid ja isutus. Lahkamisel olid antud akvaariumi kalade kudedes ja kõhuõõnsuses palju vedelikku ning nende nahk oli kaetud ebatavalisel hulgal limaga. Autorite arvates võivad eelnimetatud nähtused viidata akuutsele mürgistusele. Lisaks oli Purtse jõe setetega kokku puutunud kaladel erütrotsüütide hälbed ja kõrgemad PAH-ide metaboliitide tasemed sapis (Kreitsberg et al., 2013).

### **1.3 Reostusega seotud kaitsemehhanismide geeniekspressioon kui potentsiaalne indikaator reostusega kohastumisele**

Elusorganismi elukvaliteedi määrab suuresti tema elupaik ja sealsed survestavad faktorid nagu kiskjad, konkureerivad liigid, parasiidid ja patogeenid (Kataoka & Kashiwada, 2021). Kuna need survestavad faktorid on enamasti esinenud looduses juba pikka aega, on populatsioonidel arenenud välja kaitsemehhanismid, et nendega toime tulla. Inimtegevuse tõttu tekitatud reostus on tihti aga uus survestfaktor ning oma mõjult akuutsem, seega populatsioonid peavad kohastuma efektiivselt ja kiiresti, kuid kahjuks arvatakse, et enamikel liikidel/populatsioonidel ei ole evolutsioon piisavalt kiire ning efektiivne, et ellu jääda (Whitehead et al., 2017). Kuid leidub ka erandeid, nimelt liike ja populatsioone, kes on võimelised kohandama oma kaitsemehhanisme ja funktsioneerima tavapäraselt ka toksilises elukeskkonnas. Näiteks kalaliik *Fundulus heteroclitus* ehk hammaskarbiline on saanud üheks mudelloomaks evolutsioonilises füsioloogias (Burnett et al., 2007), kuna on võimeline elama väga reostunud elupaigas – 2010. aastal avaldatud artiklis kirjeldatud uurimuses talusid reostunud elupaikadest pärit hammaskarbilised ekstreemselt kõrgeid polüklooritud bifenüülide (*polychlorinated biphenyls*, PCB) kontsentratsioone (Nacci et al., 2010).

Molekulaarbioloogia tehnoloogiline areng on andnud võimaluse põhjalikumalt uurida ökoloogiliselt hästi kirjeldatud looduslikke populatsioone, mis võimaldab leida uusi mudelliike (Ekblom & Galindo, 2011). Üleminek kontrollitud tingimustega laborikatsetest loodusesse võimaldab uurida konkreetset ökoloogilist probleemi lokaalselt ja populatsiooni spetsiifiliselt ning

seeläbi jõuda kiiremini parima lahenduseni. Reostuse poolt algatatud evolutsiooniliste protsesside uurimiseks on võimalik uurida ühte tähtsamat protsessi elusorganismis ehk transkriptsiooni. Transkriptoom on *messenger* RNA-de (mRNA) ja mittekodeerivate RNA-de (ncRNA) transkriptide komplekt, mida toodab kindel rakk, rakutüüp või organism (Morozova et al., 2009) ning selle põhised analüüsid on olulised avastamiseks ja põhjalikult mõistmaks loodusliku valiku surve all olevaid elusorganisme. Geeniekspressiooni erinevuste uurimine looduslikes populatsioonides võib tuvastada ökoloogilise tähtsusega gene, mis on seotud evolutsiooni või plastilise vastustega (Brauer et al., 2017).

Teatakse, et kaitse reostuse vastu on hammaskarbilistel seotud arüülsüivesinike retseptoriga (*aryl hydrocarbon receptor*, AHR) (Bello et al., 2001), kuid selge mehhanism kalade resistentsusele mitmete antropogeenset päritolu reoainetele on teadmata. AHR retseptor on osa retseptorite transkriptsioonifaktorite grupist, mis aktiveeritakse läbi ksenobiootikumide (*xenobiotic-activated receptor*, XAR), aktivatsioon toimub läbi ligandi seondumise retseptorile. Evolutsiooniliselt on XAR-id spetsialiseerunud reguleerima genoomi, et kaitsta organismi keskkonnast pärit kahjulike ühendite eest (Ma, 2008). Uurides kalaliigi resistentsust, on teadlased varasemalt keskendunud biotransformatsiooni läbiviiva ensüümi perekonna tsütokroom P450 (CYP1A) vähenenud tundlikkusele (Oleksiak et al., 2011). CYP1A aktiivsus on indutseeritud PAH-ide ja halogeneeritud aromaatsete süivesinike (*halogenated aromatic hydrocarbons*, HAH) mõjul läbi AHR retseptori. Indutseeritud CYP1A ensüümide esimene etapp on lisada hapnikumolekul toksilisele ühendile, et muuta ühend polaarsemaks ja seeläbi suurendada organismist väljutamist. Samas põhjustab hapniku molekuli lisamine näiteks kantserogeensele PAH-ile või HAH-ile ülimalt reaktiivsete vaheühendite tekkimist, mis omakorda põhjustab DNA ja valkude aduktide moodustumist ning seeläbi soodustab kasvajate teket ning toksilisust (Ma & Lu, 2007). Seetõttu võivad organismi looduslikes tingimustes kaitsvad detoksifikatsiooni mehhanismid inimese poolt muudetud kõrge reoainesaldusega keskkonnas organismidele hoopis kahjulikeks osutada.

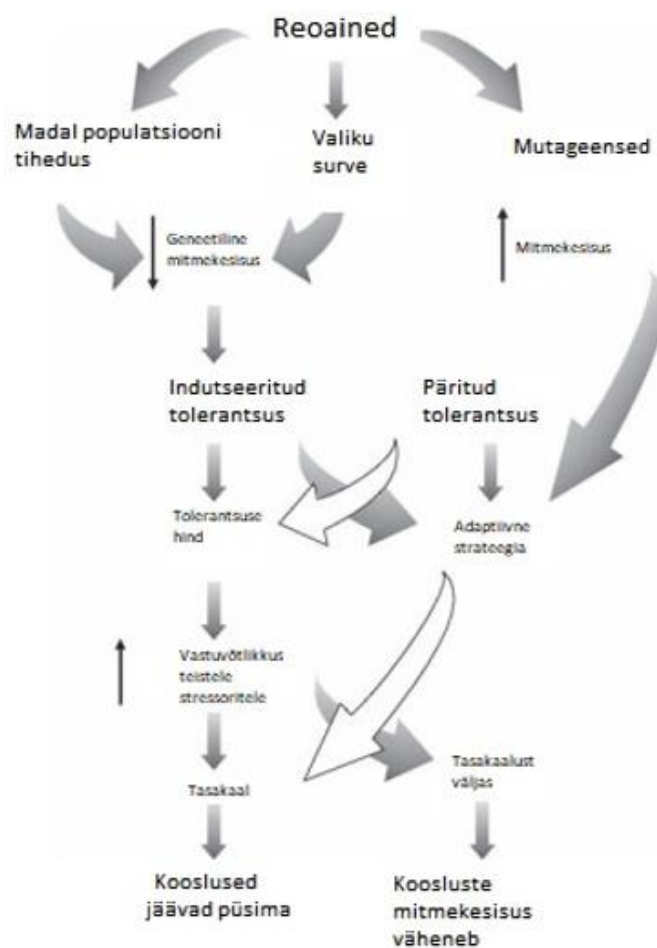
Geeniekspressiooni uuringuid on kasutatud ka kalade reostusresistentsuse uurimiseks. Näiteks Oleksiak et al., 2011 uurisid hammaskarbilise reostuse vastast resistentsust läbi geeniekspressiooni profiili, kasutades DNA-mikrokiiptehnoloogiat. Uuringus kasutati reostunud elupaigast (New Bedford Harbour, Massachusetts) ja kontrollsaidist (Scorton Creek, Massachusetts) pärit kalade embrüoid ja vastseid. Mõlemast elupaigast pärit kalade embrüod jagati kaheks ning mõjutati kas AHR antagonisti 3,3',4,4',5-pentaklorobifenüüluga (PCB-126) või dimetüülsulfoksiidiga (*dimethyl sulfoxide*, DMSO), seejärel võrreldi geeniekspressiooni profiili. Reaalaja polümeraasi

ahelreaktsiooniga (*real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) mõõdeti CYP1A ekspressiooni ning selgus, et kui tundliku kontrollgrupi embrüotes ja vastsetes esines suur CYP1A induktsioon (68 kuni 345 kordne muutus), siis reostunud elupaiga kaladel oli muutus väga väike (1.5 kuni 3.8 kordne muutus). Ehk reostunud elupaiga kalade embrüod ja vastsed olid säilitanud oma reostusevastase fenotüübi. Lisaks oli PCB-ga töödeldud puhtast elupaigast pärit vastsetel toimunud 121 geenis ekspressiooni muudatused, nimelt 60 oli üles reguleeritud ja 61 alla reguleeritud, siis reostunud elupaiga kaladel oli muudatused toimunud ainult seitsmes – 2 üles reguleeritud ja 5 alla reguleeritud. Sellest järeldub, et PCB tundlikke genee on puhtast elupaigast pärit kaladel palju rohkem kui resistentsel reostunud elupaiga kaladel. Lisaks esines PCB-ga mõjutatud puhta elupaiga kaladel arenguhäireid, perikardi turset ja vaskulaarset verejooksu. Tulemustest järeldasid autorid, et PCB poolt mõjutatud geeniekspressioon ei ole ainult CYP1A spetsiifiline, vaid kaitsemehhanism peitub regulatoorses rajas, mis reguleerib mitmeid genee (Oleksiak et al., 2011).

Antud näite abil saab eeldada, et reostunud elupaigast pärit populatsioonis on toksiliste ühendite surve mõjul muutunud kaitsemehhanismide avaldumine, selles konkreetsetes näites on populatsioonis geeniekspressioon toksilise ühendiga kokkupuutel märgatavalt madalam, ehk populatsioon on võrreldes kontrollgrupiga reostusele vähem tundlik ning organismis ei esine toksiliste ühendite poolt põhjustatud kahjustusi nii palju. Eelmainitud muutus viitab kohastumisele, aga reostunud elupaiga ja populatsiooni evolutsiooni kontekstis peab silmas pidama ka kohanemist ehk elujooksul toimunud muutusi. Kohastumist ja kohanemist mõlemat saab defineerida kui organismide võimet toime tulla nii looduslike (temperatuuri muutused, soolsuse tasemed, hapniku kättesaadavus jne) kui ka antropogeenset päritolu stressoritega (kemikaalid). Erinevus aga seisneb antud tolerantsuse edasikandumises järglastele, kus kohanemisel tolerantsus saavutatakse elu jooksul ning need muutused ei ole geneetiliselt edasikanduvad. Kohastumused on aga geneetiliselt edasikanduvad ja tagavad reostusevastase kaitse ka järgmistele generatsioonidele (Biagianti-Risbourg et al., 2013). Lisaks tuleb meeles pidada epigenoomi, mis on tundlik nii keskkonna ja antropogeensetele stressoritele ja muutused võivad kanduda järgmistele generatsioonidele (Harney et al., 2022).

Kohastumine ja kohanemine on ainult lõpp-punktid keerulises reostuse poolt mõjutatavas evolutsioonisüsteemis, mis hõlmab endas mitmeid seoseid ja tagajärgi (**joonis 1**). Olenevalt liigist ja konkreetsest populatsioonist on vastus erinevatele toksilistele ühenditele väga varieeruv. Kokkupuutel reostusega hakkab populatsioone mõjutama loodusliku valiku surve, mis võib viia geneetilise mitmekesisuse alla, sellisest kombinatsioonist on enim mõjutatud väikesed

populatsioonid. Geneetilise mitmekesisuse langus võib indutseerida reostuse vastase tolerantsi, samas tolerantsusega võib kaasneda ka hind, mis teeb populatsiooni haavatavaks teistele stressoritele (parasiidid, konkureerivad liigid, patogeenid jne). Kui stressorite hulk on suur, siis ei suuda organismid survele vastupanu osutada ning tagajärjeks on liigilise mitmekesisuse vähenemine. Lisastressorite puudumisel või mõõdukal esinemisel on organism võimeline vastu pidama survete kombinatsioonile ja kohanema uute keskkonna tingimustega ehk populatsioonid ja ökoloogiline mitmekesisus reostunud elupaigas jäävad püsima. Toksilised reoühendid võivad tekitada mutatsioone, mistõttu suureneb geneetiline mitmekesisus ja seeläbi ka võimalus kohastumuste tekkeks, mis kanduvad edasi järgmistele generatsioonidele. Sellise strateegiaga, nagu ka muul viisil tolerantsuse saavutamiseks võib kaasneda hind, ja olenevalt teiste stressorite mõju suurusest võivad kooslused kaduda, või siis hoopis olla efektiivsed mitmete stressorite talumisel ja jääda püsima (Amiard-Triquet et al., 2011).



**Joonis 1.** Seosed reostuse, geneetilise mitmekesisuse ja tolerantsuse võime vahel ning nende võimalikud tagajärjed ökoloogilistele kogukondadele (Amiard-Triquet et al., 2011).

Geenide transkriptsioon tihti muutub toksiliste ühendite kokkupuutel (Pujolar et al., 2013). See annab võimaluse võrrelda reostunud elupaigaga potentsiaalset kohastunud populatsioone ja puhta elupaiga populatsioone, et tuvastada populatsiooni potentsiaalset kohastumist ja selgitada välja loodusliku valiku poolt soositud tugevaid kaitsemehhanisme. Kuigi transkriptoomi põhised analüüside tulemused võivad viidata kohastumisele, soovitatakse tulemuste kinnitamiseks nn ühisaia (*common garden*) katset, kus erinevatest keskkondadest kogutud isendeid kasvatatakse sünnist alates sarnastes tingimustes. Lisaks on kasu ka vastastikkuse ümberasustamise katsest, et määrata, kas kohastumus ka sobib elukeskkonnaga (Donihue & Lambert, 2015). Hoffman ja Willi, 2008 soovitavad jälgida reostunud elupaigaga populatsiooni isendite geneetilisi markereid, et hinnata loodusliku valiku mõju ja populatsiooni potentsiaali kohastuda muutunud keskkonnaga, lisaks võimaldab antud meetod tuvastada kõige haavatavamaid populatsioone. Samuti on autorite arvates võimalik tuvastada ka adaptiivseid geene, mis reageerivad otse keskkonna muutustele (Hoffmann & Willi, 2008).

Pidades silmas keskkonna muutusi tekitavaid ja organismidele toksilisi uusi keemilisi ühendeid ja juba teadaolevaid kahjulikke ühendeid, on reostunud elupaigad ja seal elavad populatsioonid käsitletavad „looduslike laboritena“ (Vittecoq et al., 2018). Sellistes tingimustes saab mõista, kuidas reostus mõjutab populatsioone ja milliseid kaitsemehhanisme saab rakendada reostusega võitlemiseks, ning välja selgitada populatsiooni kõige nõrgemad, et kaitsta populatsioone ja leida potentsiaalseid ideid uute toksiliste ainete poolt haiguste ravimisel.

#### **1.4 Reostunud elupaigas elavate populatsioonide genoom ja selle uurimine**

Reostunud elupaigas elavate populatsioonide genoomi on uurinud päris mitmed teadlased, üritades välja selgitada reostuse poolt mõjutatavaid geene ja reostuse negatiivset mõju. Seni ilmunud teadustulemustes on kasutatud peamiselt uurimiseks DNA-mikrokiiptehnoloogiat ehk *microarray*'d (Asker et al., 2013; Leaver et al., 2010; Pujolar et al., 2013), RT-qPCRi (Asker et al., 2013), RNA sekveneerimist (RNA-seq – *RNA sequencing*) (Defo et al., 2018) ja restriksiooni saitidega seotud DNA sekveneerimist (RAD-seq-*restriction site associated DNA sequencing*) (Osterberg et al., 2018).

Kuigi meetodeid reostunud elupaigas elavate organismide genoomi uurimiseks ja võrdlemiseks on mitmeid, ei ole need sisult kattuvad. DNA-mikrokiiptehnoloogia suudab samaaegselt mõõta mitmete DNA/RNA järjestuste suhtelisi kontsentratsioone, kuid nagu igal meetodil, esineb ka

mikrokiiptehnoloogial puudusi (Bumgarner, 2013). Võrreldes RNA-seq meetodiga ei suuda mikrokiiptehnoloogia anda informatsiooni kogu transkriptoomi kohta, vaid ainult eelnevalt defineeritud transkriptide kohta, mistõttu on toksikoloogilistes uuringutes eelistatud RNA-seq meetod, mis aitab tuvastada toksikoloogilise tähtsusega transkripte, splaissingust tingitud variante ja mittekodeerivaid transkripte (Rao et al., 2019). RNA-seq-i puudusteks võrreldes mikrokiiptehnoloogiaga on meetodi hind, puuduvad standardsed protokollid andmete analüüsimiseks ning andmete failid on märgatavalt mahukamad ja nende analüüsimiseks on vaja võimsat arvuti infrastruktuuri (Rao et al., 2019). RT-qPCR on kõrge läbilaskvusvõimega (*high throughput*) ja võimaldab valitud geenide täpset ekspressiooni profiilimist, mõlemate meetodite eeliseks on kiirus, läbilaskvus ja automatiseeritus. Võrreldes mikrokiiptehnoloogiaga, mille abil saab paralleelselt analüüsida tuhandete geenide ekspressiooni, siis RT-qPCR võimaldab analüüsida mitmete erinevate proovide piiratud numbri geenide ekspressiooni samaaegselt (Vandesompele et al., 2002). RAD-seq on saanud populaarseks molekulaarse ökoloogia uuringutes tänu oma taskukohasuse ja võimaluse uurida mitte-mudelloomade tuhandeid üksiknukleotiidseid polümorfisme (Díaz-Arce & Rodríguez-Ezpeleta, 2019). Meetodite lai valik teeb reostunud elupaigas elavate organismide genoomi uurimise kättesaadavaks peaaegu igale teadusasutusele vastavalt vajadustele ja võimalustele.

Transkriptoomi põhised uuringud on kätte näidanud peamised ainevahetusrajad, mida reostus kaladel mõjutab. Teadlasi ökotoksikoloogilise mudellorganismina enim paelunud hammaskarbilist on uurinud ka Osterberg et al., 2018 PAH-idega reostunud Elizabethi jões, Ameerika Ühendriikides Virginias. Kasutades RAD-seqi, identifitseerisid autorid mitmeid regioone genoomist, mis viitavad looduslikule valikule ning võivad olla bioloogilise tähtsusega resistentsuse tekkes. Autorid toovad välja peamised geenid, mis nende arvates mängivad potentsiaalselt rolli PAH-ile resistentses fenotüübis:

- AHR rajas osalevad AIP (*Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*) ja ARNT1c (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1*)
- AHR rada mõjutav NCOA2 (*Nuclear receptor coactivator 2*) ja ksenobiootilise metabolismiga seotud GSTT1 (*GST theta 1*) ja CYB5 (*Cytochrome B5*)
- Geenid, mis kodeerivad valke, mis on seotud südame struktuuriga (TTN - *Titin* ja NEBL-*Nebulette*) ning geenid, mis on seotud kaaliumkanalitega (KCNB2 – *Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2* ja KCNJ14 - *Potassium inwardly rectifying channel*)

*subfamily J member 14*). Lisaks integriine kodeerivad geenid ITGB5 (*Integrin subunit beta 5*) ja ITGA10 (*Integrin subunit alpha 10*), mis on seotud südamefunktsiooniga.

Autorid pakuvad välja võimaliku stsenaariumi, kus AHR rajaga seotud geneetilised kohastumused vähendavad raja funktsionaalsust ja seeläbi vähendavad või ennetavad PAH-ide bioaktivatsiooni ning toksilisust. Autorid mainivad ka kompenseerivate kohastumuste teooriat, kus südame funktsiooni ja morfoloogiga seotud geenid aitavad võimalike probleemide eest, mida tekitavad AHR raja mutatsioonid (Osterberg et al., 2018).

Märgatavalt rohkem erinevusi on leitud mikrokiiptehnoloogia abil. Asker et al., 2013 keskendusid oma teadustöös kalaliigile euroopa emakala (*Zoarces viviparus*), kes elutseb Göteborgi sadamas, kus esineb PCB-sid, PAH-e, tributüülina, dioksiine ja raskmetalle. Oma uuringus võrdlesid autorid reostunud Göteborgi sadamast pärit emakalade maksa mRNA ekspressiooni erinevusi puhtast Fjällbacka loodusreservaadist pärit emakaladega, kasutades mikrokiiptehnoloogia ja RT-qPCR meetodeid. Reostunud elupaiga emakaladel oli võrreldes kontrollgrupiga kõrgemalt ekspresseeritud geenid seotud DNA kahjustustega (DDIT4 - *DNA Damage Inducible Transcript 4*), raku kasvu arestiga (GADD45B - *Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta* ja GADD45G - *Growth Arrest And DNA Damage Inducible Gamma*), apoptoosiga (diablo homolog; SMAC - *Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase*), ksenobiootilise metabolismiga (EST22 ja EST7) ja kaltsiumi homöostaasiga (CYP24A1). Madalamalt olid ekspresseeritud geenid, mis on seotud kaasasündinud immuunsüsteemiga (komplementi süsteemi komponendid – C1q, C4, C5, C7, C8 beeta ahel, CFB ja C4 *binding protein*), valkude transpordi ja voltumisega (*Signal Recognition Particle* ja *Protein Disulfide Isomerase*) ja raua homöostaasiga (transferritiin, haptoglobiin ja hepsidiin: HAMP - *Hepcidin Antimicrobial Peptide*) (Asker et al., 2013).

Reostuse mõju erinevusi geeniekspressioonis on otstarbekas uurida ka mitmest erinevast puhtast ja reostunud elupaigast, et oleks võimalik analüüsida replikaate erinevate (reostunud ja puhaste) elupaigatüüpide kohta. Pujolar et al., 2013 uurisid euroopa angerja (*Anguilla anguilla*) maksa geeniekspressiooni, kasutades mikrokiiptehnoloogiat. Angerjad koguti kahest erinevast PCB-ga, koororgaaniliste pestitsiididega ja broomitud tuleaeglustitega reostunud elupaigast (Hazewinkel, Belgia ja Dessel-Schoten kanal, Belgia) ja kontrollgrupp samuti kahest erinevast suhteliselt puhtast elupaigast (Wijmeers, Belgia ja Bolsena järv, Itaalia). Reostunud elupaikade angerjate geeniekspressiooni muutunud mustreid märgati detoksifikatsiooniga seotud geenides, transkriptsiooniliselt oli ülesreguleeritud CYP3A ja glutatioon-S-tranferaasi geenid. Geenid seotud

oksüdatiivse fosforülatsiooni rajaga nagu NADH dehüdrogenaas, suksinaat dehüdrogenaas, ubikvinool-tsütokroom c reduktaas, tsütokroom c oksidaas ja ATP süntetaas olid kõige reostunumas elupaigas võrreldes puhtamaga alla reguleeritud, antud rada oli ka kõige suurema statistilise olulisusega ja 43 alla reguleeritud geeniga kõige arvukamalt mõjutatud. Lisaks oli alla reguleeritud veel geenid, mis olid seotud ksenobiootilise metabolismiga (CYP3A65 ja ALDH3B1), proteosoomiga, südamelihase kontraktsiooniga, aminoatsüül-tRNA biosünteesiga, N-glükaani biosünteesiga ja lipoehappe metabolismiga (Pujolar et al., 2013).

Reostuse mõju immuunsüsteemile ja teistele metabolismi radadele on märganud ka Defo et al., 2018, kelle uurimisobjektiks oli kalaliigi kollase ahvena populatsioonid (*Perca flavescens*) St. Lawrence'i jões Kanadas. Jões esineb mitmeid reoainete ühendeid nagu PCB-d, PAH-id, raskmetallid, broomitud tuleaeglustid ja ravimiühendid. Autorid kogusid kalad kolmest erinevast punktist: madalate antropogeensete häiretega, keskmiste antropogeensete häiretega ja punktist, kus kollaste ahvenate populatsioon oli märgatavalt vähenenud. Hinnati kalade geeniekspressiooni erinevusi maksast kasutades selleks RNA sekveneerimist. Reostunud punktist kogutud kaladel oli võrreldes puhtamate punktidega kõige rohkem üles reguleeritud geenid, mis olid seotud järgnevate ainevahetusradadega:

- Retinoolide metabolismiga (*Cytochrome P450 26A1*)
- Stressivastustega (*Rab effector MyRIP, Heat shock 70 kDa protein 1*)
- Rasvhapete metabolismiga (*Elongation of very long chain fatty acids protein 6, Major facilitator superfamily domain-containing protein 2A-B*)
- Transkriptsionaalse regulatsiooniga (*Nuclear factor interleukin-3-regulated protein, Zinc finger protein 367*)

Alla reguleeritud olid geenid, mis olid seotud:

- Rakkude vahelise kommunikatsiooniga (*Gap junction gamma-1 protein*)
- Immuunsüsteemi vastustega (*Lactose-binding lectin l-2, Histone H1.5, Fuclectin-7*)
- Apoptoosiga (*Cation transport regulator-like protein 1, PTB domain-containing engulfment adapter protein 1*)
- DNA kahjustustega (*DNA damage-inducible transcript 4 protein*)
- Raua homöostaasi ja heemi oksüdatsiooniga (ferritiin, hepsidiin, tsütokroom b reduktaas 1, heemi oksügenaas)

- Reproduktiivsusega (vitellogeniin, vitellogeniin-2)
- Kilpnäärme hormoonide homöostaasiga (*Type III iodothyronine deiodinase*)

Autorite arvates viitavad tulemused sellele, et geeni ekspressiooni erinevused on kohaspetsiifilised ning populatsioonide kohastumiseks keskkonna stressoritega kasutatakse mitmeid strateegiaid. Lisaks on stressorite mõjul toimunud selektsioon geenide suhtes, mis potentsiaalselt võimendavad teatud füsioloogilisi ja metaboolseid võimekusi (nt: *Nuclear factor interleukin-3-regulated protein* 43-kordne erinevus võrreldes kõige puhtama punktiga), kuid võib eeldada ka teatud piirides geneetilise mitmekesisuse kadu (Defo et al., 2018).

On tehtud ka katseid puhtast jõesuudmest kogutud Euroopa lestadega (*Platichthys flesus*), keda hoiti seitse kuud kas puhastel või reostunud (PAH-id, PCB-d, kloororgaanilised pestitsiidid, polübroomitud difenüüleetrid ja tinaorgaanilised ühendid) setetel kunstlikes tingimustes. Seitsme kuu möödudes eemaldati kalad ja nende maksarakke töödeldi PAH-i benzo(a)püreeniga, estradioliga, vasega, nende kolme kombinatsiooniga või DMSO-ga, uurimiseks kasutati mikrokiiptehnoloogia meetodit. Tulemused näitasid, et hepatotsüütides, mis pärinesid reostunud setetel hoitud kaladest võrreldes puhastel setetel hoitud kaladega, muutus geeniekspressioon apoptoosiga seotud geenides nagu diablo homolog (SMAC) ja deoksüribonukleas II ja immuunsüsteemiga seotud geenides nagu hepsidiini prekursorid, interleukiin 8 ja selle prekursor ning komplemendisüsteemi komponent C9. Autorite tulemustest selgus, et reostunud setetel hoitud kalade hepatotsüütides suureneb ekspressioon geenides, mis on seotud kaasasündinud immuunsüsteemi, apoptoosi ja põletiku radades (Leaver et al., 2010).

Eelnevalt kirjeldatud teadusuuringute tulemustest võib leida kinnitust, et levinuimad reostuse poolt mõjutatud süsteemid on immuunsüsteemiga seotud geenid, ksenobiootilise metabolismiga seotud geenid, apoptoosiga seotud geenid ja raua homöostaasiga seotud geenid. Mõjutatud süsteemid võivad pakkuda potentsiaalset adaptiivset eelist, aga ka kahjustada organismi funktsioneerimist.

### **1.5 Glutatiooni roll antioksidantide poolt vahendatud kaitsemehhanismides**

Glutatioon (GSH) on tripeptiid tiool, mis on üks olulisemaid organismis esinevaid antioksidante ning mille kontsentratsioon rakkudes on oksüdatiivse stressi indikaatoriks (Rahman et al., 2006). Glutatioon moodustatakse, kui glutamaadile lisatakse täpses järjekorras tsüsteiin ja lõpuks glütsiin, tripeptiid tiooli üks tähtsaim osa on tsüsteiini sulfüdrüül grupp (-SH), mis osaleb konjugatsiooni ja reduktsiooni protsessides, mille abil eemaldatakse kahjulikke ühendeid (Forman et al., 2009).

Glutatioon esineb rakkudes redutseeritud vormis (GSH) ja oksüdeeritud vormis (GSSG) ning nende kahe vormi vaheline tasakaal on oluline ksenobiootikumide ja vabade radikaalide vastase kaitse toimimiseks (Rahman et al., 2006). Glutatioon kaitseb rakke läbi redutseerimisreaktsiooni rakus ning reageerib otse reaktiivsete hapniku ühenditega (*reactive oxygen species*, ROS) (Meister, 1992). Kui redutseeritud ja oksüdeeritud glutatiooni vormi vahel on tasakaal paigast ära, võib koguneda rakku liiga palju reaktiivseid hapnikuühendeid, mistõttu tekivad kahjustused DNA-s ja rakud võivad vastuseks kahjustustele käivitada apoptoosi (Kwon et al., 2019).

Rakke kahjustavad vabad radikaalid on tihtipeale tekitatud kalade elukeskkonnas olevate keemiliste ühendite poolt nagu raskmetallide katioonid, PAH-id, kloororgaanilised ja fosfororgaanilised pestitsiidid, PCB-d, dioksiinid ja muud ksenobiootikumid. Et vältida ühendite poolt tekitavaid patoloogiaid, kasutavad rakud glutatiooni põhist kaitsemehhanismi (Sukhovskaya et al., 2017). Glutatioon eemaldab elektrofiilseid ja reaktiivseid hapniku ühendeid kahel viisil, otseselt või läbi ensümaatilise katalüüsi, kus omavad rolli ensüümid glutatioon peroksidaas (*glutathione peroxidase*, GPx), glutatioon reduktaas (*glutathione reductase*, GR) ning glutatioon-S-transferaasid (*glutathione-S-transferases*, GSTs). Ensümaatiline katalüüs toimib järgmiselt: GSH on ko-substraadiks GPx-le, mis redutseerib peroksiide ja moodustab oksüdeeritud vormi GSSG. GSSG redutseeritakse NADPH ja GR katalüüsi poolt kaheks GSH-ks. Ksenobiootikumid konjugeeritakse GSH-ga läbi GSTs-de ning need konjugaadid on substraadiks gamma-glutamüültransferaasidele (*gamma-glutamyl transferase*, GGT), mis algatab merkaptopuriini happe raja ning toksiliste ühendite eliminatsiooni (Gaucher et al., 2018).

### **1.6 Biomarker etoksüresorufiini-O-detülaas (EROD)**

Etoksüresorufiini-O-detülaasi ehk EROD (*ethoxyresorufin-O-dethylase*) aktiivsus on laialt kasutatav biomarker, mis näitab kokkupuudet teatud planaarseste halogeenitud süsivesinikega (*planar halogenated hydrocarbons*, PHH) ja PAH-idega. Antud biomarker on väga tundlik ning võimaldab tuvastada CYP1A alamperekonna tsütokroom P450 sõltuvate monoksügenaaside induktsiooni ksenobiootiliste ühendite poolt. CYP1A ensüümid asuvad peamiselt maksas ning nende kontsentratsioon tõuseb keemiliste ühendite kokkupuutel, eelmainitud omadused teevad EROD-ist väga hea biomarkeri (Whyte et al., 2000). Organismis on biotransformatsiooni protsess kaheetapiline. Esimeses faasis toimuvad CYP1A alamperekonna poolt läbiviidavad reaktsioonid ning teises faasis toimuvad reaktsioonid, mis on läbiviidud teise grupi ensüümide abil, näiteks glutatioon-S-transferaasi ja uridiindifosfaat glükuronüül transferaasi abil. Reaktsioonide

kombinatsiooni läbi muudetakse ksenobiootikum vees paremini lahustuvaks ning organismist paremini väljutatavaks (International Council for the Exploration of the Sea, 2016).

EROD-i aktiivsus kirjeldab CYP1A poolt vahendatud substraadi (7-etoksüresorufiin) detüleerimise kiirust, mille läbi moodustub produkt resorufiin. Konkreetne katalüütiline efekt viitab, kui palju on ensüümi on koes ning näitab kui palju resorufiini toodetakse ühe milligrammi valgu kohta minutis (mol/mg/min). Seejärel standardiseeritakse proovid maksa valgusisalduse põhjal (Whyte et al., 2000).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud magistritöö eksperimentaalosa eesmärgiks oli selgitada välja kolme hariliku trullingu populatsiooni erinevused võimalikes kaitsemehhanismidega seotud markerites ja nende tulemuste abil analüüsida reostuse vastaseid kaitsemehhanisme ja võimalikke kohastumusi reostuse vastu. Eksperimentaalosas keskendutakse kolmele populatsioonile: reostunud Purtse jõe alamjooksu populatsioonile, mille autor eeldab kõige enam mõjutatuks reostuse poolt, eeldavalt puhtamale ülemjooksu populatsioonile ning kontrollpopulatsiooniks valitud puhtama Kunda jõe alamjooksu hariliku trullingu populatsioonile. Markeriteks olid antioksidant glutatiooni kontsentratsioon, tsütokroom P450 (CYP1A) aktiivsus biomarkeri etoksüresorufiin-O-deetülaasi (EROD) abil ja erinevused geeniekspressioonis.

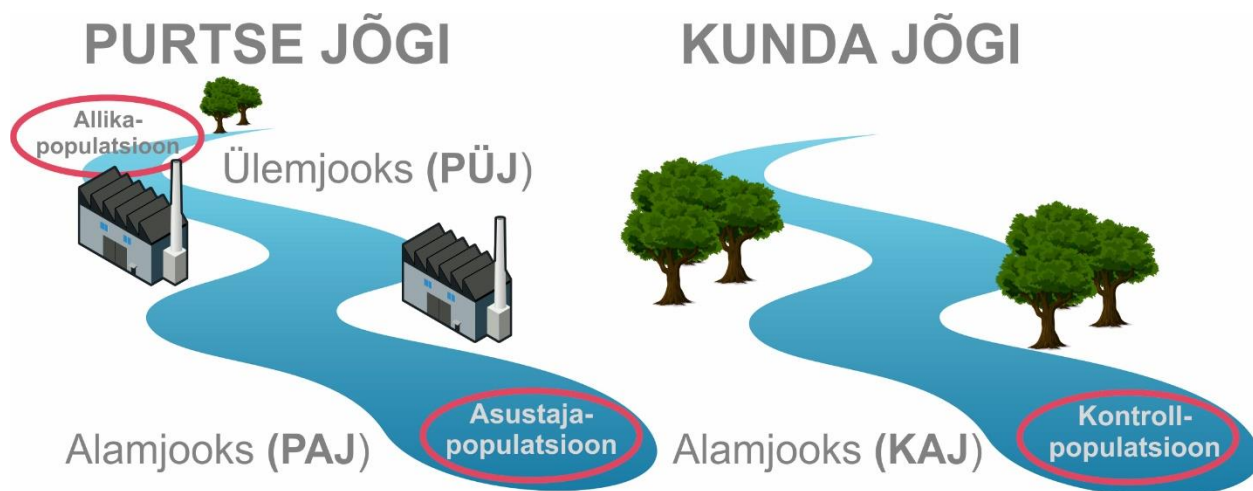
Eksperimentaalosa hüpoteesid olid järgmised:

- 1) Reostunud Purtse jõe alamjooksu kalad on kohastunud elama antropogeenset päritolu reostuse tingimustes ning nende kaitsemehhanismid (tsütokroom P450 alamperekonna ensüümide (CYP1A) aktiivsus ja antioksidant glutatiooni kontsentratsioon) on ülesreguleeritud võrreldes Purtse jõe ülemjooksu ja Kunda jõe kontrollgrupi kaladega.
- 2) Populatsioonide vahel on ekspressiooni erinevused geenides, mis on seotud reostuse vastase kaitsega, ehk reostunud Purtse jõe alamjooksu populatsioonis on kaitsemehhanismidega seotud geenid kõrgemalt ekspresseeritud kui Purtse ülemjooksu või Kunda jõe kontrollgrupi populatsioonis.
- 3) Purtse jõe alam- ja ülemjooksu populatsioonide geeniekspressiooni võrreldes on võimalik leida märke nn asustajapopulatsioonile reostuse poolt avaldatavast valikusurve ja kohastumustest, mis võimaldavad toime tulla reostunud keskkonnas.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Välitööde meetodid

Uuringusse valiti mudelliigiks harilik trulling (*Barbatula barbatula*), kuna see kalaliik on Eestis laialt levinud, põhjalähedase eluviisiga ning reostusele tundlik (Hunt, 2012). Eelnimetatud tunnuste tõttu on trulling hea uurimisobjekt, et võrrelda erinevate jõgede populatsioone ja tundlikkust reostusele, eriti Puritse jõe reostunud setete mõju. Kalad püüti 29. septembril 2020. aastal, väljaspool kudemisaega Eesti Mereinstituudi ja Tartu Ülikooli loomaökoloogia teadurite poolt eripüügiloaga, kasutades uimastavat elektrivoolu ja kahva. Allikapopulatsiooni kalad püüti Puritse jõe ülemjooksult (PÜJ) ja asustajapopulatsiooni kalad alamjooksult (PAJ) ning kontrollpopulatsiooni kalad Kunda jõe alamjooksult (KAJ) (**joonis 2.**). Seejärel kogutud kalad eutaniseeriti 250 mg/L MS222 (*tricaine methanesulfonate*) kemikaaliga ning märgiti üles iga kala kehamass, täispikkus ja sugu. Lisaks eemaldati kaladelt maks, põrn ja neer, mis säilitati kas RNAlater (500 µL) puhvris ja vedelas lämmastikus või asetati otse vedelat lämmastikku sisaldavasse tünni. Laboris säilitati kogutud proove -80 °C sügavkülmikus.



**Joonis 2.** Illustratsioon uuritavate hariliku trullingu populatsioonide süsteemist. Autor: Tuul Sepp.

### 2.2.2 Glutatiooni kontsentratsiooni mõõtmine

Glutatiooni kontsentratsiooni mõõtmiseks eemaldati proovid -80 °C sügavkülmikust ja tõsteti 4 °C külmkappi sulama. Seejärel tõsteti maksa tükid uude 1,5 mL tuubi kaalumiseks ning lisati kaaliumfosfaat (*Potassium phosphate buffer, KPE*) puhvrit (0.1 M, pH 7,56) vastavalt proovi kaalule suhtes 1:10.

Pärast KPE puhvri lisamist lisati tuubi ZrO helmeid ja homogeniseeriti proove Bullet Blenderis kuni koe homogeniseerumiseni. Kui maksad olid homogeniseerunud lisati proovidele 50 µL trikloroäädikhappe (*trichloroacetic acid, TCA*) lahust (lahjendatud veega 1:10-le) ning segati vortexil kolm korda iga viie minuti tagant 15 minuti jooksul, proove hoiti vahepeal 4 °C külmkapis. Pärast segamist proovid tsentrifugeeriti (rootor – *fixed angle*) 15 minutit 3000g ja 4 °C juures.

Proovidelt eemaldati supernatant. 20 µL supernatanti ja standardeid lisati duplikaatidena mikrotiiterplaadile, seejärel segati 1:1-le kokku DNTB (*5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*) (2 mg DNTB 3 mL KPE puhvris) ja glutatiooni reduktaasi (40 µL glutatiooni reduktaasi 3 mL KPE puhvris) lahused ja lisati 120 µL DNTB ja glutatiooni reduktaasi segu mikrotiiterplaadile. Lõpuks lisati plaadile veel 60 µL β-NADPH lahust (2 mg β-NADPH 3 mL KPE puhvris) ja mõõdeti kohe neelduvust mikrotiiterplaadi lugejal Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Ameerika Ühendriigid).

Neeldumist mõõdeti kahe minuti jooksul 412 nanomeetri juures iga 30 sekundi tagant. Tulemusi võrreldi standardkõveraga, mis saadi glutatiooni standardite abil. Standardite kasvukõvera saamiseks lahustati 1 mg glutatiooni 1 mL KPE puhvris ja lahjendati stokklahus KPE puhvris 1:100-le (35,25 nM/mL). Lahjendusrida koosnes järgmistest kontsentratsioonidest: 26.4 nM/ml, 13.2 nM/ml, 6.6 nM/ml, 3.3 nM/ml, 1.65 nM/ml ja 0.825 nM/ml.

### **2.2.3 Etoksüresorufiin-O-deetülaas (EROD) aktiivsuse mõõtmine**

EROD-i analüüsi alustati homogeniseerimispuhvri tegemisega (50 mM TRIS - tris (hüdrosümetüül) aminometaan, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Seejärel kaaluti maksaproovid ja lisati homogeniseerimispuhvrit 1:5-le. Proovid homogeniseeriti Bullet Blenderis ZrO helmestega kuni koe homogeniseerumiseni, seejärel tsentrifugeeriti homogenaati 20 minutit 10 000g ja 4 °C juures ning eemaldati supernatant.

Aktiivsuse mõõtmiseks valmistati EROD *assay* puhver (100 mM TRIS, 100 mM NaCl), etoksüresorufiin puhver (0.4 mM DMSO – dimetüülsulfoksiid, stokklahus: 1mL DMSO-s lahustati 965 µg etoksüresorufiin etüül eetrit) ja NADPH lahus (0.25 mM). Lahused pipeteeriti mikrotiiterplaadile järgmises järjekorras ja kogustes: 295 µL EROD *assay* puhvrit, 3 µL supernatanti, 1,5 µL etoksüresorufiin puhvrit ning reaktsioon alustati 1,5 µL NADPH lahuse lisamisega.

Proovid mõõdeti mikrotiiterplaadi lugejal Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Ameerika Ühendriigid). Fluorestsentsi mõõdeti lainepikkustel 530/25, 590/35 nm 30 minuti jooksul viie minutise intervalli tagant, samuti kasutati raputamiskõnksiooni (10 sekundit). Proove võrreldi etoksüresorufiini kasvukõveraga, mille lahjendused olid 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM ja 0.39 µM.

Järgnes valgualanaluus, et standardiseerida proovid maksa valgusisalduse põhjal (Bradford assay). Katset alustati värvilahuse tegemisega suhtele 1:4, värviks kasutati Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Mikrotiiterplaadile pipeteeriti 10 µL maksaproove ja standardi proove ning lisati 200 µL lahjendatud värvilahust, proovid pipeteeriti plaadile duplikaatidena. Proovid mõõdeti mikrotiiterplaadi lugejal Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Ameerika Ühendriigid) 595 nm juures. Lisaks kasutati enne mõõtmist raputamiskõnksiooni (20 sekundit) ja lasti seondumiskõnksioonil 10 minutit toimuda. Proove võrreldi veise seerumi albumiini (BSA – *bovine serum albumin*) standardkõveraga, mille lahjendused olid 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL ja 0.0625 mg/mL.

#### **2.2.4 RNA eraldamine maksast ja sekveneerimine**

RNA eraldamiseks maksaproovidest kasutati RNeasy Mini Kit'i (QIAGEN, Ameerika Ühendriigid) ja järgiti tootja poolt koostatud protokoll. RNA eraldamist alustati maksa koeproovide kaalumise ja vajadusel lõikamiseks väiksemateks tükkideks, kuna protokoll nõuab, et koetükk oleks vähem kui 30 milligrammi. Seejärel koeproovid tehti katki uhminuiga ja lisati 600 µL RLT puhvrit ning tsentrifuugiti 4 °C juures maksimum kiirusel 3 minutit. Pärast tsentrifuugimist eemaldati 300 µL supernatanti uude tuubi ning lisati sama kogus 70%-list etanooli, segu suspendeeriti pipetiga korralikult läbi.

600 µL supernatandi ja etanooli segu pipeteeriti seejärel RNeasy Mini spin kolonni ja tsentrifuugiti 30 sekundit 4 °C ja 8000g juures, pärast tsentrifuugimist eemaldati kolonni läbinud vedelik ning pipeteeriti kolonnile 350 µL RWI puhvrit ning proovid tsentrifuugiti taas 30 sekundit 4 °C ja 8000g juures. Järgmisena lisati kolonni membraanile 80 µL DNase I inkubatsioonisegu ja lasti 15 minutit reaktsioonil toimuda. Seejärel lisati 350 µL RWI puhvrit ja tsentrifuugiti 30 sekundit 4 °C ja 8000g juures ning eemaldati kolonni läbinud vedelik ning lisati kolonnile 500 µL RPE puhvrit ja tsentrifuugiti eelnevalt mainitud parameetritega.

Järgmisena lisati 500 µL RPE puhvrit ja tsentrifuugiti 2 minutit 8000g ja 4 °C juures ning eemaldati kolonni läbinud vedelik, seejärel vahetati ära kolonni all olev kogumistuub ja tsentrifuugiti

maksimum kiirusel 1 minut. Lõpuks pandi kolonn 1,5 mL kogumistuubi otsa ja lisati 50 µL RNase vaba vett ja tseentrifuugiti 8000 g juures 1 minut.

Eraldatud RNA proovid viidi Tartu Ülikooli Genoomika Instituuti, kus tehti proovidele TapeStation analüüs ning nende tulemuste põhjal valiti sekveneerimiseks 24 proovi (RIN skoorid jäid 8.9 ja 9.3 vahele). Kokku saadeti sekveneerimisele 24 proovi – 12 proovi Purtse alamjooksu kaladest, 6 proovi Purtse ülemjooksu kaladelt ja 6 Kunda alamjooksu kaladelt.

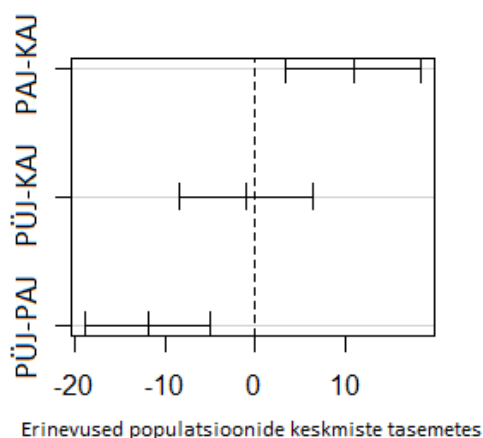
Proovid sekveneeriti samuti Tartu Ülikooli Genoomika Instituudis: Illumina TruSeq Stranded mRNA, instrument NextSeq500 (NS500528), setup: PE 2 x 76 bp + dual index (2 x 8 bp), sekveneerimise kit: NextSeq MID150, Flowcell versioon: NextSeq MID, NCS versioon: 4.0.1 ning RTA versioon: 2.11.3.0.

## **2.3 Tulemused**

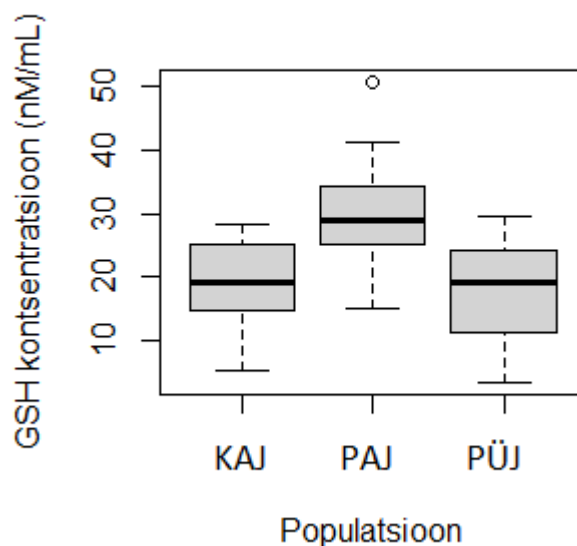
### **2.3.1 Glutatiooni ja etoksüresorufiin-O-detülaasi tulemused**

Laboris tehtud analüüsidele järgnes andmeanalüüs, kasutades andmeanalüüsi programmi RStudio. Glutatiooni kontsentratsioonide ja EROD-i aktiivsuste sõltuvust populatsioonist testimiseks kasutati ANOVA kahesuunalist analüüsi ning Tukey vahemiku testi. Korrelatsioonide testimiseks kasutati Pearsoni korrelatsiooni kordajat, ANOVA analüüsi, Welchi kahe valimi t-testi ning lineaarset regressioonimudelit.

Tehti ANOVA kahesuunaline analüüs, et uurida, kas tunnus glutatioon sõltub populatsioonist ning selgus, et tunnus glutatioon sõltub populatsioonist [ $F(2,40) = 10.18$ ,  $p = 0.000267$ ]. Statistiliselt oluliste populatsioonide tuvastamiseks tehti Tukey vahemiku test: Purtse alamjooksu (PAJ) kaladel on võrreldes Kunda alamjooksu (KAJ) kaladega kõrgem GSH kontsentratsioon [gruppide vaheline erinevus= 10.956,  $p = 0.002$ ]. Purtse ülemjooksu (PÜJ) kaladel on võrreldes PAJ kaladega madalam kontsentratsioon [gruppide vaheline erinevus= -11.879,  $p = 0.0004$ ]. PÜJ ja KAJ kalade GSH kontsentratsioon ei erine. Keskmised ja standardvead olid järgmised: PÜJ ( $\mu = 17.737$ ,  $\sigma = 7.36$ ), PAJ ( $\mu = 29.62$ ,  $\sigma = 9.003$ ) ja KAJ ( $\mu = 18.660$ ,  $\sigma = 7.357$ )



**Joonis 3. Võrdlused kahe populatsiooni glutatiooni (GSH) kontsentratsioonide vahel.** X-teljel on kujutatud erinevuse määr kahe populatsiooni vahel ning y-teljel on toodud võrreldavad populatsioonid. Äärmised kriipsud tähistavad 95%-lise usaldusintervalli otspunkte, ehk kõige ekstreemsemaid väärtusi, kui palju võib GSH kontsentratsioon nende kahe populatsiooni vahel erineda. Keskmise kriips näitab kõige tõenäolisemat väärtust, kui palju kaks populatsiooni erinevad GSH kontsentratsioonis.



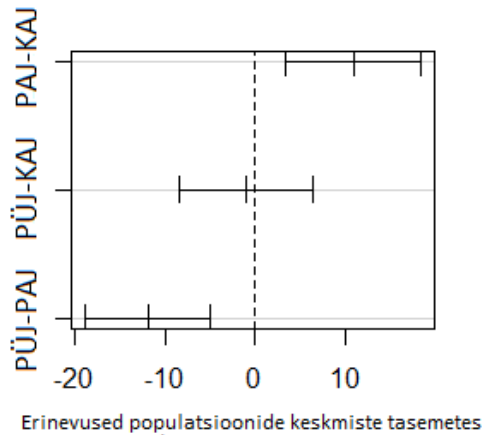
**Joonis 4. Glutatiooni (GSH) kontsentratsiooni tasemed populatsioonide lõikes.** Must paksem joon näitab mediaani ning ülemine hall regioon näitab ülemist kvartiili ning alumine hall regioon alumist kvartiili. Vurrud näitavad minimaalseid ja maksimaalseid väärtusi.

Korrelatsiooni testimiseks GSH kontsentratsiooni ja kehapikkuse vahel kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat ning selgus, et GSH kontsentratsiooni ja kehapikkuse vahel esineb nõrk korrelatsioon ( $r = 0.389$ ). Lineaarse regressioonimudeli abil hinnati korrelatsiooni statistilist olulisust ning tulemused näitasid, et korrelatsioon on statistiliselt oluline. Ehk pikema kehapikkusega kaladel on kõrgem GSH kontsentratsioon.

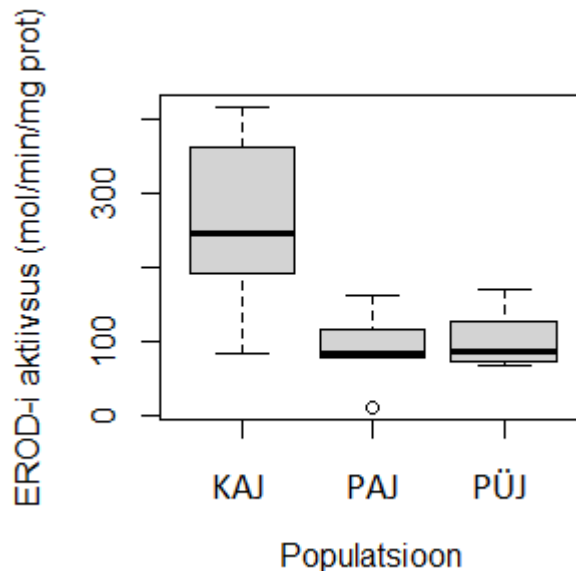
Korrelatsiooni testimiseks GSH kontsentratsiooni ja kehakaalu vahel kasutati ANOVA analüüsi. Korrelatsiooni GSH kontsentratsiooni ja kehakaalu vahel ei esinenud [ $F(1, 41) = 2.92, p = 0.095$ ].

Korrelatsiooni testimiseks GSH ja soo vahel kasutati Welchi kahe valimi t-testi. Selgus, et GSH kontsentratsioon sõltub soost ( $t = -2.452, df = 34.945, p = 0.019$ ). Emaskaladel ( $\mu = 26.177$ ) on võrreldes isaskaladega ( $\mu = 19.472$ ) kõrgem GSH kontsentratsioon.

Tehti kahesuunaline ANOVA analüüs, et uurida kas EROD-i aktiivsus sõltub populatsioonist. Tunnus EROD-i aktiivsus sõltub populatsioonist [ $F(2,15) = 7.915, p = 0.0045$ ] ning statistiliselt oluliste populatsioonide tuvastamiseks tehti Tukey vahemiku test: PAJ populatsiooni kaladel on võrreldes KAJ kaladega madalam EROD-i aktiivsus [gruppide vaheline erinevus =  $-168.417, p = 0.009$ ], PÜJ populatsiooni kaladel on võrreldes KAJ kaladega samuti madalam aktiivsus [gruppide vaheline erinevus =  $-155.145, p = 0.009$ ]. PÜJ ja PAJ populatsioonide EROD-i aktiivsuses erinevusi ei olnud. Keskmised ja standardvead olid järgmised: PÜJ ( $\mu = 103.22, \sigma = 40.724$ ), PAJ ( $\mu = 89.95, \sigma = 54.990$ ) ja KAJ ( $\mu = 258.4, \sigma = 123.521$ )



**Joonis 5. Võrdlused kahe populatsiooni etoksüresorufiin-O-detülaasi (EROD) aktiivsuste vahel.** X-teljel on kujutaud erinevuse määr kahe populatsiooni vahel ning y-teljel on toodud võrreldavad populatsioonid. Äärmised kriipsud tähistavad 95%-lise usaldusintervalli otspunkte, ehk kõige ekstreemsemaid väärtusi, kui palju võib ERODI aktiivsus nende kahe populatsiooni vahel erineda. Keskmine kriips näitab kõige tõenäolisemat väärtust, kui palju kaks populatsiooni erinevad ERODI aktiivsuses.



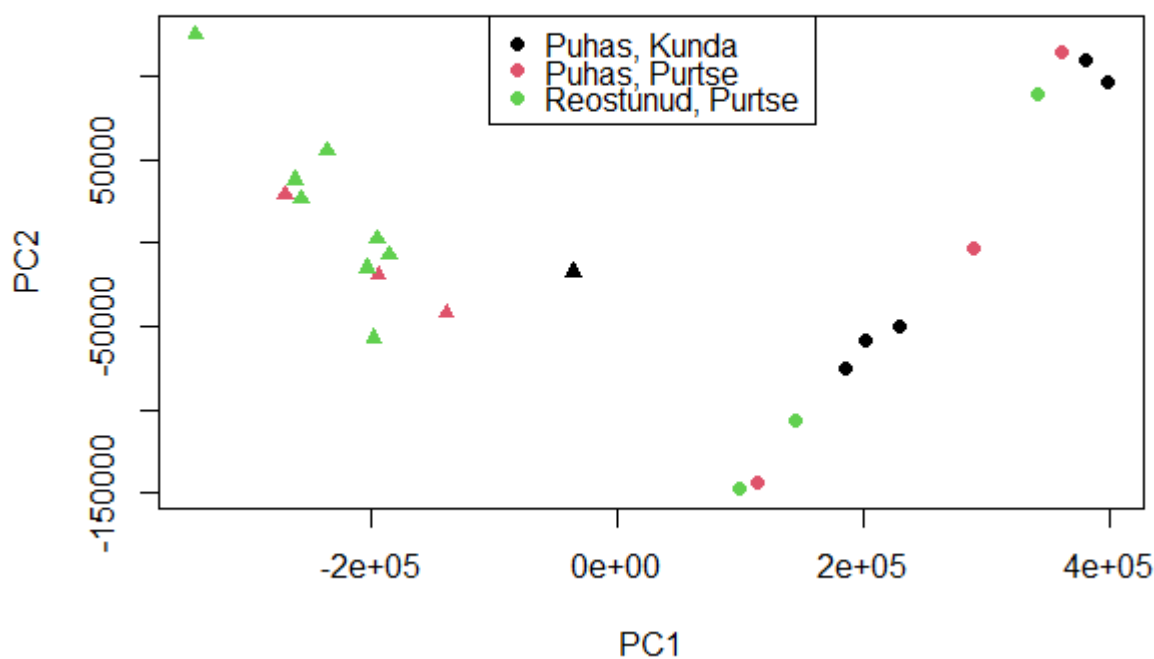
**Joonis 6. Etoksüresorufiin-O-detülaasi (EROD) aktiivsuse tasemed populatsioonide lõikes.**

Must paksem joon näitab mediaani ning ülemine hall regioon näitab ülemist kvartiili ning alumine hall regioon alumist kvartiili. Vurrud näitavad minimaalseid ja maksimaalseid väärtusi.

Korrelatsiooni uurimiseks GSH kontsentratsiooni ja EROD-i aktiivsuse vahel kasutati lineaarset regressioonimudelit. Tulemustest selgus, et korrelatsiooni GSH kontsentratsiooni ja EROD-i aktiivsuse vahel ei olnud.

### 2.3.2 Geeniekspressiooni erinevuste tulemused

Geeniekspressiooni erinevusi analüüsiti tarkvaraga Trinity ja tulemused annoteeriti Trinotate'ga. Kokku tehti kaks võrdlust: kahe eeldatavalt puhtama elupaiga trullingute Kunda jõe alamjooksu (KAJ) populatsioon ja Purtse jõe ülemjooksu populatsioon (PÜJ) võrdlus reostunuma Purtse jõe alamjooksuga (PAJ), ning Purtse jõe ülemjooksu populatsiooni (PÜJ) võrdlus Purtse jõe alamjooksu populatsiooniga (PAJ). Tulemused loeti statistiliselt oluliseks alates väärtustest  $p$ -*adjusted* < 0.01. Geeniekspressiooni erinevuste süsteemi iseloomustamiseks tehti peakomponentanalüüs.



**Joonis 7. Geeniekspressiooni peakomponentanalüüs.** Mustad punktid tähistavad Kunda alamjooksu populatsiooni kalasid. Punased punktid tähistavad Purtse ülemjooksu populatsiooni kalasid. Rohelised punktid tähistavad Purtse alamjooksu populatsiooni kalasid. Kolmnurgad tähistavad emaseid isendeid ja mummud isaseid isendeid.

Peakomponendianalüüsisist selgub, et emased ja isased isendid eristuvad geeniekspressioonis. Selleks, et välistada soost sõltuvate geenide domineerimist võrreldi puhtamate jõeosade (Purtse ülemjooks ja Kunda alamjooks) reostunuma jõe osa (Purtse alamjooks) emaste populatsioone ja isaste populatsioone. Võrdlustest on näha (**tabelid 1. ja 2.**), et puhtama elupaiga ja reostunuma elupaiga kalade erinevused geeniekspressioonis ei ole tingitud soolistest erinevustest. Siiski on tarvis meeles pidada, et elupaikade soolised erinevused võivad mõningaid signaale kunstlikult suurendada. Lisaks tuleb olla ettevaatlik kaasasündinud immuunsüsteemiga seotud geeniekspressiooni erinevuste tulemuste tõlgendamisel, kuna erinevused võivad peegeldada kokkupuudet patogeenidega, mis võib olla populatsioonide vahel erinev.

**Tabel 1. Väiksema reostuskoormusega (PÜJ+KAJ) emaste isendite ning kõrgema reostuskoormusega (PAJ) emaste isendite erinevused geeniekspressioonis**

<b>Geen</b>	<b>Base mean Puhtam (KAJ ja PÜJ)</b>	<b>Base mean Reostunum (PAJ)</b>	<b>Log2 fold</b>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>High choriolytic enzyme 1</i>	206.497	4.779	5.428	5.428	3.048e-09
<i>Dynein regulatory complex subunit 7</i>	116.625	41.483	1.501	1.371e-10	1.619e-06
<i>40S ribosomal protein S19</i>	0	266.357	-10.517	7.325e-10	5.764e-06
<i>Collagenase 3</i>	34.344	1.577	4.422	5.051e-09	2.981e-05
<i>Galactose-specific lectin nattectin</i>	102.846	7.433	3.783	1.190e-08	5.620e-05
<i>40S ribosomal protein S26</i>	3.799	89.924	-4.559	1.914e-08	7.532e-05
<i>72 kDa type IV collagenase</i>	41.739	2.083	4.297	5.112e-08	0.00015
<i>Hepcidin-2</i>	230.102	20.404	3.502	6.844e-08	0.00017

<i>Formimidoyl transferase-cyclodeaminase</i>	30.490	145.087	-2.234	2.617e-07	0.0006
<i>Serine protease 57</i>	77.220	0.444	7.461	1.077e-06	0.0019
<i>Complement C4</i>	0	646.192	-11.796	1.751e-06	0.002
<i>HERV-H LTR-associating protein 2</i>	33.222	1.589	4.371	2.734e-06	0.004
<i>Lysophospholipid acyltransferase 2</i>	5.834	27.545	-2.283	5.373e-06	0.006
<i>DNA-binding protein inhibitor ID-1</i>	122.923	36.643	1.747	7.121e-06	0.008

**Tabel 2. Väiksema reostuskoormusega (PÜJ+KAJ) isaste isendite ning kõrgema (PAJ) reostuskoormusega isaste isendite erinevused geeniekspressioonis**

<b>Geen</b>	<b>Base mean Puhtam (KAJ ja PÜJ)</b>	<b>Base mean Reostunum (PAJ)</b>	<b>Log2.fold</b>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>Complement C1s subcomponent</i>	2.661	2026.343	-9.569	3.148e-14	3.783e-10
<i>Mannan-binding lectin serine protease 1</i>	5.368	354.068	-6.028	6.442e-12	2.580e-08
<i>Vitronectin</i>	62.844	1133.338	-4.171	1.354e-10	3.256e-07
<i>APOBEC1 complementation factor</i>	184.904	0	9.801	1.227e-09	2.457e-06
<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	598.544	19.745	4.929	1.472e-09	2.528e-06

<i>Complement C3</i>	254.038	0	10.260	1.839e-09	2.762e-06
<i>Complement C1r subcomponent</i>	11.053	78.096	-2.839	1.687e-06	0.0016
<i>High choriolytic enzyme</i>	21.795	0	6.711	3.012e-06	0.002
<i>Elastase-1</i>	867.287	27.469	4.974	4.572e-06	0.003
<i>Serotransferrin</i>	2627.050	7306.995	-3.783	6.196e-06	0.0041
<i>Complement C3</i>	367.536	220.630	0.727	6.196e-06	0.004
<i>1,25-dihydroxyvitamin D (3) 24-hydroxylase</i>	24.688	0	6.899	1.342e-05	0.008

**Tabel 3. Geeniekspressiooni erinevused puhtamate elupaikade (PÜJ+KAJ – emased ja isased koos) populatsioonide ja reostunuma elupaiga (PAJ) populatsiooni vahel**

<b>Geen</b>	<b>Base mean Puhtam (KAJ ja PÜJ)</b>	<b>Base mean Reostunum (PAJ)</b>	<b>Log2 fold</b>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>Formimidoyltransferase-cyclodeaminase</i>	34.067	164.345	-2.269	6.674e-14	2.786e-10
<i>Dynein regulatory complex subunit 7</i>	187.442	70.991	1.395	8.157e-09	1.308e-05
<i>ADP-ribosylation factor-like protein 4C</i>	16.868	4.804	1.772	1.745e-08	2.428e-05
<i>Hepcidin-2</i>	433.522	64.607	2.738	2.352e-07	0.0002
<i>Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2</i>	22.560	6.996	1.703	4.098e-07	0.0003
<i>Solute carrier organic anion transporter family member 2A1</i>	25.771	7.347	1.775	5.563e-07	0.0004

<i>Galactose-specific lectin natectin</i>	100.322	14.921	2.731	8.090e-07	0.0005
<i>Lysophospho lipid acyltransferase 2</i>	5.239	27.996	-2.446	8.869e-07	0.0006
<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	1771.027	263.274	2.749	9.654e-07	0.00063
<i>DNA-binding protein binding inhibitor ID-1</i>	163.579	65.366	1.315	1.144e-06	0.00065
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28</i>	34.764	60.083	-0.798	1.591e-06	0.0008
<i>Complement C1q subcomponent subunit A</i>	99.955	49.169	1.020	1.794e-06	0.00089
<i>Complement C3</i>	274.791	38.108	2.855	2.090e-06	0.0009
<i>Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 1</i>	14.295	44.585	-1.690	2.700e-06	0.0012
<i>Zing finger protein 185</i>	5.624	19.803	-1.831	2.871e-06	0.00124
<i>Complement C3</i>	3069.762	680.972	2.172	6.881e-06	0.0025
<i>DNA-binding protein inhibitor ID-3-A</i>	96.197	53.996	0.831	8.094e-06	0.0027
<i>Transcription factor jun-B</i>	47.675	13.434	1.797	8.500e-06	0.0028
<i>Protein c-ets-1-B</i>	38.073	10.194	1.897	9.904e-06	0.003
<i>Proto-oncogene c-Fos</i>	32.778	5.741	2.452	1.070e-05	0.0031
<i>Monoacylglycerol lipase abhd6</i>	37.255	73.778	-0.997	1.129e-05	0.0032

<i>Potassium voltage-gated channel subfamily H member 7</i>	25.615	4.644	2.455	1.203e-05	0.0034
<i>Chymotrypsinogen 2</i>	191.593	56.479	1.758	1.570e-05	0.0043
<i>Peroxiredoxin-like 2C</i>	23.592	43.480	-0.891	2.510e-05	0.006
<i>Complement C3</i>	62.762	187.321	-4.357	3.140e-05	0.0076
<i>Myeloid zinc finger 1</i>	91.922	35.539	1.370	3.160e-05	0.0076
<i>Cytochrome c oxidase subunit 7B</i>	482.508	656.434	-0.444	3.173e-05	0.0076
<i>Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31</i>	25.328	38.694	-0.626	3.619e-05	0.008
<i>5-aminolevulinate synthase</i>	55.432	101.876	-0.876	4.054e-05	0.008

**Tabel 4. Geeniekspressiooni erinevused Purtse jõe ülemjooksu (PÜJ) populatsiooni ja Purtse jõe alamjooksu (PAJ) populatsiooni vahel – immuunsüsteemiga seotud geenid**

<b>Geen</b>	<b>Base mean PÜJ</b>	<b>Base mean PAJ</b>	<b>Log2 fold</b>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>Complement C4</i>	7.085	134.940	-4.244	1.281e-07	0.0002
<i>40S ribosomal protein 19</i>	3.358	276.404	-6.316	3.621e-07	0.0005
<i>Ig kappa chain V region</i>	12.975	46.856	-1.812	1.068e-06	0.001
<i>Immunoglobulin mu heavy chain</i>	7.717	35.241	-2.170	4.539e-06	0.002
<i>Complement C3</i>	286.109	33.776	3.088	2.223e-05	0.008

**Tabel 5. Geeniekspressiooni erinevused Purtse jõe ülemjooksu (PÜJ) populatsiooni ja Purtse jõe alamjooksu (PAJ) populatsiooni vahel – energia sünteesiga seotud geenid**

<b>Geen</b>	<i>Base mean</i> <b>PÜJ</b>	<i>Base mean</i> <b>PAJ</b>	<i>Log2.fold</i>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>Cytochrome c oxidase subunit 7B</i>	378.469	582.814	-0.628	7.824e-09	2.970e-05
<i>ATP synthathise F(0) complex subunit B1</i>	243.238	346.207	-0.520	4.272e-08	0.00011
<i>ATP synthathise subunit gamma</i>	206.658	292.884	-0.516	1.143e-07	0.00024
<i>ATP synthathise subunit alpha</i>	229.087	374.335	-0.711	1.206e-07	0.00024
<i>ATP synthathise subunit delta</i>	160.183	222.146	-0.486	1.713e-07	0.0003
<i>ATP synthathise F(0)</i>	66.721	104.387	-0.658	3.445e-06	0.0023

<i>complex</i>					
<i>subunit C3</i>					
<i>Cytochrome</i>					
<i>c oxidase</i>	183.832	233.268	-0.356	5.426e-06	0.0031
<i>subunit 6A</i>					

---

**Tabel 6. Geeniekspressiooni erinevused Purtse jõe ülemjooksu (PÜJ) populatsiooni ja Purtse jõe alamjooksu (PAJ) populatsiooni vahel – ksenobiootikumide ja reaktiivsete hapnikuühenditega seotud geenid**

<b>Geen</b>	<b>Base mean PÜJ</b>	<b>Base mean PAJ</b>	<b>Log2 fold</b>	<b>p-väärtus</b>	<b>p-adjusted</b>
<i>NADH dehydrogenase</i>					
<i>1 alpha subcomplex</i>					
<i>subunit 12</i>	84.825	141.990	-0.757	3.203e-06	0.0023
<i>UDP-</i>					
<i>glucuronosyltransferase</i>	2.184	9.217	-2.012	2.134e-05	0.0081
<i>1-6</i>					

---

## 2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida kolme hariliku trullingu populatsiooni abil võimalikke kaitsemehhanisme reostuse vastu ja kohastumusi. Meetoditeks olid antud uurimuses antioksidant glutatiooni kontsentratsioon maksas, tsütokroom P450 aktiivsus etoksüresorufiin-O-deetülaasi abil ning erinevused geeniekspressioonis. Uurimuses kasutatud trullingutest olid kaks populatsiooni püütud Purtse jõest - ülemjooksult ja alamjooksult. Purtse jõe ülemjooks (PÜJ) eeldati autori poolt puhtamaks ja kui allikapopulatsiooniks ning alamjooks (PAJ), mis eeldati antud töös kõige reostunumaks punktiks ja mistõttu ka reostuse poolt mõjutatuimaks populatsiooniks. Kontrollpopulatsioon pärines puhtamast Kunda jõe alamjooksult (KAJ).

Tulemustest selgus, et glutatiooni (GSH) kontsentratsioon on sõltuv populatsioonist ning kõige rohkem reostusest mõjutatud populatsioonil PAJ, on võrreldes teiste populatsioonidega kõrgemad GSH kontsentratsioonid. Varasemalt avaldatud kirjandusest leidub, et muutused detoksifikatsiooni ensüümides ning vähesed GSH kontsentratsioonid viitavad detoksifikatsiooni mehhanismide aktivatsioonile, kuid nõrgenenud antioksidant kaitsele (Otto & Moon, 1996). Kuigi antud töös kõiki GSH-ga seotud ensüüme ei käsitletud (ning nende kaasamine oleks tulevikus hea lisameetod), saab eeldada GSH kõrge kontsentratsiooni põhjal, et PAJ populatsiooni GSH-põhine kaitsemehhanism toimib ning potentsiaalselt omab osa populatsiooni võimekuses elada reostunud elupaigas ja pakkuda kaitset. Populatsioonide KAJ ja PÜJ GSH kontsentratsioonides erinevusi ei olnud, mis toetab käesoleva töö eeldust, et PÜJ populatsiooni reostuskoormus on võrreldes PAJ populatsiooniga madalam ning seetõttu on ka GSH põhine kaitsemehhanism vähem vajatud. AS Maves poolt tehtud uuringust selgub, et jõe reostatus on mosaiikne ning märgid reostusest on levinuimad lisajõgede suubumiskohtades ja suudme läheduses olevas jõelõigis (AS MAVES, 2008).

GSH kontsentratsiooni uuriti ka läbi seoste otsimise kehakaaluga, pikkusega ning sooga. Tulemustest selgus, et korrelatsioone GSH kontsentratsiooni ja kehakaalu vahel ei olnud, kuid pikkuse ja soo vahel on. Nimelt on GSH kontsentratsioon nõrgalt sõltuv kehapiikkusest ja sõltuv soost, ehk pikematel isenditel on ka kõrgem GSH kontsentratsioon ning ka emastel kaladel on kõrgem GSH kontsentratsioon, kusjuures PAJ valimis oli kõige rohkem emaseid kalasid ning seetõttu võib olla GSH kontsentratsioonid emastel antud töös kõrgemad kui isastel isenditel.

Etoksüresorufiin-O-detülaasi (EROD-i) aktiivsused sõltuvad populatsioonist, KAJ populatsioonil oli kõrgem ERODI aktiivsus kui mõlemal Purtse jõe populatsioonil. Antud tulemus võib viidata

Purtse jõe kalade vähenenud tsütokroom P450 alamperekonna ensüümide (CYP1A) tundlikkusele, mida on uurinud mitmed teadlased ja on arvatavasti potentsiaalne kohastumus väga reostunud elupaikades elavatel hammaskarbilistel. Oleksiak et al., 2011 demonstreerisid oma uuringus, et puhtast elupaigast pärit ja PCB-ga mõjutatud kalade embrüotel esines võrreldes reostunud elupaigast pärit ja samuti PCB-ga mõjutatud kalade embrüotega märgatavalt suurem CYP1A induktioon ning viitas sellele, et kalad olid oma reostusvastase fenotüübi säilitanud (Oleksiak et al., 2011). Varasemalt avaldatud kirjanduses põhjal võib eeldada, et põhjus, miks Purtse jõe kalad võivad potentsiaalselt ksenobiootikumi vastase kaitsemehhanismi nagu tsütokroom P450 tundlikkust vähendada, võib olla antud kaitsemehhanismide käivitamisel tekkivad vaheühendid, mis on mõnikord organismile toksilisemad kui esialgne ksenobiootikum (Ma & Lu, 2007). Kusjuures GSH põhine kaitsemehhanism ja ERODI vähenenud aktiivsus antud töös omavahel seotud ei olnud.

Geeniekspressiooni analüüsis kasutati kahte võrdlust. Purtse jõe ülemjooksu populatsiooni ja kontrollpopulatsiooni Kunda jõe alamjooksult võrreldi koos reostunuma Purtse alamjõe populatsiooni vastu. Selline võrdlus näitab reostuse üldisemat mõju geeniekspressioonile ning kaasates kontrollpopulatsiooni välistatakse võimalus, et tegemist on juhusliku geenivoolu tõttu tekkinud erinevustega. Siiski tuleb meele pidada, et hoolimata Purtse jõe ülemjooksu väiksemast reostuskoormusest võrreldes alamjooksuga, on näha EROD-i analüüsi tulemuste põhjal, et ka ülemjooksu populatsioon on mõnevõrra reostusest mõjutatud. Teine võrdlus tehti Purtse jõe ülemjooksu ja alamjooksu populatsioonide vahel, see võimaldab uurida allikapopulatsiooni ja asustajapopulatsiooni geeniekspressiooni erinevusi. Eelduseks töö ülesehitusel oli, et valikusurve on väiksem PÜJ populatsioonil ning allavoolu liikudes puutuvad trullingud kokku suurema reostustasemega. Alamjooksu trullingud on potentsiaalselt tugevaimate kaitsemehhanismidega ning seeläbi suudavad asustada ja ellu jääda suurema reostuskoormusega elupaigas. Antud gruppide geeniekspressiooni võrdlus võimaldab anda ülevaate, millised need kaitsemehhanismid võivad potentsiaalselt olla.

PÜJ ja KAJ populatsioonide võrdlusel PAJ populatsiooniga näitab, et reostus mõjutab üldisemalt genee, mis on seotud põletikuliste protsessidega (*Galactose-specific lectin nattoectin*), transkriptsiooni regulatsiooniga (*Transcription factor jun-B*, *Proto-oncogene c-Fos*, *Myeloid zinc finger 1*, *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31*), kaasasündinud immuunsüsteemiga (*Complement C1q subcomponent subunit A*, *Complement C3*), raua homöostaasiga (*Hepcidin-2*, *5-aminolevulinate synthase*), oksüdatiivse stressiga (*Peroxiredoxin-*

like 2C), lipiidide biosünteesiga (*Lysophospho lipid acyltransferase 2, Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 1*) ning DNA ja kudede kahjustustega (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28, Solute carrier organic anion transporter family member 2A1*). Sarnaseid geeniekspressiooni erinevusi puhtamate elupaikade ja reostunud elupaikade populatsioonide vahel on kirjeldanud ka varasemad teadusartiklid, kasutades erinevaid molekulaarbioloogia tehnoloogiaid. On täheldatud, et reostunud elupaiga populatsioonides on võrreldes puhtama elupaiga populatsioonidega madalamalt ekspresseeritud geenid, mis on seotud kaasasündinud immuunsüsteemiga ja muude immuunsüsteemi vastustega ning raua homöostaasiga (Asker et al., 2013; Defo et al., 2018). Lisaks on täheldatud transkriptsiooni regulatsiooniga seotud geenid kõrgemalt ekspresseeritud (Defo et al., 2018).

Võrdlusest PÜJ ja PAJ populatsioonide vahel selgub, et allikapopulatsiooni ja asustajapopulatsiooni vahel esineb erinevusi geenide ekspressioonis, mis on seotud immuunsüsteemiga, energia sünteesiga ning ksenobiootikumide ja reaktiivsete hapnikuühendite metabolismiga. Paljud immuunsüsteemiga seotud geenid on PAJ populatsioonis kõrgemalt ekspresseeritud, näiteks kaasasündinud immuunsüsteemi komplemendi süsteemi osa C4 on PAJ populatsioonis 16 korda kõrgemalt ekspresseeritud kui puhtamas PÜJ allikapopulatsioonis (**tabel 4.**), lisaks on 82 korda kõrgemalt ekspresseeritud *40S ribosomal protein 19*, mille eeldatav roll on kaitsta kudesid neutrofiilide poolt indutseeritud kahjustuste eest ning surevate rakkude eemaldamine põletikulistes protsessides (Markiewski et al., 2017). Veel leidub erinevusi omandatud immuunsüsteemiga seotud geenides, mis on reostunumas populatsioonis kõrgemalt ekspresseeritud (**tabel 4.**). Antud tulemused viitavad, et reostunud asustajapopulatsioonil on potentsiaalselt tugevamad immuunsüsteemi kaitsemehhanismid. Siiski, tuleb silmas pidada populatsioonide kokkupuudet erinevate patogeenidega, millele antud töös kindlaid järeldusi teha ei saa. Veel tuleb mainida, et kokkupuude immuuntoksiliste ühenditega võib immuunsüsteemi kas aktiveerida või supresseerida olenevalt liigist ja toksiliste ühendite kontsentratsioonist (Asker et al., 2013). Võrdlusest selgunud andmete põhjal ei tundu trullingute immuunsüsteemi reostuse surve all supresseeritud olevat, kuid kaitse potentsiaalset hinda ei ole võimalik antud töö alusel hinnata.

Veel leidub erinevusi energia sünteesiga seotud geenides, kus reostunud asustajapopulatsioonidel on antud geenides võrreldes allikapopulatsiooniga kõrgem ekspressioon (**tabel 5.**). On võimalik, et suurem reostuskoormus nõuab rohkem energiat, et kaitsemehhanisme üleval hoida ja kaitsta organismi reostuse vastu. Erinevusi antud süsteemiga seotud geenides on täheldatud ka varasemas teadusartiklis, kus ATP sünteesiga geenid olid alla reguleeritud (Pujolar et al., 2013). Kirjandusest

leidub, et reoainetega kokkupuutuvad organismid tavaliselt investeerivad detoksifikatsiooniga seotud protsessidesse, mis võivad olla väga kulukad (Jacquin et al., 2020).

PAJ populatsioonil on ka kõrgemalt ekspresseeritud ksenobiootikumide ja reaktiivsete hapnikuühendite metabolismiga seotud geenid. *UDP-glucuronosyltransferase 1-6*, mis omab rolli ksenobiootikumide konjugatsioonil, on PAJ populatsioonis 4 korda rohkem ekspresseeritud. Kõrgemat ksenobiootikumidega seotud geenide ekspressiooni on täheldanud ka varasemad teadustööd (Asker et al., 2013).

Antud tulemused viitavad sellele, et reostunuima elupaiga Purtse jõe alamjooksu trullingud kasutavad potentsiaalselt kaitsemehhanismidena nii võimendatud füsioloogilisi protsesse ja rakupõhiseid vastuseid, kui ka vähendatud tundlikkust kaitsemehhanismide näol, mis reostunud elupaiga korral muutuvad organismile kahjulikuks. Nagu bioloogilise mitmekesisuse säilimise põhitõeks on tasakaal, on ka reostuskoormusega võitleval organismil vaja leida vastustes reostusele optimaalne suhe, et tagada püsijäämine.

Käesolev töö ei võimalda eristada kohastumusi kohanemisest, selle jaoks oleks soovitatav teha populatsioonidega ühisaia (*common garden*) katse, et uurida seoseid fenotüübi, genotüübi ja keskkonna vahel (de Villemeruil et al., 2016). Lisaks oleks kasulik uurida antioksidant glutatiooni ensüümide aktiivsusi, et vaadata kas ensüümide aktiivsused ja antioksidantide tasemed on tasakaalus, ning hinnata põhjalikumalt reostunud jõe kalade antioksidandi põhist kaitsemehhanismi. Samuti tasuks teha longitudinaalseid uuringuid Purtse jõe populatsioonidega, et uurida kaitsemehhanismide püsivust ja potentsiaalset hinda jõe puhtamaks muutumisel.

## KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli uurida kolme hariliku trullingu (*Barbatuala barbatula*) populatsiooni abil võimalikke kaitsemehhanisme reostuse vastu ja kohastumusi. Potentsiaalsete kaitsemehhanismide uurimiseks kasutati glutatiooni kontsentratsioone maksas, tsütokroom P450 perekonda kuuluva CYP1A1 aktiivsust ning uuriti ka erinevusi geeniekspressioonis tuvastamaks reostuse surve poolt valitud kaitsemehhanisme.

Uuringu tulemused näitasid, et glutatiooni kontsentratsioon on populatsioonist sõltuv ning kõige suurema reostuskoormusega populatsioonil on kõrgemad glutatiooni tasemed. Erinevusi reostunud Purtse jõe puhtama osa populatsiooni ja Kunda jõe kontrollpopulatsiooni vahel ei olnud. Glutatioon sõltub soost, emaskaladel on kõrgemad glutatiooni tasemed. Samuti sõltub glutatiooni tasemed kehapikkusest, pikematel kaladel on kõrgem glutatiooni kontsentratsioon. Seost kehakaalu ja glutatiooni kontsentratsiooni vahel ei olnud.

Etoksüresorufiini-O-detülaasi aktiivsuste tulemustest selgus, et puhtama Kunda jõe populatsioonil on kõrgem aktiivsus kui reostunud jõe populatsioonidel. Seost etoksüresorufiini-O-detülaasi aktiivsuse ja glutatiooni kontsentratsiooni vahel ei olnud.

Geeniekspressiooni tulemused näitasid, et reostus mõjutab üldisemalt geene, mis on seotud põletikuliste protsessidega, transkriptsiooni regulatsiooniga, kaasasündinud immuunsüsteemiga, raua homöostaasiga, oksüdatiivse stressiga, lipiidide biosünteesiga ning DNA ja kudede kahjustustega. Antud töö tulemustest selgus, et asustajapopulatsiooni potentsiaalsed kaitsemehhanismid võivad olla geenides, mis on seotud immuunsüsteemiga, energia sünteesiga ja ksenobiootikumide ja reaktiivsete hapniku ühendite metabolismiga.

Antud uurimust on võimalik täiendada ühisaia katsetega ning uurida lähemalt antioksidantide mehhanisme kaasates uurimusse ensüümide aktiivsuse uuringuid. Lisaks on võimalus uurida reostunud Purtse jõe populatsioone longitudinaalselt, et hinnata kaitsemehhanismide püsivust ja muutumist ajas, kui jõgi muutub puhtamaks. Lisaks võimaldab longitudinaalne uuring selgitada potentsiaalset hinda, mis võib kaasneda kaitsemehhanismidega.

## RESÜMEE

### „Defense mechanisms in a polluted habitat: a study of Purtse river stone loaches“

Summary

Maiken Abel

The aim of this thesis was to study the defense mechanisms and potential adaptations of organisms who live in polluted habitats on the example of polluted Purtse river stone loach (*Barbatula barbatula*) populations. Methods used in this study included glutathione concentration in the liver, ethoxyresorufin-O-deethylase activity and differential gene expression.

The results showed that population with the highest pollution burden had higher antioxidant glutathione levels compared to other two populations with lesser burden. This indicates that the population has a functioning glutathione defense mechanism and could be one possible reason why the population can inhabit part of the river with high pollution burden.

Sex and body length were correlated with higher glutathione levels. Female fish had higher levels compared to male counterparts and fish with longer bodies had higher levels of glutathione. No correlation between body mass and glutathione levels was found.

Ethoxyresorufin-O-deethylase activity was highest in the control group population from cleaner Kunda river. Which could indicate that Purtse river populations have a possible defense mechanism in reduced AHR pathway sensitivity.

Gene expression results showed that pollution affects genes that are related to inflammation, transcription regulation, innate immune system, iron homeostasis, oxidative stress, lipid biosynthesis and DNA and tissue damage.

This thesis can benefit from additional research methods such as common garden experiments and indepth overview of glutathione defense mechanism by studying enzyme activities. Longitudinal studies on these populations can evaluate persistence of the defense mechanisms once the river has become cleaner and study the costs of pollution defense mechanism in a changed and clean environment.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Tuul Seppa, Jon Anders Erikssoni ja Richard Meiterni võimaluse eest tegeleda huvitava uurimustööga ning igakülgse abi eest. Lisaks soovin tänada ka Randel Kreitsbergi, Ciara Baines'i, Lauri Saksi ja Martin Keslerit, kes osalesid antud töö nõustamisel ja olid suureks abiks laboris/välitöödel.

## **KASUTATUD ALLIKAD**

Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S., & Romeo, M. (Eds.). (2011). *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10519>

Asker, N., Kristiansson, E., Albertsson, E., Larsson, D. G. J., & Förlin, L. (2013). Hepatic transcriptome profiling indicates differential mRNA expression of apoptosis and immune related genes in eelpout (*Zoarces viviparus*) caught at Göteborg harbor, Sweden. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.017>

Bello, S. M., Franks, D. G., Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (2001). Acquired Resistance to Ah Receptor Agonists in a Population of Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) Inhabiting a Marine Superfund Site: In Vivo and in Vitro Studies on the Inducibility of Xenobiotic Metabolizing Enzymes. *Toxicological Sciences*, 60(1), 77–91. <https://doi.org/10.1093/toxsci/60.1.77>

Biagianti-Risbourg, S., Paris-Palacios, S., Mouneyrac, C., & Amiard-Triquet, C. (2013). Pollution Acclimation, Adaptation, Resistance, and Tolerance in Ecotoxicology. In J.-F. Férard & C. Blaise (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* (pp. 883–892). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2\\_81](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_81)

Brauer, C. J., Unmack, P. J., & Beheregaray, L. B. (2017). Comparative ecological transcriptomics and the contribution of gene expression to the evolutionary potential of a threatened fish. *Molecular Ecology*, 26(24), 6841–6856. <https://doi.org/10.1111/mec.14432>

Bumgarner, R. (2013). DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Current Protocols in Molecular Biology* / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al.], 0 22, Unit-22.1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2201s101>

Burnett, K. G., Bain, L. J., Baldwin, W. S., Callard, G. V., Cohen, S., Di Giulio, R. T., Evans, D. H., Gómez-Chiarri, M., Hahn, M. E., Hoover, C. A., Karchner, S. I., Katoh, F., Maclatchy, D. L.,

Marshall, W. S., Meyer, J. N., Nacci, D. E., Oleksiak, M. F., Rees, B. B., Singer, T. D., ... Crawford, D. L. (2007). Fundulus as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 2(4), 257–286. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.09.001>

de Villemereuil, P., Gaggiotti, O. E., Mouterde, M., & Till-Bottraud, I. (2016). Common garden experiments in the genomic era: New perspectives and opportunities. *Heredity*, 116(3), 249–254. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.93>

Defo, M. A., Douville, M., Giraudo, M., Brodeur, P., Boily, M., & Houde, M. (2018). RNA-sequencing to assess the health of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River, Canada. *Environmental Pollution*, 243, 1657–1668. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.133>

Díaz-Arce, N., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2019). Selecting RAD-Seq Data Analysis Parameters for Population Genetics: The More the Better? *Frontiers in Genetics*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00533>

Donihue, C. M., & Lambert, M. R. (2015). Adaptive evolution in urban ecosystems. *Ambio*, 44(3), 194–203. <https://www.jstor.org/stable/24670711>

Eklblom, R., & Galindo, J. (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.152>

Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*, 7(5), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>

Giang, P. T., Burkina, V., Sakalli, S., Schmidt-Posthaus, H., Rasmussen, M. K., Randak, T., Grabic, R., Grabicova, K., Fedorova, G., Koba, O., Golovko, O., Turek, J., Cervený, D., Kolarova, J., & Zlabek, V. (2019). Effects of Multi-Component Mixtures from Sewage Treatment Plant Effluent on Common Carp (*Cyprinus carpio*) under Fully Realistic Condition. *Environmental Management*, 63(4), 466–484. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0964-7>

Häder, D.-P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of The Total Environment*, 713, 136586. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>

Hamilton, P. B., Rolshausen, G., Uren Webster, T. M., & Tyler, C. R. (2017). Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712), 20160042. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0042>

Harney, E., Paterson, S., Collin, H., Chan, B. H. K., Bennett, D., & Plaistow, S. J. (2022). Pollution induces epigenetic effects that are stably transmitted across multiple generations. *Evolution Letters*, 6(2), 118–135. <https://doi.org/10.1002/evl3.273>

Hoffmann, A. A., & Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 421–432. <https://doi.org/10.1038/nrg2339>

Hunt, T. (2012). Trulling (*Barbatula barbatula*), p.106. In Mikli, M. (ed.), *Eesti kalad.*, Varrak, Tallinn.

Jacquín, L., Petitjean, Q., Côte, J., Laffaille, P., & Jean, S. (2020). Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2020.00086>

Kataoka, C., & Kashiwada, S. (2021). Ecological Risks Due to Immunotoxicological Effects on Aquatic Organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8305. <https://doi.org/10.3390/ijms22158305>

Kreitsberg, R., Baršienė, J., Freiberg, R., Andreikėnaitė, L., Tammaru, T., Rumvolt, K., & Tuvikene, A. (2013). Biomarkers of effects of hypoxia and oil-shale contaminated sediments in laboratory-exposed gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.016>

Kwon, D. H., Cha, H.-J., Lee, H., Hong, S.-H., Park, C., Park, S.-H., Kim, G.-Y., Kim, S., Kim, H.-S., Hwang, H.-J., & Choi, Y. H. (2019). Protective Effect of Glutathione against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity in RAW 264.7 Macrophages through Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor-2/Heme Oxygenase-1 Pathway. *Antioxidants*, 8(4), 82. <https://doi.org/10.3390/antiox8040082>

Leaver, M. J., Diab, A., Boukouvala, E., Williams, T. D., Chipman, J. K., Moffat, C. F., Robinson, C. D., & George, S. G. (2010). Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure ‘biomarker’ signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquatic Toxicology*, 96(3), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.025>

Li, C., Yang, L., Shi, M., & Liu, G. (2019). Persistent organic pollutants in typical lake ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.060>

Lynch, A. J., Cooke, S. J., Deines, A. M., Bower, S. D., Bunnell, D. B., Cowx, I. G., Nguyen, V. M., Nohner, J., Phouthavong, K., Riley, B., Rogers, M. W., Taylor, W. W., Woelmer, W., Youn, S.-J., & Beard, T. D. (2016). The social, economic, and environmental importance of inland fish and fisheries. *Environmental Reviews*, 24(2), 115–121. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0064>

Ma, Q. (2008). Xenobiotic-Activated Receptors: From Transcription to Drug Metabolism to Disease. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1651–1671. <https://doi.org/10.1021/tx800156s>

Ma, Q., & Lu, A. Y. H. (2007). CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(7), 1009–1016. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015826>

Markiewski, M. M., Vadrevu, S. K., Sharma, S. K., Chintala, N. K., Ghouse, S., Cho, J.-H., Fairlie, D. P., Paterson, Y., Astrinidis, A., & Karbowniczek, M. (2017). The ribosomal protein S19 suppresses antitumor immune responses via the complement C5a receptor 1. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 198(7), 2989–2999. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602057>

Meister, A. (1992). Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Spec No, 1–6. [https://doi.org/10.3177/jnsv.38.special\\_1](https://doi.org/10.3177/jnsv.38.special_1)

Morozova, O., Hirst, M., & Marra, M. A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 135–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957>

Nacci, D. E., Champlin, D., & Jayaraman, S. (2010). Adaptation of the Estuarine Fish *Fundulus heteroclitus* (Atlantic Killifish) to Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Estuaries and Coasts*, 33(4), 853–864. <https://www.jstor.org/stable/40863462>

Oleksiak, M. F., Karchner, S. I., Jenny, M. J., Franks, D. G., Mark Welch, D. B., & Hahn, M. E. (2011). Transcriptomic assessment of resistance to effects of an aryl hydrocarbon receptor (AHR) agonist in embryos of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a marine Superfund site. *BMC Genomics*, 12(1), 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-263>

Osterberg, J. S., Cammen, K. M., Schultz, T. F., Clark, B. W., & Di Giulio, R. T. (2018). Genome-wide scan reveals signatures of selection related to pollution adaptation in non-model estuarine Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology*, 200, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.017>

Otto, D. M. E., & Moon, T. W. (1996). Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(1), 141–147. <https://doi.org/10.1007/BF00203918>

Pujolar, J. M., Milan, M., Marino, I. A. M., Capoccioni, F., Ciccotti, E., Belpaire, C., Covaci, A., Malarvannan, G., Patarnello, T., Bargelloni, L., Zane, L., & Maes, G. E. (2013). Detecting genome-wide gene transcription profiles associated with high pollution burden in the critically endangered European eel. *Aquatic Toxicology*, 132–133, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.02.012>

Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1, 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>

Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J. (2019). Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the

Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00636>

Sukhovskaya, I. V., Borvinskaya, E. V., Smirnov, L. P., & Kochneva, A. A. (2017). Role of glutathione in functioning of the system of antioxidant protection in fish (review). *Inland Water Biology*, 10(1), 97–102. <https://doi.org/10.1134/S1995082917010187>

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>

Vittecoq, M., Giraudeau, M., Sepp, T., Marcogliese, D. J., Klaassen, M., Renaud, F., Ujvari, B., & Thomas, F. (2018). Turning natural adaptations to oncogenic factors into an ally in the war against cancer. *Evolutionary Applications*, 11(6), 836–844. <https://doi.org/10.1111/eva.12608>

Weiner, R. F., & Matthews, R. A. (Eds.). (2003). Chapter 4—Water Pollution. In *Environmental Engineering (Fourth Edition)* (pp. 51–79). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-075067294-8/50004-X>

Whitehead, A., Clark, B. W., Reid, N. M., Hahn, M. E., & Nacci, D. (2017). When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary Applications*, 10(8), 762–783. <https://doi.org/10.1111/eva.12470>

Whyte, J., Jung, R., Schmitt, C., & Tillitt, D. (2000). Ethoxyresorufin- O -deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30, 347–570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://envir.ee/media/4231/download> (külastatud 29.05.22)

<https://envir.ee/en/node/2438> (külastatud 29.05.22)

[https://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Techniques%20in%20Marine%20Environmental%20Sciences%20\(TIMES\)/TIMES57.pdf](https://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Techniques%20in%20Marine%20Environmental%20Sciences%20(TIMES)/TIMES57.pdf) (külastatud 28.05.22)

<https://www.iucnredlist.org/> (külastatud 28.05.22)

[https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news/efforts-needed-protect-inland-waters-2019-02-05\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news/efforts-needed-protect-inland-waters-2019-02-05_en) (külastatud 28.05.22)

<https://envir.ee/media/5138/download> (külastatud 12.05.22)

<https://envir.ee/media/4819/download> (külastatud 12.05.22)

## LIHTLITSENTS

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maiken Abel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose **„Kaitsemehhanismid reostunud elupaigas Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) näitel“**, mille juhendaja on Tuul Sepp ja kaasjuhendajateks Jon Anders Eriksson ja Richard Meitern, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i 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 lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Maiken Abel*

**30.05.2022**