

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
ENTOMOLOOGIA ÕPPETOOL

Merle Raig

**POLÜTSÜKLILISTE AROMAATSETE SÜSIVESINIKE (PAH)
BIOTRANSFORMATSIOONI DÜNAAMIKA: EKSPERIMENT
KULDKOGREGA (*CARASSIUS CARASSIUS*)**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Randel Kreitsberg

PhD Arvo Tuvikene

Tartu 2014

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1. PAHide iseloomustus.....	6
2.2. Biotransformatsioon.....	7
2.3. Biomarkerid.....	9
2.3.1. EROD (Etoksüresorufiin-O-deetülaas) test.....	12
2.3.2. Sapi metaboliidid.....	13
2.3.3. Glutatioon.....	14
3. Materjal ja meetoodika	16
3.1. Uurimisobjekti iseloomustus	16
3.2. Laboratoorsed tööd	16
3.2.1. Kasutatud kemikaalid	16
3.2.2. Proovide kogumine	17
3.2.3. EROD aktiivsuse mõõtmine	17
3.2.4. PAHide metaboliitide mõõtmine.....	18
3.2.5. Glutatiooni (total glutathione) mõõtmine.....	19
3.3. Andmeanalüüs	20
3.4. Eetilised printsiibid	20
4. Tulemused	21
5. Arutelu	27
5.1. EROD aktiivsus	27
5.2. Sapi metaboliidid.....	29
5.3. Glutatiooni tasemed.....	31
Kokkuvõte	33

Summary.....	34
Tänuavaldused.....	36
Kasutatud kirjandus.....	37
LISA 1.....	43
LISA 2.....	44
LISA 3.....	45

1. Sissejuhatus

Keskkonda satuvad pidevalt toksilised ained, mis vabanevad näiteks tööstusest ja asulatest. Kahekümnendal sajandil toodeti erinevaid orgaanilisi saasteaineid, nagu polüklooritud bifenüülid (PCB), polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH), kloororgaanilised pestitsiidid (OCP), polüklooritud dibensofuraanid (PCDF) ja dibenso-p-dioksiinid (PCDD), ja seega paisati need ka keskkonda (van der Oost *et al.* 2003). Just viimastel aastakümnetel on tõusnud huvi uurida keskkonna saastatuse võimalikku mõju veekeskkonnale (Adedeji *et al.* 2012). Hinnates keskkonnariske ainult toksiliste ainete kontsentratsioonide järgi keskkonnas pole piisav. Toksiliste ainete kahjulikke mõjusid organismidele on raske tuvastada, sest paljud toimed avalduvad pikema aja jooksul pärast kokkupuudet. Seepärast on väljatöötatud erinevad nn varase hoiatuse markerid: biomarkerid, mis võimaldavad kasutusele võtta erinevaid ennetus- ja parandusmeetmeid (van der Oost *et al.* 2003). Veekogude reostuse seires kasutatakse erinevaid molekulaarseid, biokeemilisi, immunoloogilisi markereid. Biomarkeri mõiste viitab füsioloogilistele, biokeemilistele ja histoloogilistele muutustele, mida kasutatakse saasteainetega kokkupuute ja selle mõju indikaatorina (Adedeji *et al.* 2012), olles seeläbi kasulik indikaator nii toksikandi leviku kui ka selle mõju kohta organismile (van der Oost *et al.* 2003).

Usaldusväärseid biomarkereid kiireks keskkonnaseisundi hindamiseks on siiski vähe. Küsimusi ja erimeelsusi on tekitanud mitmete biomarkerite tõlgendatavus (nt EROD test, LSI) (van der Oost *et al.* 2003). Kuigi EROD aktiivsuse testi on kasutatud juba üle kolmekümne aasta (Whyte ja Tillitt 2000), on leitud selles mitmeid küsitavusi. Kindlaks on tehtud, et EROD aktiivsus on väga mõjutatud keskkonna- ja aastaajalistest faktoritest (Amutha *et al.* 2009; Hedman *et al.* 2011; Devier *et al.* 2013), samuti on suhe ERODi ja bioloogiliste mõjude vahel kõrgematel organiseerituse tasemetel ikka uurimisteenaks (Whyte ja Tillitt 2000). Teise biomarkeri, maksaindeksi (LSI), puhul on reostuse korral leitud vähenenud, aga ka tõusnud tasemeid (van der Oost *et al.* 2003). Samuti on vähe teada erinevate PAHide metaboliseerimise kiirusest ja dünaamikast. Eestis on siiani keskkonnaseires kasutatud vaid keemilisi analüüse (nt kontsentratsioonid veest, setetest, organismidest) ja biomarkereid mitte.

Seepärast valiti käesolevas töös uuritavateks ühenditeks PAHid ja nende mõju. Neil on organismidele kindlaks tehtud toksilised, mutageensed ja kantserogeensed mõjud (Fuentes-Rios *et al.* 2005; Zhang ja Tao 2009), ning nad on globaalselt levinud ühendid (Kopecka-Pilarczyk ja

Correia 2009), mis teevad neist tähtsad saasteained, mida uurida. Seetõttu kuuluvad PAHid ka prioriteetsete saasteainete nimistusse, mis loodi US EPA (Environmental Protection Agency, USA) poolt (Dévier *et al.* 2013). Kokri (*Carassius spp.*) kasutatakse tihti mudelorganismina, et hinnata veekogude reostuse potentsiaalseid mõjusid (Zhang *et al.* 2004; Falfushynska *et al.* 2012). Samuti on kogred teadaolevalt väga vastupidavad ekstreemsetele oludele nagu hüpoksia ja anoksia (Sollid *et al.* 2005).

Töö eesmärgiks on uurida kahe levinud PAHi, naftaleeni ja püreeni metabolismi kuldkogres (*Carassius carassius*) biomarkerite abil. Samuti on eesmärgiks iseloomustada metabolismi dünaamikat ning biomarkeritena levinud EROD aktiivsuse, sapi metaboliitide ja kalade seas vähelevinud kogu glutatiooni (tGSH) efektiivsust ning usaldusväärsust tuvastamaks toksiliste ainetega kokkupuudet kalades.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. PAHid iseloomustus

Polütsükliaromaatsed süsivesinikud on lai orgaaniliste toksiliste ühendite grupp, mille ühendid koosnevad valdavalt kahest kuni kuuest omavahel seotud benseenituumast (HELCOM 2010) (Joonis 1, Lisa 1). PAHid on peamiselt tahked või vedelad (Walker *et al.* 2012), mittepolaarsed, lipofiilsed ja looduses võrdlemisi püsivad ühendid. Nende omaduste tõttu kalduvad PAHid akumuleeruma erinevate organismide rasvkoos (HELCOM 2010). Kõrgema molekulmassiga PAHid on suhteliselt stabiilsemad, vähenenud lenduvus- ja lahustuvusvõimega kui väiksema molekulmassiga PAHid (Tuvikene 1995).

PAHid allikad on antropogeenset (fossiilsete kütuste - nafta, kivisöe ja gaasi või puidu ja jäätmete mittetäielik põletamine, naftareostus (HELCOM 2010), autode heitgaasid (van Metre *et al.* 2000), tööstusheitveed, kreosoodireostus (Kopecka-Pilarczyk ja Correia 2009)) ja looduslikku päritolu (metsapõlengud, looduslikud naftaallikad, mõnede mikroorganismide ja taimede biosünteesi produkt) (Tuvikene 1995; Kopecka-Pilarczyk ja Correia 2009). Enamike merekeskkonnas sisalduvate PAHid päritolu on siiski inimtekkeline (HELCOM 2010).

Pärast veekeskkonda jõudmist absorbeeruvad PAHid orgaaniliste ja anorgaaniliste osakeste külge ning ladestuvad peamiselt põhjasetetes. Seega, enamik PAHid püsivad reostusallika lähedal, leitud on, et nende kontsentratsioonid vähenevad peaaegu logaritmiliselt suhtes kaugusega allikast. Veeökosüsteemides on PAHid suhtelised kontsentratsioonid tavaliselt kõige kõrgemad setetes, keskmised veeorganismides ning madalaimad vees (Tuvikene 1995).

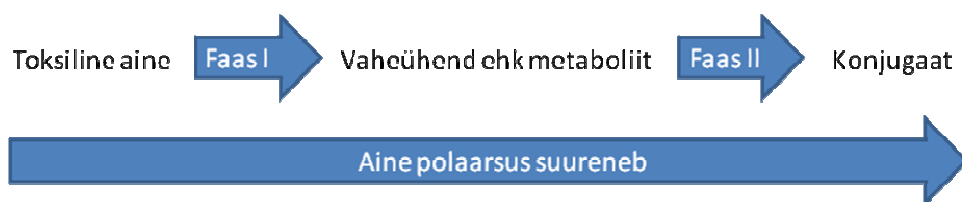
PAHid absorbeeruvad kergelt kaladesse ja teistesse veeorganismidesse saastunud toidu, setete või vee kaudu (läbi lõpuste ja naha), jõudes kõrgema tasemeni kui ümbritsevas keskkonnas. PAHid kogunevad oma lipofiilsuse tõttu organismide lipiidierikastele membraanidele ja akumulerevad esmalt kiire verevooluga organites nagu näiteks maks ja neerud. Pikaajaline kokkupuude PAHidiga põhjustab kaladel sigimisvõime vähenemist (gonaadide suuruse ja munade arvu vähenemine), maksa kahjustusi (glükogeeni reservide kahanemine, sileda- ja kareda endoplasmaatilise retiikulumi vohamine hepatotsüütides, mitokondrite paisumine, pigmendi kadumine, rakutuuma taandareng) ja immuunsüsteemi nõrgenemist makrofaagide hulga vähenemise ning T-lümfotsüütide aktiivsuse alanemise läbi. Samuti mõjutavad PAHid hematoloogiliste parameetrite (nt hemoglobiin, kortisool) tasemeid (Tuvikene 1995). PAHid metabolismi vaheproduktid (metaboliidid), mis on rohkem

reaktiivsemad ja elektrofiilsemad kui põhiühendid, võivad rakus seonduda erinevate valkude, DNA ja RNaga, mis põhjustavad raku kahjustusi, kasvajaid (Tuvikene 1995), mutatsioone (Palanikumar *et al.* 2012). Lisaks on PAHidel leitud RNA ja valkude sünteesi inhibeeriv mõju (Tuvikene 1995).

2.2. Biotransformatsioon

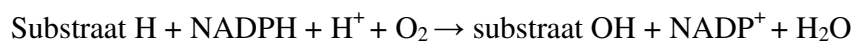
Tsütokroom P450 ensüümikompleks arvatakse olla välja kujunenud kuni 2 miljonit aastat tagasi, et kaitsta organisme looduslikult esinevate toksiliste ainete vastu (nt metsapõlengud, vulkaanipursked) (Walker *et al.* 2012). See ensüümikompleks vastutab lipofiilsete saasteainete biotransformatsiooni eest, kuna sapp ja neerud pole võimelised kõrvaldama neid ühendeid organismist. Ensüümikompleks on looduses laialt levinud, esineb nii bakteritel kui ka inimestel. See paikneb peamiselt maksa, aga ka paljude teiste kudede endoplasmaatilises retiikulumis, vähemal määral mitokondris. Biotransformatsiooni ülesandeks on muuta lipofiilsed toksilised ained hüdrofiilsemateks metaboliitideks, mille tagajärjel toksilise aine bioloogiline aktiivsus väheneb, sest hüdrofiilsemad metaboliidid ei suuda enam seonduda retseptoritega (Ioannides 2010). Siiski, sõltuvalt ainest on biotransformatsiooni vaheproduktid (metaboliidid) reaktiivsemad ja toksilisemad kui algne ühend (nt PAH) (Walker *et al.* 2012).

Toksiliste ainete biotransformatsioon koosneb kahest faasist: faas I ja faas II (Joonis 1). Esimese faasi reaktsioonid viivad polaarse rühma ksenobiootilisse molekuli, kas oksüdatiivse, redutseeriva või hüdrolüütilise reaktsiooni teel (Tuvikene 1995).



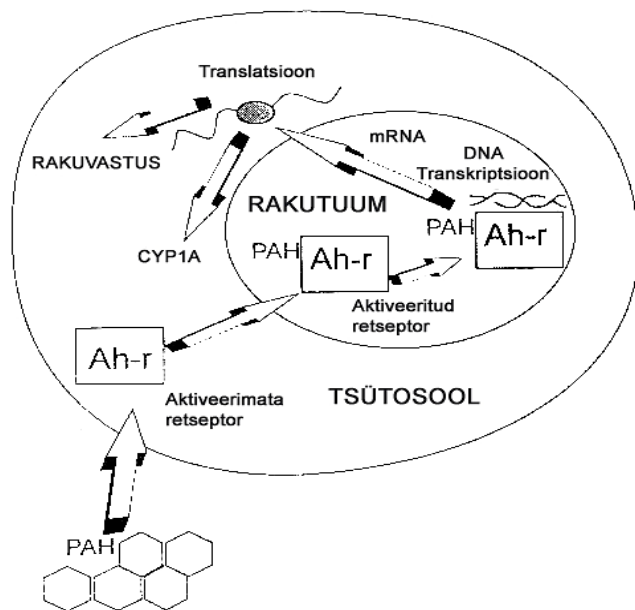
Joonis 1. Biotransformatsiooni põhiskeem (http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogu_tekst).

Tsütokroom P450 ensüümikompleksi kuuluva CYP1A induksioon on vahendatud läbi toksilise aine seondumise arüülsüsivesiniku retseptoriga (AhR) tsütosoolis (Whyte ja Tillitt 2000) (Joonis 2). Toksilise ühendi metaboliseerimiseks, mis peamiselt toimub oksüdatsiooni abil, on vajalik hapniku molekul ning NADPH. Reaktsiooni ajal antakse üks hapniku molekuli aatom üle substraadile, teine aatom redutseeritakse veeks. Redutseerimiseks on vajalikud kaks elektroni, mis tulevad NADPHlt. Transpordib neid tsütokroom P450 reduktaas, mis on flavoproteiini kompleks, koosnedes flaviin adeniin dinukleotiidist (FAD) ja flaviin mononukleotiidist (FMN) (Ioannides 2010). Reaktsioonivõrrand on alljärgnev.



I faasi protsesside tulemusena tekivad funktsionaalsed grupid nagu hüdroksüülrühmad (-OH), karboksüülrühmad (-COOH), aminorühmad (-NH₂), mis lubavad ühendil siseneda faas II konjugatsioonireaktsioonidesse (Ioannides 2010). Tsütokroom P450 katalüütilise aktiivsuse tõttu võivad moodustuda väga reaktiivsed vaheühendid (nt dihüdrodoolid ja diolepoksiidid). Need reaktiivsed elektrofiilid moodustavad kovalentseid sidemeid DNA, RNA, ja valkudega, mis viib mutatsioonide ja kasvaja tekkeni (Tuvikene *et al.* 1996; Richardson *et al.* 2001).

Teises faasis toimuvad toksiliste ainete, millel on juba vastavad funktsionaalgrupid, ja esimeses faasis tekkinud metaboliitide konjugatsiooni reaktsioonid glükuroonhappe, sulfaatide, glutatiooni või aminohapete osalusel, mida katalüüsivad vastavad transferaasid (Tuvikene 1995; Ioannides 2010). Nendest enim uuritud transferaasid on uridiin-5-difosfaat-glükuronosüültransferaas (UDP-GP), mis katalüüsib glükuronisatsiooni ja glutatioon S- transferaas (GST), mis katalüüsib reaktsioone glutatiooniga. Enamik konjugaate on orgaanilised anioonid, mis on polaarsed ja vees lahustuvad ning seeläbi lihtsalt organismist väljutatavad sapi, uriini ja naha kaudu (Tuvikene 1995).

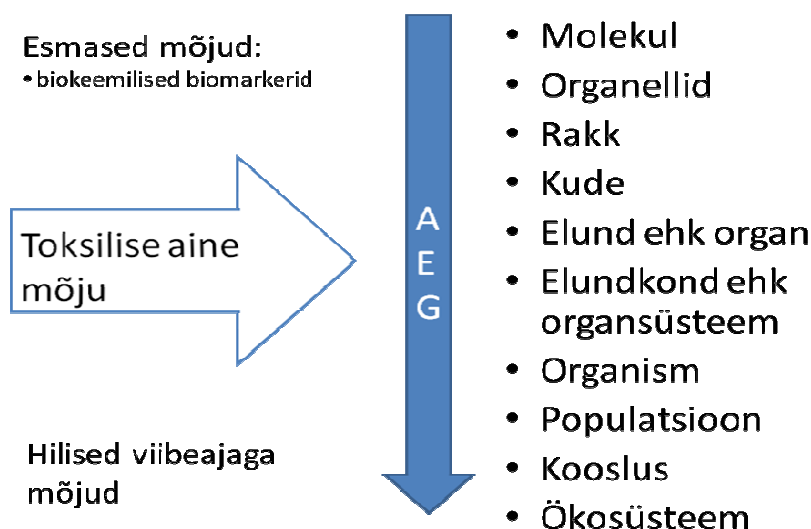


Joonis 2. CYP1A avaldumise mehhanismid PAHide mõjul (http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogu_tekst).

2.3. Biomarkerid

Mõistet „biomarker“ kasutatakse laiemas tähenduses pea iga mõõtmise kohta, mis peegeldab vastastikmõju bioloogilise süsteemi ja potentsiaalse ohu vahel, mis võib olla keemiline, füüsikaline või bioloogiline (van der Oost *et al.* 2003). Biomarkerit saab defineerida ka nii: biomarker on iga bioloogiline vastus keskkonnas olevatele kemikaalidele indiviidi tasemel, mida mõõdetakse organismis või selle produktidest (uriin, väljaheited, karvad, suled jne), viidates nihkele normaalsest tasemest, mida ei saa tuvastada tervel organismil. Biomarkereid jagatakse eksponeeringu markeriteks, mis hõlmavad välise aine või selle metaboliidi avastamise ja mõõtmise; mõjude markeriteks, mis sisaldavad mõõdetavaid biokeemilisi, füsioloogilisi muutusi kudedes või kehavedelikes, mida saab seostada organismi seisundi halvenemisega; tundlikkuse markeriteks, mis näitavad organismi suutlikkust vastata mõne kindla välise toksilise aine kokkupuute mõjule (nt geneetilised faktorid) (Douben 2003). Biomarkerite vastused võivad esineda eluslooduse organiseerituse eri tasanditel, molekulaarset kuni ökosüsteemini välja (Joonis 3). Molekulaarse taseme biomarkeriteks on ensüümiaktiivsused (nt P450 (CYP)). Raku tasandi

markerid on näiteks endoplasmaatilise retiikulumi vohamine, kromosoomimuutused, mikrotuumade tekkimine. Organi tasemel toksiliste ainete mõju uurimiseks on maksa indeks, gonadosomaatiline indeks, immunoloogilised parameetrid. Kui reostuse mõju on pikaajaline, siis tekivad muutused juba populatsioonide geenialleelide sageduses, vanuselises struktuuris. Lõpuks väheneb ökosüsteemide mitmekesisus ja häirub selle funktsioneerimine (Tuvikene 1997).



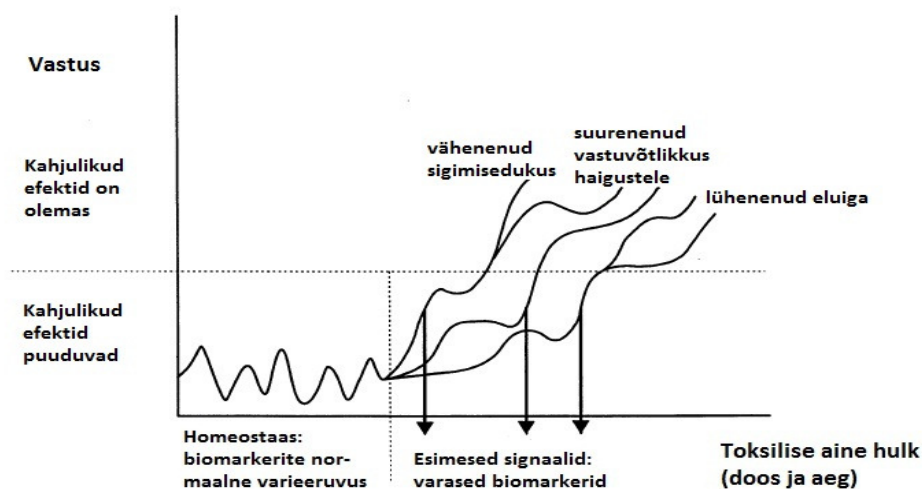
Joonis 3. Toksiliste ainetega kokkupuute tagajärjel avalduvad muutused ajas erinevatel organismi tasemetel (http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogu_tekst).

Mõjuvaim põhjus kasutamaks biomarkereid on see, et nad annavad lisaks saasteainete kvantitatiivsetele tasemetele keskkonnas infot ka nende bioloogiliste mõjude kohta. Biomarkerite kasutamine aitab avastada võimalikke ohte varases staadiumis, iseloomustada võimalikke asjakohaseid tegutsemisviise saastunud keskkondades, tuvastada saastunud proovidest toksikoloogiliselt olulised komponendid, analüüsida toksiliste ainete segude mõjusid, uurida kahjulike bioloogiliste vastuste sõltuvust elupaigast (Douben 2003). Uurides mitut biomarkeri vastust koos, saadakse olulist infot organismide toksiliste ainetega kokkupuute ja stressi kohta. Head biomarkerid on tundlikud näitajad nii saasteainete bioloogilise kättesaadavuse kui ka varaste bioloogiliste vastuste puhul. Biomarkerid peaksid vastama järgmistele tingimustele: kvantitatiivselt mõõdetav; odavalt ja lihtsalt analüüsitav; vastuvõtlik toksiliste ainete suhtes;

eelneva info olemasolu markeri loodusliku muutlikkuse kohta (Joonis 4); teada markeri taset segavad tegurid; teada suhe toksilise aine kokkupuute (doos ja aeg) ja biomarkeri vastuse vahel (van der Oost *et al.* 2003).

Biomarkerite vastuseid mõjutavaid faktoreid on palju - näiteks organismi tervislik seisund, sugu, vanus, toitumus, reproduktiivne seisund, populatsiooni tihedus, aga ka aasta-aeg, ja temperatuur. Sellest tulenevalt võib toimuda keskkonna kvaliteedi väärtõlgendamist, mida aitab vähendada mitmete biomarkerite koos kasutamine (Douben 2003). Biomarkerid esinevad siiski mingi viivitusega, seega biomarkeri ilmnemisel võib olla selle tegur juba kadunud või kadumas. Raske on määrata, milline toksiline ühend just kindla muutuse tekitas, sest organism on keskkonnas mõjutatud mitmete saasteainete poolt ja paljud neist kutsuvad esile bioloogilisi muutusi (väljaarvatud spetsiifiliste biomarkerite puhul nagu ALAD, mis inhibeeritakse pliimürgituse korral) (http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogu_tekst).

Sagedamini kasutatavad biomarkerid on biotransformatsiooni ensüümide aktiivsused (nt EROD test) - ühed tundlikumad biomarkerid; biotransformatsiooni produktid (nt PAHide metaboliidid); stressiproteiinid (*heat-shock proteins*); vere parameetrid (nt hormoonide tase); sigimisevõime ja hormoonide regulatsiooni muutused; genotoksilised ja tsütotoksilised kõrvalekalded (nt mikrotoomad, fragmenteerunud tuumad); immunoloogilised vastused; parasiteeritus; füsioloogilised ja morfoloogilised muutused (nt väärarengud; maksa- ja gonaadiindeksite kõrvalekaldumised; muutused organismi käitumises (http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogu_tekst).



Joonis 4. Organismi vastus (biomarker) põhjustab kokkupuutel toksiliste ainetega hälbimise normaalsest olukorrast. Varased biomarkerid aitavad keskkonnareostuse jälgi avastada enne, kui toksikant jõuab organismi pöördumatult kahjustada (<http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php?id=kogutekst>).

2.3.1. EROD (Etoksüresorufiin-O-deetülaas) test

Paljud lipofiilsed toksilised ained toovad organismis kaasa tsütokroom P450 induktsiooni. EROD aktiivsus kirjeldab sinna ensüümikompleksi kuuluva ensüümi CYP1A vahendatud reaktsiooni kiirust, kus substraat 7 etoksüresorufiin muudetakse resorufiiniks. See viitab hetkelisele ensüümi kogusele ja seda mõõdetakse kui palju resorufiini tekib minutis milligrammi valgu kohta (mol/mg/min). Etoksüresorufiin-O-deetülaasi EROD aktiivsuse mõõtmine kalades on hästi väljakujunenud *in vivo* biomarker vastuseks teatud planaarsetele halogeenitud ja polütsükliilistele aromaatsile süsivesinikele (PHH ja PAH) ning teistele struktuurilt sarnastele ühenditele (Whyte ja Tillitt 2000). CYP1A ensüüme indutseerivad ka mõned polüklooritud bifenuülid (PCB), dioksiinid ning dibenzofuraanid (Richardson *et al.* 2001). EROD aktiivsus viitab ka Ah-retseptor aktiivsete ühendite olemasolule kalades, mille hindamine varem oli raskendatud (Whyte ja Tillitt 200).

CYP1A induktsiooni mõõtmine EROD aktiivsuse kaudu on sagenenud, kuna see meetod on suhteliselt kiirelt ja odavalt analüüsiv, tundlik keskkonna muudatuste suhtes ja tavaliselt esimesena avastatav. See omakorda võimaldab võtta ette erinevaid ennetavaid ja parandavaid meetmeid. EROD kirjeldab ka keskkonnas olevate toksiliste ainete summaarset mõju organismile (Whyte ja Tillitt 2000). EROD mõnikord ei korreleeru teiste biomarkeritega. Richardson *et al.* (2001), Kreitsberg *et al.* (2012), Devier *et al.* (2013) töödes ei leitud EROD aktiivsuste ja PAHide metaboliitide kontsentratsioonide vahel korrelatsiooni.

Kuna EROD testi tulemusi mõjutavad mitmed faktorid (toodud allpool), siis selle rakendamisel on parim tulemus ühendada teiste testide (nt sapi metaboliidid, LSI, vereliblede mikrotoomad jne) tulemustega. EROD aktiivsust inhibeerivad osad raskemetallid, näiteks kaadmium ja vask (Benedetti *et al.* 2007). Bioloogilised parameetrid, mis mõjutavad EROD aktiivsust, on näiteks liik, kala suurus, vanus, toitumine, reproduktiivne konditsioon (Whyte ja

Tillitt 2000), sugu (Goksoyr ja Förlin 1992). Arvesse tuleks võtta ka erinevaid keskkonnafaktoreid, nagu temperatuur ja vee pH (Whyte ja Tillitt 2000), mida peaks katse jooksul mõõtma, ning aastaajalisi variatsioone (Goksoyr ja Förlin 1992).

Paljud laboratoorsed eksperimendid, väliuuringud looduses on vaadelnud EROD induksiooni rohkem kui 150 kalaliigis (Whyte ja Tillitt 2000). EROD testi rakendatakse mitmel pool maailmas. Läänemere äärsed riigid, nagu Soome (Pikkarainen 2006), Rootsi (Hansson *et al.* 2006), Saksamaa (Wölz *et al.* 2009) on proovinud selle abil määrata Läänemere ranniku reostuskoormust.

2.3.2. Sapi metaboliidid

Kiire PAHide metabolismi tõttu pakub otsene PAHide kontsentratsioonide määramine kalade kudedes vähe infot. Samas PAHide metaboliidid on sapis tuvastatavad (Kammann *et al.* 2014). Mõned PAHid väljutatakse polaarsete metaboliitidena sapipõie kaudu, kuid enamik PAHe väljutatakse siiski pärast konjugatsiooni faas II ensüümide poolt. Sapi metaboliitide tasemeid saab määrata, kas mõõtes metaboliitide kogutaseme fluorestsentsühikutena või valides ühe metaboliidi PAHide summaarse metabolismi markeriks (van der Oost *et al.* 2003). Sapi metaboliitide fluorestsentsi mõõtmine põhineb sellel, et PAHide metaboliidid on tugevad fluorofoorid, samas enamik teisi aineid sapis pole (Beyer *et al.* 2010). Peamiseks metaboliidiks kala sapis on 1-hüdroksüpüreen (1-OHPyr), mis moodustab kuni 76% PAHide metaboliitidest. Teised, väiksemal määral sisalduvad PAHide metaboliidid on 1-hüdroksüfenantreen (1-OHPhe), 1-hüdroksükruseen (Kammann *et al.* 2014).

PAHide, klooritud fenoolide, porfüriinide, suguhormoonide põhjustatud metaboliite on kasutatud reostuse kokkupuute ja mõju markeritena. Meetodi lihtsus ja kiirus on teinud selle üsna populaarseks, kuigi see ei ole täielikult selektiivne ja kvantitatiivne. Kala sapp sisaldab mitmeid eri pigmente ja teisi komponente, mis neelavad sissetulevat või emiteeritud valgust, mis võib viia signaali kaoni. Lisaks võib fluorestsentsi kalibreerimiskõver erineda lineaarsest sapi metaboliitide kõrgete kontsentratsioonide korral. Sellest on lihtsalt võimalik üle saada tagades piisava sapi lahjenduse (Beyer *et al.* 2010). Sapi metaboliitide biomarkerina kasutamise piiranguks on ka see, et metaboliitide tasemed näitavad lühiajalist (umbes nädal) kokkupuudet saasteainetega. Samuti

on sapi metaboliitide kontsentratsioonid mõjutatud kalade toitumusest. Samas kalade sapi metaboliitide tasemete tõusu on näidanud mitmed labori- ja välikatsed, mis uurisid PAHide ja teiste toksiliste ühendite olemasolu ning mõju (van der Oost *et al.* 2003).

Paljud tööd on uurinud PAHide metaboliite eri kalaliikidel (Nagel *et al.* 2012; Tairova *et al.* 2012; Brinkmann *et al.* 2013). Sapi metaboliite on uuritud näiteks angerjas, hõbekogres, sebrakalal, gupis, lestas, lõhes (Gagnon ja Holdway 2000; Richardson *et al.* 2001; Ikenaka *et al.* 2013; Kammann *et al.* 2014). Seega on sapi metaboliitide kontsentratsioonid tundlikud biomarkerid hindamiseks kokkupuudet erinevate saasteainetega (van der Oost *et al.* 2003). Nende metaboliitide määramine on hiljuti pakutud 13 indikaatori hulka, et seirata toksilisi aineid ja nende mõjusid Läänemeres (Kamman *et al.* 2014).

2.3.3. Glutatioon

Glutatioon (GSH) on oluline tripeptiid tiol antioksidant ja selle rakusisene kontsentratsioon on oksüdatiivse stressi indikaator (Rahman *et al.* 2007). On leitud, et oksüdatiivset stressi põhjustavad mitmed inimtekkelised saasteained (püsivad orgaanilised saasteained, raskmetallid), samuti sinivetikate toksiinid (Bláha *et al.* 2004). Rakus esineb glutatioon kahes erinevas vormis: redutseeritud sulfhüdrüül (GSH) kujul ja oksüdeeritud glutatioon disulfiid (GSSG) kujul. Oksüdatiivsel stressil on tugev mõju raku tioli tasakaalule ja see võib viia vähenenud GSH/GSSG suhtele mitmetes organites (Rahman *et al.* 2007). GSH kaks peamist rolli detoksifikatsioonis on olla elektrofiilsete vaheühendite konjugaat ja olla antioksidant. GSH reageerib elektrofiilsete aineosakestega ja asendab vesiniku-, kloori- ja nitrorühmad (van der Oost *et al.* 2003). Reaktiivseid hapniku eri liike nagu näiteks superoksiid anioone, hüdroksüülradikaale, vesinikperoksiide ja hüdroperoksiide ning teisi orgaanilisi radikaale neutraliseeritakse GSH poolt, kasutades detoksifikatsiooni mehhanisme, mis kaasab glutatioon peroksidaasid (GPx), glutatioon-S-transferaasid (GST) ja glutatioon reduktaasid (GR). Lisaks sellele osaleb GSH ka signaaliülekannetel, geenide ekspressioonis, apoptoosis (Rahman *et al.* 2007).

Võrreldes faas I ensüümidega (nt EROD) on faas II ensüümide (nt GSH) induksioon tavaliselt vähem väljendunud, mille tõttu võib see jääda varjatuks loodusliku varieeruvuse

tegurite tõttu (nt sugu, vanus, toitumus, aastaag, temperatuur) (van der Oost *et al.* 2003). Glutatiooni mõõtmisi on läbi viidud nii eri kalaliikidel (nt pakslaup, vikerforell, hõbekoger, angerjas) (Pena-Llpois *et al.* 2001; Stephensen *et al.* 2003; Blaha *et al.* 2004; Lushchak *et al.* 2005; Kubrak *et al.* 2012) kui ka lindudel (nt rasvatihane) (Galvan ja Alonso-Alvarez 2008). Tõusnud GSH tasemeid on laborikatsetes kaladega leitud nii PAHide, PCBde ja heksaklorobenseenide (HCB) korral. Samuti on leitud tõusnud GSH kontsentratsioone mõnedes välitöodes latika, ahvena ja särjega. Tõusnud GSSG tasemeid leiti nii laboratoorsetes uuringutes kui ka välitöodes, kus uuriti PAHide, PCBde mõju eri kalaliikidele. Maksa GSH:GSSG suhet peetakse potentsiaalseks oksüdatiivse stressi biomarkeriks (van der Oost *et al.* 2003).

3. Materjal ja meetodika

3.1. Uurimisobjekti iseloomustus

Uurimistöös kasutati kuldkokre (*Carassius carassius*). Kogred on sagedased katseorganismid veekogude reostuse uurimisel (Zhang *et al.* 2004) ja vastupidavad ekstreemsetele keskkonnaoludele (Sollid *et al.* 2005). Kuldkokre looduslik levila on Ida-Euroopast Aasiani. Koger eelistab elupaigana aeglase vooluga või seisva veega mudaseid taimestikurikkaid järve- ja jõesoppe. Toitub põhjaloomadest (teod, karbid, putukate vastsed) ja plankteritest. Suguküpsuse saavutavad 3-4 aastaselt. Eestis leiduvad enamikes mageveekogudes ja Väinameres (Miller ja Loates 1997). Kogre selg on tume, pruunikas- või hallikasroheline, küljed pronksikarva kuldse helgiga, kõht kollakashall, uimed kollakaspunakast rohekashallini. Keskmise pikkus on 25 cm ja keskmine kaal 0,5 kg (Hunt 2012).

Käesolevas katses kasutatud kogred püüti Eesti Maaülikooli Limnoloogiakeskuse tiigist 2011. a novembris kaldanoodaga. Kalad jaotati kahte kraaniveega täidetud akvaariumisse, mis alguses oli pooleks loodusliku veega, ligikaudu võrdsel arvul, kus neile oli tagatud lisahapnik. Kaladel oli vähemalt kuu ajane aklimatiseerumisperiod. Kokresid toideti üle päeva tavalise kalatoiduga (graanulid) ja hoiti loomulikus valgusrežiimis.

3.2. Laboratoorsed tööd

3.2.1. Kasutatud kemikaalid

Katseobjektidele manustati maisiõlis lahustatud tahket naftaleeni ja püreeni süstimise teel. EROD analüüsis kasutati tris (hüdroksümetüül) aminometaan hüdrokloriidi (TRIS) pH7,5, etüleendiamiintetraädikhapet (EDTA), etoksüresorufiini, dimetüülsulfoksiidi (DMSO) ja nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaati (NADPH), mis on pärit Sigma-Aldrich (USA). Kogu glutatiooni mõõtmisel kasutati kaaliumfosfaadi puhvrit, pH 7,5, sisaldades EDTA dinaatrium soola, 10%list trikloroädikhapet (TCA), 5,5-dithiobis-2-nitrobensoehape (DTNB) reagenti ja glutatioon reduktaasi (GR) ning β -NADPH soolahüdraati.

3.2.2. Proovide kogumine

Kogred jaotati nelja gruppi juhuslikustamise alusel:

- kontrollgrupp 1 (20 kala), neid ei süstitud;
- kontrollgrupp 2 (15 kala), kellele süstiti kõhuõõnde maisiõli;
- kogred, keda süstiti naftaleeniga (41 kala);
- kogred, keda süstiti püreeniga (41 kala).

Kalade kaalu hinnati silma järgi ja neile süstiti kõhuõõnde (süstla mõõtmed 0,5 ml, nõel 0,4x12 mm, 27 G rõhk) maisiõli ja maisiõlis lahustatud naftaleeni ja püreeni vastavalt ettenähtud mahtudele (Tabel 1, Lisa 2). Süstimisele järgneval päeval alustati proovide kogumisega (kontrollgrupp 2 ja PAHidega süstitud kalade proovid), kontrollgrupp 1 proovid võeti umbes 2 nädalat varem. Kalad kaaluti ja mõõdeti (andmed Tabel 2, Lisa 3), järgnevalt võeti maksa- ja sapiproovid ning lihasproovid. Proovide võtmisele eelnevalt olid kalad 4 päeva söömata sapi paremaks kättesaamiseks. Kontrollgrupp 1 (edaspidi kontroll 1) kalade proovid võeti viie päeva jooksul, iga päev 4 kala. Kontroll 1 sapiproove oli 14, maksaproove 20, lihasproove 20. Kontrollgrupp 2 (edaspidi kontroll 2) kalade proovid võeti samuti viie päeva jooksul, iga päev 3 kala. Kontroll 2 sapiproove oli 14, maksaproove 15, lihasproove 15. PAHidega süstitud kalade proovid võeti 6 päeva jooksul, iga päev 7 kala, viimasel päeval 6 kala. PAHidega eksponeeritud kalade sapiproove oli kokku 82 (naftaleeniga 41 proovi ja püreeniga 41 proovi), maksa- ja lihasproove samuti mõlemat 82 tükki (vastavalt 41 naftaleeniga ja 41 püreeniga). Proovid pandi polüetüleen Eppendorfi ja hoiti kuni analüüsimiseni -80°C juures.

3.2.3. EROD aktiivsuse mõõtmine

Maksa homogeniseerimisel ja EROD aktiivsuse mõõtmisel kasutati Staggi ja McIntoshi (1998) ning Kirby *et al.* (2000) poolt kirjeldatud meetodit. 20 - 200 mg (keskmine 117 mg) kaaluvad maksa tükid homogeniseeriti puhvriga, suhtes üks viiele. Puhver sisaldas 50 mM TRIS pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl. Proovi homogeniseerimiseks kasutati klaasnuia, mis oli kinnitatud akutrellile, see toimus 30 sekundit 1200 pööret minutis. Homogenaat pandi

polüetüleen Eppendorfi ning säilitati jääs. Homogenaadid tsentrifugiti 10000 g kiirendusega 20 minutit 4⁰ C juures. Peale tsentrifugimist eemaldati supernatant, mis säilitati -80⁰C juures.

EROD aktiivsuse mõõtmiseks kasutati Bio Tek Synergy 2 fluorestsents plaadilugejat (Gen 5 arvuti tarkvara), mille proovi sisenev ning seda ergastav kiirgus oli 530 nm. Sealt kiirguvat kiirgust mõõdeti lainepikkusel 590 nm. Lisaks rakendati prooviplaadi raputamise funktsiooni. Proovide temperatuuri kontrolliti ruumi temperatuuriga, mis oli 20⁰C. Reaktsiooni mikstuuri lõppmaht oli 301 µl, sisaldades 295 µl analüüsi puhvrit (100 mM pH 7.5 TRIS, 100 mM NaCl), 3 µl maksa homogenaati ning 1,5 µl ethoksüresorufiini substraati (0.4 mM dimetüülsulfoksiidis (DMSO)). Reaktsiooni esile kutsumiseks lisati lahusele 1,5 µl NADPH (0.25 mM) ning kiirguse lugemid salvestati 0, 5, 10, 15, 20, 25 ja 30 minuti pärast peale lisamist.

3.2.4. PAHide metaboliitide mõõtmine

Fluorimeetri tööpõhimõte seisneb kindlal lainepikkusel proovi siseneva valguskiire ergastaval mõjul uuritavale ühendile. Spetsiifiline ühend (nt PAH metaboliit) proovis hakkab seetõttu kiirgama kindla lainepikkusega fluorestseeruvat valgust. Seda eralduvat valguse hulka on võimalik mõõta, mis iseloomustab meie poolt uuritava aine sisaldust konkreetsetes proovis. Erinevatel ühendigruppidel kasutatakse ergastamiseks erineva lainepikkusega kiirgust, samuti on proovist eralduvate kiirguste lainepikkused ühendispetsiifilised.

Antud töös kasutati fluorimeetrit naftaleeni ja püreeni mõõtmistel, lisaks mõõdeti ka lahjenduse tegemiseks kasutatud etanooli lahuse näidud, mida hiljem kasutati näitude kalibreerimiseks. Kontrollide sapiproove mõõdeti nii naftaleeni kui ka püreeni lainepikkustel. Vastavad lainepikkuste paarid nende jaoks on kirjas järgnevas tabelis (Tabel 1).

Tabel 1. Lainepikkused vastavate ühendite detekteerimiseks (Lee ja Anderson 2005).

Lainepikkused		Ühend
Sisenev	Väljuv	
290 nm	380 nm	Naftaleen
341 nm	383 nm	Püreen

Fluorestsentsi abil PAHi metaboliitide sisalduse mõõtmiseks lahjendati sapiproove kontsentratsioonis 1: 1600 48 % etanoolis (Aas *et al.* 2000). Selleks lahjendati 96 % etanooli destilleeritud veega, vahekorras 1 : 1, saadud 48 % etanooli kasutati edaspidi sapi lahjendamisel. Tingituna proovide mahu väikesest kogusest otsustati kasutada 5 µl sapivedeliku lahjendamisel 8 ml etanooli. Kokku õnnestus sapivedeliku väikese mahu tõttu analüüsida 25 sapiproovi. Lahjendatud sapiproovide analüüsil kasutati fluorestsents spektrofotomeetrit – HITACHI fluorescence spectrophotometer F- 2500. Proovide mõõtmiseks sisestati 1,5 ml lahjendatud proovi kvartsküvetti (2 ml, läbimõõt 1 cm), asetati proov fluorimeetrisse ning avati kiirguskanalid, mõõtmise tulemused saadi fluorimeetriga ühendatud arvutist. Fluorimeetri tulemused avaldatakse tavaliselt fluorestsentsühikuna (FÜ), mis iseloomustavad ühendite suhtelist hulka proovis (Beyer *et al.* 2010).

3.2.5. Glutatiooni (total glutathione) mõõtmine

Kogu glutatiooni (tGSH) mõõtmiseks kalade lihaskoest kasutati Rahman *et al.* (2006) ning Galván ja Alonso-Alvarez (2008) meetodikaid, mida vähesel määral muudeti. Proovid valmistati ette kasutades Lushchak *et al.* (2005) poolt kirjeldatud meetodikat. Lihased sulatati ja kaaluti ning homogeniseeriti klaasist homogeniseerijaga 0,1 mol/l kaaliumfosfaat puhvril (pH 7,5), suhtes 1:10 (lihase kaal/vedeliku ruumala). Puhver sisaldas lisaks 5 mmol/l EDTA dinaatrium soola. Kogu lahusele lisati võrdses koguses 10% vees lahustatud trikloroäädikhapet (TCA) ja segati vorteksiga kolm korda 15 min perioodi jooksul, iga segamine 5 sek. Liigse oksüdeerumise vältimiseks asetati proovid vahepeal fooliumisse ja +4 °C juurde. Segu tsentrifugeeriti 3000 g kiirendusega 15 min 4 °C juures. Saadud supernatant eemaldati ning 20 µl supernatanti kanti mikroplaadi kaevu. Sinna lisati veel 120 µl segu, milles oli võrdses koguses DTNB ja glutatioon reduktaasi (GR) lahust. Esimene sisaldas 2 mg DTNB-d, mis oli lahustatud 3 ml kaaliumfosfaat puhvril ja teise puhul oli 3 ml puhvril lahustatud 40 µl glutatioon reduktaasi. Reaktsiooni algatamiseks lisati kaevu veel 60 µl β-NADPH lahust, mis saadi 2 mg β-NADPH lahustamisel 3 ml puhvril. Koheselt mõõdeti neeldumise 412 nm juures, kasutades spektrofotomeetrit. Mõõtmised toimusid iga 30 sek järel 2 min jooksul (kokku 5 mõõtmist, 0 sek kuni 120 sek). Kogu glutatiooni kontsentratsiooni määramiseks lihastes kasutati neelduvuse muutust, mida võrreldi standardkurviga, mis saadi glutatiooni (GSH) järjestikkustel lahjendustel

alates 0,825 nmol/ml kuni 26,4 nmol/ml. Tulemused on antud nmol grammi lihaskoe kohta. Kokku sai analüüsitud 32 lihasproovi. Eeltoodud mõõtmisprotsessi viis läbi Marko Visse.

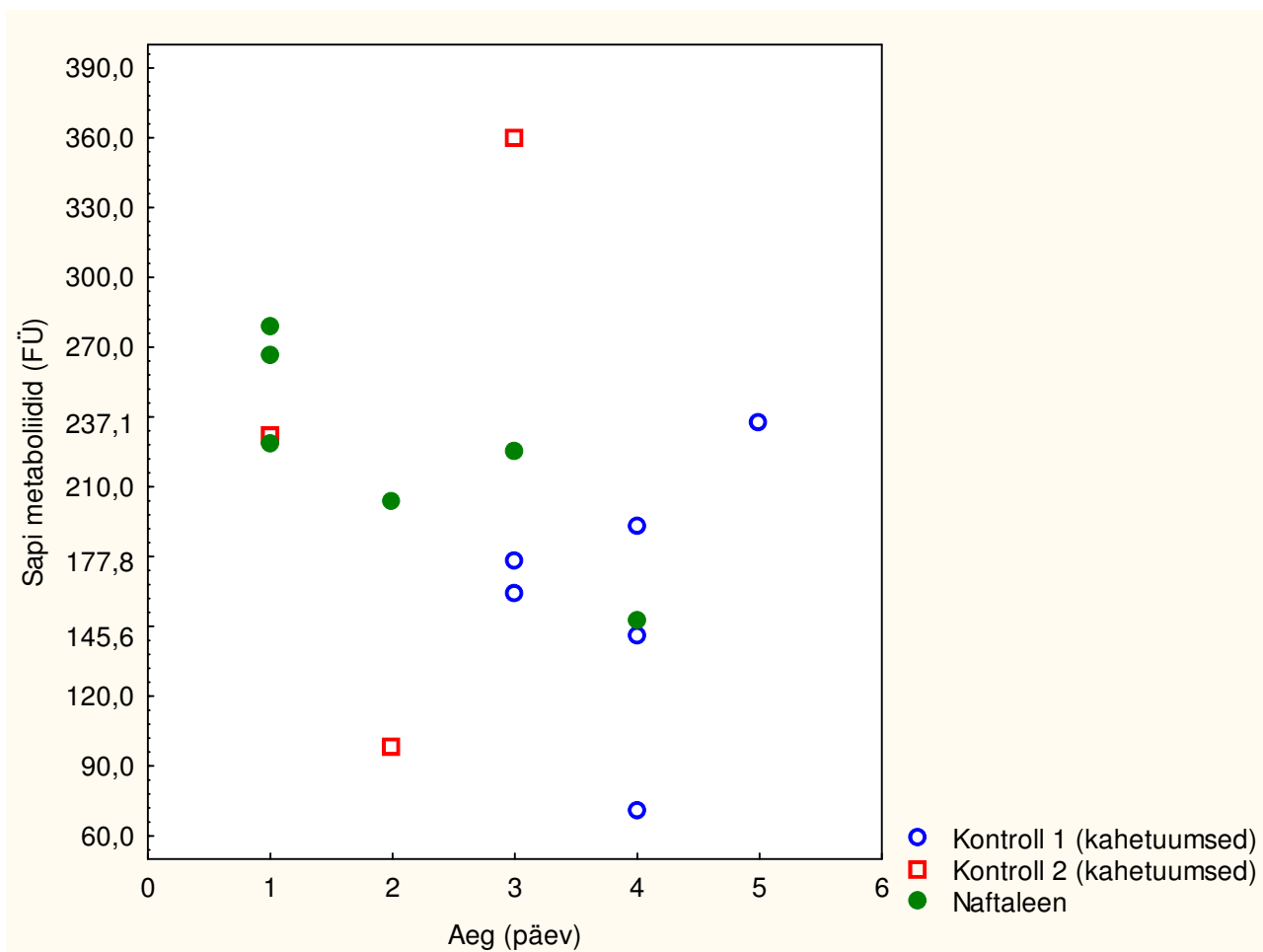
3.3. Andmeanalüüs

Andmete analüüsil kasutati statistikaprogrammi STATISTICA 7. Gruppide võrdlemisel kasutati one-way ANOVAT koos *post-hoc* Tukey testiga ja mitteparameetrilist Kruskal-Wallise testi. Sapi metaboliitide ja tGSH ajalise dünaamika iseloomustamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Sapi metaboliitide ja tGSH tasemete korrelatsiooni testimiseks kalade kaaluga ja pikkusega kasutati Spearmani korrelatsiooni. Andmete normaaljaotust testiti Shapiro-Wilk testiga.

3.4. Eetilised printsiibid

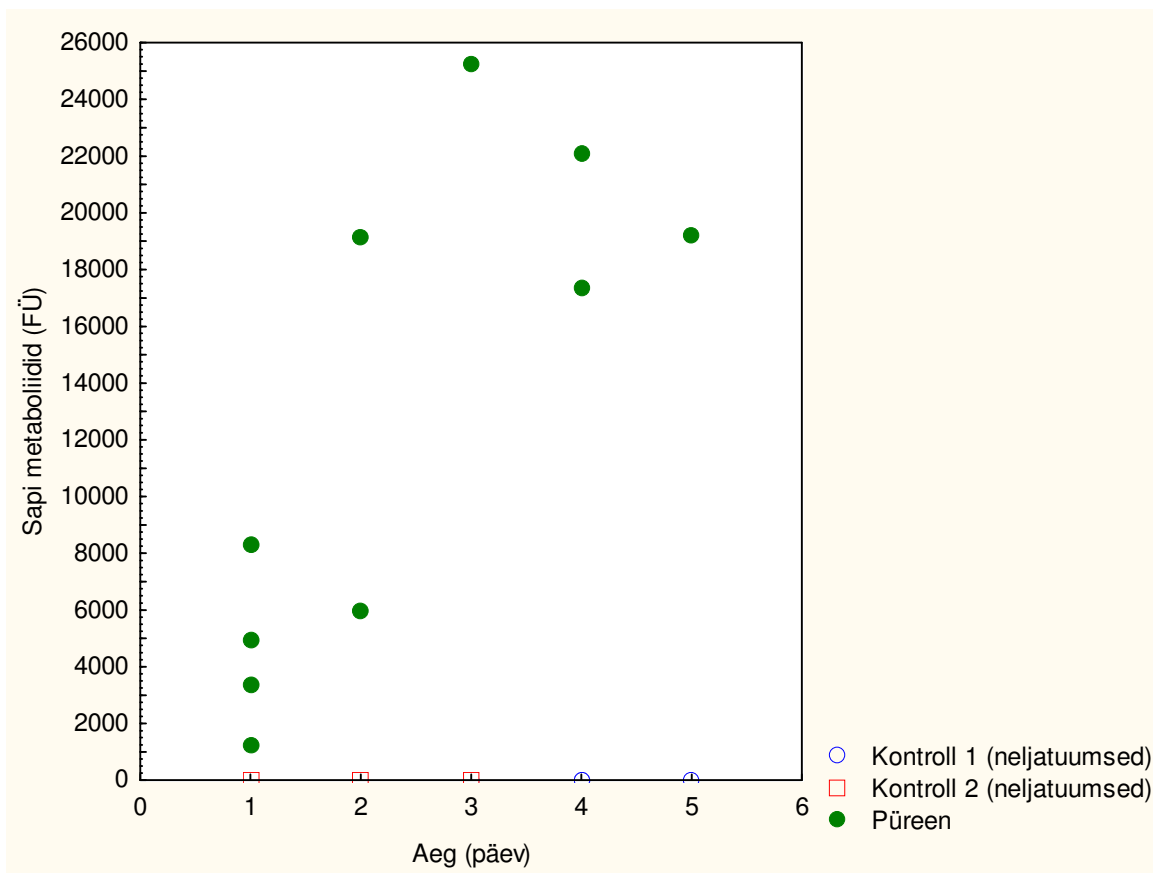
Loomeksperiment on läbi viidud rahvusvaheliste loomkatsete läbiviimise põhimõtteid ja eetikat järgides. Loomkatsete läbiviijal on FELASA C-kategooria sertifikaat. Loomkatse läbiviimine toimus Põllumajandusministeeriumi loa alusel, vastavalt loa komisjoni otsusele 2. aprill 2012 nr 104.

4. Tulemused



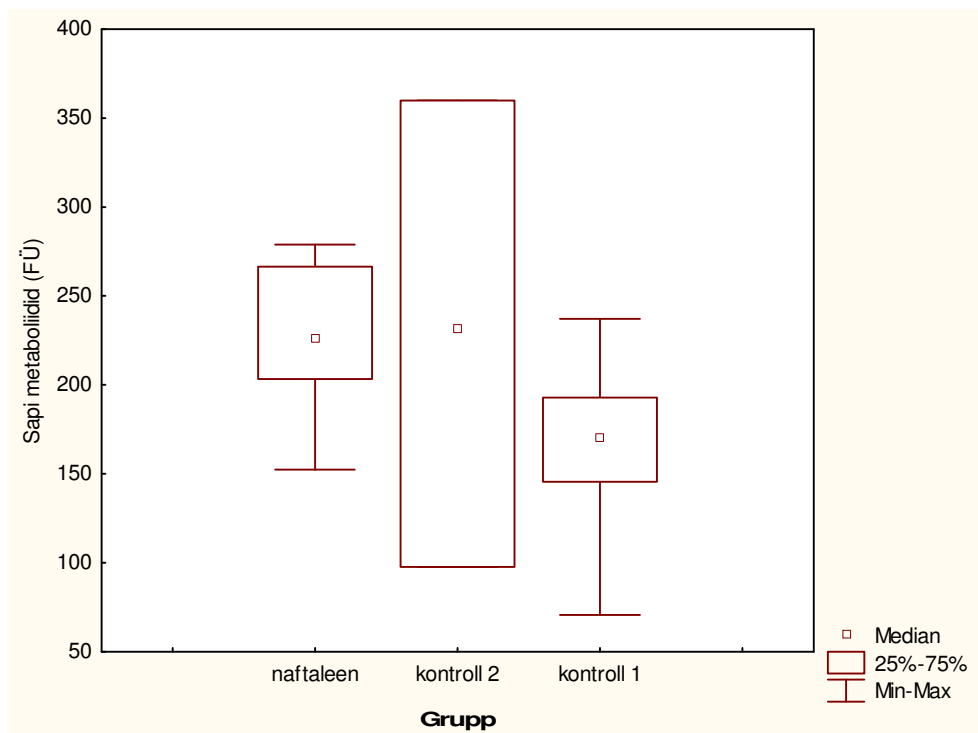
Joonis 5. Sapi metaboliitide tasemete ja proovivõtu aja vaheline sõltuvus gruppide kaupa kahetuumsete korral.

Sapi metaboliitide kontsentratsioonide ajalises dünaamikas kontrollgrupp 1 kahetuumsete puhul kindlat trendi ei leitud, proovivõtuaja ja metaboliitide tasemete vahel korrelatsiooni ei leitud ($r_s=0,309$; $N=6$; $p=0,55$). Kontroll 2 korrelatsiooni analüüsi läbi ei viidud väga väikese valimi tõttu ($N=3$). Aja ja sapi metaboliitide tasemete vahel naftaleeni puhul leiti korrelatsioon ($r_s=-0,88$; $N=6$; $p=0,02$). Naftaleeni puhul leiti langev trend, kus esimesel päeval olid kõrgemad kontsentratsioonid kui 4 päeval, mis hakkasid ajas langema (Joonis 5).



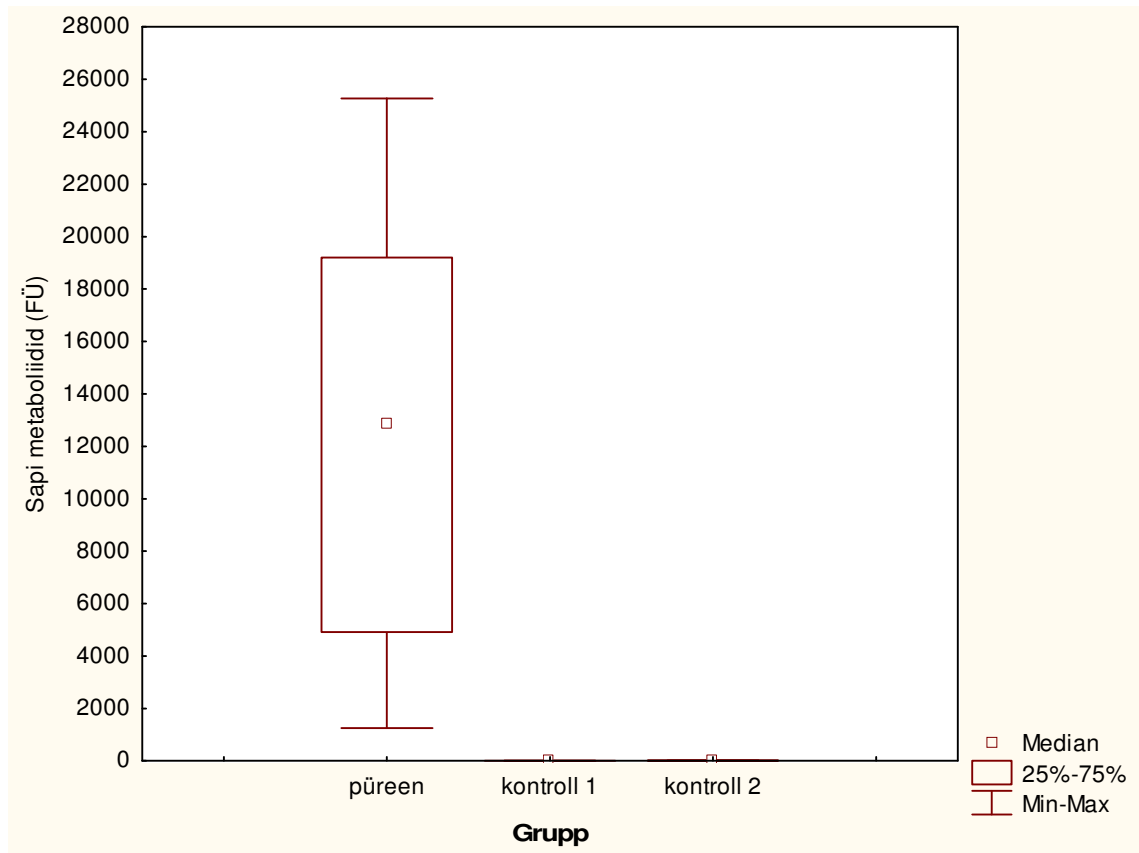
Joonis 6. Sapi metaboliitide tasemete ja proovivõtu aja vaheline sõltuvus eri gruppide kaupa neljatuumsete puhul.

Kontroll 1 neljatuumsete korral kindlat trendi ei leitud, proovivõtuaja ja sapi metaboliitide tasemete vahel korrelatsiooni ei leitud ($r_s=0,247$; $N=6$; $p=0,64$). Kontroll 2 korrelatsiooni analüüsi läbi ei viidud väga väikese valimi tõttu ($N=3$). Proovivõtuaja ja sapi metaboliitide tasemete vahel püreeni puhul leiti korrelatsioon ($r_s=0,79$; $N=10$; $p=0,006$). Püreeni korral leiti tõusev trend, kus proovivõtu esimesel päeval olid kontsentratsioonid väiksemad kui järgneval paaril päeval, millal olid ka kõige kõrgemad tasemed ning siis hakkasid aeglaselt langema (Joonis 6).



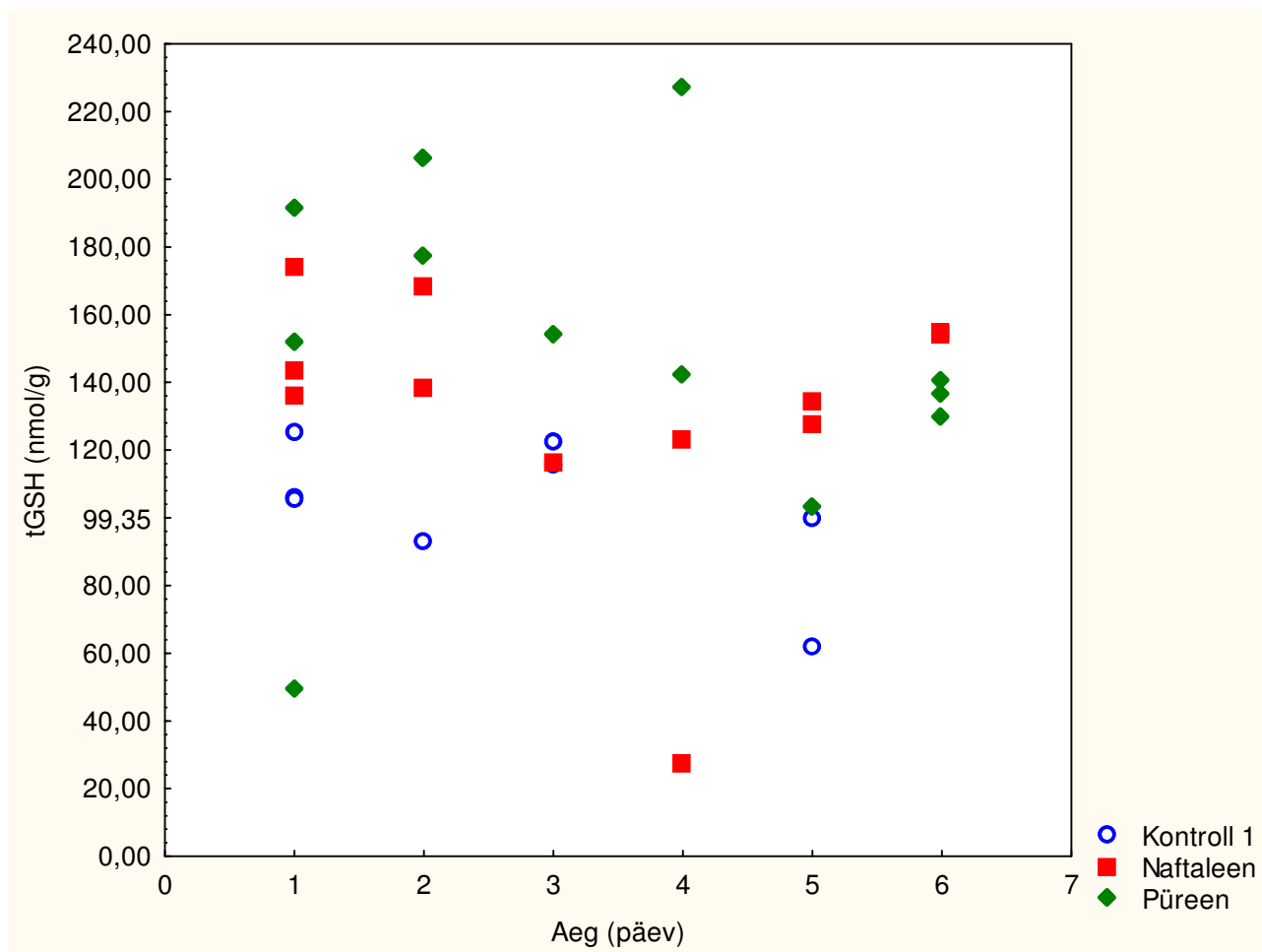
Joonis 7. Mitteparameetriline Kruskal-Wallise test. Sapi metaboliitide tasemetes ei leitud gruppide vahel erinevust kahetuumsete puhul ($H(2)=2,733$; $N=15$; $p=0,26$).

Eri gruppidel (kontrollgrupp 1 kahetuumused, kontrollgrupp 2 kahetuumused, naftaleen) ei leitud mõju sapi metaboliitide tasemetele kahetuumsete puhul ($H(2)=2,733$; $N=15$; $p=0,26$) (Joonis 7).



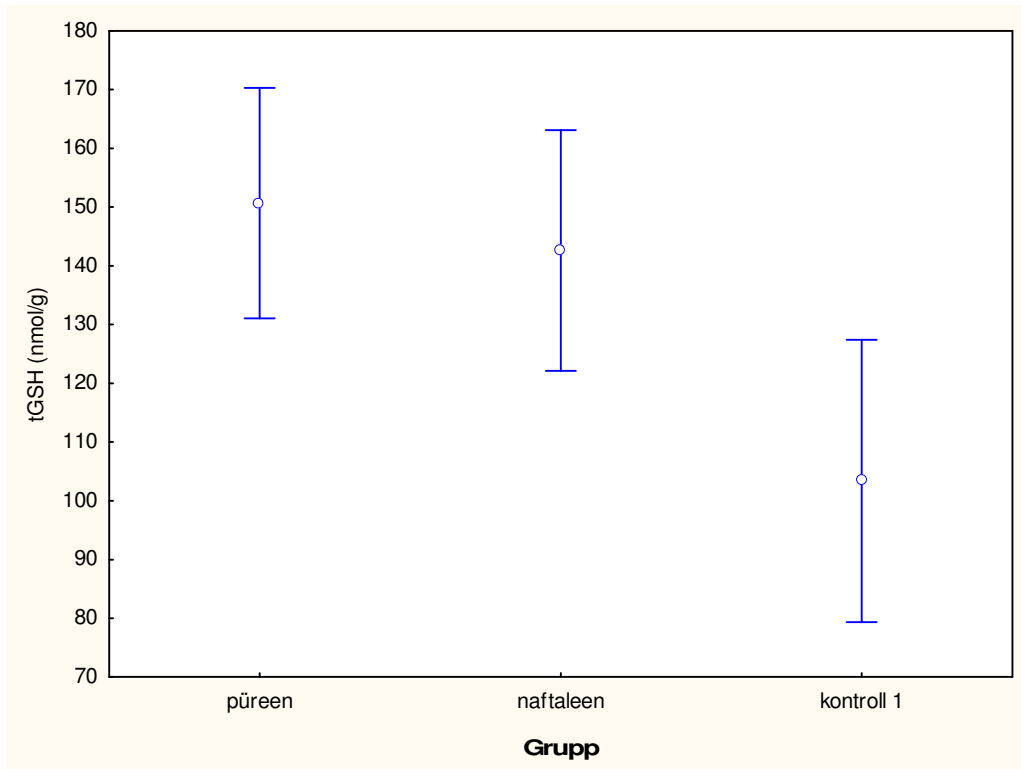
Joonis 8. Mitteparameetiline Kruskal-Wallise test. Sapi metaboliitide tasemetes leiti erinevus gruppide vahel neljatuumsete korral ($H(2)=14,07$; $N=19$; $p<0,001$). Sapi metaboliitide tasemed erinesid statistiliselt oluliselt püreeni puhul kontroll 1st ($p<0,001$).

Eri gruppidel (kontrollgrupp 1 neljatuumsed, kontrollgrupp 2 neljatuumsed, püreen) oli mõju sapi metaboliitide tasemetele neljatuumsete korral ($H(2)=14,07$; $N=19$; $p<0,001$) (Joonis 8). Sapi metaboliitide tasemed erinesid statistiliselt oluliselt püreeni puhul kontroll 1st ($p<0,001$) (Joonis 8). Sapi metaboliitide ja kalade suuruste vahel korrelatsiooni ei leitud, andmed pole toodud.



Joonis 9. Kalade lihaste kogu glutatiooni tasemete sõltuvus proovivõtu ajast eri gruppidel (kontroll 1, naftaleen, püreen).

Kogu glutatiooni tasemete ajalises dünaamikas kindlaid trende ei leitud, polnud statistiliselt olulised, kuid on märgata langevat trendi. Näiteks naftaleeni puhul ületab tGSH tase kuuendaks päevaks püreeni oma, võib öelda, et püreeni korral langeb tGSH tase mõnevõrra kiiremini (Joonis 9). Kontroll 1 puhul proovivõtuaja ja kogu glutatiooni sisalduse vahel korrelatsiooni ei leitud ($r_s=-0,457$; $N=8$; $p=0,25$). Naftaleeniga süstitud kalade kogu glutatiooni tasemete ja proovivõtuaja vahel ei leitud korrelatsiooni ($r_s=-0,199$; $N=12$; $p=0,54$). Püreeniga süstitud kalade kogu glutatiooni sisalduse ja proovivõtuaja vahel ei leitud korrelatsiooni ($r_s=-0,342$; $N=12$; $p=0,28$).



Joonis 10. Kalade lihaste kogu glutatiooni sisalduse võrdlus kolme eri grupi vahel (keskmine \pm 95%). tGSH tasemed erinesid gruppide vahel ($F_{2, 28}=5,26$; $p=0,011$) (ANOVA). Püreeni ja naftaleeni tGSH tase erineb statistiliselt oluliselt kontrollist (vastavalt $p<0,01$; $p=0,04$) (post-hoc Tukey test). tGSH madalaim väärtus analüüsist välja jäetud andmete normaliseerimise põhjustel.

Eri gruppidel oli mõju tGSH tasemetele ($F_{2,28} = 5,26$; $p=0,011$) (Joonis 10). tGSH madalaim väärtus oli analüüsist välja jäetud andmete normaliseerimise põhjustel. Võrreldes kogu glutatiooni tasemeid gruppide vahel (kontroll 1, naftaleeniga eksponeeritud kalad, püreeniga eksponeeritud kalad), siis kõrgeim glutatiooni tase oli püreeni puhul, mis erines statistiliselt oluliselt kontrollist ($p<0,01$), naftaleeni korral erines tGSH tase samuti statistiliselt oluliselt kontrollist ($p=0,04$) (Joonis 10). Kalade pikkuste ja kaalude ning tGSH tasemete vahel püreeni korral leiti korrelatsioon (vastavalt $r_s=0,641$; $N=12$; $p=0,02$ ja $r_s=0,637$; $N=12$; $p=0,03$)

5. Arutelu

5.1. EROD aktiivsus

Antud töö käigus kaladest EROD aktiivsust ei tuvastatud. Selleks võib olla mitmeid põhjuseid. Kalade tsütokroom P450 süsteem näitab suuremat aktiivsust teatud 4 - 6 tuumsetele PAHidele (Lee ja Anderson 2005). Nelja uurimuse põhjal, mis oli Lee ja Andersoni (2005) poolt kokku võetud, siis naftaleen EROD aktiivsust kalades ei indutseerinud ning püreeni korral aktiivsust polnud või oli see nõrk. Kõrgeimat P450 indutseerimise struktuurset potentsiaali omavad PAHid on 4 - 6 benseenituumaga, millel on fluoranteeni või fenantreeni struktuure ja on avatud tuumade vahelise alaga (*bay region*) (Barron *et al.* 2004). Sellised struktuurid püreenil puuduvad.

Mitmed tööd on näidanud, et väiksema molekulmassiga nagu näiteks kahe ja kolme benseenituumaga (naftaleen on kahetuumne PAH) PAHid ei ole tugevad EROD aktiivsuse indutseerijad. Näiteks Bosveld *et al.* (2002) poolt tehtud uuringu tulemus näitas, et kahe või kolme benseenituumaga PAHid pole võimelised või on ainult vähesel määral võimelised indutseerima EROD aktiivsust roti H4IIE maksarakkudes. See tulemus viitab sellele, et ühe ja kahe benseenituumaga PAHid pole struktuurselt suutelised seonduma Ah- retseptoriga (Bosveld *et al.* 2002). Ka Incardona *et al.* (2006) töös leiti, et suurema molekulmassiga PAHid on tugevamad AHR agonistid, kui väiksema molekulmassiga PAHid. Seega, see seletaks, miks naftaleeni korral EROD aktiivsust ei tuvastatud.

Järgnevates töödes pole täheldatud EROD aktiivsust kalade maksarakkudes naftaleeni (Fent ja Bätcher 2000) ja püreeni korral (Behrens *et al.* 2001). Behrens *et al.* (2001) töös tõusis EROD aktiivsus benso(a)antratseeni, benso(a)püreeni, benso(b)fluoranteeni ja krüseeni korral, mis on kõik 4 - 5 tuumset PAHid. EROD aktiivsust ei leitud antratseeni, fluoranteeni, fenantreeni ja püreeni korral, mis on 3 - 4 tuumset PAHid (Behrens *et al.* 2001). Lu *et al.* (2009) töös ei leitud EROD aktiivsuse märgatavat tõusu võrdluses kontrolliga fluoreeni ja fluoranteeni (0,1, 1,0 ja 2.0 mg/kg) ning benso(b)fluoranteeni (0.1 mg/kg) madalatel kontsentratsioonidel. Samas, kuuettuumsete PAHide benso(g,h,i)perüleeni ja indenool(1,2,3-cd) püreeni korral tõusis EROD aktiivsus märgatavalt juba madalate kontsentratsioonide puhul (Lu *et al.* 2009). Seega, võib olla, et EROD aktiivsuse tõusuks oli praeguses töös PAHide doos väike (1 mg/kg). EROD aktiivsust ei leitud Kreitsberg *et al.* (2013) töös, kus uuriti põlevkivi reostusega jõessete mõju hõbekogrele

hüpoksia tingimustes. Kopecka-Pilarczyk ja Correia (2009) töös oli EROD aktiivsus inhibeeritud kalade esimesel eksponeerimisel PAHide segule, teistkordsel eksponeerimisel oli märgata nõrka EROD aktiivsuse tõusu. Mitmed uuringud in vitro süsteemides on näidanud, et CYP1A valgu induksioon ei pruugi alati toimuda paralleelselt EROD aktiivsuse indutseerimisega. Põhjuseks võib olla konkureeriv ensüümi aktiivsuse inhibeerimine, eriti PAHide kõrgemate kontsentratsioonide korral (Wang *et al.* 2008).

Whyte ja Tillitt (2000) on oma töös toonud välja mitmeid parameetreid, mis võivad EROD aktiivsust mõjutada. Erinevused EROD aktiivsuses võivad tuleneda kala liigist, suurusel, vanusest ja reproduktiivsest faasist. Ka praeguses töös ei saa välistada liigispetsiifilist eripära. Devier *et al.* (2013) töös leiti kala vanuse ja soo oluline mõju EROD aktiivsusele. Samuti võivad mõjutada EROD aktiivsuse taset veetemperatuur ja pH, mida tuleks mõõta katse jooksul (Whyte ja Tillitt 2000). Mitmetes töödes on leitud aastaajaline mõju EROD aktiivsusele (Amutha *et al.* 2009; Hedman *et al.* 2011; Devier *et al.* 2013). Kindlaks on tehtud, et ka mitmed ained ja ainete segud võivad EROD aktiivsust inhibeerida, nagu näiteks metallorgaanilised, tinaorgaanilised ühendid ning metallid (Whyte ja Tillitt 2000). Siiski, selle mõju ERODile saab praeguse töö puhul välistada.

Kasutades CYP1A aktiivsust mõõtmaks PAHidega kokkupuudet, tuleb arvestada, et tulemused on liigi/koe spetsiifilised ja arvestada tuleb ka vanust, sugu, aastaaga, temperatuuri (Lee ja Anderson 2005). Tairova *et al.* (2012) töö näitas, et emakalade CYP1A aktiivsus oli statistiliselt oluliselt kõrgem sügisel võrreldes kevadega. Siiski, kokku umbes paarisajas laborikatses ja välitöös, mis uuris EROD aktiivsust toksilisest keskkonnast pärit kalaliikides, leiti enamikul tõusnud EROD aktiivsuse tase (van der Oost *et al.* 2003). Seega, tõlgendades assotsiatsiooni EROD aktiivsuse või CYP1A induksiooni ja keemilise aine või ainete grupi (PAHid) olemasolu vahel, tuleb olla ettevaatlik (Valdehita *et al.* 2012). Täpset vastust, miks EROD oli praeguses töös mitteaktiivne, on raske anda, kuid mõningaid järeldusi on võimalik teha. Naftaleeni ja püreeni puhul on võimalik, et need pole võimelised struktuurselt seonduma Ah- retseptoriga, seega ka CYP1A aktiivsust indutseerima, mida EROD kaudselt mõõdab. Välistada ei saa ka liigispetsiifilist mõju ja doosist sõltuvat EROD mitteaktiivsust. Praeguses töös polnud EROD test piisav, et tuvastada kalade eksponeerimist PAHidele. Rakendades

keskkonnaseires EROD aktiivsust, tuleks arvestada erinevate mõjuteguritega ja lisaks kasutada ka teisi biomarkereid ja/või toksiliste ainete kontsentratsioonide mõõtmist.

5.2. Sapi metaboliidid

Kokku umbes neljakümnes laborikatses ja välitöös, mis uuris sapi metaboliitide tasemeid reostunud keskkonnas kalades, leiti enamikul kõrgeenenud metaboliitide tase (van der Oost *et al.* 2003). Aas *et al.* 2000 töös leiti naftaga eksponeeritud kalade sapi metaboliitide kõrgemad tasemed võrreldes kontrolliga. Kopecka-Pilarczyk ja Correia (2009) töös kalade eksponeerimiskatses PAHide segule, leiti statistiliselt oluline sapi metaboliitide kontsentratsioonide tõus võrreldes kontrolliga. Ka praeguses töös leiti kalade sapi metaboliitide statistiliselt oluline tõus püreeni korral võrreldes kontrolliga. Kreitsberg *et al.* (2012) töös leiti emakalades sapi metaboliitidest kõrgeim kontsentratsioon kahetuumsete (nt. naftaleen) ja kolmetuumsete puhul, mis erineb praegusest tööst, kus kõrgem metaboliitide tase oli neljatumsete (püreen) korral. Kreitsberg *et al.* (2013) tööga võrreldes on praeguses töös sapi metaboliitide tase püreeni korral mitmeid kordi suurem. Gungördü (2011) ja Pathiratne *et al.* (2010) töös olid sapi metaboliitidest püreeni tasemed kõrgemad kui naftaleeni omad, mis vastab praeguse töö tulemustele. Praeguse tööga võrreldes oli Pathiratne *et al.* (2010) töös metaboliitide tasemed nii naftaleeni kui ka püreeni korral mitmeid kordi väiksemad. Gungördü (2011) töös olid sapi metaboliitide tasemetest naftaleeni omad kõrgemad ja püreeni omad madalamad võrreldes praeguse tööga.

Leitud on, et PAHide metaboliitide kontsentratsioonid kalade sapis varieeruvad märgatavalt liikide vahel, on mõjutatud soost, toitumusest ja mitmetest keskkonnafaktoritest nagu näiteks temperatuur (Nagel *et al.* 2012). Tairova *et al.* (2012) töös leiti, et isastel emakaladel olid sapi metaboliitide tasemed kõrgemad kui emastel. Vuorinen *et al.* (2006) töös leiti, et 1-OH püreeni kontsentratsioonid olid kõrgemad isastes lestades võrreldes emastega. Emakalades oli samuti kogu metaboliitide tase kõrgem isastes kalades, ühe erandiga. Devier *et al.* (2013) töös leiti, et sapi metaboliitide kontsentratsioonid sõltuvad aastaajast (kevadel kõrgemad tasemed kui sügisel) ja kalade vanusest, kus noorematel olid väiksemad kontsentratsioonid. Ka Nahrgang *et al.* (2013) töös leiti aastaajaline erinevus, kus 1-hüdroksüpüreeni tasemed olid kõrgemad kui 1-

hüdroksüfenantreeni omad ja need olid kõrgeimad märtsis ja detsembris. 1-hüdroksüfenantreeni metaboliitide tase oli kõrgeim märtsis.

Kaladel, keda pole hiljuti toidetud, on kõrgemad metaboliitide tasemed (Nagel *et al.* 2012). Samuti Kammann *et al.* (2014) leidis, et sapi metaboliitide kontsentratsioon mõjutab toitumus, nälja korral suureneb sapi glükuroniseeritud ja sulfaaditud PAHide metaboliitide tase. Samas Ikenaka *et al.* (2013) leidis, et metaboliitide kogusummat mõjutab toitumise asemel maksa suurus ja metaboliitide tasemetes on selged liikidevahelised erinevused. Brinkmann *et al.* (2013) töös leiti sapi metaboliitide kontsentratsioonide dünaamika märgatav erinevus kahe katses kasutatud temperatuuri vahel. 1-hüdroksüüreeni maksimaalne kontsentratsioon mõõdeti 8 päeval 12 °C juures ja teisel päeval 24 °C juures. Sarnane akumulatsioonimuster oli ka 1-hüdroksüfenantreeni korral, kus maksimaalne tase oli 4 päeval 12 °C juures ja teisel päeval 24 °C juures. 3-hüdroksübenso(a)üreeni tõusis konstantselt kuni 8 päevani 12 °C juures. 24 °C juures kontsentratsioon tõusis teiseks päevaks, kust edasi ei tõusnud (Brinkmann *et al.* 2013).

Käesolevas töös leiti sapi metaboliitide ajalises dünaamikas naftaleeni puhul langev ja üüreeni puhul tõusev trend. Selliseid tulemusi võis eeldada, sest väiksema molekulmassiga PAH, naftaleen, mis lahustub vees paremini võrreldes üüreeninga, siseneb organismi kiiremini ja metaboliseeritakse ka kiiremini, seevastu suurema molekulmassiga PAH, üureen, mis on hüdrofoobsem kui naftaleen, siseneb organismi aeglasemalt ja metaboliseeritakse seetõttu aeglasemalt. Sapi metaboliitide ja kala suuruse vahel korrelatsiooni ei leitud. Praeguses töös olid üüreeni korral sapi metaboliitide tasemed statistiliselt oluliselt tõusnud võrreldes kontrollgrupp 1, mis näitab biotransformatsiooniprotsessi toimumist ja eksponeeritust PAHidele.

Arvatakse, et PAHide metaboliidid kalade sapis kajastavad paremini reostuskoormust kui EROD aktiivsus (Wang *et al.* 2008). Tuginedes van der Oosti *et al.* (2003) tööle, hinnates biomarkereid kuue erineva kriteeriumi põhjal, siis ühe parima tulemuse (5 punkti 6-st) said biotransformatsiooni produktid (nt. sapi metaboliidid). Ka praeguse töö sapi metaboliitide tasemetest võis välja lugeda, et kalad olid eksponeeritud PAHidega, seega on sobivaks biomarkeriks keskkonnaseires.

5.3. Glutatiooni tasemed

Enamik töödest, mis vaatlevad oksüdatiivset stressi ja mõõdavad GSHd kalades, kasutavad selleks kalade maksa (Stephensen *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004; Almroth *et al.* 2008a; Falfushynska *et al.* 2012). Praeguses töös kasutati kala seljauime lihast, kuid GSH tase võib oleneda ka koest. Näiteks Pena - Llopis *et al.* (2001) töös leiti kalade eksponeerimisel herbitsiidiga GSH taseme tõus maksas ja GSH taseme langus lihases võrreldes kontrolliga, lisaks olid GSH tasemed maksas kõrgemad kui lihases. Võrreldes praeguse tööga olid maksa GSH tasemed Pena - Llopis *et al.* (2001) töös kuni 50 korda kõrgemad, kuid kalade lihaste GSH tasemed olid sarnased või madalamad praeguse töö omadest.

Tõusnud glutatiooni tasemeid on leitud mitmetes laborikatsetes, kus kalu eksponeeriti PAHide, PCBdega. Palanikumar *et al.* (2012) töös leiti antratseeni puhul GSH tasemete tõus, aga benzo(a)püreeni korral langus võrreldes kontrolliga, lisaks suurimat GSH tõusu märgati antratseeni kõrgeima kontsentratsiooni puhul seljauime lihastes, kuid maksa GSH tasemeid ei mõõdetud. Kahes laborikatses kanalisägaga ja vikerforelliga, kus kalad oli eksponeeritud PAHide ja PCBdega, olid tõusnud maksa GSSG tasemed (van der Oost *et al.* 2003). Stephensen *et al.* (2003) töös leiti kõrgeim kogu glutatiooni tase kalade maksas pärast kahte nädalat, millal kalu oli hoitud koos autorehvidega akvaariumis. Kusjuures praeguse tööga võrreldes olid tGSH tasemed maksas kuni 160 korda kõrgemad. Kokkupuutel pestitsiididega, leiti kalade maksas vähenenud GSH tasemed võrreldes kontrolliga (Falfushynska *et al.* 2012). Seevastu Stephensen *et al.* (2002) töös oli kalade maksas kogu glutatiooni tase tõusnud võrreldes kontrolliga pärast eksponeerimist pestitsiidiga, samuti leiti nõrk GSSG taseme tõus madalama doosi korral.

Võrreldes praeguse tööga olid Stephensen *et al.* (2002) töös tGSH tasemed isegi kuni 200 korda kõrgemad. Zhang *et al.* (2004) töös tõusis oluliselt GSH tase kalade maksas pärast lühiajalist (2 päeva) eksponeerimist diislikütusega, eksponeerimise jätkudes hakkas GSH tase aeglaselt langema ja tõusis taas umbes 25 päeva pärast. Almroth *et al.* (2008a) töös, kus uuriti reoveepuhastite heitvee mõjusid vikerforellile, leiti ühes piirkonnas statistiliselt oluliselt tõusnud kogu glutatiooni tase, GSSG tase ja tGSH/GSSG suhe kalade maksas võrreldes kontrollalaga. See näitab, et need kalad kannatasid oksüdatiivse stressi all (Almroth *et al.* 2008a). Järgmises töös, kus uuriti PAHide ja raskmetallide mõju kaladele, leiti, et PAHidega saastunud alal tGSH langes kalade maksas võrreldes referentsalaga, seejuures GSSG/tGSH suhe jäi muutumatuks, GSSG

mõnevõrra langes. Samas raskemetallidega saastunud alal ei leitud erilist tõusu tGSH, GSSG, tGSH/GSSG puhul võrreldes referentsalaga (Almroth *et al.* 2008b). Praeguse tööga võrreldes olid Almroth *et al.* (2008b) töös nii raskemetallidega kui PAHidega reostunud alal maksa tGSH tasemed isegi kuni 90 korda kõrgemad. Farombi *et al.* (2007) töös, kus uuriti jõe reostust oksüdatiivse stressi markerite kaudu kalades, oli GSH tase maksas tõusnud statistiliselt oluliselt võrreldes kontrollalaga. Kokku paarikümnes laborikatses ja välitöös, mis uuris GSH tasemeid reostunud keskkonnast pärit kalades, leiti enamikul kas kõrgeenenud GSH tase või olulist tõusu ei leitud (van der Oost *et al.* 2003).

Siin väljatoodud tööde põhjal võib järeldada, et üldjuhul on GSH tasemed kalade lihastes väiksemad kui maksas ning ka praeguse töö tGSH tasemed on üsna madalad. tGSH tasemete ajalises dünaamikas kindlaid (statistiliselt olulisi) trende ei leitud, kuid märgata oli langevat trendi. Praeguse töö korral tGSH tasemed tõusid võrreldes kontrolliga, nende tasemed olid statistiliselt oluliselt erinevad kontrollist nii püreeni kui ka naftaleeni puhul, seega need kalad kannatasid oksüdatiivse stressi all. Leiti ka tGSH tasemete ja kala suuruse korrelatsioon püreeni puhul. Tuginedes van der Oosti *et al.* (2003) tööle, hinnates biomarkereid kuue erineva kriteeriumi põhjal, siis faas II ensüümid (nt. GSH) said neli punkti kuuest. Seega võib kokkuvõttes öelda, et tGSH tasemete mõõtmine kalades on potentsiaalne biomarker keskkonna reostuse määramisel, kuid peab arvestama erinevate looduslike varieeruvuste tingimustega, praeguse töö puhul kala suurusega.

Kokkuvõte

Keskkonda satuvad pidevalt inimtekkelised (näiteks tööstusest, asulatest) ja looduslikud toksilised ained. Keskkonda paisatakse erinevaid orgaanilisi saasteaineid nagu PCB, PAH, kloororgaanilised pestitsiidid. Keskkonnariskide hindamine ainult toksiliste ainete kontsentratsioonide järgi keskkonnas pole piisav. Seetõttu on väljatöötatud erinevad biomarkerid, mis võimaldavad kasutusele võtta ennetus- ja parandusmeetmeid. Siiski, usaldusväärseid biomarkereid kiireks keskkonnaseisundi hindamiseks on vähe. Küsimusi ja erimeelsusi on tekitanud mitmete biomarkerite usaldusväärsus (nt EROD test, LSI).

Töö eesmärgiks oli uurida kahe levinud polütsükliilise aromaatses süsivesiniku (PAH), naftaleeni ja püreeni metabolismi kuldkogres (*Carassius carassius*) biomarkerite kaudu ja iseloomustada metabolismi dünaamikat ning biomarkeritena levinud EROD aktiivsuse, sapi metaboliitide, glutatiooni efektiivsust ning usaldusväärset tuvastamaks toksiliste ainetega kokkupuudet kalades.

Kalad jaotati nelja gruppi: kontrollgrupp 1 (20 kala), süstimata; kontrollgrupp 2 (15 kala), kellele süstiti maisiõli; kogred, keda süstiti naftaleeniga (41 kala); kogred, keda süstiti püreeniga (41 kala). Kaladelt võeti sapi-, maksa- ja lihaproovid. Vastavalt mõõdeti sapi metaboliitide tasemed, EROD aktiivsus ja kogu glutatiooni kontsentratsioonid.

Antud töö käigus kaladest EROD aktiivsust ei tuvastatud. Selle põhjuseks võib olla naftaleeni ja püreeni suutmatus seonduda struktuurselt Ah- retseptoriga, välistada ei saa liigispetsiifilist mõju ja doosist sõltuvat EROD mitteaktiivsust. Sapi metaboliitide kontsentratsioonide ajalises dünaamikas leiti naftaleeni puhul langev ja püreeni puhul tõusev trend, mis võib olla tingitud ainete erinevast lipofiilsusest. Gruppide omavahelises võrdluses oli sapi metaboliitide tase kõrgeim püreeni korral ja see erines statistiliselt oluliselt kontrollgrupp 1. See näitab biotransformatsiooniprotsessi toimumist ja eksponeeritust PAHidele. Kogu glutatiooni tasemete ajalises dünaamikas kindlat trendi ei leitud. Gruppide võrdluses oli kogu glutatiooni tase kõrgeim püreeni puhul, kuid kontrollist erinesid statistiliselt oluliselt tGSH tasemed nii püreeni kui ka naftaleeni korral. See näitab, et kalad kannatasid oksüdatiivse stressi all. Leiti ka tGSH tasemete ja kala suuruse korrelatsioon püreeni puhul. Praeguses töös olid sapi metaboliitide ja glutatiooni tasemed kindlateks PAHide eksponeeringu markeriteks, kuid EROD aktiivsus seda ei kinnitanud.

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biotransformation dynamics: experiment with crucian carp (*Carassius carassius*).

The environment is continuously loaded with anthropogenic (from industries and urban communities) and natural toxic substances. Many different organic pollutants are released into the environment, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), PAHs, organochlorine pesticides. It is not sufficient assessing environmental risks only according to concentrations of pollutants in the environment. Therefore, different biomarkers has been developed, which enable to apply preventive and remedial actions. However, reliable biomarkers for quick assessment of environmental health are still lacking. Questions and disagreements have arisen about the reliability of several biomarkers (for example EROD test, LSI).

The aim of the thesis was to study the metabolism of the two prevalent polycyclic hydrocarbons (PAH), naphthalene and pyrene in crucian carp (*C. carassius*), through biomarkers and to describe metabolism dynamics. Also, to characterize widely used biomarkers EROD activity, bile metabolites, glutathione efficiency and reliability to detect pollutant exposure in fishes.

Fishes were divided into four groups: control group 1 (20 fishes), not injected; control group 2 (15 fishes), injected with corn oil; fishes injected with naphthalene (41 fishes); fishes injected with pyrene (41 fishes). Fishes were measured, weighted and bile, liver and muscle samples were collected. Accordingly bile metabolite levels, EROD activity and total glutathione concentrations were measured.

In this thesis EROD activity was not detected in fishes. This may be due to the naphthalene and pyrene inability to bind structurally to Ah receptor, also species-specific and dose-dependent effect on EROD can not be excluded. In bile metabolites concentration dynamics were found in case of naphthalene a decreasing trend and in case of pyrene a rising trend, which may be due to substances different lipophilicity. When comparing groups, the highest bile metabolite levels were in case of pyrene, it differed significantly from control group 1 levels. It shows that the biotransformation occurs and exposure to PAHs. In the total glutathione level dynamics a particular trend was not found. When comparing groups, the highest total glutathione

level was in case of pyrene, but tGSH levels differed from control levels significantly in case of pyrene and naphthalene. This demonstrates that fishes suffered from oxidative stress. There was also found a correlation between tGSH levels and fish size in case of pyrene. In the current work biliary metabolites and glutathione levels were reliable biomarkers assessing exposure to PAHs, but this was not confirmed in case of EROD activity.

Tänuavaldused

Täna oma juhendajaid õige teema leidmisel ja igakülgse nõu ning abi eest katse läbiviimisel ja töö valmimisel. Suured tänud Marko Vissele, kes viis läbi glutatiooni mõõtmised. Samuti tahan tänada Eesti Maaülikooli Limnoloogiakeskust ja Vanemuise 21 laborit, kes võimaldasid katseruumid ja – vahendid.

Kasutatud kirjandus

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O. K. 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic toxicology* 51: 241 – 258.
- Adedeji, O., Okerentugba, P., Okonko I. 2012. Use of molecular, biochemical and cellular biomarkers in monitoring environmental and aquatic pollution. *Nature and Science* 10: 83-104.
- Almroth, B., Albertsson, E., Sturve, J., Förlin, L. 2008a. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 370–378.
- Almroth, B., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T., Förlin, L. 2008b. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine Environmental Research* 66: 271–277.
- Amutha, C., Bupesh, G., Ramesh, R., Kavitha, P., Subramanian, P. 2009. Cytochrome P450-dependent mixed function oxidases (MFO) system dynamics during the poly aromatic hydrocarbon (PAH) metabolism in green mussel *Perna Viridis* (Linnaeus, 1758). *Environmental Bioindicators* 4: 97–116.
- Barron, M., Heintz, R., Rice, S. 2004. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58: 95–100.
- Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N., Segner, H. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 632-643.
- Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F. 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology* 85: 167–175.
- Beyer, J., Jonsson, G., Porte, C., Krahn, M., Ariese, F. 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30: 224–244.
- Blaha, L., Kopp, R., Šimkova, K., Mareš, J. 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria Brno* 73: 477–482.
- Bosveld, A., de Bie, P., van den Brink, N., Jongepier, H., Klomp, A. 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* 49: 75–83.

- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J., Schäffer, A., Hecker, M., Wölz, J., Schüttrumpf, H., Hollert, H. 2013. How flood events affect rainbow trout: evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquatic Toxicology* 128–129: 13–24.
- Dévier, M., Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Menach, L., Burgeot, T., Budzinski, H. 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research* 20: 708-722.
- Douben, P. (toimetaja). 2003. PAHs: An ecotoxicological perspective. *Ecological and Environmental Toxicology Series*: 297-328.
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Stoliar, O. 2012. Population-related molecular responses on the effect of pesticides in *Carassius auratus gibelio*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 155: 396–406.
- Farombi, E., Adelowo, O., Ajimoko, Y. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun river. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4: 158-165.
- Fent, K., Bätcher, R. 2000. Cytochrome P4501 A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepastoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2047–2058.
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilan, J., Barra, R. 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61: 192–199.
- Gagnon, M., Holdway, D. 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and chemically dispersed crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 70–77.
- Galvan, I., Alonso-Alvarez, C. 2008. An intracellular antioxidant determines the expression of a melanin-based signal in a bird. *PLOS ONE* 3.
- Goksoyr, A., Förlin, L. 1992. The cytochrome P-450 System in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22: 287-312.
- Güngördü, A. 2011. Evaluation of PAH metabolites in bile of common carp, *Cyprinus carpio* L. with fixed wavelength fluorescence in a field and laboratory study. *Polycyclic Aromatic Compounds* 31: 84-96.
- Hansson, T., Lindesjö, E., Förlin, L., Balk, L., Bignert, A., Larsson, A. 2006. Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows

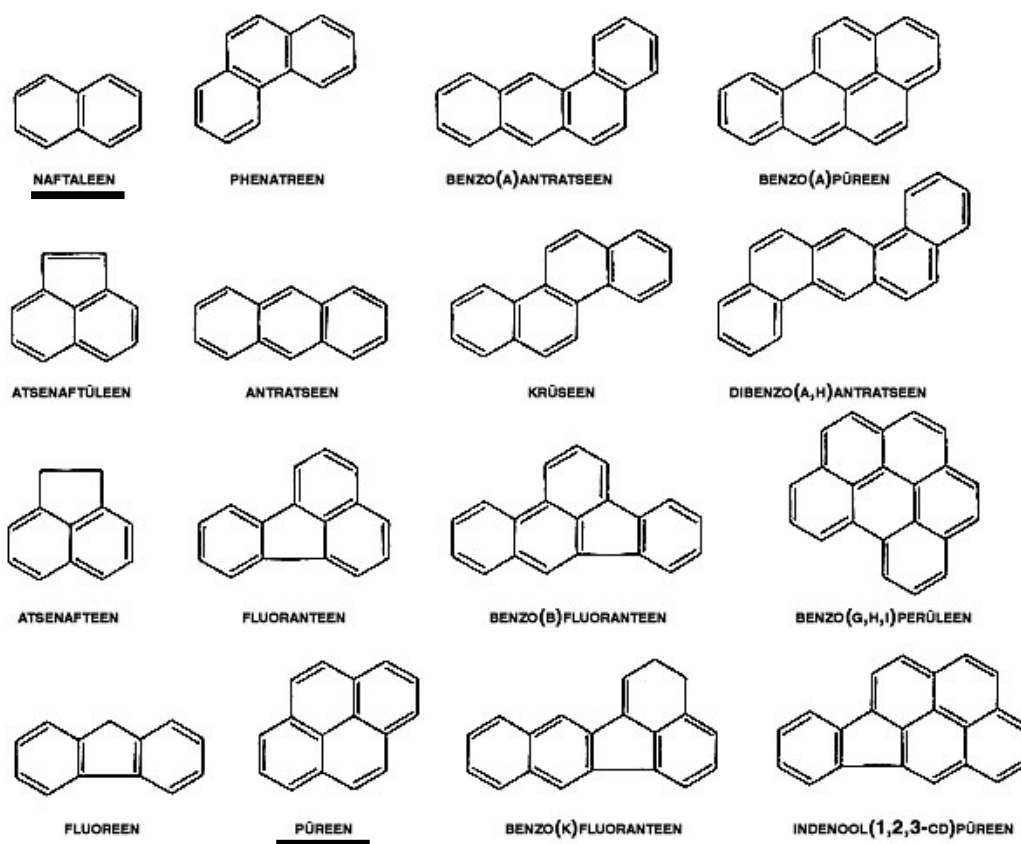
- decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. *Aquatic Toxicology* 79: 341-355.
- Hedman, J., Rudel, H., Gercken, J., Bergek, S., Strand, J., Quack, M., Appelberg, M., Förlin, L., Tuvikene, A., Bignert, A. 2011. Eelpout (*Zoarces viviparus*) in marine environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2015–2029.
- HELCOM, 2010. Hazardous substances in the Baltic Sea – An integrated thematic assessment of hazardous substances in the Baltic Sea. *Baltic Sea Environment Proceedings No. 120 B*.
- Hunt., T. 2012. Eesti kalad. Kirjastus Varrak.
- Ikenaka, Y., Oguri, M., Saengtienchai, A., Nakayama, S., Ijiri, S., Ishizuka, M. 2013. Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: Unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish species. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 567-578.
- Incardona, J., Day, H., Collier, T., Scholz, N. 2006. Developmental toxicity of 4 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217: 308–321.
- Ioannides, C. 2010. Xenobiotic metabolism. *Eurotox, Basic Toxicology Course*: 36-44.
- Kammann, U., Brinkmann, M., Freese, M., Pohlmann, J., Stoffels, S., Hollert, H., Hanel, R. 2014. PAH metabolites, GST and EROD in European eel (*Anguilla anguilla*) as possible indicators for eel habitat quality in German rivers. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 2519–2530.
- Kirby, M., Hurst, M., Kelly, C., Kirby, S., Neall, P., Tylor, T., Morris, S., Matthiessen, P. 2000. EROD and ChE measurements in flounder (*Platichthys flesus*) as monitoring tools in English estuaries. *ICES Annual Science Conference, Bruges*.
- Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1296–1302.
- Kreitsberg, R., Baršiene, J., Freiberg, R., Andreikenaite, 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.
- Kreitsberg, R., Tuvikene, A., Baršiene, J., Fricke, N., Rybakovas, A., Andreikenaite, L., Rumvolt, K., Vilbaste, S. 2012. Biomarkers of environmental contaminants in the coastal waters of Estonia (Baltic Sea): effects on eelpouts (*Zoarces viviparus*). *Journal of Environmental Monitoring* 14: 2298-2308.
- Kubrak, O., Husak, V., Rovenko, B., Poigner, H., Mazepa, M., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V. 2012. Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney

- and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology* 118-119: 88-96.
- Lee, R., Anderson, J. 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin* 50: 705–723.
- Lu, G., Wang, C., Zhu, Z. 2009. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 194-199.
- Lushchak, V., Bagnyukova, T., Husak, V., Luzhna, L., Lushchak, O., Storey, K. 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1670–1680.
- Miller, P., Loates, M. 1997. Euroopa kalad. Eesti Entsüklopeediakirjastus.
- Nagel, F., Kammann, U., Wagner, C., Hanel, R. 2012. Metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bile as biomarkers of pollution in European eel (*Anguilla anguilla*) from German rivers. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 62: 254–263.
- Nahrgang, J., Brooks, S., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T., Lukina, J., Frantzen, M., Giarratano, E., Renaud, P. 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology* 127: 21–35.
- Palanikumar, L., Kumaraguru, A., Ramakritinan, C., Anand, M. 2012. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75: 187–197.
- Pathiratne, A., Hemachandra, C., Pathiratne, K. 2010. Assessment of bile fluorescence patterns in a tropical fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to naphthalene, phenanthrene, pyrene and chrysene using fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84: 554–558.
- Pena-Llopis, S., Pena, J., Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M. 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere* 45: 671-681.
- Pikkarainen, A.-L. 2006. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC. *Chemosphere* 65: 1888-1897.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 1: 3159-3165.

- Richardson, D., Davies, I., Moffat, C., Pollard, P., Stagg, R. 2001. Biliary PAH metabolites and EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) from a contaminated estuarine environment. *Journal of Environmental Monitoring* 3: 610-615.
- Sollid, J., Kjærnsli, A., De Angelis, P., Røhr, Å., Nilsson, G. 2005. Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289: R1196–R1201.
- Stagg, R., McIntosh, A. 1998. Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 23.
- Stephensen, E., Adolfsson-Erici, M., Celander, M., Hulander, M., Parkkonen, J., Hegelund, T., Sturve, J., Hasselberg, L., Bengtsson, M., Förlin, L. 2003. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2926-2931.
- Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 435–442.
- Zhang, J., Wang, X., Guo, H., Wu, J., Xue, Y. 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 110–116.
- Zhang, Y., Tao, S. 2009. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43: 812–819.
- Tairova, Z., Strand, J., Chevalier, J., Andersen, O. 2012. PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparus*) from Danish waters. *Marine Environmental Research* 75: 45-53.
- Tuvikene, A. 1997. Assessment of inland water pollution using biomarker responses in fish in vivo and in vitro. *Tartu*, 55.
- Tuvikene, A., Huuskonen, S., Roy, S., Lindström-Seppä, P. 1996. Biomonitoring of South Estonian waters by means of xenobiotic metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114C: 171-177.
- Tuvikene, A. 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici* 32: 295-309.
- Valdehita, A., Fernández-Cruz, M., Torrent, F., Sericano, J., Navas, J. 2012. Differences in the induction of cyp1A and related genes in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Additional considerations for the use of EROD activity as a biomarker. *Journal of Fish Biology* 81: 270–287.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.

- van Metre, P., Mahler, B., Furlong, E. 2000. Urban sprawl leaves its PAH signature. *Environmental Science and Technology* 34: 4064–4070.
- Vuorinen, P., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Baršiene, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D. 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53: 479–487.
- Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S., Peakall, D. 2012. Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition. *CRC Press Taylor & Francis Group*.
- Wang, Y., Zheng, R., Zuo, Z., Chen, Y., Wang, C. 2008. Relation of hepatic EROD activity and cytochrome P4501A level in *Sebastiscus marmoratus* exposed to benzo[a]pyrene. *Journal of Environmental Sciences* 20: 101–104.
- Whyte, J., Tillitt, D. 2000. EROD Activity. *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems*: 5-8.
- Wölz, J., Borck, D., Witt, G., Hollert, H. 2009. Ecotoxicological characterization of sediment cores from the western Baltic Sea (Mecklenburg Bight) using GC-MS and in vitro biotests. *Journal of Soils and Sediments* 9: 400-4.

LISA 1.



Joonis 1. EPA (US Environmental Protection Agency) ja WHO (World Health Organisation) poolt välja toodud 16 kõige prioriteetsemat PAHi struktuuri (Tuvikene 1995).

LISA 2.

Tabel 1. Naftaleeni ja püreeeni vastavad kaladesse süstitavad lahuste mahud. Kontsentratsiooniks kalas on 1 mg/kg.

Kala mass (g)	Süstida (µl)
3	15
4	20
5	25
6	30
7	35
8	40
9	45
10	50
11	55
12	60
13	65
14	70
15	75

LISA 3.

Tabel 2. Analüüsitud kalade andmestik, kus CV tähistab kontroll 1 vasakut akvaariumi ja CP paremat. C2 tähistab kontroll kahte. N ja P tähistavad vastavalt naftaleeniga ja püreeniga süstitud kalade proove. tGSH on kogu glutatioon (*total glutathione*). Sapi metaboliidid on avaldatud fluorestsentsühikutena (FÜ).

Kood	Kuupäev	Kogupikkus (mm)	Sabata pikkus (mm)	Kogukaal (g)	Sapi metaboliidid (kahetuumsed)	Sapi metaboliidid (neljatuumsed)	tGSH (nmol/g)
CV-1	4.06.2012	67	52	3,04			105,73
CV-2	4.06.2012	92	72	10,46			
CV-3	5.06.2012	72	55	3,71			92,79
CV-4	5.06.2012	65	50	2,95			
CV-5	6.06.2012	118	94	16,9	177,8	6,5	
CV-6	6.06.2012	80	65	6,45			115,23
CV-7	7.06.2012	70	54	3,9	192,9	9,3	
CV-8	7.06.2012	78	60	4,75	70,6	7,6	
CV-9	8.06.2012	110	80	15,4			61,55
CV-10	8.06.2012	74	57	3,78			
CP-1	4.06.2012	97	78	14,15			124,89
CP-2	4.06.2012	70	55	3,95			105,22
CP-3	5.06.2012	96	78	12,75			
CP-4	5.06.2012	69	54	3,75			
CP-5	6.06.2012	67	54	3,65			
CP-6	6.06.2012	77	60	5,58	163,7	8,8	122,13
CP-7	7.06.2012	109	88	15,91	145,6	15,4	
CP-8	7.06.2012	106	84	10,46			
CP-9	8.06.2012	90	74	9,17			99,35
CP-10	8.06.2012	68	53	3,4	237,1	8,2	
C2-1	19.06.2012	110	85	16,6	231,3	8,6	
C2-2	19.06.2012	70	54	3,97			
C2-3	19.06.2012	70	55	3,57			
C2-4	20.06.2012	65	50	2,88			
C2-5	20.06.2012	100	78	11,45	97,7	16,4	
C2-6	20.06.2012	74	68	4,1			
C2-7	21.06.2012	79	60	5,14			
C2-8	21.06.2012	99	79	11,27	359,9	20	
C2-9	21.06.2012	64	50	2,59			
C2-10	22.06.2012	78	61	5,5			
C2-11	22.06.2012	69	55	3,48			
C2-12	22.06.2012	73	57	4,41			
C2-13	23.06.2012	64	48	2,66			
C2-14	23.06.2012	54	41	1,46			
C2-15	23.06.2012	65	51	2,7			

Järg tabelile 2 (2)

Kood	Kuupäev	Kogupikkus (mm)	Sabata pikkus (mm)	Kogukaal (g)	Sapi metaboliidid (kahetuumsed)	Sapi metaboliidid (neljatuumsed)	tGSH (nmol/g)
N1	20.06.2012	99	70	7,75	278,8		173,91
N2	20.06.2012	64	49	2,37			135,77
N3	20.06.2012	93	75	9,66	266,4		
N4	20.06.2012	120	100	22,25			
N5	20.06.2012	110	89	17,74	228,1		143,36
N6	20.06.2012	67	50	2,44			
N7	20.06.2012	72	58	4,02			
N8	21.06.2012	109	88	16,4	203,3		
N9	21.06.2012	99	79	10,06			
N10	21.06.2012	62	48	2,47			167,87
N11	21.06.2012	112	87	15,16			138,36
N12	21.06.2012	60	46	1,88			
N13	21.06.2012	76	60	4,39			
N14	21.06.2012	100	80	11,92			
N15	22.06.2012	64	48	2,35			
N16	22.06.2012	97	76	11,05	225		
N17	22.06.2012	65	49	2,61			115,92
N18	22.06.2012	70	55	2,99			
N19	22.06.2012	70	54	3,27			
N20	22.06.2012	69	55	3,75			
N21	22.06.2012	65	50	3,12			
N22	23.06.2012	62	49	1,65	152,4		27,37
N23	23.06.2012	65	49	2,43			
N24	23.06.2012	67	53	2,48			
N25	23.06.2012	62	50	2,1			
N26	23.06.2012	65	50	3,06			
N27	23.06.2012	70	54	3,48			122,99
N28	23.06.2012	70	55	3,95			
N29	24.06.2012	54	40	1,74			134,04
N30	24.06.2012	54	40	1,74			
N31	24.06.2012	74	57	3,53			
N32	24.06.2012	61	47	2,39			
N33	24.06.2012	55	43	1,95			127,48
N34	24.06.2012	66	50	2,55			
N35	24.06.2012	61	48	2,25			
N36	25.06.2012	59	42	1,7			
N37	25.06.2012	53	40	1,6			154,75
N38	25.06.2012	53	41	1,41			
N39	25.06.2012	61	47	2,26			
N40	25.06.2012	49	39	1,37			
N41	25.06.2012	50	39	1,21			154,23

Järg tabelile 2 (3)

Kood	Kuupäev	Kogupikkus (mm)	Sabata pikkus (mm)	Kogukaal (g)	Sapi metaboliidid (FÜ)	tGSH (nmol/g)
P1	20.06.2012	98	78	13,44		151,47
P2	20.06.2012	65	50	2,64		49,47
P3	20.06.2012	120	99	19,53	4923,1	
P4	20.06.2012	110	89	19,79	1249,1	
P5	20.06.2012	90	73	9,77	3334,1	
P6	20.06.2012	70	53	4,38		
P7	20.06.2012	99	89	12,41	8324,1	191,17
P8	21.06.2012	110	89	16,25	5952,1	
P9	21.06.2012	72	60	4,33		206,19
P10	21.06.2012	84	65	7,23		
P11	21.06.2012	109	90	14,35	19142,5	
P12	21.06.2012	76	59	5,41		
P13	21.06.2012	104	84	14,25		177,36
P14	21.06.2012	82	66	6,78		
P15	22.06.2012	70	52	4		
P16	22.06.2012	134	110	26,01	25272,5	
P17	22.06.2012	81	64	6,97		
P18	22.06.2012	69	54	3,37		154,23
P19	22.06.2012	80	64	6,1		
P20	22.06.2012	76	60	5,1		
P21	22.06.2012	72	56	4		
P22	23.06.2012	70	55	3,46		
P23	23.06.2012	69	55	3,12		
P24	23.06.2012	74	58	4,43	17335,1	142,33
P25	23.06.2012	69	52	3,48	22095,1	
P26	23.06.2012	66	53	3,3		
P27	23.06.2012	75	58	4,88		226,9
P28	23.06.2012	70	59	3,23		
P29	24.06.2012	65	50	2,67		
P30	24.06.2012	60	50	2,81		
P31	24.06.2012	71	56	3,91		102,97
P32	24.06.2012	68	53	3,56		
P33	24.06.2012	65	50	3,04		
P34	24.06.2012	66	51	2,83		
P35	24.06.2012	59	47	2,58	19207,5	
P36	25.06.2012	64	49	2,63		136,46
P37	25.06.2012	69	52	3,29		
P38	25.06.2012	68	52	2,67		
P39	25.06.2012	53	41	1,81		140,25
P40	25.06.2012	69	52	3,28		
P41	25.06.2012	69	53	3,26		129,38

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merle Raig

(sünnikuupäev: 14.11.1987)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike (PAH) biotransformatsiooni dünaamika: eksperiment
kuldkogrega (*Carassius carassius*),

mille juhendajad on PhD Randel Kreitsberg ja PhD Arvo Tuvikene

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014