

Pro gradu -tutkielma

**Ympäristöestrogeniseoksen yhteisvaikutus 20dpfZF -
seeprakalan vitellogeniinigeenin ilmentymiseen**

Kirsikka Sillanpää



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

22.11.2011

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede ja -teknologia

Sillanpää Kirsikka: Ympäristöestrogeniseoksen yhteisvaikutus 20dpfZF -
seeprakalan vitellogeniinigeenin ilmentymiseen
Pro gradu -tutkielma: 60 s.
Työn ohjaajat: Professori Aimo Oikari, MSc. Tarini Sahoo
Tarkastajat: Professori Aimo Oikari, FT Eeva-Riikka Vehniäinen
Marraskuu 2011

Hakusanat: Seeprakala, vitellogeniini, mRNA, kvantitatiivinen PCR, nuoret yksilöt, bisfenoli A, nonyylifenoli, oktyylifenoli, etinyyliestradioli

TIIVISTELMÄ

Ihmisten toimesta ympäristöön joutuvien vierasaineiden vaikutukset hormonitoimintaan ovat viime vuosina herättäneet paljon keskustelua. Yksi alan tutkituimmista aihealueista on estrogeenin kaltaisesti vaikuttavien aineiden eli ympäristöestrogenien aiheuttamat lisääntymis- ja kehityshäiriöt. Estrogeenisia vaikutuksia voidaan tutkia monella tapaa, alkaen solutason vasteista populaatiokehitykseen. Yksi paljon käytetty molekyyli-markkeri on kalojen vitellogeniinitason mittaaminen. Vaikka normaalioloissa vain naaraat tuottavat vitellogeniiniä, estrogeenialtistuksen vaikutuksesta myös koiraat ja nuoret yksilöt voivat sitä tuottaa. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin kolmen ympäristöestrogenin, bisfenoli A:n, nonyylifenolin ja oktyylifenolin vaikutusta 20 dpf ikäisten eli hedelmöityksestä lukien 20 vuorokauden ikäisten seeprakalojen (20dpfZF) vitellogeniinin mRNA:n tuottoon. Viisipäiväiset altistuskokeet veteen lisätyillä aineilla tehtiin sekä yksittäin että kolmen aineen NOEC-arvojen seoksena. Tavoitteena oli myös selvittää 20dpfZF-mallin tehokkuutta käytettäessä vitellogeniinivastetta.

Tulosten perusteella 20dpfZF-malli sopii ympäristöestrogenien testaamiseen vitellogeniinivasteen avulla, sillä positiivisena kontrollina käytetty etinyyliestradioli aiheutti selkeän annos-vasteriippuvuuden. Bisfenoli A lisäsi vitellogeniinin mRNA:n tuottoa korkeimmalla altistetulla pitoisuudella 2000 µg/l, mutta nonyylifenolilla tai oktyylifenolilla ei ollut yksittäin vaikutusta. Yksittäisten annos-vastekokeiden sekä kirjallisuusarvojen perusteella yhteisvaikutuskokeessa käytettiin bisfenoli A:n 500 µg/l, nonyylifenolin 50 µg/l ja oktyylifenolin 20 µg/l pitoisuuksia. Kolmen aineen NOEC-arvojen seoksen vaikutus oli pienempi kuin bisfenoli A:n vaikutus yksittäin.

Ympäristöestrogenien aiemmissä tutkimuksissa on yhteisvaikutuksen todettu suurin piirtein noudattavan konsentraatioihin perustuvaa summavaikutusmallia, mutta poikkeuksiakin siitä on, kuten osoitti myös tämän työn tulos. Silti kemikaalivalvonnan lainsäädännössä pääsääntöisesti huomioidaan aineiden vaikutukset yksittäin, vaikka ympäristössä aineet esiintyvät monen aineen seoksina. Riskinarvioinnissa tulisi huomioida myös tämä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science and Technology

Sillanpää Kirsikka: The joint effect of environmental estrogens on vitellogenin gene expression in 20dpfZF zebrafish
Master thesis: 60 p.
Supervisors: Professor Aimo Oikari, MSc. Tarini Sahoo
Inspectors: Professor Aimo Oikari, PhD Eeva-Riikka Vehniäinen
November 2011

Key words: zebrafish, vitellogenin, mRNA, quantitative PCR, juvenile, bisphenol A, nonylphenol, octylphenol, ethinylestradiol.

ABSTRACT

The effect that natural and synthetic chemicals might have on endocrine system has evoked much discussion in past few years. One of the most studied subjects in this field has been the action of environmental estrogens on reproduction and development. Estrogenic potencies can be studied by several means starting from cell level responses to effects on population structure. Vitellogenin (vtg) induction of fish is a well-known biomarker for estrogenic responses. In normal conditions only females produce vitellogenin, but under the influence of estrogenic substances also males and juveniles may show this response. In this thesis work the effects of three environmental estrogens, bisphenol A, nonylphenol and octylphenol, were investigated using vitellogenin mRNA induction by 20dpfZF zebrafish as the endpoint. The work was carried out as five-day exposures in water, first as single substance dose-response exposures and afterwards as a mixture exposure for the NOEC-values of the single substances. The aim was also to study if the 20dpfZF model is qualified to use in environmental estrogen studies with vtg-induction as an endpoint.

According to the results, the 20dpfZF model was appropriate for estrogenic studies since the positive control, ethinylestradiol, caused a clear dose-related response. Bisphenol A affected vtg mRNA induction in concentration 2000 µg/l, but nonylphenol and octylphenol didn't have statistically significant effect. Based on the results of single dose-response exposures and literature values, a joint exposure using the NOEC-values of the three chemicals (500 µg/l bisphenol A, 50 µg/l nonylphenol and 20 µg/l octylphenol) was conducted. In this mixture composition the effect of bisphenol A alone was greater than the joint effect.

The mixture effect of environmental estrogens often deviates from sum effect. In previous studies made with estrogenic mixtures it has been observed them to follow the concentration addition model, although not exclusively, as was also evident in this work. The current practices of risk assessment and regulation of chemicals are based on tests made with single substances. In the environment, chemicals exist always as a part of a mixture, and this should also be noted in legislation.

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
Työn tavoitteet.....	11
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	11
2.1 Koe-eläinten ylläpito	11
2.2 Koeasetelmat	14
2.3 Vesinäytteiden koepitoisuuksien analysointi	17
2.4 mRNA:n analysointi kvantitatiivisellä PCR:llä	20
2.5 Proteiinianalyysi Western-blot menetelmällä	23
3 TULOKSET	28
3.1 Pitoisuus koevesissä	28
3.2 Kuolleisuus.....	30
3.2 Referenssigeenin luotettavuus.....	31
3.3 Etinyyliestradiolin vaikutus 20dpfZF-kaloilla	32
3.4 Vitellogeniinivasteen annos-vastekokeet: NP, BPA ja OP	34
3.5 Yhteisvaikutuskokeet	36
3.6 Proteiinimittauksen kehittäminen.....	37
4 TULOSTEN TARKASTELU	38
4.1 Koeolosuhteiden arviointi	38
4.2 Kemikaalien altistuspitoisuudet vedessä.....	39
4.3 Etinyyliestradiolin annos-vasteisuus 20dpfZF-kaloilla.....	40
4.4 Yksittäisten ympäristöestrogenien annos-vasteisuus	41
4.5 Ympäristöestrogenien yhteisvaikutus.....	44
4.6 Vitellogeniinivaste biomarkkerina: 20dpfZF-malli	46
4.7 Seeprakalan varhaiset poikasvaiheet koe-eläiminä.....	48
4.8 Vtg-geeniekspression kvantitatiivinen PCR	50
4.9 Ympäristöestrogenien yhteisvaikutus riskinarvioinnissa	50
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	53
LÄHDELUETTELO	54

LYHENNELUETTELO

20dpfZF = seeprakalan 20 dpf ajankohdan kehitysvaihe

BCF = biokertymisen kerroin (bioconcentration factor)

BPA = bisfenoli A (bisphenol A)

DNEL = johdettu ei-vaikuttava pitoisuus (derived no-effect concentration/level)

dpf = päivää hedelmöittymisen jälkeen (days post fertilization)

dph = päivää kuoriutumisen jälkeen (days post hatching)

E₂ = estradioli-17β

EE₂ = 17α-etinyyliestradioli

EDC = hormonitoimintaa häiritsevä aine (endocrine disrupting compound)

ER = estrogeenireseptori

hpf = tuntia hedelmöittymisen jälkeen (hours post fertilization)

LOEC = alin vaikuttava pitoisuus (lowest observed effect concentration)

NOEC = ylin ei-vaikuttava pitoisuus (no observed effect concentration)

NP = nonyylifenoli

OP = oktyylifenoli

PNEC = ennustettu ei-vaikuttava pitoisuus (predicted no-effect concentration)

VTG/vtg = vitellogeniini (proteiini/geeni)

1 JOHDANTO

Viime vuosisadan puolivälistä lähtien keskustelu kemikaalien ympäristöongelmista on lisääntynyt jatkuvasti. Eräänlaisena ympäristöajattelun herättäjänä pidetään Rachel Carsonin kirjaa *Äänetön kevät* (1962), joka toi keskusteluun ihmisten toimesta ympäristöön päätyvien kemianteollisuuden aineiden ongelmat. Kirja, joka käsitteli hyönteismyrkkyjen aiheuttamia selkärankaisten lisääntymisongelmia, herätti ajattelemaan, miten ihmisen toiminnalla voi olla kauaskantoisia vaikutuksia myös muihin eliöpopulaatioihin. Samoihin aikoihin nousi esiin myös muita ympäristöuhkia öljyonnettomuuksien ja pienentyneiden villieläinpopulaatioiden saadessa huomiota julkisessa keskustelussa. 1960-lukua pidetäänkin ympäristöajattelun heräämisen kautena (Botkin & Keller 2010).

1970-luvulla keskusteluun nousi erityisesti luonnonvarojen riittävyys öljykriisin ja Rooman klubin ”Kasvun rajat” -kirjan myötä. 70-luvulla myös kansainvälinen ympäristöpolitiikka käynnistyi kunnolla kansainvälisten sopimusten muodossa, ja esimerkiksi vuonna 1972 perustettiin YK:n ympäristöohjelma UNEP. Sama trendi jatkui 1980-luvulla, jolloin varsinkin laajat globaalit ongelmat, kuten otsonikato, olivat keskustelun keskipisteessä (Hakala & Välimäki 2003). Sen sijaan hieman yllättäen keskustelu vierasaineiden aiheuttamista ongelmista hiljeni muiden ympäristöongelmien noustessa esiin. 1990-luvulla vierasaineiden vaikutus hormonitoimintaan ja siten mahdollisiin lisääntymisongelmiin nousi taas yleiseen keskusteluun mm. Theo Colbornin kirjan ”Our Stolen Future” ilmestyessä 1996 (Mills & Chichester 2005). Vaikka ilmastonmuutos ja luonnonvarojen riittävyys ovatkin hallinneet ympäristökeskustelua 2000-luvulla, on vierasaineiden vaikutus erityisesti ihmisten kehitys- ja lisääntymisongelmiin herättänyt runsasta huolta ja pohdintaa.

Tästä seuraten viime vuosikymmeninä myös tutkimus lisääntymiskykyä ja hormonitoimintaa häiritsevien aineiden (EDC, endocrine disrupting chemical) vaikutuksista on lisääntynyt (Witorsch 2002, Mills & Chichester 2005). EDC-aineet voivat olla joko luonnollisia tai synteettisiä hormoneja, tai niiden kaltaisesti vaikuttavia aineita. Monien yhdisteiden kuten klooridioksiinien, polykloorattujen bifenyyliden (PCB, polychlorinated biphenyls), DDT:n (dikloori-difenyylitrikloorietaani) ja sen

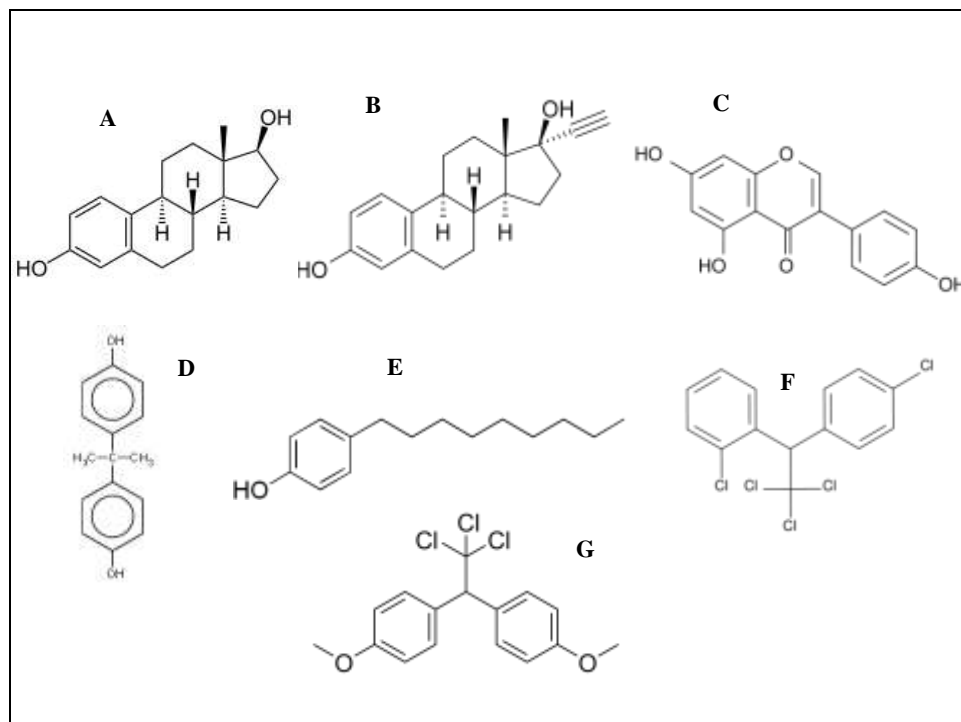
johdannaisten, ftalaattien, alkyylifenolien sekä fytoestrogeenien on havaittu vaikuttavan EDC:n tavoin (Witorsch 2002, Segner 2008). Vierasaineet voivat vaikuttaa normaaliin hormonitoimintaan joko matkimalla luonnollisia hormoneja, häiritsemällä luonnollisten hormonien toimintaa, muuttamalla niiden synteesiä tai metaboliaa, tai vaikuttamalla reseptorien lukumäärään. Usein täysikasvuisilla yksilöillä nämä vaikutukset ovat väliaikaisia ja kestävät niin kauan kuin altistus itse aineellekin kestää. Sen sijaan vaikutus nuorilla yksilöillä, varsinkin elinten kehitysvaiheessa, voi olla pysyvä ja ilmetä vasta vuosia altistuksen jälkeen (Sonnenschein & Soto 1998).

Nykyinen EU:n kemikaalilainsäädäntö käsittelee myös hormonitoimintaa mahdollisesti häiritseviä aineita. REACH (Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals) -asetus sisällyttää luvanvaraisten aineiden listaan artiklan 57 kohdan f mukaan myös aineet, joilla on hormonitoimintaa häiritseviä ominaisuuksia. Lupaa ei kuitenkaan vaadita mikäli ei uskota tapahtuvan sellaista altistusta, mikä ylittäisi aineelle määritellyt PNEC (predicted no effect concentration) tai DNEL (derived no-effect level) -arvot (Asetus EY/1907/2006). REACH myös käsittelee vain aineita, joiden valmistus- tai maahantuontimäärä ylittää yhden tonnin rajan. Asetus on tältä osalta vielä kehitystilassa, ja vuonna 2013 ollaan ko. kohtaa arvioimassa uudelleen uuden tieteellisen tiedon valossa, jolloin arviointikriteerien muuttaminen on mahdollista. Hormonitoimintaan vaikuttavien aineiden vaikutuksen arviointia vaikeuttavat mm. niiden mahdolliset vaikutukset jo pieninä konsentraatioina (pg/l tai ng/l) sekä mahdollinen seosten vaikutusten eroaminen yksittäisten aineiden ennustamista vaikutuksista. On myös keskusteltu siitä, onko pelkkä vaikutus hormonitoimintaan sinänsä laskettava haitalliseksi, vai pitäisikö sitä pitää vain mekanismina, joka saattaa johtaa mm. lisääntymis- tai kehityshäiriöihin tai syöpien kehitykseen. Hormonijärjestelmä on normaali fysiologinen ilmiö sekä ihmisillä että eläimillä, ja vierasaineiden ylimääräistä vaikutusta tähän järjestelmään voi olla vaikea arvioida (Matthiessen & Johnson 2007).

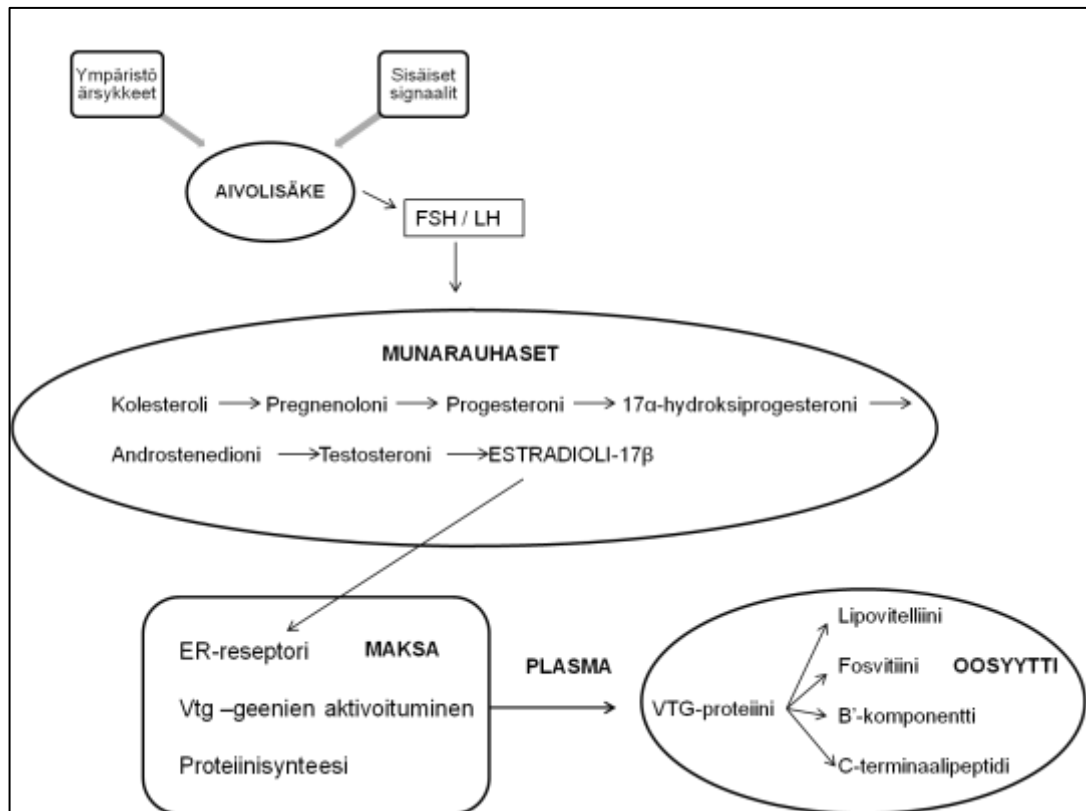
Toistaiseksi eniten tutkittu alue EDC-aineista on estrogeenien tavoin vaikuttavien aineiden eli ympäristöestrogeenien tai ksenoestrogeenien toiminta (Witorsch 2002). Pääasiallinen luonnollinen estrogeeni selkärangkaisilla, estradioli-17 β , on rakenteeltaan kolmesta kuuden ja yhdestä viiden hiilen renkaasta koostuva steroidi, jolla on kaksi hydroksyyli ryhmää, yksi molekyylin kummassakin päässä (Kuva 1). Estradiolin synteesi lähtee liikkeelle

kolesterolista, joka muutetaan ensin sukurauhasten teekasoluissa Cyp11a1-entsyymin (P450_{scc}) avulla pregnenoloniksi; tämä on hormonisteroidien synteesissä rajoittavana vaiheena. Pregnenoloni muunnetaan progesteroniksi ja sitten 17 α -hydroksiprogesteronin ja androstenedionin kautta testosteroniksi. Testosteroni eritetään teekasoluista ja se siirtyy diffuusion avulla granulositytteihin, joissa se muunnetaan estradioli-17 β :ksi Cyp19a aromataasin avulla (Clelland & Peng 2009) (Kuva 2).

Useat ympäristöestrogenit muistuttavat rakenteeltaan estradiolia (Kuva 1). Niissä esiintyy usein fenolirakenne, joka auttaa sitoutumista estrogeenireseptoriin (ER) (Kuva 2) (Blair ym. 2000, Witorsch 2002). Yhdisteet, joissa tätä rakennetta ei ole, joko muuttuvat elimistössä aromaattisiksi, tai sisältävät vastaavasti käyttäytyvän rakenteen. Estradiolista eroava rakenne vaikuttaa monin tavoin sitoutumisen tehokkuuteen, ja siksi useiden ympäristöestrogenien vaikutus on paljon heikompi kuin estradiolin (Witorsch 2002). Ympäristöestrogenin sitoutuessa estrogeenireseptoriin vaste riippuu paitsi aineen rakenteesta, myös reseptorityypistä sekä sitoutumiselimestä.



Kuva 1. Selkärankaisten eläinten luonnollinen estrogeeni, estradioli-17 β , E₂, (A), sekä joitakin ympäristöestrogeneja (B: etinylliestradioli, EE₂; C: genisteini; D: bisfenoli A; E: p-nonyylifenoli (yksi mahdollisista rakenteista); F: o,p-DDT; G: metoksikloori.)



Kuva 2. Vitellogeniinisynteesi. Ulkoiset ja sisäiset signaalit saavat aivolisäkkeen tuottamaan gonadotropiineja, jotka puolestaan ohjaavat sukupuolirauhaset tuottamaan estrogeenejä. Estrogeenien vaikutuksesta maksa tuottaa vitellogeniiniproteiinia, joka siirtyy verenkierron mukana oosyytteihin (Hiramatsu ym. 2006, Clelland & Peng 2009).

Aineiden estrogeenistä vaikutusta voidaan mitata monella tavalla. Perinteisillä eläinkokeilla on usein mitattu aineiden vaikutusta koe-eläinten sukuelinten kasvuun; nisäkkäillä (mm. jyräjät) tehdyillä kokeilla yritetään mallintaa mahdollisia vaikutuksia ihmiselle. Ympäristöestrogeenien on havaittu vaikuttavan naarilla mm. maitorauhasten, kohdun sekä muiden sukuelinten kasvuun ja kehitykseen sekä koirilla vastaavasti eturauhaseen. Erityisesti kohdussa tapahtuva altistus lisää myös myöhempien häiriöiden, kuten syövän, riskiä (Diamanti-Kandarakis ym. 2009). Koska ympäristöestrogeenit päätyvät usein jätevesien kautta vesiympäristöön, on paljon kokeita tehty myös vesieläimillä kuten esimerkiksi nilviäisillä, äyriäisillä ja muilla selkärangattomilla (Matozzo ym. 2008) sekä sammakkoeläimillä (Cheek 2006). Yhdysvalloissa on havaittu altistumisen ympäristöestrogeeneille lisäävän mm. sukuelinten epämuodostumia sammakkopopulaatioissa ja johtavan mahdollisesti näin populaatioiden pienenemiseen

(Cheek 2006). Eri kalalajeilla tehdyt lisääntymis- ja molekyyliavastekokeet ovat myös yhä yleistymässä.

Eläinkokeiden välttämiseksi on kehitetty myös solutason kokeita, jotka usein perustuvat estrogeenien indusoimien geenien ilmentymisen mittaamiseen. Aineiden estrogeenisuutta mittaavissa kokeissa on käytetty biomarkkerina mm. prolaktiinin ja ovalbumiinin syntetisointiin vaikuttavia geenejä sekä progesteroni-reseptorin geenejä (Sonnenschein & Soto 1998). Yhtenä hyvänä menetelmänä pidetään estrogeenireseptoriin sitoutumista ja reseptorin transkription aktivoimista mittaavaa ER-TA-koetta (estrogen reseptor transactivation assay), jossa mitataan aineiden sitoutumista joko ihmisen tai eläinten estrogeenireseptoriin. Tämä on mm. yksi OECD:n suosittelemista menetelmistä (Dang ym. 2011a). Solukokeissa voidaan käyttää joko koe-eläimistä eristettyjä erikoistuneita soluja (esim. maksasoluja) tai tiettyjä vaikutuksia varten kehitettyjä solulinjoja. Tunnettu aineiden estrogeenisyyttä mittaava testi on E-SCREEN, jossa käytetään kloonattuja ihmisen rintasyöpäsoluja (MCF7): estrogeenisesti vaikuttavat aineet kumoavat seerumin syöpäsolujen kasvua estävän vaikutuksen ja aiheuttavat näin syöpäsolujen lisääntymisen (Soto ym. 1995). *In vitro* tehdyt kokeet eivät kuitenkaan voi täysin korvata *in vivo* kokeita, sillä vaikutukset koko yksilössä, kuten jälkeläisten tuotto, ovat solutason vasteita monimutkaisempia.

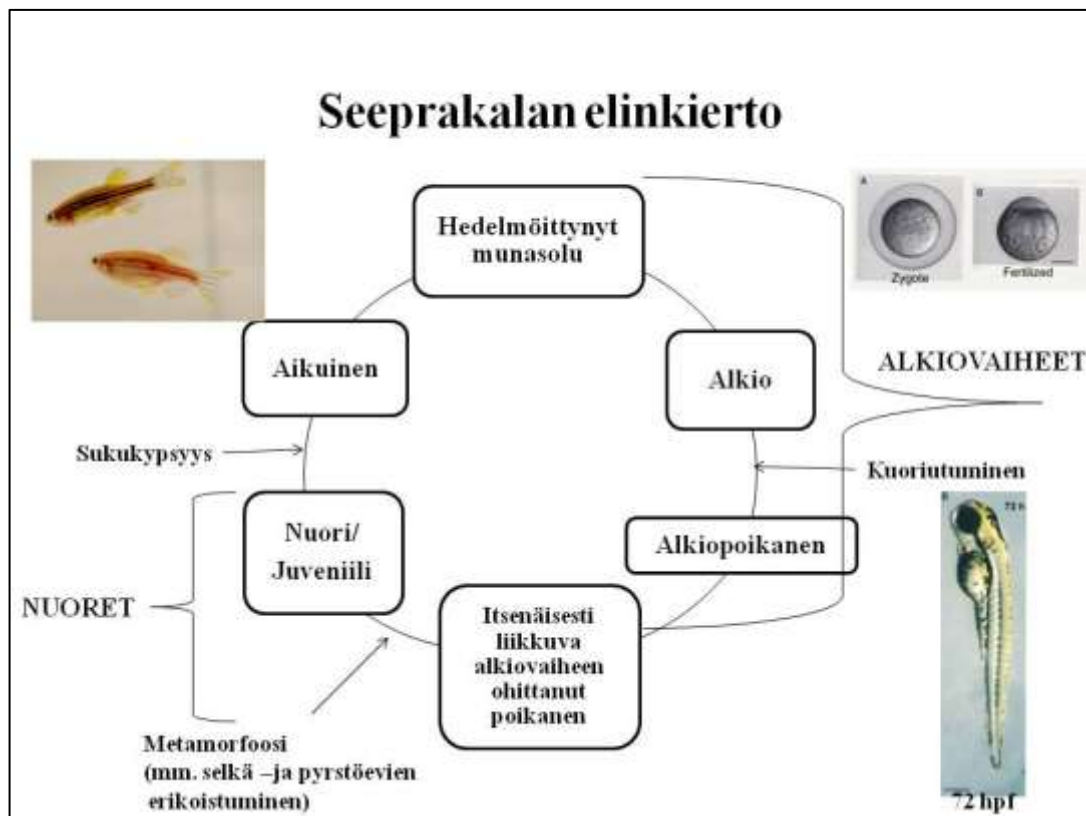
OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) on myös kehitellyt menetelmiä aineiden hormonitoimintaa häiritsevien vaikutusten havaitsemiseksi; EDC-aineiden seulomiseen voidaan käyttää mm. 21-päivän kalakoetta (21-day fish assay) tai aiemmin mainittua estrogeenireseptoriin sitoutumista (ER-TA), mutta NOAEL (no observed adverse effect level) tai NOEC (no observed effect concentration) -arvojen määrittämiseen tarvitaan vaikutuksia koko elinkiertoon tai useampiin sukupolviin mittaavia testejä (OECD 2010, Dang 2011b).

Vitellogeniini (vtg) on munasolun ruskuaisen tuottamiseen tarvittava proteiini, jota syntetisoidaan kalan maksassa estrogeenien, pääasiassa 17 β -estradiolin, vaikutuksesta. Luukaloilla lajista riippuen joko lutenisoiva hormoni (LH) tai follikkeleita stimuloiva hormoni (FSH) saa munarauhaset tuottamaan estradioli-17 β :a, joka muiden hormonien (esim. estronin) avulla käynnistää vitellogeniinin tuoton maksassa. Synteesin jälkeen

vitellogeniini vapautuu verenkiertoon, josta se siirtyy vtg-reseptorien avulla oosyyttien (munasolun emosolu) sisälle. Oosyyteissä vitellogeniini hajotetaan ruskuaisproteiineiksi eli lipovitelliiniksi, fosvitiiniksi, β' -komponentiksi ja C-terminaalipeptidiksi (Hiramatsu ym. 2006) (Kuva 2).

Vaikka normaalioloissa vain naaraat syntetisoivat vitellogeniiniä, myös koirilla ja nuorilla eli juveniileillä eläimillä on geneettinen kyky vtg-synteesiin, mikäli ympäristöstä löytyvät oikeat ärsykkeet (Hiramatsu ym. 2006). Lisääntymiskykyisillä naarilla vitellogeniinipitoisuus voi plasmassa olla kymmeniä milligrammoja millilitrassa kalalajista ja lisääntymissyklin ajankohdasta riippuen. Sen sijaan koirilla ja nuorilla yksilöillä kohonneet vitellogeniinitasot viittaavat ympäristön sisältävän estrogeenin kaltaisesti vaikuttavia aineita eli ympäristöestrogeenejä (Sumpter & Jobling 1995). Vitellogeniinin käyttö ympäristöestrogeenien biomarkkerina perustuu sen spesifisyyteen estrogeenisesti vaikuttaville aineille sekä vasteen herkkyyteen pienilläkin annosmäärillä (Hutchinson ym. 2006). Vitellogeniinin tuoton on havaittu vastaavan hyvin muita estrogeenialtistuksen aiheuttamia lisääntymiseen tai histologiaan liittyviä vasteita. Se on siis biomarkkerina luotettava ja sen antamia tuloksia voidaan verrata populaatiotason vasteisiin, kuten mm. jälkeläisten tuottoon (Dang ym. 2011b).

Seeprakala (*Danio rerio*) on pieni, trooppinen kalalaji, joka luonnossa elää Etelä- ja Itä-Intiassa. Se on suosittu koe-eläimenä, sillä pienikokoisena se vie vähän kasvatustilaa, sen kasvatus- ja lisääntymisolosuhteet tunnetaan varsin hyvin ja se tuottaa kerralla paljon jälkeläisiä. Se myös saavuttaa sukukypsyyden verrattain nopeasti (3–4 kk), joten koko elinkiertoa on helppo tutkia (Hill ym 2005). Lisäksi seeprakalan koko genomi tunnetaan ja siitä on olemassa tunnettuja mutanttikantoja (Segner 2009).



Kuva 3. Seeprakalan elinkierto hedelmöitymisestä aikuisuuteen. Alkiovaiheen (zygootti ja hedelmöitynyt munasolu) sekä 72 hpf -poikaskuvat ovat artikkelista Kimmel ym. 1995. Aikuiset kalat ovat Jyväskylän yliopistosta, kuvan ottanut Tarini Sahoo.

Seeprakalojen kehitysvaiheet tunnetaan hyvin (Kuva 3). Noin kymmenen päivän ikäisissä kaloissa alkavat kehittyä munasarjan kaltaiset ovarioaiheet, jotka noin kahdenkymmenen päivän jälkeen jatkavat joko kypsymistä täysiksi munarauhasiksi naarailta tai alkavat vastaavasti muuttua siittiörauhasiksi koirailta. Erikoistuminen muna- tai siittiörauhasiksi päättyy noin neljäkymmenen päivän kuluttua hedelmöitymisestä ja noin kuudenkymmenen päivän ikäisinä sukuelimet ovat täysin kypsyneet (Takahashi 1977). Toisaalta ensimmäisen 60 päivän aikana tapahtuvan sulusolujen siirtymävaiheen (gonadal transition stage) tarkka ajankohta vaihtelee riippuen sekä seeprakalakannasta että kasvatusolosuhteista. Takahashi (1977) havaitsi sukuelinten erikoistumisen ajoittuvan jaksolle 20–40 dpf (days post fertilization), kun taas mm. Maack'n ja Segnerin (2004) käyttämässä kannassa erikoistuminen tapahtui päivien 40 ja 70 välillä. Sukukypsyyden seeprakalat saavuttavat hyvissä kasvatusoloissa noin 90 päivän ikäisinä. Tätä sukukypsymisen koko jaksoa pidetään herkkänä elinkierron vaiheena ja alttiina ympäristön antamille signaaleille.

Estrogeenireseptoreita seeprakalalta on löydetty kolmea tyyppiä, ER α , ER β 1 ja ER β 2 (Bardet ym. 2002). Näistä ER α vastaa nisäkkäiden samanlaista reseptoria, kun taas nisäkkäiden ER β :a vastaava reseptori näyttäisi kahdentuneen kahdeksi erilliseksi geeniksi jossain vaiheessa kalojen evoluutioita. Seeprakalan alkionkehityksessä eri reseptorityypit ilmenevät eri lailla. Tingaud-Sequeira ym. (2004) havaitsivat rakkula-asteella (3 hpf, hours post fertilization) olevilla seeprakalan alkioiden emolta peräisin olevaa ER β 1 ja ER β 2 reseptoreiden mRNA:ta ja alkaen segmentaatiovaiheesta (10–12 hpf) kaikkien kolmen reseptorigeenin mRNA:ta. On todennäköistä, että ER α on pääasiallinen vitellogeniinin tuottamisesta vastaava tekijä aikaisissa kehitysvaiheissa (Muncke & Eggen 2006). 72 tunnin kohdalla ER α :n ilmentyminen alkaa kasvaa voimakkaasti samoin kuin β -tyyppien, joskin α -tyyppiä pienemmässä määrässä.

Eri ikäryhmien soveltuvuudesta ympäristöestrogeenien vaikutuksien mittaamiseen on tehty tutkimuksia (Henry ym. 2009, Jin ym. 2009). Jin ym. (2009) havaitsivat alkioiden ja alkiopoikasten (4–11 dpf) olevan herkempiä (alhaisempi LOEC) ympäristöestrogeeneille kuin aikuisten ja nuorten (17–24 dpf) kalojen, mutta vasteen mitattuna vitellogeniiniin mRNA:n tuottona olevan suurempi nuorilla ja sukukypsillä koirilla kuin alkioiden ja alkiopoikasilla. Sen sijaan Henry ym. (2009) havaitsivat tutkiessaan E₂:n ja EE₂:n vaikutusta vtg-geenien ilmentymiseen vtg-transkriptien määrän olevan suurempi alkiopoikasvaiheen (3–7 dpf) seeprakaloilla kuin mitattuna aikuisten koiraiden maksoista. Joka tapauksessa vaikuttaisi siltä, että myös alkiot ja juveniilit yksilöt ovat alttiita ympäristöestrogeenien vaikutuksille. Käytettäessä alkiot- ja alkiopoikasvaiheen yksilöitä, ei voida kuitenkaan sulkea pois maternaalisen mRNA:n vaikutusta, sillä mm. Tingaud-Sequeira ym. (2004) havaitsivat rakkula-asteella (3hpf) olevilla seeprakalan alkioiden emolta peräisin olevaa ER β 1 ja ER β 2 reseptoreiden mRNA:ta. On myös kyseenalaistettu, pystyvätkö alkiot vastamaan ollenkaan estrogeeniärsykkeeseen kahden ensimmäisen elinvuorokauden aikana estrogeenireseptorien puutteen takia (Bardet ym. 2002), tosin tästä on olemassa myös vastakkaisia todisteita (Muncke & Eggen 2006). Varsinainen seeprakalojen sukupuolinen erikoistuminen tapahtuu usein noin 20 dpf alkaen (Takahashi 1977, Uchida ym. 2002). Tätä ikävaihetta voidaan siis pitää tärkeänä paitsi yksilöiden myös populaation kannalta. Siksi on tärkeää tutkia estrogeenin vaikutuksia varsinaista alkiopoikasvaihetta myöhäisemmälläkin ikäryhmällä.

Nonyylifenoli (NP, $C_{15}H_{24}O$) ja oktyylifenoli (OP, $C_{14}H_{22}O$) ovat alkyylifenoleja, jotka syntyvät vastaavien alkyylifenolietoksyylaattien hajotessa esimerkiksi jätevedenpuhdistamoissa. Alkyylifenolietoksyylaatteja käytetään pinta-aineina mm. pesuaineissa, tekstiili- ja paperiteollisuudessa sekä hygieniatarvikkeissa (Sonneschein & Soto 1998). Noin 55 % käytöstä on teollisuuden tarpeisiin, 30 % siivousalan ja 15 % kuluttajien siivous- ja hygieniatuotteisiin. Ympäristössä alkyylifenolit sitoutuvat usein orgaaniseen ainekseen, kuten sedimentteihin ja orgaanisiin partikkeleihin, mikä voi merkittävästi hidastaa niiden hajoamista. Alkyylifenolit voivat myös bioakkumuloitua eläinten lipidiainekseen, mikäli niille altistutaan ravinnon tai ympäristön kautta. Alkyylifenolien on havaittu olevan alkuperäisiä etoksyylaatteja myrkyllisempiä, ja esimerkiksi nonyyylifenoli vaikuttaa mm. soluhengitykseen, kalsiumin liikkumiseen lihassoluissa ja hermosolujen kehitykseen (Soares ym. 2008). Tunnetuin alkyylifenolien vaikutus lienee hormonitoiminnan häiritseminen, erityisesti estrogeenireseptorin kautta (Ying ym. 2002).

Alkyylifenolien toksisuus riippuu mm. hiiliketjun pituudesta ja haarautumisesta, jotka vaikuttavat niiden K_{OW} arvoihin ja siten myös bioakkumuloitumiseen. Bioakkumuloituminen riippuu myös lajista: nonyyylifenolille on mitattu kaloista BCF (bioaccumulation concentration factor) -arvoja 271–344 rasvapäämudulla (*Pimephales promelas*, 20 päivän altistus ja 7 päivän puhdistumisaika) ja 24–110 kirjolohella (*Oncorhynchus mykiss*) (Servos 1999). Koska $\log K_{OW}$ -arvo nonyyylifenolille on 4,48 ja oktyylifenolille 4,12, on oktyylifenolin bioakkumuloituminen oletettavasti nonyyylifenolia pienempää. Tsuda ym. (2001) saivat kuitenkin hieman poikkeavasti medakalla (*Oryzias latipes*) 168 tunnin altistuksen aikana BCF-arvoksi (\pm keskihajonta) nonyyylifenolille 167 ± 23 (tuorepaino) ja oktyylifenolille 261 ± 62 (tp).

Bisfenoli A (BPA, 4,4'-dihydroksi-2,2-difenyylipropaani, $C_{15}H_{16}O_2$) on monomeeri, jota käytetään polykarbonaattimuovien ja epoksihartsien valmistamiseen ja sitä vastaavasti vapautuu ympäristöön näiden hydrolyysituotteena. BPA:n runsas käyttö on aiheuttanut paljon keskustelua sen mahdollisista vaikutuksista ihmisen kehitys- ja lisääntymishäiriöihin, sillä BPA:ta käytetään paljon mm. elintarvikkeiden pakkauksissa. Ympäristöön BPA:ta pääsee pääasiassa jätevedenpuhdistamoiden kautta, kaatopaikkojen suotovesissä sekä muovien hajoamisen luonnossa seurauksena. Vedessä BPA hajoaa

suhteellisen nopeasti (puoliintumisaika noin 4,5 vuorokautta), mutta sillä on taipumusta sitoutua sedimentteihin, mikä hidastaa hajoamista. BPA voi vaikuttaa eläimillä sekä teratogeenisesti että vaikuttamalla ympäristöestrogenin tavoin mm. sukupuolen määräytymiseen, sukuelinten toimintaan sekä vitellogeniinin tuottoon (Sonnenschein & Soto 1998, Crain ym. 2007).

Vaikka yksittäisten ympäristöestrogenien vaikutukset ovat fysiologisiin estrogeneihin verrattuna heikompia (Blair ym. 1999, Zhang ym. 2010), ympäristössä aineet esiintyvät usean aineen seoksena. Lähtökohtaisesti seosten vaikutukset voivat olla additiivisia, jolloin vaikutus on yksittäisten aineiden summa, synergistisiä eli selvästi osiensa summaa suurempi tai antagonistisia, jolloin vaikutus on pienempi. Tehdyissä kokeissa (Rajapakse ym. 2004, Brian ym. 2005, Lin & Janz 2006, Zhang ym. 2010) on osoitettu yhteisvaikutuksen usein kuitenkin eroavan pelkästä summavaikutuksesta, joten aineiden haitallisuuden arvioiminen ja säätely yksittäin saattaa johtaa ympäristölle koituvien riskien aliarvioimiseen (Matthiessen & Johnson 2007).

Ilmiöiden mittaaminen luonnossa ja kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa voi erota paljon. Laboratorio-oloissa sekä altistusolosuhteita (aineet, pitoisuudet) että ympäristökijöitä (lämpötila, ravinto) pystytään kontrolloimaan tarkasti. Ympäristössä sen sijaan olosuhteet saattavat vaihdella jatkuvasti. Eläimet altistuvat eri aineiden sekoituksille ja altistuspitoisuudet vaihtelevat koko ajan. Esimerkiksi Kolpin ym. (2002) tutkivat eri orgaanisten haitta-aineiden esiintymistä Yhdysvaltojen jokivesissä ja havaitsivat mediaanimäärän aineita näytteissä olevan seitsemän ja maksimimäärän yhdessä näytteessä 38. Aineiden esiintyminen seoksina näin ollen vaikeuttaa merkittävästi ympäristössä esiintyvien aineiden vaikutusten arvioimista. Usein pitkäaikaisten vaikutusten arvioimiseen käytetään ympäristöstä mitattuja aineiden keskiarvoa tai mediaania, mutta myös lyhytaikaiset korkeat altistukset saattavat vaikuttaa eliöihin pysyvästi (Crain ym. 2007). Laboratorioissa tehdyt kontrolloidut kokeet ovat siis tärkeitä yksittäisten aineiden tai tunnettujen aineseosten vaikutusten ja vaikutusmekanismien selville saamiseksi.

Työn tavoitteet

Etinyyliestradiolia käytettiin tässä tutkimuksessa sekä positiivisena vertailuaineena että ympäristöön joutuvana kemikaalina, jonka vaikutus välittyy ER-reseptorin kautta. Lisäksi tutkittiin kolmea estrogeenisesti vaikuttavaa teollisuuskemikaalia: bisfenoli A:ta, nonyylifenolia sekä oktyylifenolia.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, eroaako näiden kolmen ympäristöestrogenin yhteisvaikutus yksittäisten aineiden vaikutuksesta nuorilla (n. 20 dpf), sukuelinten erikoistumisvaiheessa olevilla seeprakaloilla eli 20dpfZF-mallilla. Kaikilla yksittäisillä aineilla suoritettiin ensin annos-vaste kokeet ylimmän vaikuttamattoman pitoisuuden (no-observed effect concentration, NOEC) selvittämiseksi. Yhteisvaikutuskoe suoritettiin näiden NOEC-pitoisuuksien seoksella. Vasteena tutkimuksessa mitattiin vitellogeniini1:n lähetti RNA:ta (messenger RNA, mRNA). Lisäksi tehtiin myös alustavia mittauksia vtg-geeniekspression heijastumisesta vastaavan proteiinin pitoisuuteen.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Koe-eläinten ylläpito

Altistuskokeissa käytettiin 20 vuorokauden ikäisiä seeprakalan varhaispoikasia. Kokeissa käytetyt kalat olivat villimuodon sekakantaa, jota on vuodesta 2008 pidetty Tampereen yliopistollisessa sairaalassa professori Mika Rämetin laboratoriossa. Emokaloja oli säilytetty Jyväskylän yliopiston kalakoetiloissa (Ambiotica) talvesta 2009–2010 asti, ja yhden aineen altistuskokeisiin poikasia tuottaessaan niiden ikä oli vuodesta puoleentoista vuotta. Emokaloja säilytettiin jaoteltuina sukupuolen mukaan eri 30–45 litran akvaarioissa Ambiotican kalakoetiloissa. Kaloja ruokittiin sekä hiutaleruoalla (esimerkiksi TetraMin^R Granuler, Tetra GmbH, Saksa) että ennen lisääntymistä ja sen jälkeen pakastetuilla surviaissääsken toukilla. Akvaarioiden veden lämpötila vaihteli välillä 25–28 °C:n ja pH 7,5–7,6. Veden kovuus mitattuna Tetratest KH/GH -liuskoilla (Tetra GmbH, Saksa) oli 14,3 mg/l karbonaattikovuutena ja 28,6 mg/l Ca/Mg²⁺ -suoloina.

Lisääntymiseen käytettiin erillisiä muovisia lisääntymisakvaarioita (Kuva 4), joihin akvaarion koon (3–6 l) mukaan laitettiin kerrallaan 2–5 yksilöä kumpaakin sukupuolta. Akvaarioiden pohjat peitettiin marmorikuulilla (läpimitta n. 15 mm) emojen

muniensyönnin estämiseksi sekä lisättiin muutamia hyvin pestyjä muovisia akvaariokasveja lisääntymisen stimuloimiseksi. Lisääntymisakvaarioiden lämpötila säädettiin alueelle 27–28 °C ja kalojen annettiin olla niissä yön yli eli noin 18–20 tuntia.



Kuva 4. Seeprakalojen lisääntymisakvaarioita. Akvaariot ovat Techniplastin (Italia) Zb70 (A) ja Zb30 (B) -akvaarioita. Zb60:n tilavuus noin kuusi litraa ja Zb30:n noin kolme litraa. Molemmissa akvaarioissa on pohjalla marmorikuulia ja muovisia akvaariokasveja.

Aamulla kalat siirrettiin takaisin alkuperäisiin akvaarioihinsa, marmorikuulat ja kasvit poistettiin, ja hedelmöittyneet munat poimittiin ns. alkioveteen lasisille litran tai puolentoista litran tarjottimille, joissa niitä kasvatettiin noin 0,5–0,8 litrassa alkiovetä riippuen yksilömäärästä (kuva 5). Tarjottimet peitettiin läpinäkyvillä muovilevyillä ja siirrettiin noin 900 luxin valaistukseen (36 W, Philips TLD36W/33) kehittymään. Kasvatusvetenä käytetty alkiovesi valmistettiin sekoittamalla 20 litraan tislattua vettä 320 ml 60x E3 kantavettä. Valmistettu kasvatusvettä säilytettiin huoneenlämmössä ilmastettuna. Kantavesi valmistettiin Nüsslein-Volhardit ja Dahm'n (2002, kuten siteerattu Lom Lab Protocols -sivulla) ohjeiden mukaan liuottamalla kahteen litraan tislattua vettä 34,4 g NaCl:a (100 %, VWR International, Belgia), 1,52 g KCl:a ($\geq 99,5$ %, Merck, Saksa), 5,8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$:nä (≥ 98 %, Merck, Saksa) sekä 9,8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$:nä (99 %, J.T.Baker,

Hollanti). Valmista 60x 3E:tä säilytettiin 4 °C:ssa. Ohjeeseen ei sisällynyt pH:n säätöä, joten valmiin E3 kantaveden pH oli 5,7.



Kuva 5. Seeprakalan poikasten (0–20 dpf) Pyrex kasvatustarjottimia. Edessä ja takana vasemmalla olevien isojen tarjottimien (Pyrex 230, 200 * 255 mm) tilavuus noin 1600 ml ja takana oikealla olevan pienemmän (Pyrex 242, 165 * 215 mm) noin 1000 ml.

Noin vuorokauden kuluttua munien siirrosta tarjottimilta poistettiin lopullisesti hedelmöittymättömät munat. Poikaset kuoriutuvat noin kolmen päivän kuluttua hedelmöittämisestä ja alkoivat liikkua itsenäisesti noin viiden päivän ikäisinä, jolloin myös ulkoinen ruokinta aloitettiin SDS100-kuivamuonalla. Ruokinnan aloittamisen jälkeen akvaarioista poistettiin päivittäin ylijäänyt ruoka sekä vaihdettiin tarpeen mukaan 300–500 ml vettä.

Poikasia kasvatettiin lasitarjottimilla (noin 150 yksilöä per tarjotin) 20 päivän ikäisiksi eli kemikaalialtistukseen asti. Puhtaan kasvatusveden lämpötila vaihteli välillä 25–29 °C ja pH 5,8–5,9. Veden kovuus oli 14,3 mg/l mitattuna karbonaattikovuutena ja 28,6 mg/ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -suoloina. Veden ammoniumpitoisuutta mitattiin Tetratest $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -liuskoilla (Tetra GmbH, Saksa), ja se vaihteli kasvatustarjottimilla välillä 0–3 mg/l, kun taas puhtaan kantaveden ammoniumpitoisuus oli välillä 0–0,25 mg/l. Veden happipitoisuus vaihteli

mitattaessa ennen ja jälkeen vedenvaihdon välillä 89,5–95,5 % ASV. Happipitoisuus mitattiin VWR DO 2000 Portable Dissolved Oxygen Instrument -mittarilla (Pennsylvania, USA) ja pH pHenomenal (VWR, Belgia) -mittarilla. Molemmat mittarit kalibroitiin aina ennen mittausta.

2.2 Koeasetelmat

Kaikki kokeet (Taulukko 1) suoritettiin 20 päivän ikäisillä seeprakalan varhaisilla alkioaikavaiheen jälkeisillä nuorilla poikasilla eli 20dpfZF-mallin kaloilla. Tutkittavista aineista valmistettiin varastoliuokset metanoliin, joista lopulliset altistuskonentraatiot laimennettiin 250 ml:ksi alkioveteen. Kokeet suoritettiin noin 300 ml:n lasipurkeissa (Kuva 6).

Taulukko 1. Kaikki 20 dpf seeprakaloilla eli 20dpfZF-mallilla suoritettavat ympäristöestrogenialtistuskokeet. Taulukossa esitetty aine, tekstissä käytetty lyhenne, käytetyt pitoisuudet, yksilömäärät osakokeissa sekä lopullisissa näytteissä ja toistojen lukumäärä kokeissa.

Aine	Lyhenne	Pitoisuusalue ($\mu\text{g/l}$)	Yksilömäärä osakokeissa	Yksilömäärä näytteessä	Toistojen määrä
Etinyyliestradioli	EE ₂	0,001–0,1	30	25	2
Bisfenoli A	BPA	125–2000	35	25	3
Nonyylifenoli	NP1	12,5–200	35	25	3
	NP2	1–100	30	25	2
Oktyylifenoli	OP	5–100	30	25	2
Yhteisvaikutuskoe		500 + 50 + 20	30	25	2

Jokaiseen purkkiin laitettiin 25–35 (jokaisessa kokeessa yksilömäärät purkeissa samat) hyväkuntoista poikasta. Altistukset kestivät 120 tuntia (117–122) ja ne pyrittiin aloittamaan ja lopettamaan päivittäin samaan aikaan. Kokeen päätyttyä jokaisesta purkista kerättiin sama määrä yksilöitä yhdeksi näytteeksi 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Putket jäädytettiin heti nestetyössä ja niitä säilytettiin –80 °C:ssa analyysien suorittamiseen asti. Kaikista altistuskonentraatioista otettiin 8 ml:n vesinäytteet LC–MS:lla analysoitavaksi sekä juuri ainetta sekoittaessa että 24 tunnin kuluttua vaihdettaessa uutta vettä tilalle. Etinyyliestradiolin vesinäytteet valmistettiin altistusta aloittaessa samasta varastoliuoksesta erillisinä näytteinä, sillä pienen konsentraation takia tarvittiin tilavuudeltaan suuremmat

näytteet. Etinyyliestradioli-vesinäytteiden tilavuus vaihteli välillä 500–1000 ml ja ne analysoitiin GC–MS:lla.



Kuva 6. Esimerkki koasetelmasta. Kuvissa 300 ml:n lasipurkkeja, joissa 250 ml altistusvettä. Purkit satunnaisessa järjestyksessä, jota muutettiin päivittäin aina vedenvaihdon yhteydessä. Purkit peitetty Sarstedtin muovikansilla.

Kokeiden aikana huoneen lämpötila vaihteli välillä 26,0–28,5 °C ja altistusveden 26,0–29,0 °C, joista korkeimmat arvot 2010 kesällä. Kokeissa seurattiin veden pH:ta, happipitoisuutta sekä johtokykyä. Johtokyky mitattiin Hanna Instruments HI 9635 Microprocessor Conductivity/TDS Meter -mittarilla (Rhode Island, USA).

Kaikissa kokeissa liotinkontrollina käytettiin metanolia, jonka pitoisuus vastasi suurinta koesarjassa käytettyä pitoisuutta. Metanolipitoisuus ensimmäisessä nonyylifenoli-

koesarjassa oli 0,02 % ja muissa 0,01 %. Bisfenoli A:n ja nonyylifenolin kokeissa oli myös vesikontrollit, joihin ei lisätty mitään ainetta. Positiivisena kontrollina toimi kaikissa kokeissa 17 α -etinyliestradioli (EE₂, 98 %, HPLC-laatu, Sigma,) altistuspitoisuutena 25 ng/l.

2.2.1 Annos-vastekokeet

Kokeissa käytettiin kolmea estrogeenisesti vaikuttavaa ainetta: nonyylifenolia (4-n-Nonylphenol, puhtaus 98+ %, Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, Massachusetts, USA) oktyylifenolia (4-tert-Octylphenol, 97 %, Aldrich, Missouri, USA) ja bisfenoli-A:ta (Bisphenol A, 99+ %, Aldrich). Aineille suoritettiin ennen yhteisvaikutuskoetta annos-vastekokeet NOEC-arvojen selville saamiseksi. BPA:lla ja NP:lla käytettiin annos-vastekoesarjoissa viittä ja OP:lla neljää konsentraatiota.

Positiiviselle kontrollille eli etinyliestradiolille tehtiin annos-vastekoesarja 15.2.–20.2.2011, jossa nominaaliset altistuspitoisuudet olivat 1, 5, 25, 50 ja 100 ng/l, tosin pitoisuudesta 1 ng/l oli vain yksi toisto. Koe suoritettiin sen selvittämiseksi, mikä mahdollinen vitellogeniinin maksimituotanto on ja minkälaista jakaumaa vaste noudattaa. Altistusveden pH kokeen alussa oli 6,1 ja 24 tunnin jälkeen veden vaihdon yhteydessä mitattuna 5,9. Happipitoisuutta ei kokeessa mitattu mittarin toimimattomuuden takia, mutta sen voi arvioida vastaavan muiden kokeiden happipitoisuutta eli noin 90 % ASV. Yhdessä altistusastiassa yksilömäärä oli 30 ja lopullinen näytekoko 25. Kokeessa käytetty etinyliestradiolin varastoliuos oli valmistettu 31.1.2011.

Nonyylifenolin ensimmäisessä annos-vastekokeessa (NP1, 8.7.–13.7.2010) käytetyt nominaaliset pitoisuudet olivat 12,5, 25, 50, 100 ja 200 μ g/l. Jokaisesta konsentraatiosta oli kolme rinnakkaista altistusta, joiden lisäksi liuotin-, vesi- sekä EE₂-kontrollit. Koska kuolleisuus liuotinkontrollissa oli suuri, lähes 50 %, tehtiin nonyylifenolilla myös toinen annos-vastekoe (NP2, 14.12.–19.12.2010), jossa nominaaliset pitoisuudet olivat 1, 10, 50, 100 ja 200 μ g/l. Laimennusveden happipitoisuus ensimmäisessä kokeessa oli vähintään 89 % ASV ja pH 5,8. Toisessa kokeessa pH:ksi mitattiin kantavedestä 5,9 ja 24 tunnin jälkeen altistusvedestä 6,3. Koevesien johtokyky vaihteli välillä 850–1050 μ S. Ensimmäisessä kokeessa yhden osakokeen yksilömäärä oli 35 ja toisessa kokeessa 30. Lopullinen näytekoko kummassakin kokeessa oli 25 yksilöä, lukuun ottamatta astioita, joissa

kuolleisuus tämän esti. Ensimmäisessä kokeessa käytetty nonyylifenolin varastoliuos oli valmistettu 27.5.2010 ja toisessa kokeessa 13.12.2010.

Bisfenoli A:n annos-vastekokeessa (30.7.–4.8.2010) nominaaliset pitoisuudet olivat 125, 250, 500, 1000 ja 2000 µg/l kolmena rinnakkaisena altistuksena. Altistusveden pH kokeessa oli noin 5,8, happipitoisuus 89,5 - 92 % ASV ja johtokyky 780–880 µS. Yhden osakokeen yksilömäärä oli 35, josta lopullinen näyttekoko oli 25 yksilöä lukuun ottamatta purkkeja, joissa kuolleisuus oli suuri. Kokeessa käytetty bisfenoli A:n varastoliuos oli valmistettu 14.6.2010.

Oktyylifenolin annos-vastekokeessa (15.2.–20.2.2011) nominaaliset pitoisuudet olivat 5, 10, 50 ja 100 µg/l, kahtena rinnakkaisena altistuksena. Koesarja tehtiin EE₂:n koesarjan yhteydessä samoissa olosuhteissa. Yhdessä altistusastiassa yksilömäärä oli 30 ja lopullinen näyttekoko 25. Kokeessa käytetty oktyylifenolin varastoliuos oli valmistettu 13.2.2011.

2.2.2 Yhteisvaikutuskokeet

Kirjallisuusarvojen ja annos-vastekokeiden perusteella (Tulokset s. 32–34) suoritettiin yhteisvaikutuskoe ylimmillä ei-vaikuttavilla pitoisuuksilla (NOEC, no observed effect concentration) 16.3.–21.3.2011. Bisfenoli A:lle tämä arvo oli annos-vastekokeiden perusteella 1000 µg/l, mutta kirjallisuuden avulla täydennettynä päädyttiin arvoon 500 µg/l. Koska mikään nonyylifenolin konsentraatio ei aiheuttanut vastetta, valittiin NOEC-arvoksi ylin käytetty konsentraatio eli 100 µg/l. Yhteisvaikutuskokeen esikokeessa tämä aiheutti kuitenkin yllättäen sataprosenttisen kuolleisuuden, joten jatkokokeessa päädyttiin arvoon 50 µg/l. Oktyylifenolille käytettiin arvoa 20 µg/l. Kaikki kokeissa käytettyjen kemikaalien varastoliuokset valmistettiin metanoliin 15.3.2011. Yhdessä altistusastiassa yksilömäärä oli 30 ja lopullinen yhden näytteen yksilömäärä 25. Laimennusveden pH oli 6,4 ja 24 tunnin altistuksen jälkeen 5,9.

2.3 Vesinäytteiden koepitoisuuksien analysointi

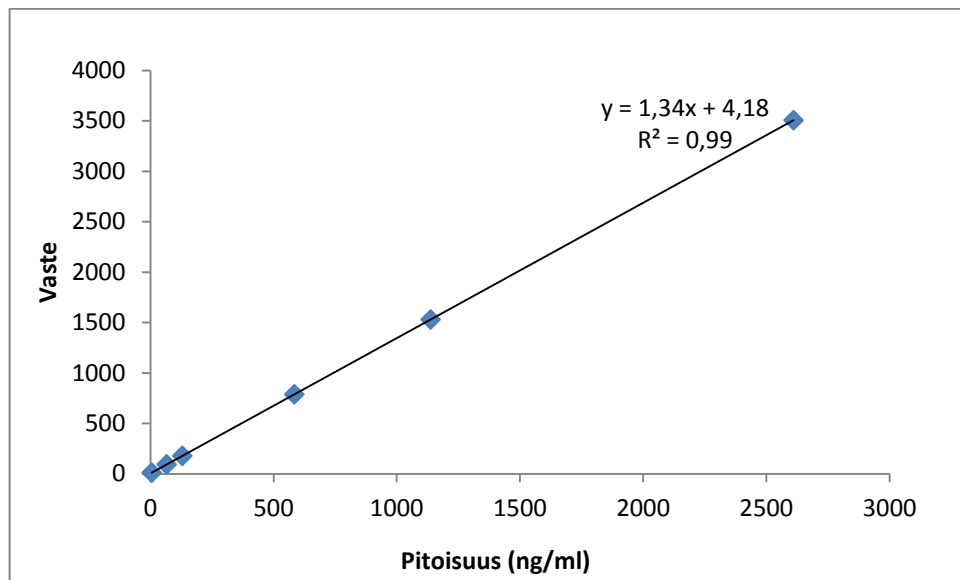
Vesinäytteet analysoitiin nestekromatografi-massaspektrometrillä. Vesinäytteiden ajo suoritettiin Revilla-Ruiz ym. (2007) ohjeiden mukaan Waters Alliance 2795 (Waters, Massachusetts, USA) nestekromatografilla käyttäen metanolin ja veden seosta (suhde 60:40) ja virtausnopeutta 0,2 ml/min. Ennen näytteiden ajoa Waters SunFireTM C₁₈ 2,1 x 50

mm kolonnia tasapainotettiin 15 minuuttia 100 %:lla metanolilla, josta vähitellen siirryttiin suhteeseen 60:40. Metodien haihdutuslämpötila oli 250 °C ja lähdelämpötila 120 °C. Detektorina käytettiin Quattro Micro kolmoiskvadrupolimassaspektrometria (Waters, Massachusetts, USA), jossa metodina oli sähkösumutus (ESI). Haihdutuskasuna ajossa käytettiin typpeä, jonka virtaus oli 450 l/h ja törmäyskaasuna argonia.

Jokaisen mittauksen yhteydessä valmistettiin kuuden pitoisuuden standardisuora, jossa konsentraatiot olivat noin 2500, 1000, 500, 100, 50 ja 10 ng/ml jokaiselle mitattavalle yhdisteelle (Kuva 7). Aineiden standardisuorat valmistettiin seoksena lukuun ottamatta ajoja, joissa mitattiin sekä oktyyli- että nonyylifenolinäytteitä, jolloin molemmille valmistettiin erilliset standardisuorat. Lopulliset standardikonsentraatiot vaihtelivat hieman riippuen käytetyn varastoliuoksen alkuperäisestä pitoisuudesta. Näytteiden pH säädettiin ennen analyysiä noin kolmeen 1 M HCl:lla. Näytekupliin laitettiin 500 µl varsinaista näytettä ja 400 µl ammoniumasetaattia (NH₄Ac, puhtaus 99,99 %, Aldrich, USA) 90 %:ssa asetosyanonitriilin vesiliuoksessa (ACN), minkä lisäksi sekä standardeihin että näytteisiin lisättiin 100 µl sisäisen standardin käyttöliuosta pitoisuutena 5 µg/l. Nonyylifenolin sisäisenä standardina käytettiin oktyylifenolia, bisfenoli A:n d16-bisfenoli A:ta ((Bisphenol-A)-d₁₆, puhtaus 98 %, Aldrich, Missouri, USA) ja oktyylifenolin nonyylifenolia. Koska yhteisvaikutuskokeiden näytteet sisälsivät sekä nonyyli- että oktyylifenolia, käytettiin näissä näytteissä sisäisenä standardina pelkästään d16-bisfenoli A:ta.

Nonyylifenoli-, oktyylifenoli- sekä yhteisvaikutuskokeen näytteitä mitattaessa alimmat konsentraation jäivät ensin alle laitteen havaitsemisrajan, joten mittaukset uusittiin uuttamalla näytteet käyttäen HLB Oasis 3cc/60mg patruunoita. Patruunat esikäsiteltiin 3 ml:lla MTBE:ä (metyyli-tert-butyylieetteri, HPLC-laatu, Rathburn), 3 ml:lla metanolia sekä 3 ml:lla tislattua vettä. Näytteitä, joihin oli lisätty 100 µl sisäistä standardia (5 mg/ml oktyylifenoli, nonyylifenoli tai d16-bisfenoli A), valutettiin patruunoiden läpi etukäteen tunnettu tilavuus, joka vaihteli välillä 7–11 ml. Näytteiden lisäyksen jälkeen patruunoiden annettiin kuivua, minkä jälkeen aineet uutettiin patruunoista 10 %:lla metanolin ja MTBE:n seoksella (1:10) (2 * 3 ml). Näytteitä kuivatettiin tyypellä noin puoli tuntia noin 60 °C:n vesihauteessa kunnes MTBE haihtui näytteistä kokonaan. Näytteisiin lisättiin 0,5 ml tislattua vettä, jonka pH oli säädetty HCl:lla kolmeen, sekä 0,5 ml NH₄Ac:a 90 %:ssa

ACN:ssä. Tämän jälkeen näytteet siirrettiin MS-näytepulloihin ja suoritettiin mittaus kuten tavallisesti. Ajon jälkeen näytteiden muodostamat piikit integroitiin ja piikkien pinta-alasta laskettiin automaattisesti näytteiden pitoisuudet MassLynx V.4.1 QuanLynx -sovelluksella (Water Inc., Massachusetts, USA).



Kuva 7. Esimerkki LC-MS/MS -mittauksen standardisuorasta (bisfenoli A). Nimelliset pitoisuudet 10, 50, 100, 500, 1000 ja 2500 µg/l.

Etinyyliestradiolivesinäytteiden pitoisuus mitattiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä. Näytteet uutettiin muita vesinäytteitä vastaavalla tavalla, käyttäen sisäisenä standardina 100 µl d4-etinyyliestradiolia pitoisuutena 5 mg/ml. Uutettujen liuosten tilavuus vaihteli välillä 500–1000 ml. Kaasukromatografiaa varten näytteet käsiteltiin Zhang ym. (2006) ohjeiden mukaan. Näytteistä haihdutettiin ensin MTBE typen avulla. Sen jälkeen niihin lisättiin 50 µl pyridiiniä (J.T. Baker, Hollanti) ja 50 µl BSTFA:a (N,O-Bis(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi 1 %:ssa trimetyyliklorosilaanissa, Fluka, Sigma Aldrich, Sveitsi). Näytteitä kuumennettiin puoli tuntia noin 70 °C:ssa, minkä jälkeen ne jälleen kuivatettiin typen avulla. Näytteisiin lisättiin 100 µl heksaania ja mitattiin EE₂ -pitoisuus kaasukromatografi-massaspektrometrillä.

Näytteet injisoitiin HP 6890 Senes Injectorilla (Saksa) ja analysoitiin HP Mass Selective Detector 5973:lla (Saksa). Erottelu tapahtui HP-5 5 %:ssa fenolimetyylisiloksaani -kapillaarikolonissa (30 m x 250 µm x 0,25 µm) käyttäen kantajakaasuna heliumia, jonka virtaus oli 0,5 ml minuutissa. Massaspektrometrissä käytettiin valikoivaa ioni-

monitorointia (selected ion-monitoring, SIM) ja seuratut ionit olivat 425.00, 429.00, 285.00 ja 287.00. Näytteiden antamat piikit integroitiin MSD Chemstation -ohjelmalla (Agilent Technologies, Kalifornia, USA). Tulokset laskettiin standardisuoran avulla, jonka EE₂ konsentraatiot olivat 10, 50, 100 ja 150 ng/ml. Standardit oli valmistettu metanoliin ja käsitelty kuten uutetut näytteet.

2.4 mRNA:n analysointi kvantitatiivisella PCR:llä

Kvantitatiivista PCR -analyysiä varten nestetyyppessä säilytetyistä näytteistä eristettiin ensin RNA TRI REAGENT^o -ohjeen mukaan (TRI REAGENT^o RNA/DNA/Protein Isolation reagent, Molecular Research Center Inc) käyttäen ko. reagenssia, joka koostuu fenolin ja guaniinithiosyanaatin seoksesta. Ohjeen mukaan eristykseen käytetään 1 ml reagenssia 50–100 mg (tuorepaino) näytettä kohti, joten näytteiden painon vaihdellessa useimmiten välillä 20–40 mg, käytettiin reagenssia 0,5 ml. Kokonaisista poikasista koostuvat näytteet homogenisoitiin käsin muovisauvoilla ensin TRI-reagenssissa tasaiseksi massaksi, minkä jälkeen seokseen lisättiin 100 µl kloroformia (Merck, Saksa, >99%). Näytteitä sentrifugoitiin (VWR By Hitachi Koki Himac CT 15RE) 15 minuuttia 4 °C:ssa (12000 g) ja vesifaasiin siirtynyt RNA pipetoitiin uuteen Eppendorf-putkeen. Jäljelle jäänyt proteiinin ja DNA:n sisältävä orgaaninen faasi siirrettiin –20 °C:n lämpötilaan proteiininanalyysiä varten. Vesifaasiin sekoitettiin 250 µl isopropanolia (Rathburn, HPLC-laatu), johon RNA saostui 10 minuutin sentrifugoimisen jälkeen (4 °C, 12000 g). Isopropanoli poistettiin ja RNA-pelletti pestiin 0,5 ml:lla 75 %:a etanolia (Etax Aa 99,5 % Altia) ja pyöritettiin vielä viisi minuuttia sentrifugissa (4 °C, 7500 g). Eristettyä RNA:ta säilytettiin 75 %:ssa etanolissa –20 °C:ssa cDNA-synteesiin asti.

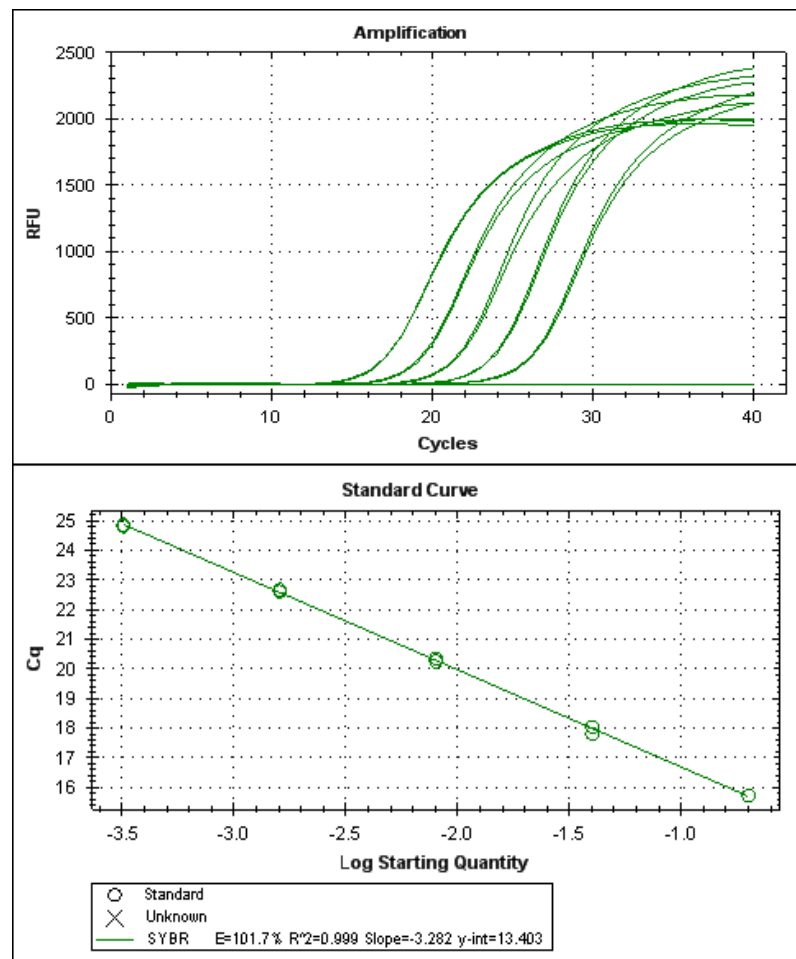
Komplementaarinen DNA (complementary DNA, cDNA) syntetisoitiin RNA:sta käyttäen Bio-Radin (CA, USA) iScript cDNA Synthesis Kit -reagenssejä sekä ohjetta. RNA-näytteestä poistettiin ensin etanoli ja pelletti liuotettiin noin 40–50 µl:aan steriiliä vettä. Liuoksen RNA-pitoisuus sekä puhtaus mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA), RNA-laaturajana pidettiin 260/280 -suhdetta 1,8 (Taylor 2010). Tämän jälkeen RNA:sta laimennettiin nukleasittomalla vedellä 15 µl:n liuos, jonka pitoisuus oli 100 ng/µl. Tähän lisättiin vielä 5 µl synteesikitin sisältämien reaktioseoksen (reaction mix) ja käänteiskopioijantsyymin seosta

(tilavuussuhde 4:1) ja ajettiin näyte C 1000 Thermal Cycler PCR-laitteella (Bio-Rad, CA, USA) ohjeen mukaan (5 min 25 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C, jäädytyslämpötila 4 °C).

MSc Tarini Sahoo oli aiemmin suunnitellut seeprakalan vitellogeniini 1:n (vtg1) sekä referenssigeenien β -aktiinin sekä elf1:n (elongation factor 1) alukkeet Primer-Blast-ohjelmalla (NCBI, Bethesda, Maryland, USA). Tämän jälkeen oli tutkittu MFOLD-ohjelmalla muodostavatko alukkeet mahdollisesti sitoutumista tai DNA:n monistumista vaikeuttavia sekundäärisiä rakenteita, esimerkiksi aluke saattaa muodostaa silmukoita itsensä kanssa (Taylor 2010). Suunnittelun jälkeen alukkeet tilattiin Sigmaalta (www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html). Alukkeiden sekvenssit olivat vitellogeniini 1:lle 5'-CTGTGTTGCAGTTCCTACTT (forward primer) ja 5'-TGACCAGCATTGCCATAAC (reverse primer), ja vastaavasti β -aktiinille 5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA ja 5'-ACCGCAAGATTCCATACCCA, sekä elf1 α :lle 5'-ATGGCATCAAGGGCATCAAG ja 5'-AAACATGGGCTGGTTCAAGG.

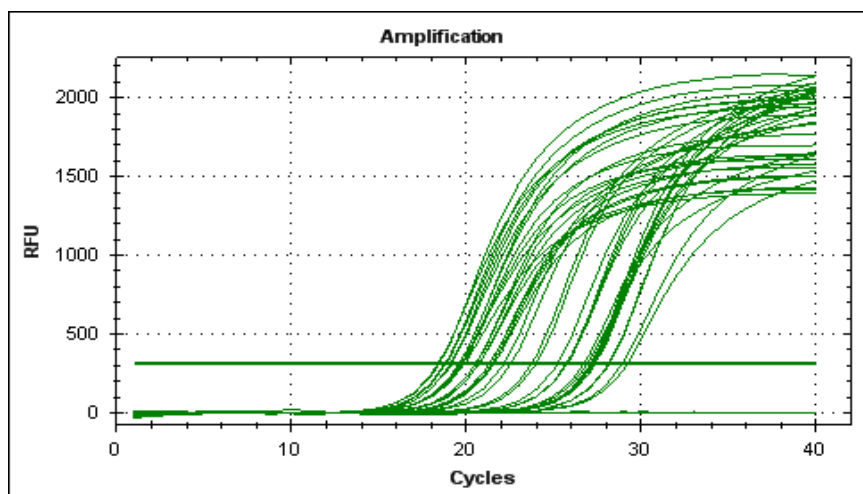
Ennen näytteiden kvantitatiivista PCR-ajoa kaikkien geenien tehokkuudet tarkistettiin erillisellä ajolla. Jokaisen geenin tehokkuutta testattiin laimentamalla siirtäjä-RNA:lla (transfer RNA, tRNA, Biorad, CA, USA) 200 ng/l kantaliuos-cDNA:sta viiden konsentraation laimennussarja: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 ja 1:3125, jolloin lopulliset konsentraatiot olivat siis 40, 8, 1,6, 0,32 ja 0,064 ng/l. Molempia testattavia primereita (reverse ja forward) laimennettiin 10 μ M kantaliuoksesta ensin steriilillä vedellä 2 μ M:ksi, joka lopullisessa ajossa laimeni 200 nM:ksi. Varsinaisen synteessin ilmentämiseen käytettiin SYBRGreen (Biorad, CA, USA) -väriainetta. cDNA-näytteet, alukeliuos ja SYBRGreen-väriaine pipetoitiin kuoppalevyille ja ajettiin BioRadin CFX96TM Real-Time PCR Detection System -laitteella (CA, USA).

Ajomenetelmä oli seuraava: 10 minuuttin jakso 95 °C:ssa, mikä aiheuttaa cDNA:n denaroitumisen ja mahdollistaa alukkeiden sitoutumisen. Tämän jälkeen ajettiin varsinainen polymeerasiketjureaktio: 40 kierrosta 30 sekuntia 95 °C:ssa, 30 sekuntia 60 °C:ssa ja 30 sekuntia 72 °C:ssa. Tätä seurasi sulamiskäyrän (melt curve) määrittäminen 55 °C:sta 95 °C:een 0,5 °C:n nousulla viiden sekunnin välein. Alukkeiden tehokkuudet olivat β -aktiinille 99,4 %, elf1:lle 101,7 % ja vtg1:lle 96,9 % (Kuva 8).



Kuva 8. Esimerkkiajo 20dpfZF-kalamallin tutkimuksissa käytettyjen geenien tehokkuuksien määrittämisestä. Kuvassa on *elf1*:n alukkeiden ajo. Yläkuvassa ajon amplifikaatio. Alakuvassa standardisuora, josta tehokkuudet laskettiin, ja jossa käytetyt cDNA:n konsentraatiot olivat 40, 8, 1,6, 0,32 ja 0,064 ng/l.

Alukkeita säilytettiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa $10\text{ }\mu\text{M}$ konsentraatioisena varastoliuoksena, josta ne kaikissa ajoissa laimennettiin juuri ennen käyttöä steriilillä vedellä $2\text{ }\mu\text{M}$ liuokseksi, joka lopullisessa seoksessa kuoppalevyllä laimeni 200 nM :ksi. Aiemmin syntetisoidusta näytteiden cDNA:sta mitattiin konsentraatio NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä ja näytteet laimennettiin siirtäjä-RNA-liuoksella (BioRad, CA, USA) $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ konsentraatioon. Alukkeista, steriilistä vedestä ja SYBRGreenistä tehtiin seos, joka suojattiin valolta. Tämän jälkeen 96-kuoppalevyllä pipetoitiin jokaiseen kuoppaan $5\text{ }\mu\text{l}$ tutkittavaa cDNA:ta sekä $20\text{ }\mu\text{l}$ alukeseosta kahtena rinnakkaisena teknisenä toistona. Kvantitatiivisen PCR:n ajoprotokolla oli vastaava kuin alukkeiden tehokkuutta määrittäessä (Kuva 9).



Kuva 9. Esimerkkikuva kvantitatiivisen PCR:n ajosta, kyseessä oktyylifenolin qPCR-ajon amplifikaatio. Kuvassa laitteen ilmoittama fluoresenssisignaali fluoresenssiyksikköinä (relative fluorescence units, RFU) suhteessa näytteiden kynnyssykleihin (threshold cycle, Ct) eli kuvasta näkyvät kerrat, jolloin näytteiden fluoresenssit ovat ylittäneet ennalta asetetun kynnyksen.

Jokaisessa PCR-ajossa valvottiin referenssigeenien laatua variaatiota kuvaavan M-arvon avulla (Tulokset taulukko 9). Kaikkien rinnakkaisten teknisten toistojen Ct-arvojen varianssin (CV) rajana pidettiin 0,2:ta, tätä isommilla variansseilla yhden toiston oletettiin epäonnistuneen ja se poistettiin analyysistä (Taylor 2010).

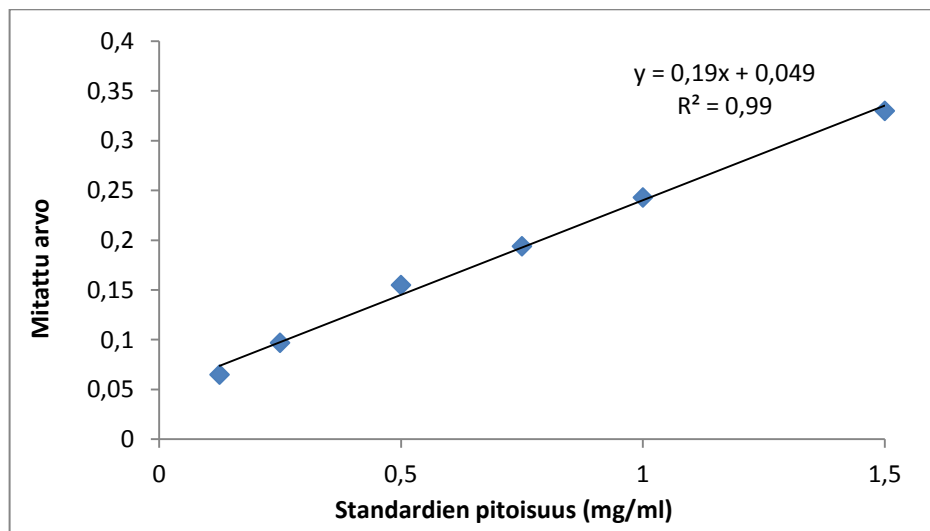
2.5 Proteiinianalyysi Western blot menetelmällä

Vitellogeniiniproteiinianalyysiä varten RNA-synteesissä syntyneet fenolinäytteet sulatettiin ja niihin lisättiin 0,3 ml etanolia per 1 ml alun perin käytettyä TRI REAGENT® -reagenssia, osalle näytteistä tämä vaihe tehtiin suoraan RNA-erottelun yhteydessä. DNA erotettiin muusta näytteestä viiden minuutin sentrifugoinnilla (4 °C, 2000 g, VWR By Hitachi Koki Himac CT 15RE). Supernatantti pipetoitiin uuteen 1,5 ml Eppendorf-putkeen proteiinianalyysiä varten.

Proteiinit eristettiin ensin näytteistä dialysoimalla (Hummon ym. 2007) mukaan 0,1 %:ssa SDS (natriumlauryylisulfaatti) -liuoksessa 4 °C:ssa noin vuorokauden ajan vaihtaen dialyysiliuosta kahden, neljän ja 16 tunnin kuluttua. Dialyysin jälkeen näytteet siirrettiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 15 minuuttia. Supernatantti ja pohjalle kerääntynyt massa erotettiin eri putkiin, ja kiinteä massa liuotettiin 200 µl:an

seosta, joka oli valmistettu 8M ureasta 100 nM:ssa Tris-HCl -liuoksessa ja 1 %:sta SDS:sta (suhde 1:1).

Dialysoitujen näytteiden kokonaisproteiinipitoisuus mitattiin 1:40 laimennuksista. Määrittystä varten tehtiin BSA-proteiinista (bovine serum albumin) standardisuora (0,0–1,5 mg/ml) tislattuun veteen (Kuva 10). Sekä standardeja että näytteitä pipetoitiin 5 µl 96-kuoppalevyille kolmena rinnakkaisena näytteenä. Kuoppiin lisättiin sen jälkeen Bio-Rad DC Protein Assay (CA, USA) reagensseja A (20 µl) ja B (200 µl). Proteiinipitoisuus mitattiin sekä aiemmin erotetusta nestefaasista että liuotetusta massasta, mutta koska nestefaasin proteiinipitoisuus oli pieni (< 1,0 mg/ml), käytettiin analyysiin vain alkuperäistä kiinteää faasia. Mittaus suoritettiin Labsystems iEMS Reader MF -fotometrillä käyttäen Ascent Software for iEMS reader MF -ohjelmaa.



Kuva 10. Esimerkkikuvaaja TRIAGENT^o-käsiteltyjen seeprakalan poikasnäytteiden kokonaisproteiinimittauksen standardisuorasta.

Western blot -proteiinijossa positiivisena kontrollina käytettiin TRI REAGENT -käsitlemättömiä EE₂-altistettuja poikasnäytteitä sekä puhdasta vitellogeniiniproteiinia. Käsitlemättömät poikasnäytteet homogenisoitiin muovisauvalla 50 µl:ssa KGB-puskuria (MgSO₄*7 H₂O, NaH₂PO₄*H₂O, Hepes, K⁺ glukonaatti, sorbitoli, pH 7,8). Näytteitä sentrifugoitiin viisi minuuttia (1000 g, 4 °C), minkä jälkeen supernatantti pipetoitiin uuteen Eppendorf-putkeen. Standardinäytteiden proteiinipitoisuus mitattiin kuten muistakin näytteistä.

Proteiinit eroteltiin SDS-Page-menetelmällä eli natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla kuten on kuvattu esimerkiksi artikkelissa Vehniäinen ym. (2003). Erottelugeeli (10 %) valmistettiin sekoittamalla tislattua vettä, 1,5 M Tris (pH 8,8) -liuosta, 30 %:sta akryyliamidia (Acrylamide/Bis Solution 29:1 (3,3 % C), Bio-Rad, CA) ja 10 %:sta SDS-liuosta. Geeli jähmetettiin lisäämällä 10 %:n ammoniumpersulfaatin vesiliuosta sekä TEMED (N,N,N',N' -tetrametyylietyleenidiamiini, ICN Biomedicals Inc., elektroforeesi-laatu) -liuosta. Ylägeeli valmistettiin samoin, tosin Tris-liuos oli 0,5 molaarista (pH 6,8). Näytteet laimennettiin puskuriliuoksessa (0,125 mol/L Tris-HCL, 2 % SDS, 20 % glyserolia, 0,02 % bromifenolinsinistä, ja 5 % 2-merkaptolietanolia) suhteessa 1:1 ja pipetoitiin 20 µg proteiinia yhteen näytekuppaan. Positiivisen kontrollin proteiinimäärä oli 50 µg. Näytteitä ajettiin geelissä Bio-Radin Mini-PROTEAN[®] -laitteella 200 V jännitteellä huoneenlämmössä noin 30 minuuttia.

Varsinainen Western blot -ajo suoritettiin Bio-Radin Criterion[™] Blotter -laitteella puskurissa, joka koostui 25 mM tris-liouksesta ja 192 mM glyysinistä (>99 %, Sigma) 20 % metanolissa (pH 8,3). Proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle (Whatman[®] Protran[®] Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Saksa), ajaen ne sähkövirran avulla 4 °C:ssa ja 100 V:n jännitteellä. Ajon jälkeen nitroselluloosakalvot värjättiin Ponceau S -värillä (0,2 % Ponceau S -väri, practical grade, Sigma, 3 %:ssa TCA:ssa) ja valokopioitiin. Kalvot huuhdottiin TBST-liuoksella eli 0,1 %:lla Tweenillä (TWEEN 20[®], polyoxyethelene sorbitant monolaurate, ICN, Ohio, USA) 10x TBS:ssä (9 % NaCl, 100 mM tris-HCl, pH 7,4) ja jätettiin yöksi 9 %:een maitojauhe-liuokseen TBST:ssä.

Primaarisena vasta-aineena käytettiin kanin polyklonaalista anti-seeprakala vitellogeniiniä (Biosense Laboratories AS, Norja) laimennettuna 1:500 TBST-puskurilla. Vasta-aineseosta pipetoitiin vaakasuoralle tasolle kiinnitetylle parafilmille ja aseteltiin sille kalvo proteiinipuoli alaspäin. Vasta-ainetta käytettiin 1 ml per nitroselluloosakalvo. Kalvoja inkuboitiin vasta-aineessa puolitoista tuntia, minkä jälkeen kalvot pestiin TBST:llä. Sekundäärisenä vasta-aineena käytettiin vuohen anti-kani IgG-HRP (Goat Anti-Rabbit, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) -proteiinia laimennettuna 1:10 000 TBST-puskurilla. Vasta-ainetta pipetoitiin taas parafilmille 1 ml yhdelle kalvolle ja inkuboitiin tunti, minkä jälkeen kalvot pestiin TBST:llä.

Kemiluminesenssi saatiin aikaan Milliporen (Massachusetts, USA) Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate -reagensseilla A ja B (suhde 1:1), joissa kalvoja inkuboitiin viisi minuuttia. Luminesenssi mitattiin Bio-Radin (CA, USA) ChemidocXRS-laitteella ohjelman Quantity One 4.6.3.-versiolla.

2.6 Tulosten analysointi

2.6.1 Vesinäytteiden pitoisuuksien laskeminen

LC-MS:lla analysoitujen vesinäytteiden muodostamat piikit integroitiin ja niistä laskettiin näytteiden pitoisuudet automaattisesti MassLynx-ohjelmalla (Waters, USA). Vesinäytteiden ympäristöestrogenipitoisuuksista laskettiin Microsoft Excelin avulla keskiarvot eri analyyseistä sekä näiden ero nimellisiin alkupitoisuuksiin nähden prosentteina.

GC-MS:llä analysoitujen etinyliestradiolinäytteiden muodostamat piikit integroitiin ja piikkien pinta-ala laskettiin MSD ChemStation -ohjelmalla (Agilent Technologies, CA, USA). Standardinäytteistä laskettiin RF (retention factor) -kerroin kaavalla 1.

$$RF = \frac{(A_{standardi} * C_{sis.std})}{(A_{sis.std} * C_{standardi})} \quad (1)$$

jossa $A_{standardi}$ on standardin piikin pinta-ala, $C_{sis.std}$ sisäisen standardin konsentraatio, $A_{sis.std}$ sisäisen standardin piikin pinta-ala ja $C_{standardi}$ standardinäytteen tunnettu konsentraatio.

RF-kertoimen avulla laskettiin lopullisten näytteiden konsentraation kaavalla 2.

$$C_{näyte} = \frac{(A_{näyte} * C_{sis.std})}{(A_{sis.std} * RF)} \quad (2)$$

jossa $C_{näyte}$ on näytteen pitoisuus ja $A_{näyte}$ näytteen piikin pinta-ala.

2.6.2 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivisen PCR:n tuloksista määritettiin käsittelyn vaikutus alustavasti REST 2009 (versio 2.0.13) -ohjelmalla, jolla arvioitiin vaikuttiko kemikaalialtistus vtg-geeniin ylös- vai alaspäin säätelevästi.

Tulosten merkitsevyyden selvittämiseksi verrattiin sekä suoria *vtg*-geenin kynnyssyklejä (threshold cycle, Ct) eri käsittelyillä että normalisoimalla *vtg*-geenin Ct-arvot referenssigeenien arvoihin sekä näytteiden arvot kontrollien arvoihin. Normalisointi tapahtui $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -menetelmällä Livak & Schmittgenin (2001) mukaan. Koska referenssigeenejä oli kaksi, laskettiin ensin molempien referenssigeenien Ct-arvoista keskiarvot jokaiselle näytteelle. Jokaisen näytteen *vtg*-ekspresso normalisoitiin sitten suhteessa tähän referenssigeenien keskiarvoon (ΔCt). Tämän jälkeen laskettiin ΔCt -arvojen ero altistettujen näytteiden sekä kontrollinäytteiden välillä $\Delta\Delta Ct$. Molemmat vaiheet on esitetty yhdistettynä kaavassa 3.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct(vtg) - Ct(ref))_{\text{näyte}} - (Ct(vtg) - Ct(ref))_{\text{kontrolli}} \quad (3)$$

Näistä arvoista laskettiin lopuksi näytteiden suhteellinen *vtg*-ekspression muutos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Näytteiden välisten erojen analysointi tehtiin ANOVA:lla sekä suorille Ct-arvoille että suhteellisille ekspression muutoksille ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Näytteiden varianssien homogeenisuus testattiin Levenen testillä ja koska se useimmiten ei toteutunut, tehtiin näytteille Log_{10} -muunnos. Näytteiden keskinäisten erojen havaitsemiseen käytettiin post hoc -testinä Tukey:n testiä. Mikäli näytteiden varianssien ero oli log-muunnoksesta huolimatta Tukey'n testiin liian suuri, käytettiin post hoc testinä Dunnett T3 -testiä. Näytteiden erot analysoitiin myös käsittelemättömistä Ct-arvoista. Ct-arvot kuitenkin ovat jo valmiiksi eksponentiaalisia, eikä niiden vertaamisesta toisiinsa siksi saa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -arvojen luotettavuuteen verrattavissa olevia tuloksia. Kaikki edellä mainitut tilastolliset analyysit suoritettiin PASW Statistics 17 (Illinois, USA) -tilastollisella ohjelmalla ja merkitsevyyden rajana oli $p < 0,05$.

EE₂ -tuloksista tehtiin myös annos-vastemallinnus käyttäen R-tilasto-ohjelman (versio 2.12.2) drc-lisäkirjastoa sekä laskettiin EC₅₀-arvo loglogistisella kolmen parametrin mallilla.

3 TULOKSET

3.1 Pitoisuudet koevesissä

Bisfenoli A:n, nonyyylifenolin sekä oktyylifenolin annos-vastekokeiden nimelliset (nk. nominaaliset) ja todelliset (ts. mitatut) pitoisuudet ovat taulukoissa 2-4. Kaikista tutkittavista aineista analysoitiin sekä 0 että 24 tunnin näytteet. Nonyylifenolin 24 h:n vesinäytteissä ei yhdessäkään havaittu enää nonyyylifenolia, joten taulukossa esitetyt pitoisuudet ovat altistuksen alkutilanteen arvoja molemmista kokeista (Taulukko 2). Muiden aineiden osalta taulukot esittävät tulokset sekä 0 että 24 tunnin vesinäytteiden osalta. Vaikka pienimpien konsentraatioiden nonyyli- ja oktyylifenolinäytteet uutettiin, ei LC-MS silti pystynyt havaitsemaan aineille selvästi tunnistettavaa piikkiä. Metodille ei ollut määritetty havaitsemisrajaa, joten on mahdollista, että alimmat konsentraatiot jäivät tämän alle.

Taulukko 2. Nonyylifenolikokeiden altistusvesien nimelliset ja mitatut (LC-MS) alkupitoisuudet sekä näiden suhde prosentteina. Ensimmäisessä kokeessa (NP1) nimelliset pitoisuudet olivat välillä 12,5–200,0 µg/l, toisessa (NP2) 1,0–200,0 µg/l. NA= ei analysoitavissa.

NP 1			NP 2		
Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%	Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%
13	NA	0	1	NA	0
25	33	133	10	NA	0
50	49	98	50	46	93
100	96	96	100	79	79
200	147	73	200	274	137

Taulukko 3. Bisfenoli A -kokeen 30.7.–4.8.2010 altistusvesien nimelliset ja mitatut (LC-MS) pitoisuudet sekä näiden suhde prosentteina. Vesinäytteet otettu altistuksen alussa (0 h) ja 24 tunnin altistuksen jälkeen vedenvaihdon yhteydessä (24 h).

BPA 0h			BPA 24h kuluttua		
Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%	Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%
125	188	150	125	340	272
250	308	123	250	269	108
500	592	118	500	549	110
1000	1061	106	1000	969	97
2000	2107	105	2000	1709	85

Taulukko 4. Oktyylifenolikokeen 15.2.–20.2.2011 altistusvesien nimelliset ja mitatut (LC-MS) pitoisuudet sekä näiden suhde prosentteina. Vesinäytteet otettu altistuksen alussa (0 h) ja 24 tunnin altistuksen jälkeen vedenvaihdon yhteydessä (24 h). NA= ei analysoitavissa.

OP 0h			OP 24h kuluttua		
Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%	Nim. pitoisuus (µg/l)	Mit. pitoisuus (µg/l)	%
5	NA		5	NA	
10	3	31	10	1	7
50	26	51	50	11	21
100	39	39	100	44	44

Yhteisvaikutuskokeen vesinäytteiden nimelliset ja mitatut pitoisuudet on esitetty taulukossa 5. Yksittäisten aineiden näytteissä oktyylifenoli oli juuri ja juuri havaittavissa ja seosnäytteissä ei ollenkaan. Myös nonyyllifenolin mitatut pitoisuudet olivat seoksissa huomattavasti nimellisiä pitoisuuksia pienempiä. Bisfenoli A oli kaikissa näytteissä havaittavissa ja mitatut arvot osuivat kolmesta aineesta tarkimmin nimellisiin arvoihin, vaikka olivatkin jonkin verran näitä suurempia.

Taulukko 5. Yhteisvaikutuskokeen 16.3.–21.3.2011 vesinäytteiden nimelliset ja mitatut (LC-MS) pitoisuudet sekä näiden suhde prosentteina. Kaikki arvot altistuksen alkutilanteesta otetuista vesinäytteistä. Näytteen (BPA+NP+OP) aineiden nimelliset pitoisuudet olivat samat kuin yksittäisten aineiden näytteissä ja näytteen (BPA+NP+OP 1:2) aineiden nimelliset pitoisuudet puolet yksittäisten näytteiden pitoisuuksista. NA = ei analysoitavissa.

Nimelliset pitoisuudet	BPA mitattu (µg/l)	NP mitattu (µg/l)	OP mitattu (µg/l)	BPA %	NP %	OP %
BPA 500,0 (µg/l)	546			109		
NP 50,0 (µg/l)		36			73	
OP 20,0 (µg/l)			0,2			0,8
BPA+NP+OP	590	3,3	NA	118	6,6	
BPA+NP+OP 1:2	320	2,9	NA	128	12	

Taulukossa 6 ovat GC/MS:llä mitatut EE₂-pitoisuudet. EE₂-annos-vastekokeessa olleen pitoisuuden 100 ng/l mittaus epäonnistui, sillä ioni 425.00 ei antanut mittauksessa integroitavissa olevaa piikkiä. Mitatut arvot vastasivat suurin piirtein nimellisiä (76–125 %) lukuun ottamatta bisfenoli A:n annos-vastekokeessa käytettyä positiivista kontrollia, jonka mitattu pitoisuus oli yli nelinkertainen nimelliseen verrattuna.

Kuolleisuus ensimmäisissä kokeissa (NP1 ja BPA) oli keskimäärin kolme kertaa suurempaa kuin jälkimmäisissä (NP2 ja OP) kokeissa.

Taulukko 8. Yhteisvaikutuskokeen (16.-21.2011) kuolleisuudet laskettuna keskiarvona rinnakkaisista näytteistä. Yksilömäärä osakokeissa 30.

Yhteisvaikutuskoe	
	%
MeOH	10,0
EE ₂	5,0
BPA	6,7
NP	8,3
OP	8,3
BPA+NP+OP	13,3
BPA+NP+OP 1:2	1,7

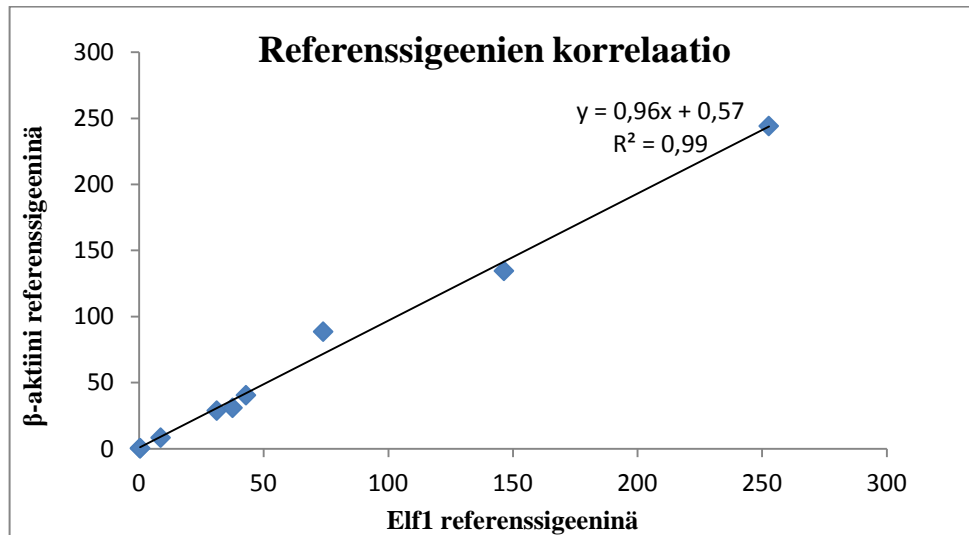
3.3 Referenssigeenien luotettavuus

Referenssigeenien luotettavuutta seurattiin niiden keskinäistä varianssia kuvaavan M-arvon sekä sisäistä varianssia kuvaavan CV-arvon avulla (Taulukko 9). Homogeenisissä aineistoissa M-arvon olisi hyvä olla alle 0,5 ja heterogeenisissä alle 1,0 (Taylor ym. 2010). CV-arvon puolestaan olisi hyvä olla alle 0,2. Vain ensimmäisessä nonyyllifenoliajossa arvo ylitti hieman rajan 0,5, joten keskimäärin referenssigeenien keskinäinen variaatio oli hyväksyttävissä rajoissa. Myös CV-arvot olivat keskimäärin hyviä.

Taulukko 9. Referenssigeenien β -aktiinin ja elf1:n keskiarvoiset CV- sekä M-arvot kaikissa kvantitatiivisen PCR:n ajoissa.

Koe	Geeni	CV-arvo	M-arvo
EE ₂	β -aktiini	0,04	0,11
	elf1	0,04	0,11
NP1	β -aktiini	0,17	0,57
	elf1	0,23	0,57
NP2	β -aktiini	0,03	0,10
	elf1	0,03	0,10
BPA	β -aktiini	0,04	0,13
	elf1	0,05	0,13
OP	β -aktiini	0,09	0,25
	elf1	0,08	0,25
Yhteisvaikutus	β -aktiini	0,06	0,17
	elf1	0,06	0,17

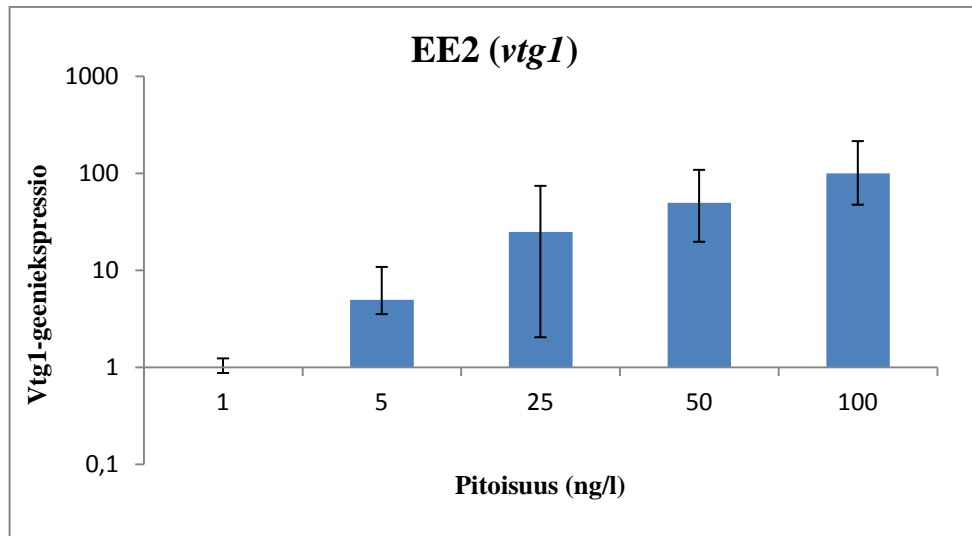
Vtg-geeniekspression laskemisessa käytetyt referenssigeenit, β -aktiini ja elf1, korreloivat toistensa kanssa. Pearsonin testillä korrelaatiokerroin EE_2 -altistuksen aiheuttamalle vtg-ekspressiolle oli 0,99 ja Spearmanin 1,00 (Kuva 11).



Kuva 11. Seepprakalan 20dpfZF-mallin kokeissa referenssigeeneinä käytettyjen β -aktiinin ja elf1:n yksittäin antamien tulosten korrelaatio. Kuvassa korrelaatio EE_2 -annosvastekokeen tuloksista laskettuna yksittäin molemmilla referenssigeeneillä.

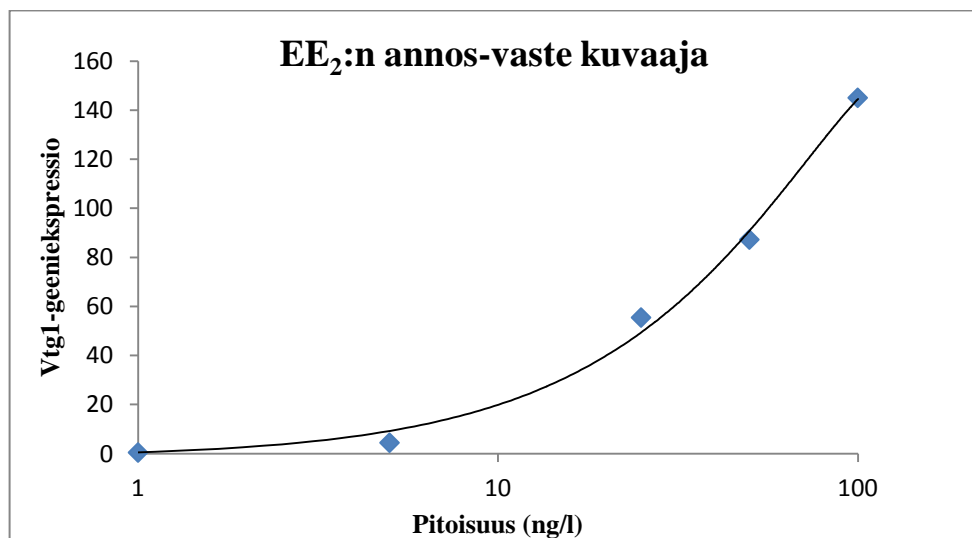
3.4 Etinyyliestradiolin vaikutus vtg1-geenin ekspressioon

Positiivisena kontrollina käytetty, mutta myös itsessään ympäristöestrogeeninä toimiva etinyyliestradioli nosti useimmissa altistuspitoisuuksissa vtg-geenin säätelytasoa (kuva 12). Tason nousu kasvoi pitoisuuden kasvaessa ja pitoisuudessa 100 ng/l ekspressio oli keskimäärin noin 90-kertainen. Vaikka kokonaisuudessaan näytteiden välillä olikin merkitsevä ero, ei post hoc -testi pienen näytekoon takia pystynyt laskemaan näytteiden välisiä eroja. Verrattaessa pelkkiä Ct-arvoja pitoisuudet 25–100 ng/l erosivat merkitsevästi liuotinkontrollista.



Kuva 12. Vtg1-geenin ekspression annos-vasteisuus seeprakalan 20 vuorokauden ikäisillä poikasilla (ns. 20dpf ZF -malli) etinyyliestradiolin pitoisuuksissa 1–100 ng/l viiden päivän altistuksen jälkeen verrattuna metanolikontrollin ekspressioon (\pm keskiarvon keskivirhe).

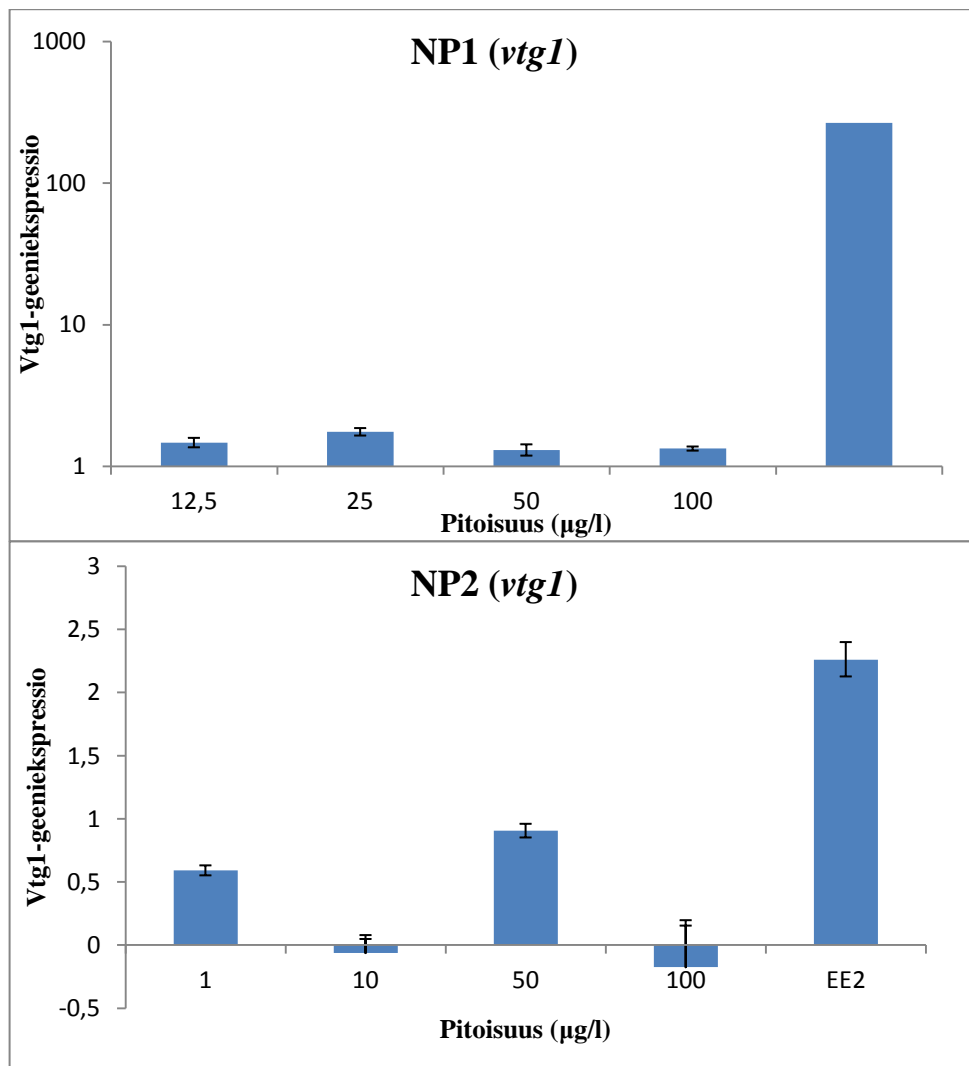
EE₂-altistuksesta saatiin laskemalla $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -arvoista kolmen parametrin loglogistisella mallilla EC₅₀-arvoksi 94 ng/l (Kuva 13). Tämä malli ei oleta altistuspitoisuuden 100 ng/l antaneen maksimivastetta, vaan että vtg-tason nousu mahdollisesti yhä jatkuu suuremmilla altistuspitoisuuksilla. Samaa mallia käyttäessä EC₂₀-arvoksi saatiin 28 ng/l ja EC₈₀-arvoksi 316 ng/l. Näin ollen tämän mallin mukaan vtg1-geeniekspression kasvu jatkuisi vielä paljon tässä kokeessa käytetyn maksimipitoisuuden yläpuolella.



Kuva 13. EE₂-altistuksen annos-vastekuvaaja altistettaessa 20 dpf seeprakalan poikasia viiden vuorokauden ajan pitoisuuksille 1 - 100 ng/l.

3.4 Vitellogeniinivasteen annos-vastekokeet: NP, BPA ja OP

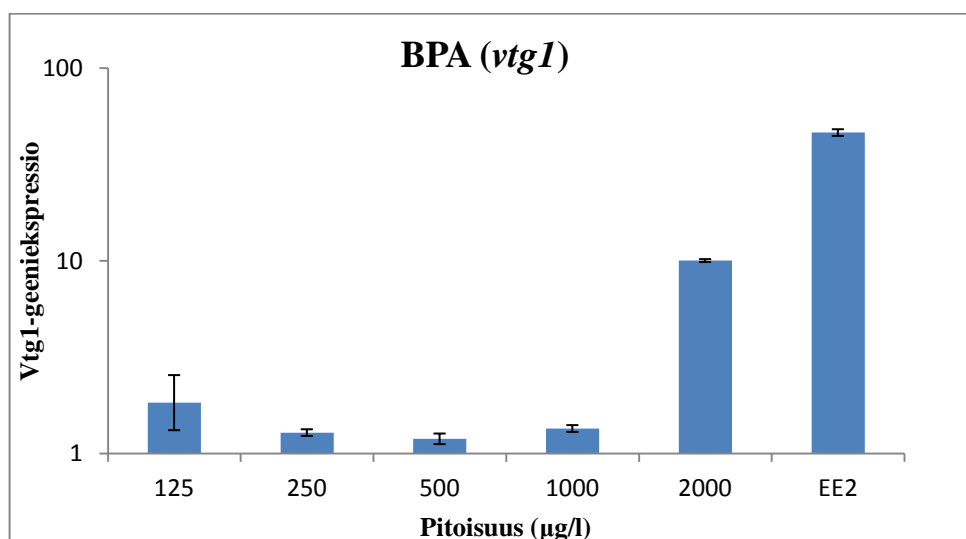
Sekä ensimmäisen että toisen nonyylifenolin kokeessa mikään tutkittu pitoisuus ei aiheuttanut havaittavaa vitellogeniini:n geeniekspression nousua metanolikontrollin ekspressioon verrattuna (Kuva 14). Toisessa kokeessa (NP2) pitoisuudet 10 ja 100 µg/l itse asiassa pienensivät keskimääräistä vtg-geenin ekspressiota, mutta tulokset missään altistuspitoisuudessa eivät tässäkään tapauksessa olleet tilastollisesti merkitseviä.



Kuva 14. Vtg1-geenin keskimääräinen ekspressio seeprakalan 20 vuorokauden ikäisillä poikasilla (20dpfZF-malli) nonyylifenolin annos-vastekokeissa verrattuna kontrollikokeen (liuotinmetanoli; NP1: 0,02 %, NP2: 0,01 %) ekspressioon viiden päivän altistuksessa (\pm keskiarvon keskivirhe). Etinyyliestradiolin (EE₂) pitoisuus oli 25 ng/l ja nonyylifenolin pitoisuudet 12,5–100 µg/l (NP1) ja 1-100 µg/l (NP2).

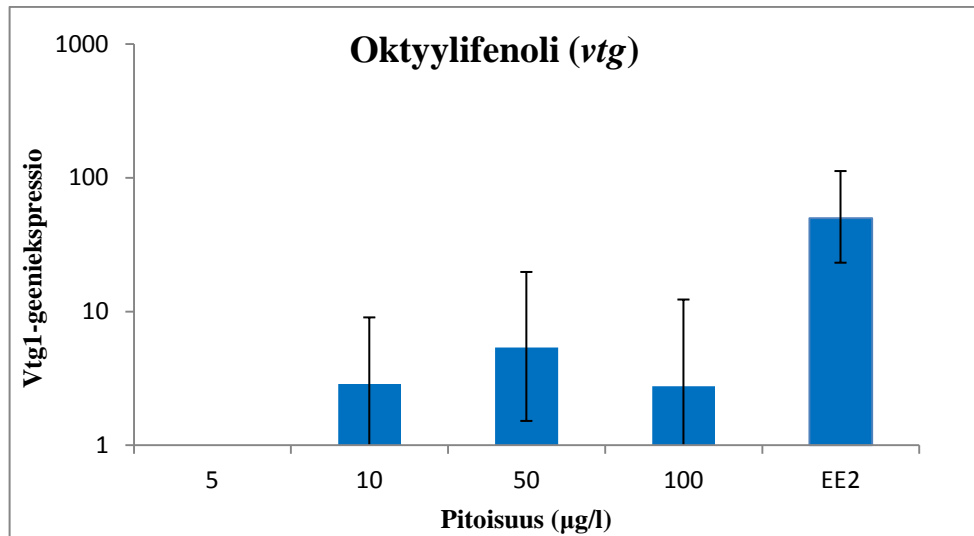
NP2-kokeessa positiivinen kontrolli etinyyliestradioli antoi muihin annos-vastekokeisiin verrattuna (Kuva 14) huomattavasti pienemmän vasteen, mikä lienee johtunut epähuomiossa käytetystä vanhentuneesta kemikaalista.

Bisfenoli-A:n kokeessa kaikki pitoisuudet aiheuttivat vtg-geenin ilmentymisen lievää kohoamista, mutta vain suurimmassa pitoisuudessa (2000 µg/l) ero oli huomattava eli noin 10-kertainen (Kuva 15). Verrattaessa pelkkiä Ct-arvoja, pitoisuudet 125 µg/l ja 2000 µg/l erosivat merkitsevästi ($p < 0,05$) metanolikontrollista, 250 µg/l ja 500 µg/l puolestaan eivät.



Kuva 15. Vtg1-geenin ekspressio 20 vuorokauden ikäisillä seeprakalan poikasilla (20 dpf -malli) viiden päivän altistuksen jälkeen verrattuna kontrollin ekspressioon (\pm keskiarvon keskivirhe). Positiivisen kontrollin etinyyliestradiolin (EE₂) pitoisuus oli 25 ng/l ja bisfenoli A:n nominaaliset pitoisuudet 125–2000 µg/l.

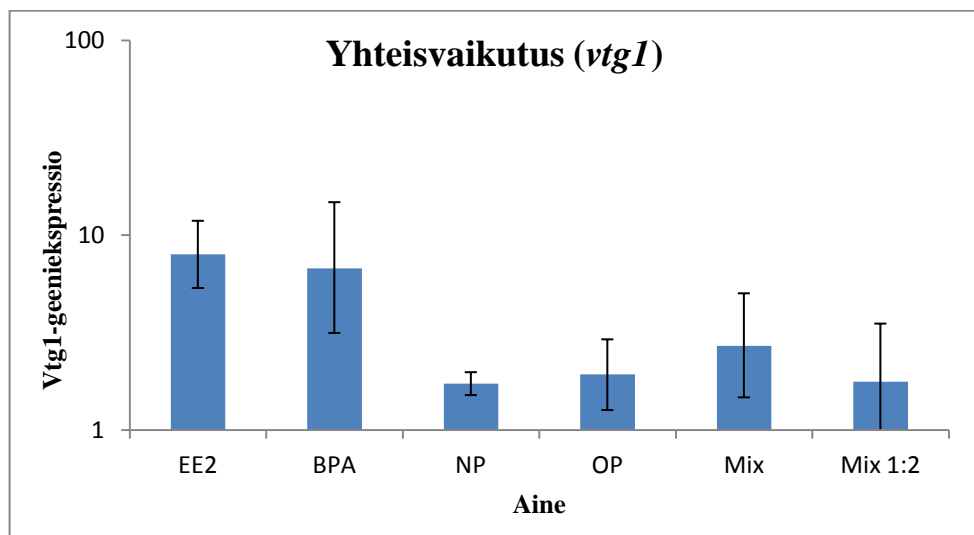
Oktyylifenolin nominaaliset alkupitoisuudet 10–100 µg/l aiheuttivat vtg-geenin toimintatason kohoamista verrattuna kontrolliin (Kuva 16), tosin ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä pienen toistomäärän takia. Verrattuna muihin yksittäisiin annos-vastekokeisiin, oktyylifenolin vaste oli epälineaarinen. Kuten etinyyliestradiolikokeessa, näytteiden varianssit olivat suuria, mikä johtui suurista koesarjojen välisistä eroista.



Kuva 16. Vtg1-geenin ekspressio 20 vuorokauden ikäisillä seeprakalan poikasilla (20dpfZF-malli) etinyyliestradiolin pitoisuudessa 25 ng/l ja oktyylifenolin pitoisuuksissa 5-10 µg/l viiden päivän altistuksen jälkeen verrattuna kontrollin ekspressioon (\pm keskiarvon keskivirhe).

3.5 Yhteisvaikutuskokeet

Yhteisvaikutuskokeessa eri altistuksien väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa (Kuva 17). Positiivinen kontrolli etinyyliestradioli nosti vtg1-geenin säätelyä vain noin 7-kertaiseksi, mikä viittaa ilmeiseen annostelussa sattuneeseen virheeseen.

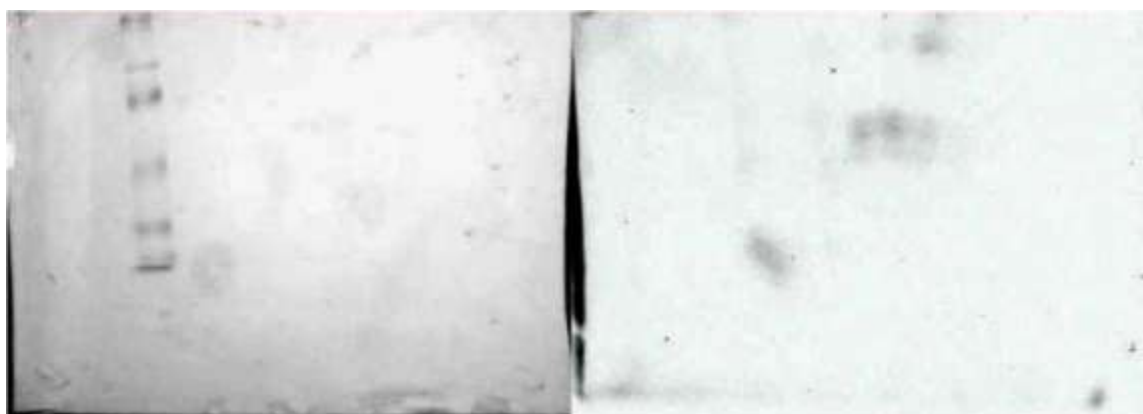


Kuva 17. Vtg1-geenin ekspressio seeprakalan 20 vuorokauden ikäisillä poikasilla (20dpfZF-malli) yhteisvaikutuskokeessa viiden päivän altistuksen jälkeen verrattuna metanolikontrollin ekspressioon (\pm keskiarvon keskivirhe). Kokeessa käytetyt pitoisuudet olivat BPA = bisfenoli A 500 µg/l, NP = nonyyliifenoli 50 µg/l, OP = oktyylifenoli 25 µg/l, Mix = edellisten seos ja Mix 1:2 = seos, jossa konsentraatiot puolet Mix -seoksesta.

Pelkkä bisfenoli A pitoisuudessa 500 µg/l lisäsi enemmän vtg1-geenin ekspressiota (n. 6,7 -kertainen) verrattuna aineiden seokseen (2,7 -kertainen). Sekä NP:n että OP:n vaikutukset jäivät yhteisvaikutusta pienemmäksi ja vastasivat aiemmissa annos-vastekokeissa saatuja arvoja.

3.6 Proteiinimittauksen kehittäminen

TRI REAGENT^o -käsittelyt näytteet eivät antaneen Western blot -ajossa näkyvää vastetta. Sen sijaan positiivisena kontrollina käytetyt TRI REAGENT^o -käsittelemättömät EE₂-altistetut (pitoisuus 25 ng/l) 20 dpf poikasnäytteet antoivat selvästi näkyvät palkit (Kuva 18). Alkuperäisen näyttemäärän pienen koon takia (poikasnäytteet massaltaan 20–40 mg) on käsittelyn jälkeinen vitellogeniiniproteiinimäärä ollut luultavasti liian pieni analyysiä varten tai tuhoutunut käsittelyn seurauksena kokonaan. TRI REAGENT^o -käsittelyt näytteet olivat pitoisuuksiltaan jo mitattaessa kokonaisproteiinipitoisuuksia huomattavasti käsittelemättömiä näytteitä pienempiä: alle 5 mg/ml verrattuna käsittelemättömien näytteiden arvoihin 20 - 40 mg/ml.



Kuva 18. Vasemmalla kuva valmiista proteiiniblotista, jossa näkyy molekyylimarkkerin muodostama juova. Oikealla proteiiniblotti, johon on Milliporen ImmobilonTM -reagensseilla aikaansaatu kemiluminenssi vasta-aineiden sitoutumiskohtiin. Keskellä näkyvät juovat TRIREAGENT^o -käsittelemättömistä EE₂ -altistetuista (25 ng/l, 5 vrk) poikasnäytteistä.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Koeolosuhteiden arviointi

Kaikkien kokeiden olosuhteet pyrittiin pitämään mahdollisimman samankaltaisena, mutta vaihtelua sekä koeolosuhteissa että poikasten ominaisuuksissa on saattanut olla. Mitatuista fyysistä olosuhteista lämpötila ja valo pysyivät kokeissa kohtalaisen samanlaisina. Sen sijaan veden laatu (pH, happi) vaihtelivat kokeissa pH:n osalta välillä 5,8–6,8 ja happipitoisuuden suhteen 89–97 % ASV. Happipitoisuuden mittaukseen vaikutti laitteen epävarma toiminta. Ensimmäisten kokeiden pH oli yllättävän matala (5,8). Aluksi epäiltiin laitteen väärää kalibrointia sillä kaikki pH-mittaukset suoritettiin samalla laitteella. Alkioveden pH oli kuitenkin myös myöhemmissä erikseen tehdyssä mittauksessa matala: noin 5,7. Alkioveden reseptissä ei mainittu pH:n säätämistä, joten sitä ei ole valmistettaessa tehty. Ohjetta ei kuitenkaan otettu alkuperäisestä lähteestä, joten ei ole varmaa, onko osa reseptistä jäänyt huomioimatta. Poikasten kuolleisuus ei kuitenkaan vaikuttanut epänormaalilta ja ravinnon otto oli normaalia. Joka tapauksessa erilaiset olosuhteet ovat saattaneet vaikuttaa altistumiseen ja myös tuloksiin.

Engeszer ym. (2007) kävivät läpi seeprakalojen luonnollisia elinympäristöjä Koillis-Intiassa ja havaitsivat elinolosuhteiden vaihtelevan pH:n suhteen välillä 5,9 ja 8,1. Tämä viittaisi, että seeprakalat pystyvät elämään normaalisti myös tämän työn kokeissa olleissa happamuusolosuhteissa. Luonnossa seeprakalan alkioiden ja poikasten uskotaan kehittyvän virtavesien läheisyydessä olevissa lammikoissa ja lammissa, joissa veden vaihtuvuus on mahdollisesti pieni ja CO₂:n tuotto saattaa paikoittain olla suurta. Myös alkioita ja poikaset sietänevät siis alhaisiakin pH-olosuhteita. Seeprakalan poikaset ovat kuitenkin herkkiä pH:n vaihteluille, mutta näissä kokeissa pH-arvot pysyivät kokeiden aikana tasaisina (Engeszer ym. 2007).

Poikasten kasvuolosuhteet ovat saattaneet vaihdella johtuen myös kasvattajan lisääntyneestä kokemuksesta. Ensimmäisissä kokeissa käytetyt poikaset ovat mahdollisesti kasvaneet ahtaammissa olosuhteissa kuin myöhemmin käytetyt, mikä on saattanut yhtenä syynä vaikuttaa ensimmäisen nonyylifenolikokeen (NP1) suureen kuolleisuuteen. Kaikkiin kokeisiin pyrittiin valitsemaan hyväkuntoisia poikasia, ja huonosti uivat ja syövät jätettiin kokeiden ulkopuolelle.

4.2 Kemikaalien altistuspitoisuudet vedessä

Positiivisesta kontrollista EE₂:sta otettiin vain yksi vesinäyte per altistus koetta aloitettaessa, joten ei voida päätellä, hajosiko aine altistuksen kestäessä. Bisfenoli A - kokeen EE₂-vesinäytteen pitoisuus oli yllättävän suuri, tämä tosin on paikkansapitävä BPA-kokeen positiivisen kontrollin yllättävän suuren ekspressiotason nousun kanssa. Käytetty EE₂-varastoliuos oli kokeessa samaa, mitä käytettiin ensimmäisessä nonyyliifenolikokeessa (NP1), samoin pipetoidut määrät olivat samoja, siksi tulos onkin hieman yllättävä. Toisaalta vaikka NP1-kokeen vesianalyysin mukaan EE₂-pitoisuus oli lähellä nominaalista, oli vtg1-vaste suurin kaikista yksittäisistä annos-vastekokeista. Muutenkin kun verrataan positiivisen kontrollin vesinäytteitä ja vtg1-ekspressiota, eivät tulokset vastaa toisiaan: NP2- ja yhteisvaikutuskokeen vesinäytteiden mitatut arvot ovat lähellä nominaalisia, vaikka kokeissa syntynyt vaste oli yllättävän pieni. Sen sijaan EE₂-annos-vastekokeen vesinäytteiden mitatut arvot olivat nimellisiin verrattuna pieniä, kun taas mitattu vtg1-vaste kasvoi tasaisesti altistuspitoisuuden kasvaessa.

Oktyylifenolin vesinäytteistä mitatut todelliset alkupitoisuudet olivat huomattavasti nimellisiä pitoisuuksia alhaisempia. Varastoliuokset valmistettiin samalla tavoin ja samoissa pitoisuuksissa kuin bisfenoli A:n ja nonyyliifenolin, joten OP-kantaliuoksen valmistamisessa tapahtuneet mahdolliset mittausvirheet tuskin selittävät suurta eroa. Lisäksi annos-vastekokeessa käytetty liuos sekä yhteisvaikutuskokeessa käytetty kantaliuos valmistettiin eri kerroilla, joten suuren virheen olisi pitänyt tapahtua molemmilla valmistuskerroilla. Käytetty kemikaali on saattanut olla liian vanhaa (avattu 31.12.2009) tai sen laatu on voinut huonontua muusta syystä. Toisaalta LC-MS standardisuorassa käytettiin samoja kemikaaleja, joten huonontuneen kemikaalin olisi pitänyt vääristää myös itse mittauksista eikä vain sen tulosta. Etanoliin liuotetun oktyylifenolin on aiemmin tehdyissä kokeissa havaittu vesiliuoksessa vähenevän 24 tunnissa jopa alle puoleen alkuperäisestä konsentraatiosta (Vázquez ym. 2009), mutta nyt tehdyssä kokeessa ei havaittu vähenemistä alkutilanteesta ja 24 altistuksen jälkeen otettujen näytteiden välillä.

Kaikissa kokeissa altistusvesi vaihdettiin 100 %:sti päivittäin. Alkyyliifenolien pitoisuuksien on aiemmin havaittu pienenevän altistusvedessä vuorokaudessa jopa alle puoleen (Vázquez ym. 2009). Päivittäisellä vedenvaihdolla taataan ainakin jokseenkin

pysyvämmät altistuspitoisuudet. Tasaisimman altistustilanteen loisi läpivirtaussysteemi, jossa koeastioiden pinnat olisi kyllästetty tutkittavalla aineella, jottei aineen nettokiinnittymistä pintoihin pääsisi tapahtumaan. Tämä on teknisesti kuitenkin vaikeampi toteuttaa kuin staattinen systeemi, jossa vesi vaihdetaan väliajoin. Oktyylifenolin pitoisuudet, vaikka olivatkin suhteessa nimellisiin arvoihin kaikkein pienimmät, säilyivät kuitenkin mitattavina vielä 24 tunnin jälkeen. Pitoisuudessa 50 µg/l oli 24 tunnin mittausarvo noin 40 % prosenttia tuoreesta altistusvedestä. Sen sijaan nonyylifenolilta ei mitään pitoisuutta pystytty edes havaitsemaan 24 tunnin jälkeen. Bisfenoli A:n pitoisuuksissa ei tapahtunut merkittävää pienenemistä vuorokauden altistuksen aikana.

4.3 Etinyyliestradiolin annos-vasteisuus 20dpfZF-kaloilla

Vitellogeniinivastetta voidaan mitata joko geeniekspressiona lähetti-RNA:na tai proteiinina. Aikuisilla kaloilla näitä mitataan useimmiten joko koko kalan homogenaatista, maksasta tai plasmasta, nuorilla tai hyvin pienillä eläimillä koko kalasta. Vtg-geeniekspressio oletettavasti ilmenee proteiinisynteesiä nopeammin, ja esimerkiksi Hemmer ym:n (2001) tutkimuksessa nonyylifenolin ja metoksikloorin vaikutuksesta sukukypsien loistohammaskarppikoiraiden (*Cyprinodon variegatus*) vitellogeniini-tuotantoon maksimigeeniekspressio saavutettiin viiden ensimmäisen päivän aikana, kun taas plasmasta mitatut proteiinitasot kasvoivat tasaisesti 42 päivän ajan. Thomas-Jones ym. (2003) saivat tulokseksi vtg-geeniekspression olevan proteiinimittausta herkempi, mutta proteiinitason nousevan suhteellisesti enemmän. Mitattaessa sekä vtg-mRNA:ta että proteiinia nuorten kirjolohinaaraiden maksasta E₂ ja EE₂ altistuksen jälkeen, saatiin molemmille vasteille seitsemän päivän altistuksessa samat LOEC -arvot, mutta mRNA-taso nousi proteiinitasoa nopeammin. VTG-proteiinin tason suhteellinen nousu (5000–50000-kertainen lähtötasoon verrattuna) koko altistuksen ajalta oli kuitenkin huomattavasti suurempi kuin mRNA:n (200–1000) (Thomas-Jones ym. 2003).

Etinyyliestradioli vaikutti 20dpfZF -kaloilla tässä tutkimuksessa nostaen vtg-ekspressiota EE₂-konsentraation noustessa. Aikaisemmissa tutkimuksissa EE₂ on vaikuttanut koirasseprakalojen VTG-proteiinitasoon plasmassa alkaen pitoisuuksissa 3 ng/l (Rose ym. 2002) ja 5 ng/l (Van den Belt ym. 2001). Sama pitoisuus nosti myös tässä tutkimuksessa hieman vtg-ekspressiota, vaikka tulos ei ollutkaan tilastollisesti merkitsevä. Versonnen ja Janssen (2004) saivat LOEC-arvoksi aikuisille koirasseprakaloille 10 ng/l, sen sijaan

pitoisuus 1 ng/l ei heidän tutkimuksessaan antanut tilastollisesti merkitsevää vastetta. Etinyyliestradioli vaikuttaa siis estrogeenisesti jo hyvin matalissa pitoisuuksissa ja sopii näin positiiviseksi kontrolliksi ympäristöestrogeenialtistuksiin alkaen pitoisuudesta 10 ng/l. Korkeat pitoisuudet voivat kuitenkin vaikuttaa koe-eläinten hyvinvointiin, joten käytettäessä sitä positiivisena kontrollina yhtenä pitoisuutena, ei pitoisuuden kannattane ylittää 30 ng/l. Tässä opinnäytetyössä saatu tulos vaikuttaa luotettavalta, sillä pitoisuus 1 ng/l ei antanut minkäänlaista nousua, kun taas pitoisuudessa 5 ng/l näkyi lievä vasteen nousu. Näin ollen myös 20 vuorokauden ikäisillä seeprakalan poikasilla on kyky vastata ulkoiseen ympäristöestrogeenialtistukseen ja ne kelpaavat koe-eläimiksi käytettäessä vasteena vitellogeniinin geeniekspressiota.

EE₂:n on myös havaittu vaikuttavan koirasseeparakalojen lisääntymiskykyyn vähentämällä sekä seksuaalikäyttäytymistä että hedelmöittämisen onnistumista. Pitoisuus 50 ng/l osoittautui Van den Belt ym. (2001) tutkimuksessa letaalitoksiseksi aikuisille seeprakaloille (60 % yksilöistä kuoli kolmen viikon altistuksen ja sen jälkeisen viiden päivän lisääntymiskauden aikana). Myös pienemmät pitoisuudet vaikuttivat lisäävästi altistuksen jälkeiseen kuolleisuuteen. Altistettaessa nuoria kaloja (kuoriutumista kaksi kuukautta) korkeille pitoisuuksille (100 ng/l) Scholz ja Gutzeit (2000) havaitsivat EE₂:n vaikuttavan myös medakan lisääntymiseen ja sukupuolielinten muodostumiseen sekä lisäävän aromataasientsyymiä tuottoa koirailta aikuisiässä.

4.4 Yksittäisten ympäristöestrogeenien annos-vasteisuus

Tässä tutkimuksessa nonyylifenoli ei aiheuttanut millään tutkittavalla pitoisuudella 20dpfZF-mallilla vitellogeniinigeenin ekspansion kasvua. Sen sijaan se osoittautui letaalitoksiseksi pitoisuudessa 200 µg/l molemmissa koesarjoissa ja yhteisvaikutuskokeen esikokeessa jopa pitoisuus 100 µg/l aiheutti 100 %:n kuolleisuuden. Nonyylifenolin on aiemmin todettu olevan letaalitoksinen rasvapäämudulla pitoisuuksissa 128–320 µg/l (LC₅₀, 96 tunnin altistus) ja medakalla pitoisuudessa 480 µg/l (LC₅₀, 48 tunnin altistus) (Servos 1999). Jo pitoisuus 100 µg/l aiheutti 40 %:n kuolleisuuden medakakoiraille 21 päivän altistuksessa (Ishibashin ym 2006). Samassa tutkimuksessa nonyylifenolin pitoisuus 100 µg/l vaikutti myös medakan munien tuotantoon sekä niiden kuoriutumiseen heikentävästi.

Jin ym. (2009) havaitsivat nonyylifenolin pitoisuuden 50 µg/l aiheuttavan vtg1-geeniekspression nousua seeprakalan alkioilla (0–3 dpf) ja nousu oli kontrolliin verrattuna noin kaksinkertainen. Sen sijaan alkioipoikasilla (4–11 dpf) ja nuorilla (17–24 dpf) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää vtg1-ekspression kasvua edes korkeimmassa testatussa pitoisuudessa (100 µg/l). Myöskään muiden tutkittujen geenien (vtg2, ER α , ER β) ekspresio ei kasvanut verrattuna kontrollikaloihin altistettaessa nuoria seeprakaloja nonyylifenolille. Sen sijaan alkioipoikasilla 100 µg/l nosti sekä vtg2:n että ER α :n säätelyä.

Tulosten perusteella siis nuoret seeprakalat ovat nonyylifenolin estrogeenisille vaikutukselle vähemmän herkkiä verrattuna kuoriutumattomiin alkioihin ja ruskuaispussivaiheisiin alkioipoikasiin. Aikuisille koiraskaloille nonyylifenolin LOEC-arvo oli Jin ym (2009) tutkimuksessa 100 µg/l ja NOEC-arvo 50 µg/l. Myös Yang ym. (2006) saivat aikuisten koirasseeprakalojen vitellogeniiniproteiini-induktion LOEC ja NOEC arvoiksi vastaavat luvut kolmen viikon altistuksessa. Yangin ym. (2006) tutkimuksessa naarasemokalojen nonyylifenolialtistus vaikutti myös munankuoren paksuuteen sekä syntyneiden jälkeläisten epämuodostumien määrään. Van den Belt ym. (2003) saivat altistaessaan sukukypsiä seeprakalakoiraista kolmen viikon ajan nonyylifenolin eri konsentraatioille LOEC-arvoksi vtg-proteiinin induktiolle 500 µg/l ja NOEC-arvoksi 100 µg/l.

Nonyylifenolin estrogeenisyyteen vaikuttaa myös käytettävän kemikaalin laatu. Tässä tutkimuksessa käytetty nonyylifenoli oli sivuketjutonta para-isomeeriä. Aiemmissä tutkimuksissa on usein käytetty teknistä nonyylifenolia eli para-nonyylifenolin usean eri sivuketjullisen isomeerin seosta (Preuss ym. 2006). Puhtaan sivuketjuttoman 4-n-nonyylifenolin on havaittu olevan estrogeenisiltä vaikutuksilta selvästi heikompaan verrattuna isomeerien seokseen kuten myös verrattuna useisiin yksittäisiin sivuketjullisiin isomeereihin (Blair ym. 2000, Preuss ym. 2006). Verrattaessa eri isomeerien aiheuttamaa MVLN -solujen (ihmisen MCF-7 rintasyöpäsoluja, joihin on siirretty estrogeenireseptori) transkription aktivoitumista, oli sivuketjuttoman 4-n-NP-isomeerin vaikutus vain 20 % positiivisena kontrollina käytetystä E₂:sta, kun taas isomeerien seos ylsi jopa 82 %:iin. Kvantitatiivisen PCR:n tuloksiin saattaisi nonyylifenolin osalta vaikuttaa myös nonyylifenolin vaikutus toiseen referenssigeeniin. Hoyt ym. (2003) havaitsivat nimittäin nonyylifenolin pienentävän elf1 α :n ja β :n ekspressiota seeprakalan alkioilla (0–48 hpf,

hours post fertilization). Pelkän β -aktiinin käyttäminen referenssigeeninä ei kuitenkaan muuttanut tuloksia, joten referenssigeenivalinta ei tässä tapauksessa vaikuttanut.

Oktyylifenoli ei aiheuttanut tässä työssä tilastollisesti merkitsevää vtg1-geenin tason kohoamista. Tulos vastaa aiemmin aikuisilla seeprakaloilla tehtyjä kokeita, sillä Van den Belt ym. (2003) eivät myöskään havainneet 4-tert-oktyylifenolin aiheuttavan tilastollisesti merkitsevää plasman VTG-proteiinin tason kohoamista koirasseeprakaloilla pitoisuuksissa 12,5–100 $\mu\text{g/l}$ kolmen viikon altistuksessa. Van den Beltin (2001) ryhmän tulokset vastaavat kuitenkin tämän tutkimuksen tuloksia 20dpfZF:lla siinä, että heidän tutkimuksessaan oktyylifenoli lievästi nosti VTG-proteiinin tasoa pitoisuuksissa 25 ja 50 $\mu\text{g/l}$, mutta ei pitoisuudessa 100 $\mu\text{g/l}$. Samoin tässä tutkimuksessa korkein vtg1-geenin transkription taso saavutettiin pitoisuudessa 50 $\mu\text{g/l}$, mistä pitoisuudessa 100 $\mu\text{g/l}$ se jonkin verran laski. Näin ollen oktyylifenoli näyttäisi ainakin joissakin tapauksissa noudattavan epälineaarista annos-vasteisuutta.

Ortiz-Zarragoitia ja Cajaraville (2005) havaitsivat oktyylifenolin pitoisuuden 500 $\mu\text{g/l}$ nostavan sukukypsien koirasseeprakalojen maksan vitellogeniiniproteiinin pitoisuutta seitsemän päivän altistuksessa. Oktyylifenolin on myös havaittu vaikuttavan vitellogeniinin tuotantoon koiraskirjoahvenilla (*Cichlasoma dimerus*) (Vázquez ym 2009) pitoisuudessa 30 $\mu\text{g/l}$ sekä -karpeilla (*Carassius carassius*) (Zhang ym. 2010) pitoisuudessa 60 $\mu\text{g/l}$. Toisin kuin tässä opinnäytetyössä, Zhang ym:n (2010) tutkimuksessa vaste oli lineaarinen alueelle 5 - 500 $\mu\text{g/l}$. Saattaakin olla, kuten myös Van den Belt ym. (2001) epäilivät, ettei seeprakala ole lajina herkkä oktyylifenolin vaikutuksille. Oktyylifenolin on havaittu vaikuttavan seeprakaloilla myös pituuskasvuun, maksan peroksisomien lisääntymiseen sekä munarauhasten kokoon (Van den Belt ym. 2001, Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville 2005, Dumitrescu ym. 2010).

Bisfenoli A aiheutti 20dpfZF:lla tässä tutkimuksessa vtg1-geenin lisäätelyä pitoisuudessa 2000 $\mu\text{g/l}$, minkä perusteella NOEC-arvoksi saatiin 1000 $\mu\text{g/l}$. Kausch ym (2008) havaitsivat bisfenoli A:n lisäävän vtg1-geenin säätelyä kolmen viikon altistuksen jälkeen sukukypsillä seeprakalakoirailla pitoisuudessa 1000 $\mu\text{g/l}$. Myös Van den Belt ym. (2003) saivat vastaavan LOEC-arvon VTG-proteiinin tuotantoon koirasseeprakaloille kolmen viikon altistuksessa. Bisfenoli A:n on myös todettu vaikuttavan sukukypsien

koirasrasvapäämutujen vitellogeniinin tuottoon alkaen pitoisuudesta 160 µg/l (Staples ym. 2011) sekä koiraskirjolohien vitellogeniinin tuottoon pitoisuudessa 500 µg/l (Lindholst ym. 2000).

Bisfenoli A:n on todettu säätelevän vitellogeniiniin lisäksi myös muita geenejä seeprakalalla, esimerkiksi joitakin yksilönkehitystä ohjaavia (*hox5a5*), glukoosiaineenvaihduntaan liittyviä (*gapdh*, *pgam1*) sekä metaboliaan vaikuttavia geenejä (Kausch ym. 2008). Solutason kokeissa BPA:n on havaittu stimuloivan mm. aromataasiaktiivisuutta (Whitehead & Rice 2006).

4.5 Ympäristöestrogenien yhteisvaikutus

Tässä tutkimuksessa havaittu yhteisvaikutus oli loppujen lopuksi pienempi kuin yhden yksittäisen aineen eli bisfenoli A:n vaikutus. Toisaalta pienen toistomäärän ja näytteiden suuren vaihtelun takia tilastollista merkitsevyyttä tuloksilla ei ollut. Suuresta näytteiden välisestä vaihtelusta huolimatta molemmat BPA-kokeet antoivat kuitenkin seosta suuremman geenivasteen nousun. Näin ollen näiden tulosten perusteella seoksen muut ainesosat toimivat seoksessa antagonistisesti. Yksittäin nonyylifenolilla tai oktyylifenolilla ei ollut mitään vaikutusta.

Yhteisvaikutuksia on yritetty mallintaa usealla tavalla. Zhang ym. (2010) vertailivat eri mallinnustapoja yhteisvaikutuksen selville saamiseksi ja päätyivät pitämään konsentraatioadditiota tutkituista malleista sopivimpana. Konsentraatioadditiomalli (CA, concentration addition) perustuu ajatukseen, että jokainen seoksen osa-aine vaikuttaa samalla lailla samaan kohde-elimeen. Itsenäisen toiminnan (IA, independent action) mallissa sen sijaan osa-aineet voivat vaikuttaa myös kukin omalla laillaan esim. omaan kohde-elimeensä. Yleisesti ottaen katsotaan, että ympäristöestrogenit vaikuttavat konsentraatioaddition lailla ja myös useat tutkimustulokset tukevat tätä teoriaa (Thorpe ym. 2001, Thorpe ym. 2003, Brian ym. 2005, Zhang 2008).

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu ympäristöestrogenien vaikuttavan sekä additiivisesti että myös antagonistisesti, riippuen seoksen kemikaaleista. Sun ym. (2009) havaitsivat 17β-estradiolin, 4-tert-nonyylifenolin ja BPA:n toimivan additiivisesti tutkiessaan sukukypsillä medakakoirilla jokaisen aineen kolmen eri konsentraation binäärisiä seoksia. Jokainen aine saavutti tosin altistuksessa tason, jolla toisen aineen konsentraation

kasvattaminen ei enää nostanut vitellogeniiniproteiinin määrään plasmassa; E₂:lla tämä pitoisuus oli 25 ng/l, BPA:lla 2500 µg/l ja NP:lla 250 µg/l. Myös Brian ym. (2005) havaitsivat additiivisen vaikutuksen tutkiessaan sukukypsillä rasvapäämutukoirailta viiden estrogeenisesti vaikuttavan aineen yhteisvaikutusta pienissä konsentraatioissa (EE₂ 0,12 ng/l, E₂ 5 ng/l, 4-*t*-NP 1,4 µg/l, 4-*t*-OP 9 µg/l, BPA 30 µg/l). Vaikka yksikään aine ei yksittäin vaikuttanut plasman VTG-proteiini-induktioon, aiheutti yhteisvaikutus tilastollisesti merkitsevän vasteen. Yhteisvaikutus on havaittu myös tutkittaessa vaikutusta rasvapäämutujen munantuotantoon, heptosomaattiseen indeksiin sekä koiraiden sekundäärisiin sukupuolipiirteisiin (Brian ym. 2007). Myöskään hiivasoluilla tehdyllä estrogeenisuus-testillä (YES, yeast estrogen screen) neljän estrogeenisesti vaikuttavan aineen (4-*n*-OP, 4-NP, *o,p'*-DDT, genisteiini) yhteisvaikutus ei eronnut konsentraatioadditiolla ennustetusta. YES-testissä hiivasolut on geenilisäyksen avulla saatu tuottamaan ihmisen ER α estrogeenireseptoria, jonka aktivoitumista estrogeenisten aineiden vaikutuksesta mitataan (Payne ym. 2000).

Sen sijaan Lin ja Janz (2006) havaitsivat 4-nonyylifenolin teknisen seoksen pienentävän EE₂:n pitoisuuden 10 ng/l aiheuttamaa VTG-proteiini-induktiota NP:n melko korkeissa pitoisuuksissa (10–100 µg/l) altistettaessa nuoria seeprakaloja kuoriutumista (2 dph) 60 dph asti. Sen sijaan hyvin matalassa EE₂:n pitoisuudessa (1 ng/l) nonyyylifenoli suurensi VTG-induktiota pitoisuudessa 10 µgNP/l, mutta laski sitä taas 100 µgNP/l:ssa. On siis mahdollista, että alkyylifenolit vaikuttavat myös antagonistisesti useamman yhdisteen seoksessa. Tähän viittaa myös Rajapakse ym. (2004) tulos, kun he tutkivat kuuden estrogeenisesti vaikuttavan aineen (EE₂, E₂, 4-NP, 4-*t*-OP, genisteiini, BPA) seosta E-SCREEN-testillä. Kun alkuperäinen yhteisvaikutus erosi ennustetusta additiivisuudesta, Rajapakse ym (2004) määrittivät antagonistisesti vaikuttavan aineen joko nonyyli- tai oktyylifenoliksi. Lin ja Janz (2006) spekuloiivat antagonismin johtuvan kilpailusta, jossa heikommin estrogeenisesti vaikuttava aine (OP, NP) kilpailee vahvempien (E₂, EE₂) kanssa sitoutumisesta estrogeenireseptoriin ja vähentää näin kokonaisseoksen estrogeenistä vaikutusta mitattuna VTG-proteiinin induktiona. Tästä ilmiöstä voi olla kyse tässäkin tutkimuksessa silloin kun vaikuttamaton 4-*n*-nonyylifenoli tai heikosti estrogeeninen oktyylifenoli saattoivat kilpailla sitoutumisesta estrogeenireseptoriin bisfenoli A:n kanssa ja laskea näin seoksen kokonaisvaikutusta. Verrattuna 17 β -estradioliin (100 %) on bisfenoli A:n sitoutumisen estrogeenireseptoriin arvioitu olevan 0,008 %, 4-*n*-

nonyylifenolin 0,0032 % ja oktyylifenolin 0,015 % (Blair ym. 1999). Näiden arvojen perusteella oktyylifenoli siis sitoutuisi estrogeenireseptoriin tehokkaimmin.

Aineiden erilainen vaikutus selittyy osaltaan myös eri vaikutusreiteillä: esimerkiksi bisfenoli A:n ja genisteiinin on todettu säätelevän eri genejä seeprakalalla. Bisfenoli A:n on todettu vaikuttavan moniin proteiinien muodostumiseen ja hajoamiseen vaikuttaviin geeneihin, kun taas genisteiini vaikuttaa moniin alkionkehitystä ohjaaviin geeneihin mm. munasolua ympäröivän zona pellucida -kerroksen proteiineihin. E₂, BPA ja genisteiini myös vaikuttavat kaikki yksilönkehitystä ohjaaviin proteiineihin, mutta eri geenien välityksellä. Eri vaikutukset viittaavat eri vaikutusreitteihin, onkin epäilty myös, että aineet voivat vaikuttaa joko reseptorien kautta tai ilman. Estrogeeniset vaikutukset, kuten vitellogeniinin tuotto, tapahtuvat kuitenkin estrogeenireseptorin kautta (Kausch ym. 2008). Aineet myös sitoutuvat eri tehokkuuksilla eri reseptorityyppeihin, esimerkiksi rotan kudoksilla tehdyissä kokeissa genisteiini ja bisfenoli A sitoutuivat tehokkaammin ERβ:an, kun taas EE₂ sitoutui ERα:an (Kuiper ym. 1997).

4.6 Vitellogeniinivaste biomarkkerina: 20dpfZF-malli

Vitellogeniinin proteiini- ja mRNA-vasteet eroavat kinetiikaltaan. VTG-proteiinilla on havaittu rasvapäämudun veressä mRNA:ta pidempi puoliintumisaika, minkä takia proteiinivasteen mittaaminen on mahdollista jonkin aikaa myös altistuksen loputtua. mRNA:n havaitseminen altistuksen alettua on kuitenkin nopeampi ja mahdollistaa myös lyhyemmän altistusajan (Schmid ym. 2002). Tässä tutkimuksessa altistusaika oli kohtalaisen lyhyt (5 vrk) verrattuna useisiin muihin, erityisesti aikuisilla kaloilla tehtyihin tutkimuksiin. mRNA lienee siinä mielessä ollut proteiinia parempi mittauskohde. Proteiinimittaus ei tässä opinnäytetyössä antanut tulosta, mikä tosin on voinut johtua näytteiden käsittelystä TRI REAGENT[®] -menetelmällä ja sen jälkeisestä dialyysistä, mitkä olivat vähentäneet näytteiden kokonaisproteiinimäärää. TRI REAGENT[®] -menetelmän ei sinänsä pitäisi vähentää proteiinimäärää, vaan päinvastoin sen on aiemmissa tutkimuksissa havaittu lisäävän eroteltavissa olevan proteiinin määrää (Lenchik ym. 2005). Onkin mahdollista, että jos käsittelyn harjoittelua olisi jatkettu muutamain muutoksin, tulokset olisivat jatkossa parantuneet.

Useimmilla luukaloilla on havaittu kolme erilaista vitellogeniinityyppiä, tosin näiden luokittelussa on vielä epäyhtenäisyyttä. Hiramatsu ym. (2006) totesivat katsauksessaan vitellogeniiniproteiinien jakautuvan pääasiassa kahteen eri ryhmään, ”täydellisen” ruskuaisproteiinin rakenteen omaaviin (VgA ja VgB) ja niihin, joilta puuttuu proteiinista fosvitiiniryhmä (phosvitin; VgC). Näistä ”täydelliset” vitellogeniinit voidaan jakaa vielä kahteen eri ryhmään lipovitelliinin rakenteen perusteella: VgA:lla LvH-ketjurakenne on osittain hajonnut kun taas VgB:llä se on ehjä (Wang ym. 2005). Myös proteiineja koodaavat geenit eroavat niin, että samaa proteiinia voi koodata useampi geeni. Seeprakalalta vitellogeniinigeenejä on löydetty ainakin seitsemän. Näistä vtg 1, 4, 5, 6 ja 7 koodaavat VgA:ta, vtg2 VgB:tä ja vtg3 VgC:tä (Wang ym. 2005, Henry ym. 2009).

Tässä tutkimuksessa vitellogeniinigeenin mittaamiseen käytettiin vain yhtä muotoa, vtg1:tä. Vitellogeniineistä tunnetaan vtg1:n promoottorialueen sekvenssi, mikä mahdollistaa tietyn geenin mittauksen (Henry ym 2009). Vtg1:tä ja vtg2:ta pidetään yleisesti kahtena hallitsevimpana geeninä, mutta näidenkin herkkyys eroaa toisistaan riippuen kalan iästä ja altistuksen pituudesta (Jin ym. 2009). Wang ym. (2005) tutkivat vtg1:n, vtg2:n ja vtg3:n ilmentymistä naarasseeparakalan kudoksissa ja havaitsivat vtg1:tä ja vtg2:ta olevan runsaasti mm. maksassa, suolistoa ympäröivissä rasvasoluissa ja munarauhasissa, kun taas vtg3:n ekspressio oli näissä joko vähäistä tai olematonta (suhde 1,0:0,01:0,001). Sen sijaan Meng ym. (2009) havaitsivat vtg4:n ja vtg5:n olevan sekä hallitsevia naarasseeparakalojen maksassa että ainoita havaittavia vtg-geenejä altistamattomien koiraskalojen maksasoluissa. Tämä oletettavasti johtuu koiraiden pienestä 17 β -estradiolin tuotosta sukusolujen erikoistumisen kautena, mikä myös saa aikaan lievän vtg-geenien aktivoitumisen. Samassa tutkimuksessa saatiin tulokseksi myös vtg1:n ja vtg2:n ekspressioiden olevan toisiaan vastaavaa kummankaan hallitsematta. Henry ym. (2009) tutkivat eri vitellogeniiniproteiineja koodaavien geenien ekspression kasvua altistettaessa eri-ikäisiä seeprakaloja E₂:lle ja EE₂:lle ja havaitsivat suurimman muutoksen ekspressiossa aikuisilla kaloilla vtg1:ssä ja alkiopoikasilla (3–6 dpf) vtg2:ssa. Sen sijaan kun Yamaguchi ym. (2005) testasivat estrogeenisesti vaikuttavien aineiden (mm. BPA ja NP) vaikutuksia medakakoiraiden vtg1:n ja vtg2:n ilmentymiseen, he havaitsivat korkeimpien altistuspitoisuuksien (BPA 8000 μ g/l ja NP 500 μ g/l) vaikuttavan tilastollisesti merkitsevästi vain vtg2:n induktioon, pääasiassa koska myös kontrollit nostivat vtg1:n tasoa.

Vitellogeniinivaste toimii siis hyvin ympäristöestrogeenien biomarkkerina. Tätä tukevat sekä useat aiemmat tutkimukset että myös tämän työn tulokset, sillä altistus tunnetulle synteettiselle estrogeenille EE₂:lle nosti 20dpfZF-koeyksilöiden vitellogeniinitoimintaa. Sekä mRNA:n että proteiinin mittauksessa on etunsa, joten riippuneen altistuksen kestosta, koe-eläimestä sekä tavoitteesta, kumman vasteen valinta on suositeltavaa. Kuitenkin mitattaessa vain yhtä geenimuotoa on hyvä pitää mielessä, etteivät tulokset kokonaisuudessaan kerro vitellogeneeni-induktiosta, eivätkä näin ole välttämättä suoraan verrannollisia proteiinituotantoon, joka riippuu usean eri vtg-geenin toiminnasta.

4.7 Seeprakalan varhaiset poikasvaiheet koe-eläiminä

Verrattuna muihin kalalajeihin seeprakala vaikuttaa olevan koe-eläimenä hieman epäherkempi. Van den Belt ym. (2003) tutkivat nonyyylifenolin, oktyylifenolin ja bisfenoli A:n vaikutuksia sekä aikuisten seeprakalakoiraisten että nuorten kirjolohien vitellogeniiniproteiinin tuottoon ja havaitsivat kirjolohen olevan selvästi herkempi. Heidän mukaansa nuoret kirjolohet olivat ainakin kolme kertaa herkempiä oktyylifenolille (LOEC kirjolohella 30 µg/l, seeprakalalla ei vaikutusta 100 µg/l:ssa) ja viisi kertaa herkempiä nonyyylifenolille (kirjolohella LOEC 100 µg/l, seeprakalalla LOEC 500 µg/l) kuin koirasseeprakalat. Bisfenoli A:n LOEC-arvo oli kummallakin lajilla 1000 µg/l. Lindholst ym. (2003) päätyivät samanlaisiin tuloksiin bisfenoli A:n osalta. Verratessaan VTG-proteiini-induktiota myös he havaitsivat aikuisen kirjolohen olevan 2–5 kertaa aikuista koirasseeprakalaa herkempi.

Osaltaan eri herkyyteen voi vaikuttaa lajien erilainen vierasainemetabolia ja erityiskyky. BPA poistuu seeprakalan plasmasta nopeasti maksaan, jossa se metabolisoidaan pääasiassa glukuronidikonjugaatiksi ja siirretään sappirakkoon. Eliminaation maksassa uskotaan tapahtuvan nopeasti verrattuna mm. kirjolohen lämpimämmän elinympäristön takia. Verrattuna kirjolohen plasmaan ja maksaan, BPA:n erityksen seeprakalan koko elimistöstä on havaittu tapahtuva 50–300 % nopeammin (Lindholst ym. 2003).

Tähän asti seeprakaloilla tehdyistä kokeista suurin osa on suoritettu aikuisilla yksilöillä ja erityisesti vitellogeniinivastetta mitattaessa aikuisilla koirilla. Jin ym:n (2009) tutkimuksessa aikuiset seeprakalakoiraat (mitattuna maksasta) olivat hieman nuoria (17–24 dpf, mitattu koko kehon homogenaatista) kaloja herkempiä tuottamaan vtg1 mRNA:ta

seitsemän päivän E₂-altistuksessa (LOEC-arvo aikuisilla 0,1 ja nuorilla 0,25 µg/l). Erot eivät kuitenkaan olleet suuria ja molemmilla ikäryhmillä geenien induktiotasot olivat korkeita eli mitattu vaste suuri. Versonnen ja Jansen (2004) testasivat EE₂:n vaikutusta sekä aikuisten koirasseeparakalojen että nuorten yksilöiden VTG-proteiinin määrään ja havaitsivat, etteivät koepitoisuudet 1–100 ng/l nostaneet poikasten VTG-tasoa merkittävästi. Yhtenä syynä mahdollisesti oli poikasten ikä, sillä altistusajankohtana poikasten iät olivat joko 28–42 tai 28–61 dph, eli ne olivat jo mahdollisesti ohittaneet sukusolujen erikoistumisvaiheen alkamisen.

Verrattaessa eri-ikäisten poikasten sopivuutta koe-eläimiksi, ikäryhmät 20:stä päivästä eteenpäin vaikuttavat sopivimmilta estrogeeniaineenvaihdunnan näkökulmasta. Kun Andersen ym. (2003) altistivat eri-ikäisiä seeprakalan poikasia EE₂:lle, he havaitsivat VTG-proteiinivasteen olevan selvästi pienempi poikasilla, joita oli altistettu kausina kuoriutumisen–10 dph ja 10–20 dph verrattuna myöhempisiin poikaskausiin. Kun verrattiin poikasia, joita oli altistettu aikoina kuoriutumisen–30 dph tai 20–30 dph, ei havaittu 20 ylimääräisen altistuspäivän nostavan ko. vastetta merkittävästi. Sen sijaan alkioajan altistus (hedelmöittyminen–kuoriutuminen) nosti VTG-proteiinin määrää selvästi. Tässä opinnäytetyössä 20 dpf poikaset olivat EE₂-altistuksen perusteella kykeneviä tuottamaan vtg1 mRNA:ta ja myös muilla aineilla nonyyylifenolia lukuun ottamatta saatiin lievä, joskin tilastollisesti ei-merkittävä vaste aikaan. Tämän ikäluokan poikaset ovat siis mahdollinen, joskin ehkä hieman epäherkkä, malli käytettäväksi estrogeenisuuskokeissa. Myös muut seikat, kuten helppo poikasten tuotto ja lyhyt kasvatusaika lisäävät seeprakalan poikasten käytettävyyttä koe-eläiminä tähän tarkoitukseen.

Paljon on keskusteltu myös alkioiden ja alkiopoikasten käyttämisestä aikuisten ja nuorten yksilöiden sijaan. Mm. Muncke ja Eggen (2006) ehdottivat vtg1-geenin käyttöä nk. MolDar (molecular *D. rerio* teratogenicity test) -analyysissä tutkittaessa estrogeenisia vaikutuksia. MolDarT-kokeessa mitataan tiettyjen kohdegeenien ilmentymistä altistettaessa alkioita viiden päivän ajan hedelmöityksestä 120 tuntiin. Muncke ja Eggen (2006) havaitsivat altistuksen etinyyliestradiolille nostavan alkioiden vtg1-geenin ekspressioita merkittävästi kaikilla testatuilla annoksilla 72 tunnista alkaen. Myös aiemmin mainitun Andersen ym:n (2003) tutkimuksessa alkiot olivat herkkiä ympäristöestrogeenien vaikutuksille VTG-proteiinin tuottoa tutkittaessa. Hyvin varhaisten alkioiden altistaminen

saattaa kuitenkin vääristää tuloksia jos huomioon ei oteta mahdollisesti emoilta saatua vtg-mRNA:ta tai EE₂:n bioakkumuloitumista *ex ovario* alkiokudoksiin (Andersen ym. 2003).

4.8 Vtg-geeniekspression kvantitatiivinen PCR

Verrattuna muihin analyysitapoihin, kvantitatiivinen PCR on herkkä, sillä se pystyy teoriassa antamaan tuloksen, kunhan tutkittavasta RNA:sta on yksikin kopio näytteessä. Tarvittava RNA:n määrä luotettavaan analyysiin on myös pieni, 100–200 ng (Larkin ym. 2003). Täten se on kätevä esimerkiksi poikasnäytteitä tutkittaessa, jolloin näytteiden RNA ja proteiinimäärät eivät välttämättä ole suuria. Nyt suoritetuissa kokeissa kokonais-RNA-pitoisuudet TRI REAGENT^o -eristyksen jälkeen olivat keskimäärin 500–1000 µg/ml.

Tässä tutkimuksessa RNA-eristys sekä sitä seuraava cDNA-synteesi onnistuivat laadunvarmistuksen perusteella hyvin, lukuun ottamatta joitakin yksittäisiä näytteitä, sillä 260/280 -suhde oli useimmissa näytteissä yli 1,8. Sen sijaan kvantitatiivisen PCR:n ajossa saattoi näytteiden välillä tapahtua käsittelyeroja, mikä heijastui liian suurina CV-arvoina. Teknisten replikaattien osalta tilanne parani myöhempien analyysien osalta kokemuksen karttuessa, mutta biologisten toistojen välinen ero oli osassa kokeita hyvin suuri. Esimerkiksi EE₂-kokeessa biologisten toistojen annos-vastesuunta oli sama, mutta vasteessa eli ekspressiovoimakkuudessa oli suuri ero, mikä heikensi tilastollisen analyysin luotettavuutta. Suurempi biologisten toistojen määrä olisi tässä suhteessa helpottanut tilannetta, mutta koeyksilöiden rajallinen määrä eli poikasten pieni syntyvyys oli rajoittava tekijä.

Myös referenssigeenien luotettavuus vaikuttaa kvantitatiivisen PCR:n tuloksiin. Useampaa kuin yhden referenssigeenin käyttämistä pidetään suositeltavana (Taylor 2010). Tässä työssä käytettiin kahta referenssigeeniä, β-aktiinia ja elf1α:a. Ennen PCR-ajoja suoritettun tehokkuuden testauksen ja varsinaisten ajojen M-arvojen perusteella referenssigeenit toimivat hyvin ja niiden keskinäinen yhteensopivuus oli hyvä. Verrattaessa tuloksia, jotka oli laskettu vain toisen referenssigeenin avulla, tulokset vastasivat hyvin toisiaan.

4.9 Ympäristöestrogenien yhteisvaikutus riskinarvioinnissa

Ympäristöstä mitatut estrogeenisesti vaikuttavien aineiden pitoisuudet riippuvat mittausspaikasta ja ajankohdasta. Jätevedenpuhdistamoiden käsitellyistä vesistä mitatut nonyylifenolin pitoisuudet ovat vaihdelleet havaitsemattomasta arvoon 343 µg/l asti.

Jätevedenpuhdistamoiden lietteistä mitatut pitoisuudet ovat voineet yltää jopa 12 400 µg/kg (k.a.) asti. Myös luonnon pintavesistä on mitattu korkeita pitoisuuksia (640 µg/l), mutta suurin osa mitatuista pitoisuuksista on asettunut välille 0,0–5,0 µg/l. Sen sijaan sedimenteissä hyvin korkeat eli yli 10 000 µg/kg nonyylifenolin pitoisuudet ovat suhteellisen yleisiä (40 %:ssa Ying ym. 2002 referoimasta tutkimuksesta) (Ying ym. 2002, Soares ym. 2008). Kanadassa Toronton ja Mississaugan jätevedenpuhdistamon poistovesistä mitattiin oktyylifenolin pitoisuuksia 0,12–2,5 µg/l, kun taas jätevedenpuhdistamoiden lietteistä samassa tutkimuksessa korkeimmat mitatut pitoisuudet olivat 9,2–12,1 µgOP/g eli 9200–12100 µgOP/kg (k.a.) (Lee & Peart 1995, kuten siteerattu Ying ym. 2002). Saksassa jätevedenpuhdistamon poistovesistä on mitattu oktyylifenolin pitoisuuksia 30–110 ng/l (Hansen ym. 1998). Ympäristössä oktyylifenolin pitoisuuksia on mitattu pintavesistä 0,47 µg/l asti ja sedimenteistä 670 µg/l asti (Ying ym. 2002). Nonyyli- ja oktyylifenolin pitoisuudet jäävät näin vesistöissä alle rajan, jolla olisi tutkimusten valossa lyhytaikaisia hormonaalisia vaikutuksia.

Pintavesissä on mitattu bisfenoli A:n pitoisuuksia havaitsemattomasta 12 µg/l:aan, suurimman osan mittaustuloksista kuitenkin ollessa alle 1 µg/l. Kolpin ym. (2002) mittasivat BPA:n pitoisuuksia muiden estrogeenisesti vaikuttavien aineiden ohella 139 Yhdysvaltojen joesta ja saivat mediaaniarvoksi 0,14 µg/l ja maksimiksi 12 µg/l. Lu ym. (2010) puolestaan mittasivat kolmesta Kiinan Jangtse-joen kohdasta eri estrogeenisesti vaikuttavien aineiden pitoisuuksia ja saivat BPA:lle arvot väliltä 7,5 ja 60,7 ng/l. Jätevedenpuhdistamoiden laskuvesistä on mitattu Saksassa pitoisuuksia 8–33 ng/l. Luonnossa havaitut pitoisuudet jäävät siis kaikilla tässä tutkimuksessa käsitellyillä aineilla huomattavasti alle pitoisuuksien, joissa vaikutuksia hormonitoimintaan on havaittu. Tämä saattaa johtua mm. aineiden sitoutumisesta orgaaniseen ainekseen ja hajoamisesta valon vaikutuksesta nestefaasissa.

Yksittäin mitattuna useimmat ympäristöestrogeenit esiintyvät siis pitoisuuksina, joilla ei ole eliöissä havaittavia lyhytaikaisia vaikutuksia. Ympäristössä aineet esiintyvät kuitenkin monen aineen seoksina ja on arvioitu että luonnon pintavesistä löytyisi yhteensä yli 50 000 vierasainetta (Matthiessen & Johnson 2007). Kuten edellä käsiteltiin, ympäristöestrogeenit vaikuttavat usein additiivisesti (Payne ym. 2000, Brian ym. 2005, Sun ym. 2009, Zhang ym. 2010), mutta nykyisen lainsäädännön puutteissa tätä mahdollisuutta ei huomioida

lainkaan. Olisikin parempi arvioida aineiden vaikutusta ei yksittäin, vaan esimerkiksi estrogeeniekvivalentteina (Matthiessen & Johnsson 2007). Vuonna 2013 Euroopan Komissio on arvioimassa uudelleen REACH-asetuksen hormonitoimintaa häiritseviä aineita käsittelevän artiklan 57 kohdan f mainitsevat aineet uuden tieteellisen tutkimuksen valossa (Asetus EY/1907/2006). Tällöin on kaavailtu olevan mahdollista ottaa arviointiin myös yhteisvaikutus, vaikka yksittäisten aineiden pitoisuudet jäisivätkin alle PNEC-tason.

Vaikutusten arviointia vaikeuttaa myös kirjava testikäytäntö. Sekä solu- että yksilötason kokeissa koeolosuhteet ja -lajit vaihtelevat paljon. Vaikka kaikilla selkärankaisilla vaikuttaa periaatteessa sama fysiologinen pääestrogeeni, 17β -estradioli, eroavat vaikutukset ja vaikuttavat pitoisuudet lajeittain (Matthiessen & Johnsson 2007). Esimerkiksi verrattaessa eri ympäristöestrogeeneillä tehtyjä ER TA (estrogeenireseptorin transkription aktivoituminen) -testien tuloksia, havaittiin suuria lajien ja reseptorityyppien välisiä eroja johtaen jopa 1000-kertaisiin laboratorioden välisiin eroihin tuloksissa (Dang ym. 2011a). Ympäristöestrogeenien vaikutukset saattavat olla myös epälineaarisia, mikä vaikeuttaa vasten arvioimista testattujen pitoisuuksien ulkopuolella. Vaikutukset saattavat myös ilmetä vasta altistuksen jälkeen tai viiveellä tietyn akkumuloitumisen tason jälkeen (Matthiessen & Johnsson 2007).

Tässä opinnäytetyössä yhteisvaikutuskokeen tulos oli pienempi kuin yhden yksittäisen aineen, BPA:n vaikutus. Vaikutusta ei siis voinut ennustaa CA- tai IA -mallin avulla. Tässä työssä käytettiin kolmen heikosti estrogeenisen aineen seosta, mutta luonnossa seokset ovat moninkertaisesti monimutkaisempia. Myös yksittäisten aineiden vaikutukset erosivat oktyylifenolin osalta lineaarisesta vasteesta.

Riskinarvioinnissa on kuitenkin huomioitava, että pelkkä estrogeeninen vaikutus ei sinänsä tee aineesta välttämättä haitallista. Naarilla estrogeenijärjestelmä on luonnollisesti toiminnassa koko ajan, ja voi olla vaikea arvioida, mikä lisäys ympäristön estrogeenisillä aineilla tähän on. Ympäristössä haitta syntyy vasta, jos aineilla havaitaan olevan populaatiotason vaikutuksia eli vaikutus on esimerkiksi lisääntymiskykyyn tai syntyneiden poikasten sukupuolijakaumaan. Pelkkä vitellogeniinituotanto koirilla tai poikasilla ei sinänsä ole erityisen haitallista (Sumpter & Jobling 1995), vaikka korkeilla pitoisuuksilla toksisia vaikutuksia voikin olla. Vitellogeniini toimiikin parhaimmillaan biomarkkerina

populaatiotason vaikutusten riskiä arvioidessa. Vitellogeniinivasteen onkin todettu hyvin ennustavan monimutkaisempia esim. lisääntymiseen ja kudosten muutoksiin liittyviä vasteita (Dang ym. 2011b).

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

20dpfZF-malli toimi ympäristöestrogenien vaikutusten ennakoinnissa, sillä poikaset olivat fysiologisesti valmiita estrogeenivasteelle ja kykeneviä altistettaessa tuottamaan vitellogeniiniä. Yksittäisten aineiden vaikutukset erosivat aineiden seoksen vaikutuksesta, sillä seosyhteisvaikutus oli bisfenoli A:n yksittäistä vaikutusta pienempi. Seosten yhteisvaikutusten eroaminen yksittäisten aineiden vaikutuksista tulisi myös huomioida lainsäädännössä nykyistä paremmin.

Viime aikoina on paljon käyty keskustelua eläinkokeiden korvaamisesta sekä solutasolla että alkioilla tehtävillä kokeilla. Niillä voi kuitenkin olla vaikea arvioida monimutkaisia vasteita, erityisesti vaikutuksia koko eliön elinkaareen tai lisääntymiseen. Siksi tarvitaan myös kokeellista tietoa vaikutuksista eläviin yksilöihin myös alkiota myöhemmillä ikäkausilla. Lyhytaikaisten kokeiden lisäksi myös vaikutusta koko elinkiertoon ja erityisesti lisääntymiseen on jatkossakin tarpeen tutkia. Vitellogeniinivaste toimii kuitenkin hyvin biomarkkerina aineiden mahdollisen estrogeenisen vaikutuksen osalta, mukaan lukien kun käytetään 20dpfZF-mallia.

KIITOKSET

Tämä työ ei olisi valmistunut ilman ohjaajieni professori Aimo Oikarin ja MSc. Tarini Sagoon korvaamattomia neuvoja sekä kärsivällisyyttä opastamisessa, joten suuri kiitos heille. Kiitokset myös FT Eeva-Riikka Vehniäiselle, FM Marja Lahdelle, Siiri Latvalalle sekä Jyväskylän Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen Ympäristötieteiden ja -teknologian osaston muulle henkilökunnalle avusta analyysitekniikoiden opettelemisessa sekä muusta tuesta.

LÄHDELUETTELO

- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, Å., Norrgren, L. & Petersen, G.I. 2003: Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). –Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 134: 365 – 374.
- Asetus EY/1907/2006: Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006 kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta. EUVL L396/1, 11.9.2011 saatavilla osoitteesta:
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:FI:PDF>.
- Bardet, P-L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V. & Vanacker, J-M. 2002: Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). – Journal of Molecular Endocrinology 28: 153 – 163.
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R. & Sheehan, D.M. 2000: The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. – Toxicological Sciences 54: 138 – 153.
- Botkin, D.B. & Keller, E.A. 2010: Environmental Science, –Earth as a living planet. John Wiley & Sons, Inc. s. New Jersey, USA s. 1 – 16.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A & Sumpter, J.P. 2005: Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. – Environmental Health Perspectives 113: 721 – 728.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A. & Sumpter, J.P. 2007: Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. –Environmental Science and Technology 41: 337 – 344.
- Cheek, A.O. 2006: Subtle sabotage: endocrine disruption in wild populations – Revista de Biología Tropical 54: 1 – 19.
- Clelland, E. & Peng, C. 2009: Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. –Molecular and Cellular Endocrinology 312: 42 – 52.
- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A. & Guillette Jr., L.J. 2007: An ecological assesment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. –Reproductive Toxicology 24: 225 – 239.
- Dang, Z., Ru, S., Wang, W., Rorije, E., Hakkert, B. & Vermeire, T. 2011a: Comparison of chemical-induced transcriptional activation of fish and human estrogen reseptors: Regulatory implications. –Toxicology Letter 201: 152 – 175.

- Dang, Z., Li, K., Yin, H., Hakkert, B. & Vermeire, T. 2011b: Endpoint sensitivity in fish endocrine assays: Regulatory implications. –*Toxicology Letter* 202: 36 – 46.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, T. & Gore, A.: Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. –*Endocrine Reviews* 30: 293 – 342.
- Dumitrescu, G., Petculescu Ciochina, L., Voia, S., Dronca, D. & Boca, L. 2010 : Evaluation of octylphenol effect on development and survival on zebrafish (*Danio rerio*) during different ontogenic period. –*Animal Science and Biotechnologies* 43: 479 – 483.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A. & Parichy, D.M. 2007: Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. –*Zebrafish* 4: 21 – 38.
- Evans, D.H. (toimittanut) 1998: The Physiology of Fishes. 2. painos CRC Press LLC Florida, USA s. 465 – 488.
- Hakala, H. & Välimäki, J. 2003: Ympäristön tila ja suojele Suomessa. 2. painos. Gaudeamus, Helsinki s. 17 – 34.
- Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M. & Blaise, C. 1998: Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. –*Trends in analytical chemistry* 17: 448 – 451.
- Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Høglund, M.D. & Denslow, N.D. 2001: Effects of p-nonylphenol, methoxychlor and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). –*Environmental Chemistry and Toxicology* 20: 336 – 343.
- Henry, T.B., McPherson, J.T., Rogers, E.D., Heah, T.P., Hawkins, S.A., Layton, A.C. & Saylor, G.S. 2009: Changes in the relative expression pattern of multiple vitellogenin genes in adult male and larval zebrafish exposed to exogenous estrogens. – *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154: 119 – 126.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heidemann, W. & Peterson, R.E. 2005: Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. –*Toxicological Sciences* 86: 6 – 19.
- Hoyt, P.R., Doktycz, M.J., Beattie, K.L. & Greeley Jr., M.S. 2003: DNA microarrays detect 4-nonylphenol-induced alterations in gene expression during zebrafish early development. –*Ecotoxicology* 12: 469 – 474.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V. & Hara, A. 2006: Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environment. –*Marine Biology* 149: 35 – 47.
- Hummon, A.B., Lim, S.R., Difilippantonio, M.J. & Ried, T. 2007: Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. –*BioTechniques* 42: 467 – 472.
- Ishibashi, H., Hirano, M., Matsumura, N., Watanabe, N., Takao, Y. & Arizono, K. 2006: Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). –*Chemosphere* 65: 1019 – 1026.
- Jin, Y., Chen, R., Sun, L., Qian, H., Liu, W. & Fu, Z. 2009: Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of

- zebrafish as biomarker of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. – *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 150: 414 – 420.
- Kausch, U., Alberti, M., Haindl, S., Budczies, J. & Hock, B. 2008: Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: Gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). – *Environmental Toxicology* 23: 15 – 24.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. 1995: Stages of embryonic development of the zebrafish. – *Developmental Dynamics* 203: 253 – 310.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. & Buxton, H.T. 2002: Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. – *Environmental Science and Technology* 36: 1202 – 1211.
- Kuiper, G.G.J., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J. 1997: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . – *Endocrinology* 138: 863 – 870.
- Larkin, P., Knoebl, I. & Denslow, N.D. 2003: Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. – *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136: 149 – 161.
- Lenchik, N., Desiderio, D.M. & Gerling, I.C. 2005: Two-dimensional gel electrophoresis characterization of the mouse leukocyte proteome, using a tri-reagent for protein extraction. – *Proteomics* 5: 2202 – 2209.
- Lin, L.L. & Janz, D.M. 2006: Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. – *Aquatic Toxicology* 80: 382 – 395.
- Lindholst, C., Pedersen, K.L. & Pedersen, S.N. 2000: Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). – *Aquatic Toxicology* 48: 87 – 94.
- Lindholst, C., Wynne, P.M., Marriott, P., Pedersen, S.N. & Bjerregaard, P. 2003: Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. – *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 169 – 177.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.,D. 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. – *Methods* 25: 402 – 408.
- Lu, G.H., Song, W.T., Wang, C. & Yan, Z.H. 2010: Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section). – *Chemosphere* 80: 982 – 990.
- Maack, G. & Segner, H. 2004: Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. – *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 139: 47–55.
- Matozzo, V. Gagne, F., Marin, M.G., Ricciardi, F. & Blaise, C. 2008 : Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. – *Environment International* 34: 531 – 545.
- Matthiessen P. & Johnson I. 2007: Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. – *Environmental Pollution* 146: 9 – 18.

- Meng, X., Barholomew, C. & Craft, J.A. 2009: Differential expression of vitellogenin and oestrogen receptor genes in the liver of zebrafish (*Danio rerio*). –Analytical and Bioanalytical Chemistry 396: 625 – 630.
- Mills, L.J. & Chichester, C. 2005: Are endocrine-disrupting compounds in the aquatic environment impacting fish populations? –Science of the Total Environment 343: 1 – 34.
- Muncke, J. & Eggen, R.I.L. 2006: Vitellogenin1 mRNA as a molecular biomarker in developing zebrafish. –Environmental Toxicology and Chemistry 25: 2734 – 2741.
- Nüsslein-Volhard, C. & Dahm, R. 2002 : Zebrafish 1. painos. Oxford University Press, Iso-Britannia s. 20.
- OECD 2010: Workshop report on OECD countries activities regarding testing, assessment and management of endocrine disrupters.
- Ortiz-Zarragoitia, M. & Cajaraville, M.P. 2005: Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. –Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 141: 133 – 144.
- Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M. & Kortenkamp, A. 2000: Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. –Environmental Health Perspectives 108: 983 – 987.
- Preuss, T.G., Gehrhardt, J., Schirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P.D., Giesy, J.P. & Ratte, H.T. 2006: Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. – Environmental Science and Technology 40: 5147 – 5153.
- Rajapakse, N., Silva, E., Scholze, M. & Kortekamp, A. 2004: Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. –Environmental Science and Technology 38: 6343 – 6352.
- Revilla-Ruiz, P., Kearney, G., McMillan, D. & Rodriguez-Gonzalo, E. 2007: A sensitive method for the determination of endocrine-disrupting compounds in river water by LC/MS/MS. –Environmental Applications Book, Waters s. 52 – 55.
- Rose, J., Holbech, H. Lindholst, C., Nørum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. 2002: Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). – Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 131: 531 – 539.
- Schmid, T., Gonzales-Valero, J., Rufli, H. & Dietrich, D.R. 2002: Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnow (*Pimephales promelas*). –Toxicology Letters 131: 65 – 74.
- Scholz, S. & Gutzeit, H.O. 2000: 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). – Aquatic Toxicity 50: 363 – 373.
- Scholz, S. & Mayer, I. 2008: Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. –Molecular and Cellular Endocrinology 293: 57 – 70.
- Segner, H. 2008: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. –Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 149: 187 – 195.

- Servos, M.R. 1999: Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. –Water Quality Research Journal of Canada 34: 123 – 177.
- Soares A., Guieysse, B, Jefferson, B, Cartmell, E & Lester, J.N. 2008: Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. –Environmental International 34: 1033 – 1049.
- Sonnenschein, C. & Soto, A.M. 1998: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. –Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 65: 143 – 150.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. & Serrano, F.O. 1995: The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. –Environmental Health Perspective 103: 113 – 122.
- Staples, C.A., Hall, A.T., Friederich, U., Caspers, N. & Klecka, G.M. 2011: Early life-stage and multigeneration toxicity study with bisphenol A and fathead minnows (*Pimephales promelas*). –Ecotoxicology and Environmental Safety 74: 1548 – 1557.
- Sumpter, J.P. & Jobling, S. 1995: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. –Environmental Health Perspective 103: 173 – 178.
- Sun, L., Zha, J. & Wang, Z. 2009: Interaction between estrogenic chemicals in binary mixtures investigated using vitellogenin induction and factorial analysis. –Chemosphere 75: 410 – 415.
- Takahashi, H. 1977: Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido University 28: 57 – 65.
- Taylor, S. 2010: A practical guide to publishing RT-qPCR data that conform to the MIQE guidelines. –American Biotechnology Laboratory 28: 14 – 19.
- Thomas-Jones, E., Thorpe, K., Harrison, N., Thomas, G., Morris, C., Hutchinson, T., Woodhead, S. & Tyler, C. 2003: Dynamics of estrogen biomarker responses in rainbow trout exposed to 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol. –Environmental Toxicology and Chemistry 22: 3001 – 3008.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Scholze, M., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R. 2001: Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). –Environmental Science and Technology 35: 2476 – 2481.
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R. 2003: Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. –Environmental Science and Technology 37: 1142 – 1149.
- Tingaud-Sequeira, A., André, M., Forgue, J., Barthe, C. & Babin, P.J. 2004 : Expression patterns of three estrogen receptor genes during zebrafish (*Danio rerio*) development: evidence for high expression in neuromasts. –Gene Expression Patterns 4: 561 – 568.

- Tsuda, T., Takino, A., Muraki, K., Harada, H. & Kojima, M. 2001: Evaluation of 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. –*Water Research* 35: 1786 – 1792.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. 2002: Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. –*The Journal of Experimental Biology* 205: 711 – 718.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., & Witters, H. 2001: Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). –*Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 458 – 467.
- Van den Belt, K. Verheyen, R. & Witters, H. 2003: Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. –*Ecotoxicology and Environmental Science* 56: 271 – 281.
- Vásquez, G.R., Meijide, F.J., Da Cuña, R.H., Lo Nostro, F.L., Piazza, Y.G., Babay, P.A., Trudeau, V.L., Maggese, M.C., & Guerrero, G.A. 2009: Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). –*Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150: 298 – 306.
- Vehniäinen, E.-R., Häkkinen, J. & Oikari, A. 2003: Photoinduced lethal and sublethal toxicity of retene, a polycyclic aromatic hydrocarbon derived from resin acid, to coregonid larvae. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2995 – 3000.
- Versonnen & Jansen 2004: Xenoestrogenic effects of ethynylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). –*Environmental Toxicology* 19: 198 – 206.
- Wang, H., Tan, J.T.T., Emelyanov, A., Korzh, V., Gong, Z. 2005: Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. –*Gene* 356: 91 – 100.
- Whitehead, S. & Rice, S. 2006: Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. –*Best Practise & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 20: 45 – 61.
- Witorsch, R.J. 2002: Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted. –*Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36: 118 – 130.
- Yamaguchi, A., Ishibashi, H., Kohra, S., Arizono, K. & Toninaga, N. 2005: Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). –*Aquatic Toxicology* 72: 239 – 249.
- Yang, F.X., Xu, Y. & Hui, Y. 2006: Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish. –*Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 142: 77 – 84.
- Ying, G.-G., Williams, B. & Kookana, R. 2002: Environmental faith of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. –*Environment International* 28: 215 – 226.
- Zhang, H., Kong, F.X., Wang, S.H., Yu, Y. & Zhang, M. 2008: Vitellogenin induction by a mixture of steroidal estrogens in freshwater fishes and relevant risk assessment. –*Environmental Toxicology* 24: 484 – 491.

- Zhang, H., Kong F.X., Yu, Y., Shi, X.L., Zhang, M. & Tian, H.E. 2010: Assessing the combination effects of environmental estrogens in fish. –*Ecotoxicology* 19: 1476 – 1486.
- Zhang, Z.L., Hibberd, A. & Zhou, J.L. 2006: Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. –*Analytica Chimica Acta* 577: 52 – 61.