

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

LISANNE NÄÄB

REOSTUSEGA SEOTUD GEENIDE EKSPRESSIOON
PIKAEALISTEL MERELINDUDEL

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Tuul Sepp PhD,

Richard Meitern PhD

TARTU 2021

Infoleht

Märkamaks inimtekkeliste reoainete kahjulikku mõju elustikule juba enne, kui need on põhjustanud olulise languse looduslike populatsioonide arvukuses, on üheks võimalikuks lähenemisviisiks uurida reostusega seotud geenide ekspressiooni organismidel, sest geeniekspressiooni erinevus võrreldes puhtas keskkonnas elavate loomade tasemest on märk sellest, et reostus loomi mõjutab. Selle töö eesmärk on luua ülevaade merelindudel tehtud reostusega seotud geeniekspressiooni uuringutest, et mõista reoainete ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid merelindudel, saada ülevaade kasutatavatest meetoditest ning leida üles peamised teadmistaugud. Siia maani on neid uuringuid väga vähe, kuid siiski on leitud mitmeid gene, mille avaldumist reostus mõjutab. Näiteks on võõrainete metaboliseerimise ja oksüdatiivse stressiga seotud geenid merelindudel saastunud elupaikades üles reguleeritud. Kuna reostuse mõju geeniekspressioonile võib sõltuda mitmest erinevast tegurist, siis on uuringud spetsiifilised ja raskesti võrreldavad. Parema võrreldavuse huvides võiks ühtlustada meetodeid ja analüüsitavaid ainevahetusradasid. Veel üheks tulevikusuunaks võiks olla vähem invasiivsete meetodite arendamine proovide kogumiseks.

Märksõnad: ökotoksikoloogia, merelinnud, geeniekspressioon, reostus

One possible approach for noticing the harmful effects of pollutants on the biota before these substances have caused a decline in populations is investigating how pollution affects gene expressions in organisms, as differences in gene expression profiles are a sign of wildlife being under the stress of pollution. The aim of this paper is to give an overview of studies investigating the associations between gene expression and pollutants in seabirds and find main knowledge gaps. Despite there being only a few studies on the topic, several gene regulation pathways that are affected by pollution have been found. For instance, genes that are related to xenobiotic metabolism and oxidative stress are upregulated in seabird populations living in polluted habitats. Since the effect of pollution on gene expression can depend on many different factors, the studies are specific and difficult to compare. Future research could focus on adopting universal methods to improve comparison between studies. Another topic that should be focused on is collecting samples using less invasive methods.

Keywords: ecotoxicology, seabirds, gene expression, pollution

Lühendid

mRNA (*messenger ribonucleic acid*) – informatsiooni-RNA

GSSG (*oxidised glutathione*) – oksüdeeritud glutatioon

GSH (*reduced glutathione*) – redutseeritud glutatioon

GST (*glutathione-S-transferase*) – glutatiooni S-transferaas

HSP (*heat shock proteins*) – kuumašoki valk

CYP (*cytochrome P450*) – tsütokroom P450

Me-Hg (*methylmercury*) – metüüelavhõbe

PCB (*polychlorinated biphenyl*) – polüklooritud bifenuülid

PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbon*) – polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud

BFR (*brominated flame retardant*) – broomitud leegiaeglustid

DRC (*dioxin related compound*) – dioksiini-laadsed ühendid

OH-PCB (*hydroxylated polychlorinated biphenyl*) – hüdroksüleeritud polüklooritud bifenuülid

MeSO₂-PCB (*methyl sulfone polychlorinated biphenyl*) – metüülsulfoon polüklooritud bifenuülid

PFC (*perfluorinated compound*) – perfluoritud ühendid

SSH (*suppression subtractive hybridization*) – supressioon-PCR reaktsiooni sisaldav subtraktiivne hübridisatsioon

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	5
2. Materjal ja meetodid	7
3. Merereostuse allikad	8
3.1 Püsivad orgaanilised saasteained	8
3.2 Elavhõbe ja teised raskmetallid	8
4. Reostuse mõju uurimisel kasutatavad meetodid	10
4.1 Uuritud liigid.....	10
4.2 Katsedisain	10
4.3 Proovikogumismeetodid	11
4.4 Reostuse hindamine	11
4.5 Molekulaarsed meetodid	12
5. Reostusega seotud ainevahetusradade kirjeldus	16
5.1 Oksüdatiivse stressiga seotud geenid.....	16
5.2 Biotransformatsioon.....	17
5.3 Muud ainevahetusrajad	18
6. Arutelu	20
Kokkuvõte.....	24
Summary	25
Tänuavaldus	27
Kasutatud kirjandus	28
Internetiallikad	32

1. Sissejuhatus

Inimkonna kiire kasv ning elustandardite muutus tingib järjest suureneva inimtegevuse surve ökosüsteemidele (Cohen, 2010). Kuni 100 km kaugusel rannikust elab umbes 40% inimestest ning see arv hinnatakse olema tõusuteel (McMichael et al., 2020). Selle üheks tagajärjeks on igal aastal kümnete tuhandete tööstustest, põllumaadelt, kaevandustest ja majapidamistest tulenevate keemiliste saasteainete mereökosüsteemidesse paiskamine (Álvarez-Muñoz et al., 2016). Püsivatel orgaanilistel ühenditel ja raskmetallidel on suur mõju mereelustikule, muutes merekeskkonda ja kahjustades organismide tervist, mistõttu muutub ka mereökosüsteemide toimimine (Shahidul Islam & Tanaka, 2004). Paljud uurimistööd on näidanud nii sünteesitud orgaaniliste ainete kui ka raskmetallide negatiivset mõju mereorganismidele endokriin-, immun-, närvi- ja reproduktiivsüsteemi kahjustamise kaudu ning mõjude tõttu kasvule ja arengule (Mrema et al., 2013; Whitney & Cristol, 2018). Lisaks olemasolevatele saasteainetele sünteesitakse ka uusi ühendeid, mille mõju veel ei osata hinnata (Hao et al., 2021). Seetõttu on väga oluline uurida nii olemasolevate kui uute ainete mõju elustikule, et osata populatsioone ja ökosüsteemide teenuseid ennetavalt saasteainete kahjuliku mõju eest kaitsta.

Ökotoxikoloogia on interdistsiplinaarne teadus, mis uurib, hindab ja ennustab saasteainete mõju elustikule (Forbes, 1993). Ökotoxikoloogia uuringud ei ole piiritletud ühe ökosüsteemi hierarhilise tasemega. Võidakse näiteks uurida, kuidas keskkonnamürgid mõjutavad elustikku nii geenide, biokeemia, füsioloogia, organismide, populatsioonide kui ka koosluste toimimise tasandil ning parema arusaamise nimel on hädavajalik integreerida eri tasandite uurimistest saadud teadmisi (Hao et al., 2021). Ökotoxikoloogide kaugem eesmärk on kaitsta populatsioone ja ökosüsteemide stabiilsust. Seetõttu on ökotoxikoloogia suurimaks väljakutseks märgata inimtekkeliste saasteainete kahjulikku mõju elustikule juba enne, kui need on põhjustanud olulise languse looduslike populatsioonide arvukuses (Rodríguez-Romero et al., 2021). Just pikaealiste liikide puhul võib langus populatsiooni tasemel olla väga pika viiteajaga näitaja selle kohta, et reostus loomi negatiivselt mõjutab (Edwards et al., 2019). Reostus mõjutab küll loomade tervist negatiivselt, kuid suremus ei pruugi suureneda, sest langus tervises kompenseeritakse elukäigu lõivusuhetega, vähendades näiteks investeeringuid sigimisse või parasiitidevastasesse kaitsesse (vt nt Murren et al., 2015; Snell-Rood et al., 2015; Byrne et al., 2020; DiGiacopo & Hua, 2020). Seetõttu on vaja leida meetodeid reoainete mõju uurimiseks subletaalsel tasemel. Selles bakalaureusetöös uuritakse, kuidas mõjutavad reoained merelinde molekulaarsel tasandil.

Merelinnud moodustavad ökosüsteemidest väga tähtsa osa, olles toiduahelate lõpplülid, ühenduslülid mere- ja maismaaökosüsteemide vahel toitainete ülekandjatena (Hentati-Sundberg et al., 2020) ning teistele liikidele levimisvektoriks. Seetõttu sobivad merelinnud mereökosüsteemi seisundi indikaatoriteks (Burger & Gochfeld, 2004). Lisaks on merelinnud pakutud üheks mudelrühmaks lindude ökotoksikoloogias (Hao et al., 2021). Kuna merelinnud sarnanevad oma elukäigult (pikk eluiga, aeglane elutempo, toiduahela tipplülid) rohkem inimestele kui paljud teised ökotoksikoloogilised mudelobjektid (nt kalad), siis võib nende tervislikku seisundit pidada ka heaks indikaatoriks keskkonna tervisemõjude kohta inimesele. Kuna merelindude põlvkonnad vahetuvad aeglaselt, siis on neil ka raskem kohastuda keskkonnas toimuvate muutustega ning nende tervise uurimine väärrib tähelepanu ka looduskaitsest seisukohast (Hoffmann & Sgrò, 2011).

Molekulaarsete analüüside laiem leviku ja soodsama hinna tõttu on need vahendid saanud kättesaadavaks ka ökotoksikoloogilisteks uuringuteks, võimaldades mõista keskkonnamürkide mõju elusolenditele molekulaarsel tasemel. Ökotoksikoloogid on järjest rohkem uurimas ja kindlaks tegemas, millised geenid või biomarkerid näitavad saasteainetega kokkupuutumist ja nende mõju organismile (Hao et al., 2021). Selle informatsiooni põhjal saavad teadlased arendada ennetavaid meetodeid, hindamaks liikide vastuvõtlikkust saasteainetele (Hao et al., 2021). Üheks võimalikuks lähenemiseks on uurida reostusega seotud geenide ekspressiooni, mis võimaldab välja selgitada reostuse poolt mõjutatud ainevahetusradasid ja füsioloogilisi protsesse. Geeniekspressiooni uurimine võiks seega olla üheks paljulubavaks uurimissuunaks, mis võimaldaks hinnata lindude tervislikku seisundit, kui on teada, mida uuritud geneetilised markerid tähendavad. Kuigi üksikuurimusi reoainete ja lindude geeniekspressiooni seoste kohta on viimasel ajal kogunema hakanud (Tabel 1), siis puuduvad hetkel ülevaateuurimused, mis aitaksid mõista reoainete, geeniekspressiooni ja merelindude tervise vahelisi seoseid.

Selle töö eesmärk on luua ülevaade merelindudel tehtud uuringutest reostuse poolt mõjutatud geenide ekspressiooni kohta. Töö annab ülevaate peamistest merelindudel uuritud reoainetest, kasutatavatest meetoditest ning uuritud ainevahetusradadest. Uurimisküsimused, mida bakalaureusetöös käsitletakse, on järgmised: 1) Kui palju on uuritud reostusega seotud geenide ekspressiooni merelindudel? 2) Milliseid geeniekspressiooniradu võib reostus mõjutada? 3) Kui suures osas on reostuse poolt mõjutatud geenirajad merelindudel samad, kui palju võib eeldada liigipõhiseid erinevusi? 4) Milliste piirangutega tuleb arvestada, kui teha geeniekspressiooni uuringuid vabalt elavatel merelindudel?

2. Materjal ja meetodid

Selle töö jaoks kogusin artikleid mitmel erineval viisil. Kuna geeniekspressiooni ja reostuse vahelisi seoseid analüüsivate tööde hulk merelindudel on väga väike, kasutasin mitut erinevat andmebaasi: National Library of Medicine (PubMed), Web of Science ja Google Scholar. Uuringute leidmiseks kasutasin erinevates kombinatsioonides järgmisi märksõnu: „pollution“, „toxicology“, „seabird“, „gene expression“, „toxicogenomics“, „ecotoxicology“, „transcriptome“. Samas ei olnud andmebaaside kasutamine uuringute leidmiseks kõige efektiivsem viis, sest näiteks PubMedis tehtud otsing ((gene expression) OR (mRNA)) AND (seabird) AND ((ecotoxicology) OR (pollution) OR (toxicology)) tõi välja ainult neli uuringut. Seega, et leida üles teisi geeniekspressiooni ja reostuse vahelisi seoseid analüüsivaid uuringuid merelindudel, vaatasin juba leitud artiklitest, milliseid töid nemad viitavad ja kes neid viitavad. Nii leidsin veel uuringuid ja sellesse töösse sai vaatluse alla kümme uurimust. Neid uuringuid võib veel leiduda, kuid mul ei õnnestunud neid üles leida.

Geeniekspressiooni uuringutest merelindudel tuli välja, milliseid reoaineid ja ainevahetusradu on merelindudel seoses geeniekspressiooniga analüüsitud. Koostamaks ülevaadet merereostuse allikatest ja ainevahetusradadest, kasutasin andmebaasi Google Scholar. Reoainetest ülevaate tegemiseks kasutasin otsingumootoris erinevaid märksõnu, näiteks „brominated flame retardants“, „polycyclic aromatic hydrocarbons“, „perfluorinated compounds“ ja „dioxin related compounds“, „methylmercury“. Kuna geeniekspressiooni uuringutest tuli välja, et enim uuritud ainevahetusrajad on tsütokroomi geenide ja oksüdatiivse stressiga seotud, kasutasin neid ainevahetusradasid sisaldavate uuringute leidmiseks erinevaid märksõnu, näiteks „cytochrome“, „cytochrome P450“ ja „biotransformation“ ning „oxidative stress“, „glutathione-S-transferase“ ja „glutathione peroxidase“.

3. Merereostuse liigid

3.1 Püsivad orgaanilised saasteained

Püsivad orgaanilised saasteained on inimese sünteetisid orgaanilised kemikaalid, mis jaotuvad kahte kategooriasse: turu jaoks loodud ained ning tahtmatud kõrvalproduktid (Hao et al., 2021). Oma kõrge lipofiilsuse tõttu akumulerevad need ained elusorganismide rasvkoos. Ained levivad globaalse õhu- ja veeringluse kaudu ning püsivate omaduste tõttu jäävad nad keskkonda ja organismidesse väga pikaks ajaks. Siiani leitakse elusolenditest mõnesid püsivaid orgaanilisi ühendeid, näiteks pestitsiidina kasutatud diklorodifenüültrikloroetaani (*dichlorodiphenyltrichloroethane*, DDT, Zhou et al., 2016) ja elektriseadmetes kasutatud polüklooritud bifenüüle (*polychlorinated biphenyl*, PCB, Mello et al., 2016), ehkki need ained on juba aastakümneid keelatud (Hao et al., 2021).

Samas sünteesitakse järjest uusi orgaanilisi aineid, mida kasutatakse tööstustes ja tarbekaupades. Näiteks broomitud leegiaeglustid (*brominated flame retardant*, BFR) lisatakse sõidukitele, elektroonika- ja tekstiilist tarbekaupadele, et vähendada kaupade süttimise tõenäosust (de Wit, 2002). Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (*polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH) tekivad süsinikku sisaldavate materjalide, nagu puit, kivisüsi, nafta, gaas või biomass, mittetäielikul põlemisel (Huang & Penning, 2014). Seega võivad need ained tekkida nii looduslikult kui ka antropogeenselt, näiteks autokütuse põletamisel (Huang & Penning, 2014). Perfluoritud ühendeid (*perfluorinated compound*, PFC) lisatakse tarbekaupadele nende omaduste parandamiseks, näiteks muudavad nad köögitarvikud mittenakkuvaks ja riided vetthülgavaks ning neid kasutatakse elektritarvetes ja -kaablites (Stahl et al., 2011). Dioksiini-laadsed ühendid (*dioxin related compound*, DRC) tekivad peamiselt keemiliste protsesside kõrvalsaadustena majapidamis- ja meditsiinijäätmete põletamise ning prügilate ja metsade tulekahjude käigus (Kulkarni, 2019). Teadlased ja laiem üldsus tunnevad muret, sest järjest rohkem leidub uuringuid, mis annavad teada nende saasteainete sisaldusest elusolendites ja keskkonnas ning nende ainete kahjulikust mõjust organismidele (Hao et al., 2021).

3.2 Elavhõbe ja teised raskmetallid

Elavhõbedareostus kujutab keskkonnale ja inimese tervisele suurt ohtu ning oma püsivuse tõttu võib elavhõbe keskkonnas väga kaua ringelda (Boening, 2000). Uuringud näitavad, et atmosfääris ja ookeanis sisalduva elavhõbeda tase on vastavalt kuni viis korda ja kaks korda kõrgem looduslikust tasemest (European Environmental Agency, 2018). Veeökosüsteemid on sellele raskmetallile eriti haavatavad, kuna veeökosüsteemides muudetakse anorgaaniline elavhõbe orgaaniliseks metüülelavhõbedaks, mis on elusorganismidele mürgine, ja enim kannatavad organismid, kes on toiduahela lõpplülis (Henny et al., 2002).

41% Euroopa Liidu pinnaveekogudest ületavad kehtestatud elavhõbeda piirnormi (European Environmental Agency, 2018). Ka Eestis on enamikes rannikuveekogudes leitud, et elustikus sisalduva elavhõbeda kontsentratsioon on üle piirnormi (Internet 1). Euroopas on elavhõbedaheitme peamised allikad tahkekütuste põletamine, ülemaailmselt on olulised allikad näiteks väiksemamahulised kullakaevandused (European Environmental Agency, 2018). Lisaks elavhõbedale võivad elusolendeid kahjustada ka teised raskmetallid, näiteks alumiinium, kaadmium ja plii (García-Fernández, 2014).

4. Reostuse mõju uurimisel kasutatavad meetodid

4.1 Uuritud liigid

Kuigi leidub palju teadusuuringuid reoainete mõjust lindudele, on nende seas merelindudele keskenduvaid töid pigem vähe. Näiteks andmebaasis National Library of Medicine (PubMed) tehtud otsing tõi välja 8571 uuringut, mis käsitlesid linde ja reostust, sama otsing merelindude kohta andis aga 640 tulemust. Veel napimalt leidub merelindudel tehtud uuringuid reostusega seotud geeniekspressiooni kohta. Erinevaid meetodeid kombineerides leiti kõigest kümme üksikuurimust, mis analüüsivad reostuse ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid merelindudel (Tabel 1).

Peamiselt on uuringuid läbi viidud kajaklastel: randkajakas (*Larus atricilla*), vöötnokk-kajakas (*Larus delawarensis*), hõbekajakas (*Larus argentatus*), jaapani kajakas (*Larus crassirostris*) ja kaljukajakas (*Rissa dactyla*). Uuringuid on tehtud ka kormoranlastel: ameerika kormoran (*Phalacrocorax auritus*), kormoran (*Phalacrocorax carbo*); alklastel: krüüsel (*Cephus grylle*), põhjatirk (*Uria lomvia*) ja tormilindlastel: jää-tormilind (*Fulmarus glacialis*) (Tabel 1). Uuritud liigid on geograafiliselt kallutatud: pooled liikidest (krüüsel, põhjatirk, kaljukajakas, jää-tormilind, hõbekajakas) pesitsevad Arktikas. Samas on liike uuritud ka suurte tööstuspiirkondade veekogude juures: Suur Järvistu Ameerikas (Crump et al., 2015) ning veekogud Jaapanis (Nakayama et al., 2008) ja Koreas (Kim et al., 2013).

4.2 Katsedisain

Reoainete mõju uurimisel merelindude geeniekspressioonile on kasutatud erinevaid katsedisaine. Näiteks on tehtud gradiendipõhiseid uuringuid. Kanadas võeti ameerika kormoranilt vereproove viiest pesitsuskohast, mis olid teada erineva elavhõbeda saastatuse tasemega (Gibson et al., 2014). Reostuse mõju on uuritud ka korrelatiivselt ühes kohas ühel ajahetkel: Teravmägedel võeti proovid jää-tormilindudelt ja kaljukajakatelt, et uurida, kas ja kuidas on saasteainete sisaldus maksas ja ajus seotud biotransformatsiooni geenide ekspressiooniga (Helgason et al., 2010). Lisaks on tehtud eksperimente: hõbekajaka tibud jagati kahte gruppi, millest ühte söödeti reoainete seguga ja teine oli kontrolliks. Grupid jagati omakorda kaheks: ühes vähendati toidukogust ja teine oli kontrolliks. Selline katsedisain

võimaldas uurida, kuidas mõjutab vähenenud toidu saadavus reoainete mõju lindude füsioloogiale (Routti et al., 2013).

Jenko et al., (2012) tegid doosipõhise eksperimendi, kus randkajaka munadesse süstiti erinevas doosis elavhõbedat. Seega katsedisainid on mitmekesised, kuid enim leidub gradiendipõhiseid ja üksiku ajapunkti uuringud (Tabel 1). Longitudinaalset katsedisainiga uuringut ei leidunud.

4.3 Proovikogumismeetodid

Lindude ökotoksikoloogias on enim uuritud organiks maks (Hao et al., 2021), mis on peamine reoainete detoksifikatsiooniga tegelev organ. Näiteks muundatakse maksas metüül-elavhõbe anorgaaniliseks elavhõbedaks (Henny et al., 2002). Ka on võõraineid metaboliseeriva tsütokroomi P450 kontsentratsioon kõrgeim just maksas (Wallace et al., 2017). Seega on maks enim uuritud organiks ka reostuse poolt mõjutatud geeniekspressiooni uuringutes merelindudel (Tabel 1).

Peale maksa on uuritud ka aju, kilpnääret ning kopse. Vaid kaks teadustööd uuris reostuse poolt mõjutatud geenide mRNAde taset veres ning üks teadustöö kasutas mune (Tabel 1). Veri on sobiv kohaliku reostuse taseme mõõtmiseks (Burger & Gochfeld, 2004), kuna lindude erütrotsüütide eluiga on 35 kuni 42 päeva (Rodnan et al., 1957). Seega on suurem osa geeniekspressiooniga seotud töödest sisaldanud merelindude hukkamist, mis tekitab eetilisi küsimusi. Lisaks ei saa tapmist kasutada kaitse all olevate liikide uurimisel (Espín et al., 2016).

4.4 Reostuse hindamine

Merelindude geeniekspressiooni mõjutajatena on uuritud nii raskmetalle kui inimese poolt sünteesitud püsivaid orgaanilisi saasteaineid. Raskmetallidest on enim uuritud elavhõbedat. Püsivate orgaaniliste saasteainete nimekiri on väga pikk ning vastavalt on ka uuringuid paljude erinevate saasteainete kohta: PCB, BFR, PFC, DRC, PAH (Tabel 1).

Üldiselt on looduses linnud eksponeeritud mitmele eri saasteainele korraga ning seega on järjest enam uuringuid hakanud keskenduma saasteainete segule. Näiteks hõbekajaka tibusid söödeti reoainete seguga, milles sisaldasid PCB, BFR ja organokloriin-pestitsiidid (Routti et al., 2013). Kormoranidel on leitud, et dioksiinilaadsete ja perfluoritud ühendite koosmõju indutseeris geeni CYP1A mRNA ekspressiooni suuremal määral kui perfluoritud ühendid üksinda (Nakayama et al., 2008).

4.5 Molekulaarsed meetodid

Geeniekspressiooni uurimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid ning uuringudisaine. Üldiselt analüüsitakse uuringutes kindlate, eelnevalt välja valitud geenide ekspressiooni. Polümeraasahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction*, PCR) jaoks disainitakse praimerid vastavalt referentsgeenidele/genoomile. Kuna uuritava linnu referentsgenoomi, mille põhjal analüüsitavatele geenidele primereid disainida, ei pruugi olemas olla, siis kasutatakse teiste, lähedalt suguluses olevate organismide referentsgeene/genoome. Näiteks jää-tormilinnu ja kaljukajaka geeniekspressiooni uurimiseks kasutati primereid, mis disainiti vastavalt hõbekajaka ja kana biotransformatsiooni geenide konserveerunud kohtadele (Helgason et al., 2010). DNA-mikrokiiptehnoloogia (*DNA microarray*) puhul kinnitatakse tahkele kandjale kovalentselt paljusid kindlaid oligonukleotiidseid järjestusi (või geene), mida hübridiseeritakse uuritavate cDNA-proovidega (komplementaarne DNA).

Erinevaid meetodeid võidake omavahel kombineerida. Näiteks kormorani geeniekspressiooni analüüsimiseks kasutati DNA-mikrokiiptehnoloogiat, mis sisaldas 1061 unikaalset oligonukleotiidi ning mille abil leiti erinevalt ekspresseerunud geenid (Nakayama et al., 2008). Seejärel hinnati kvantitatiivselt nelja geeni erinevat ekspressioonitaset. Ka Jenko et al. (2012) tuvastasid randkajakal SSH meetodi (*suppression subtractive hybridization*, supressioon-PCR reaktsiooni sisaldav subtraktiivne hübridisatsioon) abil 15 erinevalt ekspresseerunud geeni, mis olid elavhõbeda poolt mõjutatud. 15 geenist valisid nad välja kaheksa geeni edasiseks analüüsiks qPCR abil (kvantitatiivne PCR, *quantitative PCR*).

Eelnevalt välja valitud geenide meetodika puuduseks on see, et uuringust ei tule välja uusi ainevahetusrajas olulisi geene, mis võivad erinevalt ekspresseerunud olla. Näiteks hõbekajaka tibudele anti halogeenitud orgaanilisi reoaineid sisaldavat kalamaksaõli ning uuriti nende geeniekspressiooni muutusi võrreldes kontrollgrupiga, kes sai puhast õli. Biotransformatsiooni käigus muundunud saasteainete kontsentratsioon oli katsegrupil kõrgem (näiteks 4-OH-PCB187 tase erines gruppide vahel 33 korda) ja see näitas, et katsegrupi biotransformatsiooni valgud olid aktiivsed olnud. Sellest tulenevalt eeldati, et ka katse- ja kontrollgrupi biotransformatsiooni valkude (CYP1A4, CYP1A5, CYP3A) mRNAde tasemed on maksas erinevad. Seda aga analüüs ei tuvastanud. Töö autorid pakkusid välja mitu võimalikku seletust. Esiteks, biotransformatsiooni käigus muundunud saasteained on organismis üsna püsivad, aga mõõdetud mRNAde kontsentratsioon näitab geenide ekspressiooni taset kindlal ajahetkel (proovide võtmine). Seega võis mRNAde tase kahe grupi vahel erineda enne proovide võtmist.

Lisaks võivad saasteaineid, mida hõbekajakale manustati, muundada teised ensüümid, mida selles töös ei uuritud, näiteks CYP2B valgud. Ka ei pruugi reostuse mõju avalduda geenide transkriptsiooni, vaid hoopis valkude translatsioonijärgse modifikatsiooni tasemel (Regoli et al., 2011).

Ühes teises uuringus mõõdeti jää-tormilindudel kõrgem CYP ensüümide aktiivsus kui kaljukajakatel (Helgason et al., 2010). Samas mõõdeti jää-tormilindude maksas madalam geenide CYP1A4 ja CYP1A5 mRNAde tase kui kaljukajakate maksas, mis on mõneti vastuolus sellega, et jää-tormilindudel olid CYP ensüümid kõrgema aktiivsusega (Helgason et al., 2010). Põhjuseks võib olla viivitus mRNA ekspressiooni ja valkude aktiivsuse tuvastatava taseme vahel, sest mRNA poolestusaeg on lühem kui CYP valkudel (Regoli et al., 2011).

Tabel 1. Ülevaade uuritud liikidest ja kasutatavatest meetoditest teadustöodes.

Artikkel	Liik	Reoaine	Katsedisain	Mol. meetod	Elujärk	Kude	Geenirada
Gibson et al., 2014	ameerika kormoran (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Me-Hg	keskkonna gradient	qPCR	täiskasvanud emased ja isased	veri	oksüdatiivne stress
Jenko et al., 2012	randkajakas (<i>Larus atricilla</i>)	Me-Hg	gradiendiga eksperiment	SSH, qPCR	munad ja tibud	maks	oksüdatiivne stress
Routti et al., 2013	hõbekajakas (<i>Larus argentatus</i>)	halogeenitud orgaaniliste saasteainete segu	eksperiment	qPCR	tibud	maks, aju	Biotransformatsioon I ja II
Helgason et al., 2010	kaljukajakas (<i>Rissa dactyla</i>), jäätormilind (<i>Fulmarus glacialis</i>)	PCB	üksik ajapunkt	qPCR	tibud	maks, aju	Biotransformatsioon I ja II
Nakayama et al., 2008	kormoran (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PFC segu; PFC + DRC koosmõju	üksik ajapunkt	DNA mikrokiip-analüüs, qPCR	täiskasvanud emased ja isased	maks	oksüdatiivne stress, võõrainete metaboliseerimine
Técher et al., 2016	vöötnokk-kajakas (<i>Larus delawarensis</i>)	BFR	üksik ajapunkt	qPCR	täiskasvanud emased ja isased	kilpnääre, aju, maks	kilpnäärme funktsioon
Wallace et al., 2017	ameerika kormoran (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	õhus levivad PAH	keskkonna gradient	qPCR	tibud	maks, kops	P53 rada

Crump et al., 2015	hõbekajakas (<i>Larus argentatus</i>)	halogeenitud orgaaniliste saasteainete segu	keskkonna gradient	qPCR	munad	-	võõrainete ja rasvade metabolism, kilpnäärme rada
Kim et al., 2013	jaapani kajakas (<i>Larus crassirostris</i>)	raskmetallid (Hg, Al, Cd, Pb, Cr, Fe, Cu, Zn, Se, As, Pb)	keskkonna gradient	qPCR	tibud	veri	raskmetallide tekitatud kahjustuste vastane kaitse
Zahaby et al., 2021	põhjatirk (<i>Uria lomvia</i>) krüüsel (<i>Cephus grylle</i>)	PAH, raskmetallid (Hg, As, Cd, Pb, Se)	üksik ajapunkt	qPCR	täiskasvanud, emased ja isased	maks	võõrainete ja rasvade metabolism, immuun- ja endokriinsüsteem, kilpnäärme rada, DNA parandus

5. Reostusega seotud ainevahetusradade kirjeldus

5.1 Oksüdatiivse stressiga seotud geenid

Oksüdatiivne stress on bioloogilisi struktuure kahjustavate vabade radikaalide ja antioksidantide vaheline häiritud tasakaal (Sies, 1997). Antioksidandid neutraliseerivad vabu radikaale või parandavad vabade radikaalide kahjustatud struktuure. Oksüdatiivne stress mõjutab ka kuumašokivalke (*heat shock proteins*, HSP), mis mõjutavad antioksidantide taset rakus (Martindale & Holbrook, 2002).

Üks võtmetähtsusega antioksidantidest, mis rakusiseselt organismides vabu radikaale neutraliseerib, on glutatioon (Galván & Alonso-Alvarez, 2008). Glutatioon esineb organismis kas redutseeritud (GSH) või oksüdeeritud (GSSG) vormis. Redutseeritud vormis on glutatioon rakkudele kättesaadav ja toimib antioksidandina, oksüdeeritud vormis aga kättesaamatu. GSH ja GSSG suhte kaudu mõõdetakse seega rakkude oksüdatiivset stressi ning suurem GSH:GSSG näitab suuremat oksüdatiivset stressi (Zitka et al., 2012). Ensüüm glutatiooni peroksideas (GPX) kaitseb rakke ja ensüüme oksüdatiivse kahjustuse eest, sidudes glutatiooniga vabad radikaalid nagu vesinikperoksiid, lipiid-peroksiid või orgaaniline hüperoksiid (Internet 2).

Üks reoaineid, mille mõju organismidele avaldub oksüdatiivse stressi tekitamise kaudu, on metüül-elavhõbe (Me-Hg, Gibson et al., 2014), mille kõrvaldamine organismist toimub antioksidantensüümide vahendusel. Glutatioon S-transferaas (GST) katalüüsib glutatiooni seostumist metüül-elavhõbedale (aga ka teistele ksenobiootikumidele) ning tekkivat ühendit on võimalik rakust väljutada (Farina & Aschner, 2019). Seega aitab GST kaasa Me-Hg rakust väljutamisele. Selle süsteemiga seotud geenide avaldumist on vabalt elavatel lindudel ka uuritud. Gibson et al. (2014) uurisid vere Me-Hg taseme seost oksüdatiivse stressiga seotud geenidega ameerika kormoranidel. Uuringus leiti, et Me-Hg kontsentratsioon oli positiivses korrelatsioonis mõnede glutatiooni rajaga seotud geenide (GSTM3 ja GPX3) avaldumisega emaste kormoranide veres. Nendest tulemustest järeldati, et Me-Hg-l on soospetsiifiline seos ameerika kormoranide oksüdatiivse stressiga seotud geenide ekspressiooniga.

Soospetsiifilist seost võib selgitada isaste ja emaste lindude erineva hapnikutarbimise ja energiavajadusega sigimise ajal. Kuna isastel oli emastest keskmiselt kõrgem glutatiooni rajaga seotud geeni GSTM3 ekspressiooni tase (mis ei olnud korrelatsioonis Me-Hg tasemega), siis on võimalik, et isased saavad endale lubada pidevalt kõrget kaitsemehhanismide taset, samas

kui emased reageerivad sigimise kõrgema hinna tõttu kõrgema geeniekpressiooniga vaid vajadusel, siis, kui elavhõbeda tase veres organismile liiga ohtlikule tasemele tõuseb. Samas ühe geeni puhul tundub energiavajaduse vahe siiski olema küllalt madal, et põhjendada sugudevahelisi erinevusi.

Analüüs teisel liigil, kormoranidel näitas samuti soospetsiifilisi, aga vastupidiseid tulemusi: maksas olevate reoainete (perfluoritud ühendid) tasemed korreleerusid glutatiooni rajaga seotud geenide (GPX1 ja GSTA3) mRNAde tasemetega positiivselt just isastel kormoranidel (Nakayama et al., 2008). Põhjuseks võib olla see, et vastuseks kindlat tüüpi keemilistele ühenditele (antud juhul ainetele, mis põhjustavad rakuorganellide peroksisoomide vohamist, ing. k. *peroxisome proliferators*) toimib emastel tõhusalt östrogeenipõhine antioksidant-ensüümide regulatsioon (Nakayama et al., 2008). Kahes nimetatud uuringus analüüsiti erinevaid liike (kormoran ja ameerika kormoran), kudesid (maks ja veri) ning reoaineid (perfluoritud ühendid ja Me-Hg). Kuna ka ühel reoainel võib olla liigi- ja koespetsiifiline mõju (Gibson et al., 2014), siis ei ole vastukäivad tulemused väga üllatavad, vaid pigem näitavad ökotoksikoloogia kompleksust ja spetsiifilisust.

5.2 Biotransformatsioon

Püsivad orgaanilised saasteained on lipofiilsed ja bioakumuleeruvad organismide rasvkoos. Neid saasteaineid aitavad metaboliseerida I ja II faasi biotransformatsiooni ensüümid, mis muudavad lipofiilsed saasteained vees paremini lahustuvateks ühenditeks ja seetõttu on neid võimalik organismist väljutada. Esimese faasi ehk tsütokroom P450 (CYP) ensüümid katalüüsivad polaarse grupi, näiteks hüdroksüülrühma, lisamist saasteainele. Teise faasi ensüümid (näiteks glutatioon-S-transferaas) katalüüsivad I faasi ensüümide poolt toodetud reaktiivsete vaheühendite lisamist endogeensetele molekulidele (nt glutatioon), mida saab rakust väljutada (Routti et al., 2013). Samas võivad biotransformatsioonide vaheühendid organismi jääda ja nende ainete negatiivne mõju endokriinsüsteemile võib olla ohtlikum kui algsete saasteainete mõju. Näiteks mõned PCB vaheühendid on struktuurselt sarnased merelindude kilpnäärmehormoonidele ja seostuvad neid hormoone organismis transportivatele ühenditele tugevamini kui hormoonid ise (Ucán-Marín et al., 2009). Lisaks on saasteainete I faasi biotransformatsioonis tekkinud vaheühendid reaktiivsed ja võivad tekitada oksüdatiivset stressi (Mels et al., 2011).

Kormoranidel tehtud uuring näitas, et dioksiinide kõrgem tase maksas seostub tsütokroomi mRNAde (CYP1A4 ja CYP1A5) ja valkude (CYP1A) kõrgema tasemega (Nakayama et al., 2008). Ka hõbekajakal on uuritud tsütokroomi geenide ja reostuse vahelisi seoseid. Munaproovidest leiti, et osa tsütokroomi gene (CYP3A37 ja CYP1A4) oli üles reguleeritud, samas kui geen CYP7B1 oli alla reguleeritud (Crump et al., 2015).

Paastumine või vähenenud toidu saadavus võivad indutseerida biotransformatsiooni geenide ekspressiooni. Rändamise või pesitsemise ajal, kui linnud võtavad organismis talletatud rasvavarud kasutusele, satuvad rasvkoos talletunud lipofiilsed saasteained vereringe kaudu teistesse organitesse, näiteks maksa ja aju, kus saasteainete kontsentratsioon suureneb (Routti et al., 2013; Hao et al., 2021). Seetõttu võib reoainetel olla eriline negatiivne mõju just paastuvatele lindudele. Seda on ka uuritud seoses geeniekspressiooniga. Hõbekajaka tibudele anti halogeenitud orgaanilisi reoaineid sisaldavat kalamaksaõli ning uuriti nende geeniekspressiooni muutusi võrreldes kontrollgrupiga, kes sai puhast õli. Seejärel vähendati mõlemas grupis pooltel kajakapoegadel toidukogust. Tsütokroom P450 rajaga seotud geenid (CYP1A4, CYP1A5 ja CYP3A) ekspresseerusid ainult pärast vähendatud toidukogust nii kontroll- kui ka katsegrupis.

Reostusega seotud geeniekspressiooni uurimisel tuleb võtta arvesse liikide ökoloogiat, et teha õigeid järeldusi, kas ja milline on reoainete mõju geenide avaldumisele. Jää-tormilinnud ja kaljukajakad sisaldasid erineval määral teatud tüüpi reoaineid (metüülsulfoon-polüklooritud bifenuülid, MeSO₂-PCB) (Helgason et al., 2010). Need erinevused võivad tuleneda sellest, et uuritud lindudel on erinev biotransformatsiooni võimekus vaheühendite sulfoonide moodustamisel ja/või eemaldamisel (Helgason et al., 2010), kuid samas võib lindudel saasteainete tase erineda hoopis nende erineva ökoloogia tõttu. Näiteks linnud talvituvad erinevates kohtades: jää-tormilinnud on rohkem põhja pool kui kaljukajakad, kes lähevad aladele üle Põhja-Atlandi ookeani. Lisaks erineb liikide toitumisareaal: jää-tormilinnud teevad palju pikemaid toitumisrändeid (60-500km) kui kaljukajakad (10-45 km). Mõlemad on pelaagilised liigid, kuid kaljukajakad söövad väikseid selgrootuid ja kalu, samas kui jää-tormilinnud toituvad vähkidest, peajalgsetest, kaladest, raibetest (Helgason et al., 2010).

5.3 Muud ainevahetusrajad

Lisaks antioksidantide süsteemile ning biotransformatsiooniradadele on leitud seoseid ka teiste geeniradade ja reoainete tasemetega. Näiteks oli kormoranidel perfluoreeritud

saasteainete tase maksas seotud rakkudevahelise suhtluse geenide (*cell-to-cell communications*) ja rakumembraani eest vastutavate geenide ekspressiooniga (Nakayama et al., 2008). Lisaks olid samad reoained negatiivselt seotud kuumašokivalkude (geen HSPA8) ning transkriptsiooni mõjutavate valkude (geen TRA1) mRNAde tasemega. Kuna need molekulaarsed šaperonid (*molecular chaperones*) stabiliseerivad valke, siis võib reoainetele eksponeeritus põhjustada ebanormaalsete/mittefunktsioneerivate valkude kuhjumist rakus (Nakayama et al., 2008).

Muutusi seoses reoainetega on leitud ka vähitekkega seotud geeniradadades. Ameerika kormoranidel, kes olid kokku puutunud polütsükliiliste aromaatsete süsivesinikega (PAH), olid DNA paranduse ja apoptoosiga seotud geenid maksas ja kopsus ülesreguleeritud, samas kui vähiteket allasuruva P53 geenirajaga seotud geenid olid mõlemas uuritud koes alla reguleeritud (Wallace et al., 2017). See viitab, et reoainetega on seotud nii adaptiivsed (vähiteket allasuruvad kaitsemehhanismid, oksüdatiivse stressi vastane kaitse) kui ka kahjulikud (nt vähiteket soodustavad) muutused geenide ekspressioonis. On võimalik, et reostusel on mõju ka geenidele, mis osalevad kilpnäärme töös (Técher et al., 2016), lipiidide ainevahetuses (Crump et al., 2015) ja raskmetallide tekitatud kahjustuste vastases kaitstes (Kim et al., 2013).

6. Arutelu

Merelindudel on reostuse mõju geeniekspressioonile siiaaani väga vähe uuritud. Kui reoaineid ja linde käsitlevaid teadustöid leidis PubMedi andmebaasis 8571, siis reostuse ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid analüüsivaid töid merelindudel leidsin kõigest kümneringis. Samas võiks nimetatud uurimisteema paljulubav olla, kuna geeniekspressiooni erinevuste uurimine on kulutõhus meetod leidmaks varajasi märke sellest, et reostus populatsioone mõjutab (Crump et al., 2015; Zahaby et al., 2021). Lisaks, kuigi klassikaliseks ökotoksikoloogia uurimisobjektiks on kalad, siis merelinnud, kes on toiduahela tipplülid ja sarnanevad oma elukäigult inimesele, on hea mudelrühm, et hinnata mereökosüsteemi seisundit ning reoainete võimalikku mõju inimesele (Burger & Gochfeld, 2004).

Kuna teadmised reostuse mõjust merelindude geeniekspressioonile on alles algusjärgus, on senised uuringud keskendunud eelkõige geenidele ja ainevahetusradadele, mille puhul mõju analoogia alusel klassikaliste ökotoksikoloogia mudelliikidega (näiteks kalad) on etteennustatav. Üks selliseid valdkondi on reoainete detoksifikatsioonirajad. Tsütokroom on üks võtmetähtsusega valkudest võõrainete metaboliseerimisel ning tsütokroomiga seotud geenide avaldumise ja reostuse vahelist positiivset seost on kaladel korduvalt demonstreeritud (vt nt Baker et al., 2009; Sellin Jeffries et al., 2012; Christiansen et al., 2014). Tsütokroomi perekonna geenide avaldumist vastusena reostusele on ka merelindude puhul enim uuritud ning on leitud, et need geenid on tõepoolest merelinnuliikidel saastunud elupaikades elavatel populatsioonides üles reguleeritud (Nakayama et al., 2008; Crump et al., 2015). Lisaks detoksifikatsiooniradadele on rohkem tähelepanu saanud ka oksüdatiivne stress, mis on üks mehhanismidest, mille kaudu reoainete kahjulik mõju organismidele avaldub.

Nii nagu tsütokroomi perekonna geenide puhul, on ka mõnede oksüdatiivse stressiga seotud geenide (nt glutatioon-S-transferaas ja glutatioon-peroksidaas) avaldumise ja reoainete taseme vahel positiivsed seosed (Nakayama et al., 2008; Gibson et al., 2014). On võimalik, et reostusel on mõju ka geenidele, mis osalevad kilpnäärme töös (Técher et al., 2016), vähitekkes või selle allasurumise regulatsioonis (Wallace et al., 2017), lipiidide ainevahetuses (Crump et al., 2015) ja raskmetallide tekitatud kahjustuste vastases kaitses (Kim et al., 2013). Uuringute ja teadmiste lisandumisel võime loota, et lisaks seni uuritud geeniradadele hakkab kogunema ka andmeid reostuse mõju kohta erinevatele võimalikele patoloogiatele (näiteks vähitekketele, Baines et al., 2021), samuti uusi teadmisi looduslikest kaitsemehhanismidest reostunud keskkonnas toime tuleku ning kaitsemehhanismidega seotud füsioloogiliste lõivuhete kohta, näiteks reostusele

reageerimise tulemusena võivad väheneda investeeringud sigimisse või parasiitidevastasesse kaitsesse.

Senised uuringud on liikide poolest geograafiliselt kallutatud, sest kümnest uuritud linnuliigist pooled pesitsevad Arktikas: kaljukajakas, jää-tormilind, põhjatirk, krüüsel, hõbekajakas (Tabel 1). Arktikas on kohalik saaste väike, kuid globaalse reostuse ning õhu- ja veeringluse tõttu kannatab see keskkond siiski reostuskoormuse all. Pikk eluiga ja suured rasvavarud soodustavad külmas keskkonnas elavatel organismidel kõrget lipofiilsete saasteainete bioakumulatsiooni (Dietz et al., 2019), mistõttu on sealne elustik reostusele vastuvõtlikum. Arktikas on uuritud reoainete ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid mitte ainult merelindudel, vaid ka hüljestel (Brown et al., 2014), vaaladel (Buckman et al., 2011) ja jääkarudel (Gilmore, 2015).

Reostusega seotud geeniradade uurimine vabalt elavatel loomadel teeb keeruliseks selle uurimisala spetsiifilisus, sest reoainetel võib olla nii koe-, vanuse-, soo- kui liigispetsiifiline mõju. Samas mõjutab uurimistulemuste tõlgendamist ka see, millisel üldistustasandil järeldusi teha. Näiteks üks mehhanism, mille kaudu reoainete mõju organismidele avaldub, on oksüdatiivse stressi tekitamine (Jenko et al., 2012; Gibson et al., 2014). Kahel kormorani liigil (kormoran ja ameerika kormoran) on eri uuringutes näidatud oksüdatiivse stressiga seotud geenide (GST ja GPX) avaldumise ja reoainete tasemete vahelisi positiivseid seoseid (Nakayama et al., 2008; Gibson et al., 2014). Samas, kui tulemuste detailidesse süveneda, siis mõlemast uuringust nähtub, et reoainetel on geeniekspressiooniga soospetsiifiline, kuid kahe liigi võrdluses hoopis vastupidine seos. Nimelt ameerika kormoranil oli Me-Hg tase positiivses korrelatsioonis geenide avaldumisega emastel lindudel (Gibson et al., 2014), samas kui kormoranidel korreleerusid reoainete (perfluoritud ühendid) tasemed geenide avaldumisega positiivselt hoopis isastel lindudel (Nakayama et al., 2008). Antud tulemustest tehakse erinevaid tõlgendusi liikide bioloogia kohta. Kormoranidel seletatakse nähtud seost sellega, et emastel toimib tõhusalt östrogeenipõhine antioksidant-ensüümide regulatsioon (Nakayama et al., 2008), ameerika kormoranide puhul tuuakse aga välja pesitsusaegne energiavajaduse erinevus sugude vahel (Gibson et al., 2014). Need uuringud näitavad, et sugudevahelisi erinevusi on oluline arvestada keskkonnaseirel proove kogudes ja riskianalüüsi tehes, sest seda erinevust arvesse võtmata ei pruugi seosed reoainete ja geenide avaldumise vahel välja tulla. Samuti on oluline arvestada pesitsusstaadiumiga ning oluline oleks korraldada uuringuid erinevatel aastaajadel (nt võib reostuse negatiivne mõju avalduda rändeperioodil, mil

kasutusele võetakse rasvavarud). Selle võivad aga keeruliseks muuta raskused merelindude püüdmisel proovi võtmiseks väljaspool pesitsushooaega.

Lisaks sellele, et reoainete mõju on liigispetsiifiline ja paljudest teguritest sõltuv, raskendab molekulaarsete ökotoksikoloogiliste uuringute tegemist sobiva hulga ja õigete geenide välja valimine. Kogu genoomi transkriptoomi analüüsimine on kulukas ja ajamahukas, kuid ette välja valitud gene analüüsides ei pruugi uuringust välja tulla uusi teadmisi mõjutatud ainevahetusradade ja oluliste geenide kohta. Näiteks hõbekajaka tibudega tehtud eksperiment näitas saasteainete metaboliseerimisega seotud CYP valkude erinevat aktiivsust katse- ja kontrollgrupi vahel, kuid CYP mRNAde (CYP1A4, CYP1A5) ekspressioonis kahe grupi vahel eeldatud erinevust ei leitud (Routti et al., 2013). On võimalik, et CYP valke indutseerisid teised geenid, mida nimetatud uuringus ei analüüsitud, näiteks CYP2B. Jääkarul ongi näidatud, et CYP1B1 mRNA korreleerus positiivselt reoainete (PCB) tasemega, samas kui PCB ja CYP1A1 vahel korrelatsiooni ei leitud (Gilmore, 2015). Lisaks on oluline proovide kogumise ajastus, sest mRNA eluiga on lühike. Geenide mRNAde tase ei pruugi alati valkude aktiivsust/taset näidata, sest valgul, mis on geeni lõpp-produktiks, võivad toimuda ka translatsioonijärgsed modifikatsioonid. Seetõttu võiksid uurimused edaspidi keskenduda üksikute geenide eraldi analüüsimise asemel suurema hulga reostusega seotud geenide (nt 30) korraga analüüsimisele, nagu on teinud Zahaby et al., (2021), sest üksikute geenide analüüsimise puhul on väiksem tõenäosus, et seos reostusega välja tuleb.

Siiamaani on enamike teadustööde jaoks kogutud merelindudelt proove erinevatest siseorganitest (maks, aju, kops, kilpnääre), mis tähendab lindude tapmist. See aga tekitab eetilisi küsimusi ning lisaks ei ole võimalik surmata kaitse all olevaid linde. Seega võiks üheks tuleviku väljavaateks olla vere ja siseorganites analüüsitud geeniekspressiooni vaheliste seoste välja selgitamine, mis võimaldaks lindude tervislikku seisundit hinnata ja uurida vähem invasiivsete meetoditega ehk vereproovide võtmisega. Ka nahabiopsiaid on võimalik sooritada ilma lindu oluliselt häirimata (vt nt Rattiste et al., 2015 nahabiopsia uuringuks kalakajakalt). Tulevikus võiks olla võimalik arendada väheinvasiivseid meetodeid reostusega seotud geeniekspressiooni uurimiseks ka sulenääpsust (Zheng et al., 2020).

Kuna seni on tehtud vähe uuringuid, on hetkel teadmised reostuse mõju kohta linnu erinevatel eluetappidel puudulikud. Kuigi leidub mõningaid uuringuid ka tibude kohta, on teadustööd liikide, meetodite, analüüsitud geenide, reoainete ja kudede poolest niivõrd erinevad (Tabel 1), et on väga raske teha järeldusi merelindude eluetappide ja geeniekspressiooni vaheliste seoste kohta. Samas võiks see informatsioon väärtuslik olla, kuna see võimaldaks välja selgitada, kas

mingil eluetapil võib reostuse mõju geeniekspressioonile suurem/teistsugune olla. Seega veel üheks tulevikuväljavaateks oleks meetodite, uuritavate kudede ja analüüsitavate ainevahetusradade ühtlustamine, et oleks võimalik uuringuid omavahel rohkem võrrelda. Väga väärtuslikud võiksid olla ka longitudinaalsed uuringud, mis samadel lindudel jälgivad geeniekspressiooniga seotud muutusi erinevatel eluetappidel. Näiteks inimese puhul on näidatud, et erinevas eluetapis on aktiivsed erinevad tsütokroomid: ema üsas leiduvaid hormone kahjutuks tegev ensüüm CYP3A7 on aktiivne looteas, samas mõningad teised ensüümid (CYP3A4 ja CYP2D6) avalduvad alles pärast sündi esimestel kuudel (Kearns et al., 2009).

Lisaks reostunud piirkondades läbi viidavatele uuringutele on väärtuslikud ka uuringud suhteliselt puhastelt merealadelt. Need annaksid baasinformatsiooni geeniradade toimimise kohta ja aitaksid teha järeldusi selle kohta, kas ja kuidas reostus geeniekspressiooni mõjutab. Heaks näiteks on hiljuti Arktikas läbi viidud uuring. Kuna kliima soojenemisest tingitud merejää sulamise tõttu tekivad Arktikas uued võimalused laevaliikluse tihenemiseks ja maavarade kaevandamiseks ning sellega seoses eeldatakse reostuskoormuse kasvu, siis uuriti põhjatirgul ja krüüslil saasteainete sisaldust ja varem teadaolevalt reostuse poolt mõjutatud geenide ekspressiooni vahelisi seoseid (Zahaby et al., 2021). Kuna saasteainete kontsentratsioon oli lindudel suhteliselt madal, siis eeldati ka madalat geenide avaldumise taset, mida analüüs näitaski. Seega saab tulevikus neid tulemusi baasinformatsioonina kasutada, leidmaks kõrgema reostusega seotud geenide avaldumise korral varajasi märke sellest, et suurenev reostuskoormus Arktikas linde mõjutab (Zahaby et al., 2021). Analoogselt saaks piirkondi, kus aktiivselt tegeletakse reostuskoormuse vähendamisega (nt linnade ja sadamate lähistel) kasutada reostustaseme ja geeniekspressiooni vaheliste seoste longitudinaalseks uurimiseks.

Kokkuvõte

Ökotoksikoloogia, mis uurib reoainete mõju elustikule, suurimaks väljakutseks on märgata inimtekkeliste reoainete kahjulikku mõju elustikule juba enne, kui need on põhjustanud olulise languse looduslike populatsioonide arvukuses. Üheks võimalikuks lähenemisviisiks on uurida organismidel reostusega seotud geenide ekspressiooni, sest geeniekspressiooni erinevus normaalsest tasemest on märk sellest, et reostus loomi mõjutab. Selle töö eesmärk oli luua ülevaade merelindudel tehtud reostusega seotud geeniekspressiooni uuringutest, mõistmaks reoainete ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid merelindudel.

Ehkki leidub palju ökotoksikoloogilisi uuringuid lindude kohta, on nende seas töid, mis analüüsivad merelindude geeniekspressiooni, väga vähe, kõigest kümneringis. Nende tööde seas on enim uuritud reoainete ja erinevate tsütokroomi perekonna geenide vahelisi seoseid. Tsütokroom P450 on oluline valkude perekond võõrainete metaboliseerimisel ja osaleb biotransformatsiooni esimeses faasis. Vastusena reostusele ongi selle valguperekonna teatud geenid merelindudel üles reguleeritud ning seda ka teistel selgroogsete klassidel, näiteks kaladel ja imetajatel. Samas tekitab biotransformatsiooni esimene faas reaktiivseid vaheühendeid, mis võivad oksüdatiivset stressi tekitada. Teiseks enim uuritud geeniderühmaks ongi oksüdatiivse stressiga seotud geenid. Näiteks ensüüm glutatioon-S-transferaas aitab kaasa võõrainete või nende biotransformatsiooni esimeses faasis tekkinud reaktiivsete vaheühendite väljutamisele rakust ning see geen on eri liikidel saastunud keskkondades üles reguleeritud.

Geeniekspressiooni ja reostust uurivate tööde tõlgendamise teeb keeruliseks mitu asjaolu. Esiteks, reostuse mõju geeniekspressioonile võib sõltuda paljudest erinevatest teguritest nagu liik, uuritud kude, sugu, eluetapp. See teeb uuringud spetsiifiliseks ja raskendab nende võrdlemist. Lisaks on uuringute tegemisel väga oluline sobiva hulga ja õigete sihtmärkgeenide välja valimine, sest muidu ei pruugi ainevahetusradades tähtsad ja reostuse taustal erinevalt ekspresseerunud geenid analüüsist välja tulla. Kuna geeni lõpp-produktiks on valk, siis on oluline teada mRNAde ja valkude vahelisi seoseid, sest järeldusi valkude kohta tehakse mRNAde põhjal.

Tulevikuväljavaadeteks võiks olla kasutatavate meetodite ja katsedisainide ühtlustamine, et oleks võimalik erinevaid töid võrrelda. Lisaks võiks selgitada välja lindude verenäitajate ja tervise vahelised seosed, et lindude tapmise asemel saaks koguda proove vähem invasiivsete meetoditega. Baasinformatsiooni välja selgitamine geeniradade kohta aitab teha õigemaid järeldusi, et reostus geeniekspressiooni mõjutab.

Summary

Associations between pollution and gene expression in long-lived seabirds

One of the major challenges in ecotoxicology is noticing the harmful effects of pollutants on the biota before they have caused a decline in populations. One possible approach is investigating how pollution affects gene expressions in organisms as difference in gene expression is a sign of wildlife being under the stress of pollution. The aim of this paper is to give an overview of studies investigating the relations of gene expression and pollutants in seabirds to understand how pollution affects gene expression in seabirds.

Even though there are quite a lot of ecotoxicological studies on birds, only around ten of them analyse gene expression in seabirds. Among those studies, relations between cytochrome family genes and pollutants have been investigated the most. Cytochrome P450 is an important protein family that metabolises xenobiotics in phase one biotransformation. In seabirds and other vertebrate classes such as fish and mammals cytochrome family genes are upregulated in response to pollution. However, some of the reactive metabolites formed in phase one biotransformation can cause oxidative stress. The second most investigated gene group is in fact the oxidative stress genes. For instance, enzyme glutathione-S-transferase helps to excrete xenobiotics or their reactive metabolites formed in phase one biotransformation. This gene is in fact upregulated in different species in polluted environments.

There are several factors that make interpreting studies on gene expression and pollution challenging. First of all, the effect of pollution on gene expression can depend on many different factors such as species, tissue, sex and stage of life. This means that the studies are specific and difficult to compare. In addition, it is important to choose the right amount and the right target genes, otherwise new knowledge on affected metabolic pathways and differentially expressed genes dependent on pollution might be lost. Since the end product of gene expression is a protein, it is important to know the correlations between mRNAs and proteins, as conclusions about proteins are made on mRNAs.

One future outlook could be adopting universal study design and methods to improve comparison between studies. In addition, it is important to reveal the relations between bird's health and blood indicators to collect samples using less invasive methods. Furthermore, clarifying background information about gene expression under normal circumstances could help draw better conclusions on the effects of pollution.

Tänuavaldus

Täna südamest oma juhendajat Tuul Seppa, kelle põhjalik tagasiside, suunavad kommentaarid ja väga toetav suhtumine olid töö kirjutamisel hindamatuks abiks. Täna ka oma kaasjuhendajat Richard Meiterni asjalike kommentaaride ja abi eest. Samuti täna Liina Päärut, Minna Kruusamäed ja Keily Tammaru, kes hoidsid töömotivatsiooni kõrgel ja aitasid mind keeleliste küsimuste lahendamisel.

Kasutatud kirjandus

Selle töö kirjanduse loetelu ja viitamine järgib ajakirja Biologia nõudeid.

- Álvarez-Muñoz D., Llorca M., Blasco J. & Barceló D. 2016. Chapter 1 - Contaminants in the Marine Environment. pp. 1–34. In: Blasco J., Chapman P.M., Campana O., & Hampel M. (eds), *Marine Ecotoxicology*, Academic Press.
- Baines C., Lerebours A., Thomas F., Fort J., Kreitsberg R., ..., Sepp T. 2021. Linking pollution and cancer in aquatic environments: A review. *Environ Int.* **149**: 106391.
- Baker M.E., Ruggeri B., Sprague L.J., Eckhardt-Ludka C., Lapira J., ..., Hardiman G. 2009. Analysis of endocrine disruption in Southern California coastal fish using an aquatic multispecies microarray. *Environ Health Perspect.* **117**: 223–230.
- Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere.* **40**: 1335–1351.
- Brown T.M., Ross P.S., Reimer K.J., Veldhoen N., Dangerfield N.J., Fisk A.T. & Helbing C.C. 2014. PCB Related Effects Thresholds As Derived through Gene Transcript Profiles in Locally Contaminated Ringed Seals (*Pusa hispida*). *Environ Sci Technol.* **48**: 12952–12961.
- Buckman A.H., Veldhoen N., Ellis G., Ford J.K.B., Helbing C.C. & Ross P.S. 2011. PCB-Associated Changes in mRNA Expression in Killer Whales (*Orcinus orca*) from the NE Pacific Ocean. *Environ Sci Technol.* **45**: 10194–10202.
- Burger J. & Gochfeld M. 2004. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. *EcoHealth.* **1**: 263–274.
- Byrne M., Foo S.A., Ross P.M. & Putnam H.M. 2020. Limitations of cross- and multigenerational plasticity for marine invertebrates faced with global climate change. *Glob Chang Biol.* **26**: 80–102.
- Christiansen H.E., Mehinto A.C., Yu F., Perry R.W., Denslow N.D., Maule A.G. & Mesa M.G. 2014. Correlation of gene expression and contaminant concentrations in wild largescale suckers: A field-based study. *Sci Total Environ.* **484**: 379–389.
- Cohen J.E. 2010. Population and Climate Change. *Proc Am Philos Soc.* **154**: 158–182.
- Crump D., Williams K.L., Chiu S., Letcher R.J., Periard L. & Kennedy S.W. 2015. Biochemical and Transcriptomic Effects of Herring Gull Egg Extracts from Variably Contaminated Colonies of the Laurentian Great Lakes in Chicken Hepatocytes. *Environ Sci Technol.* **49**: 10190–10198.
- Dietz R., Letcher R.J., Desforges J.-P., Eulaers I., Sonne C., ..., Víkingsson G. 2019. Current state of knowledge on biological effects from contaminants on arctic wildlife and fish. *Sci Total Environ.* **696**: 133792.
- DiGiacopo D.G. & Hua J. 2020. Evaluating the fitness consequences of plasticity in tolerance to pesticides. *Ecol Evol.* **10**: 4448–4456.

- Edwards J.E., Hiltz E., Broell F., Bushnell P.G., Campana S.E., ..., Hussey N.E. 2019. Advancing Research for the Management of Long-Lived Species: A Case Study on the Greenland Shark. *Front Mar Sci.* **6**: 87.
- Espín S., García-Fernández A.J., Herzke D., Shore R.F., van Hattum B., ..., van den Brink N.W. 2016. Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use?. *Ecotoxicology.* **25**: 777–801.
- European Environment Agency. 2018. Mercury in Europe’s Environment. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Farina M. & Aschner M. 2019. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: an intriguing interplay. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **1863**: 129285.
- Forbes T.L. 1993. *Ecotoxicology in Theory and Practice.* Springer Science & Business Media, 272 pp.
- Galván I. & Alonso-Alvarez C. 2008. An Intracellular Antioxidant Determines the Expression of a Melanin-Based Signal in a Bird. *PLoS One.* **3**: e3335.
- García-Fernández A. 2014. Ecotoxicology, Avian. pp. 289–294. *Encyclopedia of Toxicology,*
- Gibson L.A., Lavoie R.A., Bissegger S., Campbell L.M. & Langlois V.S. 2014. A positive correlation between mercury and oxidative stress-related gene expression (GPX3 and GSTM3) is measured in female Double-crested Cormorant blood. *Ecotoxicology.* **23**: 1004–1014.
- Gilmore E.H. 2015. Do contaminants in polar bear (*Ursus maritimus*) modulate the expression of selected genes and cause DNA strand breaks?. *Magistritöö. Bioteaduste osakond, Oslo ülikool, Tromsø, Norra.*
- Hao Y., Zheng S., Wang P., Sun H., Matsiko J., Li W., Li Y., Zhang Q. & Jiang G. 2021. Ecotoxicology of persistent organic pollutants in birds. *Environ Sci Process Impacts.* **23**: 400–416.
- Helgason L.B., Arukwe A., Gabrielsen G.W., Harju M., Hegseth M.N., Heimstad E.S., Jørgensen E.H., Mortensen A.S. & Wolkers J. 2010. Biotransformation of PCBs in Arctic seabirds: Characterization of phase I and II pathways at transcriptional, translational and activity levels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **152**: 34–41.
- Henny C.J., Hill E.F., Hoffman D.J., Spalding M.G. & Grove R.A. 2002. Nineteenth Century Mercury: Hazard to Wading Birds and Cormorants of the Carson River, Nevada. *Ecotoxicology.* **11**: 213–231.
- Hentati-Sundberg J., Raymond C., Sköld M., Svensson O., Gustafsson B. & Bonaglia S. 2020. Fueling of a marine-terrestrial ecosystem by a major seabird colony. *Sci Rep.* **10**: 15455.
- Hoffmann A.A. & Sgrò C.M. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature.* **470**: 479–485.

- Huang M. & Penning T.M. 2014. Processing Contaminants: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). pp. 416–423. In: Motarjemi Y. (eds), *Encyclopedia of Food Safety*, Academic Press, Waltham.
- Jenko K., Karouna-Renier N.K. & Hoffman D.J. 2012. Gene expression, glutathione status, and indicators of hepatic oxidative stress in laughing gull (*Larus atricilla*) hatchlings exposed to methylmercury. *Environ Toxicol Chem.* **31**: 2588–2596.
- Kearns G.L., Abdel-Rahman S.M., Alander S.W., Blowey D.L., Leeder J.S. & Kauffman R.E. 2003. *Developmental Pharmacology — Drug Disposition, Action, and Therapy in Infants and Children.* *N Engl J Med.* **349**:1157-1167.
- Kim M., Park K., Park J.Y. & Kwak I.-S. 2013. Heavy metal contamination and metallothionein mRNA in blood and feathers of Black-tailed gulls (*Larus crassirostris*) from South Korea. *Environ Monit Assess.* **185**: 2221–2230.
- Kulkarni P.S. 2019. Dioxins. pp. 125–134. In: Nriagu J. (eds), *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*, Elsevier, Oxford.
- Martindale J.L. & Holbrook N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* **192**: 1–15.
- McMichael C., Dasgupta S., Ayeb-Karlsson S. & Kelman I. 2020. A review of estimating population exposure to sea-level rise and the relevance for migration. *Environ. Res. Lett.* **15**: 123005.
- Mello F.V., Roscales J.L., Guida Y.S., Menezes J.F.S., Vicente A., Costa E.S., Jiménez B. & Torres J.P.M. 2016. Relationship between legacy and emerging organic pollutants in Antarctic seabirds and their foraging ecology as shown by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. *Sci Total Environ.* **573**: 1380–1389.
- Mels C., Westhuizen F., Pretorius P. & Erasmus E. 2011. Unbalanced biotransformation metabolism and oxidative stress status: implications for deficient fatty acid oxidation. *Health.* **3**: 43–48.
- Mrema E.J., Rubino F.M., Brambilla G., Moretto A., Tsatsakis A.M. & Colosio C. 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology.* **307**: 74–88.
- Murren C.J., Auld J.R., Callahan H., Ghalambor C.K., Handelsman C.A., ..., Schlichting C.D. 2015. Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity.* **115**: 293–301.
- Nakayama K., Iwata H., Tao L., Kannan K., Imoto M., Kim E.-Y., Tashiro K. & Tanabe S. 2008. Potential effects of perfluorinated compounds in common cormorants from Lake Biwa, Japan: An implication from the hepatic gene expression profiles by microarray. *Environ Toxicol Chem.* **27**: 2378–2386.
- Rattiste K., Klandorf H., Urvik J., Sepp T., Asghar M., Hasselquist D., Coe C. & Hõrak P. 2015. Skin pentosidine and telomere length do not covary with age in a long-lived seabird. *Biogerontology.* **16**: 435-441.

- Regoli F., Giuliani M.E., Benedetti M. & Arukwe A. 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol.* **105**: 56–66.
- Rodnan G.P., Ebaugh F.G. Jr., Fox M.R.S. & Chambers D.M. 1957. The Life Span of the Red Blood Cell and the Red Blood Cell Volume in the Chicken, Pigeon and Duck as Estimated by the Use of Na₂Cr⁵¹O₄: With Observations on Red Cell Turnover Rate in the Mammal, Bird and Reptile. *Blood.* **12**: 355–366.
- Rodríguez-Romero A., Viguri J.R. & Calosi P. 2021. Acquiring an evolutionary perspective in marine ecotoxicology to tackle emerging concerns in a rapidly changing ocean. *Sci Total Environ.* **764**: 142816.
- Routti H., Helgason L.B., Arukwe A., Wolkers H., Heimstad E.S., Harju M., Berg V. & Gabrielsen G.W. 2013. Effect of reduced food intake on toxicokinetics of halogenated organic contaminants in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Environ Toxicol Chem.* **32**: 156–164.
- Sellin Jeffries M.K., Mehinto A.C., Carter B.J., Denslow N.D. & Kolok A.S. 2012. Taking microarrays to the field: differential hepatic gene expression of caged fathead minnows from Nebraska watersheds. *Environ Sci Technol.* **46**: 1877–1885.
- Shahidul Islam Md. & Tanaka M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull.* **48**: 624–649.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* **82**: 291–295.
- Snell-Rood E., Cothran R., Espeset A., Jeyasingh P., Hobbie S. & Morehouse N.I. 2015. Life-history evolution in the anthropocene: effects of increasing nutrients on traits and trade-offs. *Evol Appl.* **8**: 635–649.
- Stahl T., Mattern D. & Brunn H. 2011. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environ Sci Eur.* **23**: 38.
- Técher R., Houde M. & Verreault J. 2016. Associations between organohalogen concentrations and transcription of thyroid-related genes in a highly contaminated gull population. *Sci Total Environ.* **545–546**: 289–298.
- Ucán-Marín F., Arukwe A., Mortensen A., Gabrielsen G.W., Fox G.A. & Letcher R.J. 2009. Recombinant transthyretin purification and competitive binding with organohalogen compounds in two gull species (*Larus argentatus* and *Larus hyperboreus*). *Toxicol Sci.* **107**: 440–450.
- Wallace S., De Solla S., Thomas P., Harner T., Eng A. & Langlois V. 2017. Airborne polycyclic aromatic compounds contribute to the induction of the tumour-suppressing P53 pathway in wild double-crested cormorants. *Ecotoxicol Environ Saf.* **150**: 176–189.
- Whitney M.C. & Cristol D.A. 2018. Impacts of Sublethal Mercury Exposure on Birds: A Detailed Review. *Rev Environ Contam Toxicol.* **244**: 113–163.

- de Wit C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*. **46**: 583–624.
- Zahaby Y., Xia P., Crump D., Provencher J.F., Thomas P.J., ..., O'Brien J. 2021. ToxChip PCR Arrays for Two Arctic-Breeding Seabirds: Applications for Regional Environmental Assessments. *Environ Sci Technol*. (Trükis)
- Zheng X., Zhang B., Zhang Y., Zhong H., Nie R., Li J., Zhang H. & Wu C. 2020. Transcriptome analysis of feather follicles reveals candidate genes and pathways associated with pheomelanin pigmentation in chickens. *Sci Rep*. **10**: 12088.
- Zhou Y., Asplund L., Yin G., Athanassiadis I., Wideqvist U., Bignert A., Qiu Y., Zhu Z., Zhao J. & Bergman Å. 2016. Extensive organohalogen contamination in wildlife from a site in the Yangtze River Delta. *Sci Total Environ*. **554–555**: 320–328.
- Zitka O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlager T. & Kizek R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett*. **4**: 1247–1253.

Internetiallikad

1. Keskkonnaagentuur. 2018. Elavhõbeda heide on Euroopas endiselt probleem. <https://www.keskkonnaagentuur.ee/et/uudised/elavhobeda-heide-euroopas-endiselt-probleem>
2. The UniProt Consortium. 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 *Nucleic Acids Res*. 49:D1. <https://www.uniprot.org/uniprot/P22352>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lisanne Näab,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Reostusega seotud geenide ekspressioon pikaealistel merelindudel“, mille juhendaja on Tuul Sepp, 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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lisanne Näab

27.05.2021