

Pro gradu -tutkielma

**Polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen vaikutus  
vesikirpun *Daphnia magna* ja harvasukamadon  
*Lumbriculus variegatus* monivierasaineresistenssiin**

Teemu Halttunen



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

23.10.2019

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Ympäristötiede ja -teknologia

Halttunen Teemu: Polyaromaattisten hiilivetyjen vaikutus vesikirpun *Daphnia magna* ja harvasukamadon *Lumbriculus variegatus* monivierasaineresistenssiin  
Pro gradu -tutkielma: 35 s., 2 liitettä (2 s.)  
Työn ohjaajat: FT Eeva-Riikka Vehniäinen ja Professori Jussi Kukkonen  
Tarkastajat: Professori Tuula Tuhkanen ja FT Eeva-Riikka Vehniäinen  
Lokakuu 2019

---

Hakusanat: MXR, polysykliset aromaattiset hiilivedyt, antraseeni, pyreeni, kryseeni, *Lumbriculus variegatus*, vesikirppu, *Daphnia magna*

## TIIVISTELMÄ

Polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH) yhdisteitä pidetään yleisesti haitallisina yhdisteinä. Joidenkin PAH-yhdisteiden on havaittu muun muassa heikentävän j eliöiden lisääntymiskykyä. PAH-yhdisteitä muodostuu epätäydellisen orgaanisen materiaalin palamisen yhteydessä ja myös raakaöljy sisältää runsaasti PAH-yhdisteitä. PAH-yhdisteitä päätyy ympäristöön esimerkiksi laskeumien, hulevesien ja öljyonnettomuuksien takia. Monivierasainevastustuskyky (MXR) on proteiinipohjainen eliöiden kyky vastustaa haitallisten aineiden kertymistä soluihin. MXR-mekanismia esiintyy niin aito- kuin esitumaisilla eliöillä. MXR-mekanismien toiminta voi estyä erilaisten yhdisteiden vaikutuksesta, joita on niin luonnollisia kuin ihmisen valmistamiakin. Tässä työssä tutkittiin ovatko PAH-yhdisteet antraseeni, kryseeni ja pyreeni vesikirpun *Daphnia magna* ja harvasukamadon *Lumbriculus variegatus* MXR-mekanismien inhibitoreita. Kokeet suoritettiin siten, että kumpikin koe-eliö altistettiin kullekin PAH-yhdisteelle erikseen. Altistuksen jälkeen mitattiin, kuinka paljon koe-eliön oli kertynyt fluoresoivaa merkkiainetta ja verrattiin tätä sekä normaalia että inhibitiotilannetta kuvastaviin kontroleihin. Tutkimuksessa havaittiin, että pyreeni poikkesi muista tutkituista PAH-yhdisteistä. Harvasukamadolla ilmeni MXR-järjestelmän voimistumista. Vesikirppu eritti ulos jotakin pyreenin metaboliittia. Havainnot osoittavat, että mikään PAH-yhdisteistä ei ollut MXR-järjestelmän inhibiittori eli tutkitut PAH-yhdisteet eivät yksittäisinä aiheuttaisi haitallisten aineiden kertymistä tutkittujen eliöiden soluihin.

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

Halttunen Teemu: The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons on the multixenobiotic resistance of *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*  
Master thesis: 35 p., 2 appendixes (2 p.)  
Supervisors: FT Eeva-Riikka Vehniäinen and Professor Jussi Kukkonen  
Inspectors: Professor Tuula Tuhkanen and PhD Eeva-Riikka Vehniäinen

October 2019

---

Key words: MXR, polycyclic aromatic hydrocarbons, Anthracene, Pyrene, Chrysene, *Lumbriculus variegatus*, *Daphnia magna*

## ABSTRACT

Usually polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered harmful compounds. For example, some PAHs are known to lower the reproduction of some organisms. PAHs are formed by uncomplete burning processes, and crude oil also contains high concentrations of PAH compounds. PAH compounds end up in the environment via precipitations, storm waters and oil accidents. Multixenobiotics resistance (MXR) is a protein-based defend mechanism, which allows the organisms to prevent the accumulation of harmful substances in the cells. The MXR mechanism occurs in both eukaryote and prokaryote organisms. MXR mechanism can be inhibited by differend kind of compounds. Some of inhibitors are natural orgin and some ones are artificial. The aim of this work was studying if anthracene, chrysene and pyrene are inhibitors of MXR mechanism in water flea *Daphnia magna* and oligochaeta *Lumbriculus variegatus*. In studyings both of test organisms were treated separatety to each tested PAH compound in three different concentrations and one group with only fluorescent compound and other group whit fluorescent and known inhibitor. After of test the amount of fluorecence was measured and compared between every treatment group. Pyrene differed from other PAHs in this study. Pyrene acted as an inducer of MXR in *Lumbriculus variegatus*, and *Daphnia magna* secreted some unknown metabolite of pyrene. None of the tested PAHs were inhibitors to any of tested organisms, so they do not behave as chemosensitizer.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
<b>AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>5</b>
1.1 Altistuskokeissa käytettävät aineet .....	5
1.2 Koe-eläimien saatto kokeita varten .....	7
1.2.1 Vesikirppu <i>Daphnia magna</i> .....	7
1.2.2 Harvasukamato <i>Lubriculus variegatus</i> .....	8
1.3 Altistuskokeet.....	8
1.3.1 Vesikirppu <i>Daphnia magna</i> .....	9
1.3.2 Harvasukamato <i>Lubriculus variegatus</i> .....	10
1.3.3 Vertailunäyte.....	11
1.4 Proteiinimääritys.....	11
1.5 Vesianalyysit.....	11
1.6 Tulosten laskeminen ja tilastollinen testaus.....	12
<b>TULOKSET</b> .....	<b>14</b>
1.7 MXR-mittaukset .....	14
1.7.1 Vesikirppu <i>Daphnia magna</i> .....	14
1.7.2 Harvasukamato <i>Lubriculus variegatus</i> .....	17
1.8 Altistusvesianalyysit .....	20
<b>TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>23</b>
<b>JOHTOPÄÄTÖKSET</b> .....	<b>29</b>
<b>KIITOKSET</b> .....	<b>31</b>
<b>LÄHTEET</b> .....	<b>32</b>
<b>LIITTEET</b> .....	<b>1</b>
LIITE 1. M7 VESI.....	2
LIITE 2. KEINOTEKOINEN MAKEAVESI (KTM).....	3

## JOHDANTO

Vuonna 1976 Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto (United States Environmental Protection Agency; EPA) muodosti nopeassa ajassa Yhdysvaltojen hallinnolle listan vesiä pilaavista aineista. Listalle valittiin myös 16 polysyklisiä aromaattisia hiilivedy-yhdisteitä edustavaa PAH-yhdistettä. Mukana ovat myös antraseeni, kryseeni ja pyreeni. Kriteereinä listalle päättymiseen olivat mahdollinen haitallisuus, tuotantomäärät ja päästömäärät sekä yhdisteluokan edustavuus ja kaupallisen referenssi-aineen saanti (Keith 2014).

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet koostuvat kahdesta tai useammasta yhteen liittyneestä aromaattisesta renkaasta (Douben 2003). Niitä muodostuu keskeneräisessä orgaanisen materiaalin poltossa ja luonnossa matalassa lämpötilassa ja korkeassa paineessa – kuten öljyn muodostumisessa (Eisler 1987). Yleensä PAH-yhdisteillä on korkea sulamis- ja kiehumispiste, matala höyrynpaine ja matala vesiliukoisuus (Douben 2003).

PAH-yhdisteitä päätyy vesistöihin ilmateitse ja pintavalunnan kautta. Merissä suurimmat pitoisuudet ovat keskittyneet rannikoille ja estuaareille lähelle ihmisasutusta. Suurimmat lähteet ovat hulevedet, jätevedet, ilmateitse tulevat laskeumat, teollisuuden purkuvedet ja fossiilisten polttoaineiden tuotannossa ja kuljetuksessa tapahtuvat vuodot (Latimer & Zheng 2003).

Vesiympäristössä PAH-yhdisteet päätyvät lipofiilisyytensä vuoksi joko sedimenttiin tai liuenneisiin pienhiukkasiin. Latimer & Zheng (2003) tekstissään kertovat merten rannikoilla PAH-yhdisteiden konsentraation merivedessä vähenevän rannalta ulapalle mentäessä ja pinnalta pohjaan päin. Pintaveden pitoisuudet voivat olla 10-kertaisia saman paikan syvemmältä kerättyjen näytteiden suhteen. Sedimenttiin kertyy kuitenkin suurimmat konsentraatiot. Rannikoiden merivesistä mitatut PAH-konsentraatiot ovat ei mitattavissa olevista tasoista meren pintakalvolta mitattuihin kymmeneen tuhansiin nanogrammiin litrassa. Sedimenteistä mitatut

arvot puolestaan vaihtelevat näytteenotto paikasta riippuen nanogramman kymmenyksistä vajaaseen 200000 ng/g kuiva-ainetta. Luonnonvesistä otetuista näytteistä on mitattu muun muassa seuraavia PAH pitoisuuksia. Fernandes ym. (1997) mittasivat Seine-joen alkupään makeasta vedestä 30 – 36 ng/l PAH-ainepitoisuuksia. Hyötylänen & Oikari (1999) mittasivat kreosootin pilaaman järven pohjasedimentin pintakerroksen (0–10 cm) uutoksen PAH-yhdisteiden konsentraatioksi 1,7mg/l. Kreosootista PAH-yhdisteitä on 85 %, joista suhteellisina prosenttiosuuk-  
sina antraseenia on 13 % ja kryseeniä että pyreeniä kumpaakin 2 % (Mueller ym. 1989). Niger-joen suistoalueelta on mitattu muun muassa 9770 µg/kg kuivaa sedi-  
menttiä (Ekpo ym. 2012). Hwang & Foster (2006) mittasivat joen normaalissa vir-  
taamatilanteessa PAH- konsentraatioksi 89–457 ng/l ja myrskyn aikaisessa virtaa-  
masta 1510–12500 ng/l, joista 68–97 % oli kiinnittyneenä kiintoaineisiin. He saivat  
lienneen fraktion PAH pitoisuudeksi arviolta 350–400 ng/l. Marsalek ym. (1997)  
mittasivat Burlingtonissa sijaitsevan Skyway Bridge -sillan hulevesistä  
0,015 – 0,5 g/l PAH-yhdisteitä, joista 11 % oli lienneena vedessä eli 1,65–55,0 mg/l.

Multixenobiotic resistance (MXR) eli suomeksi monivierasainevastustuskyky on eliöiden käyttämä suoja mekanismi vierasaineita kohtaan. MXR on energiaa käyttä-  
vien proteiinien järjestelmä, jossa ATP:tä hydrolysoidaan ja aikaiseksi saadaan ai-  
neiden (substraattien) siirto pitoisuusgradienttia vastaan. MXR-proteiinit kuuluvat  
ATP:tä sitoviin kuljettajaproteiineihin eli niin kutsuttuun ATP-kasetti (ABC eli  
Adenosinetriphosphate Binding Cassette) -proteiiniryhmään (Epel ym. 2008). Näitä  
proteiineja esiintyy niin aito- kuin esitumallisillakin eliöillä. ABC-proteiinien ylä-  
luokkaan (superfamily) kuuluu seitsemän luokkaa (family, class) A–G. Luokat  
A–D ja G ovat kalvopumppuja ja luokat E ja F vaikuttavat ribonukleaasin toiminta-  
taan (Igarashi ym. 2004).

Keskeiset siirtäjäproteiinit, jotka toimivat monivierasainevastuskyvyssä, kuuluvat  
proteiiniluokkien ABCB, ABCC ja ABCG alle. Luokasta ABCB mukaan kuuluu ala-  
luokka ABCB1 eli permeability-glykoproteiini (P-gp tai MDR). ABCC-luokassa on  
monia alaluokkia ABCC1–5, joista parhaiten tutkittu on ABCC1 eli multidrug resis-  
tance(-associated) protein 1 (MRP1) ja ABBG-luokasta alaluokka ABCG2, breast

cancer resistance protein (BCRP) (Schinkel & Jonker 2003). En tutkinut tässä työssä ABCG2:ta, joten en esittele sitä enempää.

Siirtäjäproteiinit P-gp ja MRP1 sijaitsevat solujen pintakalvolla (Leslie ym. 2005). Niiden rakenteessa on solukalvon läpäiseviä domeeneita, nukleotidien sitoutumispaikkoja (NBD) ja N-glykosyloitu osio. P-gp:ssä solukalvon läpäiseviä domeeneita on kaksi ja MRP:ssä kolme. N-glykosyloidut (N-glycosylated) osiot sijaitsevat P-gp:ssä ja MRP1:ssä eri paikoissa. Proteiinien solukalvon domeenien segmenttien rakenne määrittää siirtäjäproteiinin substraattispesifisyyden (Schinkel & Jonker 2003).

Substraateiltaan P-gp ja MPR:t ovat laaja-alaisia. P-gp-siirtäjäproteiinien substraatit ovat orgaanisia ja sisältävät aromaattisia renkaita, ja myös ei-aromaattisia alifaattisia tai rengasrakenteita sisältäviä molekyyliä siirretään. Kooltaan substraatit ovat alle 200:sta daltonista melkein 1900:aan daltoniin. Suurin osa P-gp:n tehokkaasti siirtämistä substraateista on varauksettomia tai luonnossa heikkoja emäksiä, mutta P-gp pystyy myös siirtämään heikosti joitakin happoja. Yhteistä substraateilla on amfifiilisyyden, josta johtuen ne voivat diffundoitua solukalvon läpi kohtuullisessa ajassa (Schinkel & Jonker 2003). Epel ym. (2008) toteaa substraattien olevan keski-vertoisesti hydrofobisia ja niissä on positiivisesti varautuneita domeeneja. P-gp-proteiinit eivät osallistu metaboloitujen vierasaineiden siirtoon vaan sitä hoitavat jotkin ABCC-proteiiniluokan jäsenet kuten MRP1 (Epel ym. 2008). MRP1:n substraatit ovat pääasiassa amfipaattisia orgaanisia anioneita. MRP1 pystyy myös siirtämään epäorgaanisia raskasmetalli-oksianioneita kuten arseniittia (Schinkel & Jonker 2003). Laaja-alaisen substraattijoukon takia MXR-proteiinit voivat inhiboitua helposti etenkin erilaisia yhdisteitä sisältävistä seoksista (Epel ym. 2008), kuten dieselistä tai yhdyskuntajätevedestä (Kurelec, Branko 1995, Smital ym. 2011).

Inhibiittorina toimivat vierasaineet voivat estää substraatteja sitoutumasta siirtäjäproteiinin sitoutumiskohtiin joko vaurioittamalla niitä tai täyttämällä sitoutumispaikat olemalla voimakkaampia sitoutujia kuin ulos siirrettävät substraatit. MXR-mekanismiin inhibitiota kutsutaan myös kemialliseksi herkistymiseksi, koska inhibition johdosta vierasaineiden kertyminen kohteeseen on helpompaa (Epel ym.

2008). Hyvänä puolena tästä on haluttujen lääkeaineiden kertyminen soluihin ja huonona puolestaan haitta-aineiden liiallinen kertyminen (Kurelec, B. 1997, Schinckel & Jonker 2003). Inhibiittoreita on luonnollisia ja ihmisen tekemiä, kuten viherlevästä *Caulerpa taxofolia* tehty uute tai synteettiset myskit (Schröder ym. 1998, Smital ym. 2004).

Tässä tutkimuksessa koe-eläiminä käytetään vesikirppua *Daphnia magna*, joka on rantakallioiden lätäköissä ja pienissä lampareissa elävä vesikirppulaji, ja harvasukamatoa *Lubriculus variegatus*, joka puolestaan elää makeiden vesien pohjasedimentissä (Koivisto 1995, Jantunen ym. 2008). Vesikirpun *Daphnia magna* ja harvasukamadon *Lubriculus variegatus* MXR- proteiineista ja niiden vaikutuksesta on vähän tietoa (Campos ym. 2014, Vehniäinen & Kukkonen 2015). Vehniäinen & Kukkonen (2015) löysivät, että harvasukamadolle paras MXR-mekanismiin estäjä olisi kallis ja valolle herkkä MK571, joka on ABCC ryhmän inhibiittori ja vesikirpulle reversiini 205 (ABCB1 inhibiittori). Heillä oli mukana tutkimuksissa myös verapamiili, joka on MXR-mekanismiin yleisinhibiittori, mutta sillä ei saatu niin selviä vasteita merkkiaineen kertyvyyteen. Verapamiili kuitenkin toimii MXR- inhibitorina harvasukamadolla.

Tässä tutkimuksessani käytin PAH-yhdisteinä antraseenia, kryseeniä ja pyreeniä, joilla tein lyhytaikaisia valottomia altistuskokeita. PAH-yhdisteillä on tehty paljon fototoksisuustestejä, koska niiden on havaittu olevan voimakkaasti fototoksisia (Pelletier ym. 1997). Antraseenista Paumen ym. (2008) havaitsivat 28 päivän kroonisessa kokeessa, että 0,15  $\mu\text{M}$  vähensi harvasukamadon *Lumbriculus variegatus* lisääntymiskykyä 50%. Viaene ym. (2015) havaitsivat kokeissaan pyreenin laskevan vesikirppujen *Daphnia magna* populaation kokoa konsentraatiossa 75  $\mu\text{g/l}$  ja kasvatettavan vesikirppupopulaation sisäistä kilpailua sekä lisäävän sääsken *Chaoborus sp.* toukan saalistusta vesikirppua kohtaan. Harvasukamadolle *Lumbriculus variegatus* pyreeni puolestaan aiheuttaa narkoottista vaikutusta, jonka voi havaita verisuonten supisteluasteesta (Mäenpää ym. 2009). Robidoux ym. (2018) tutkivat Cold Lake Blend (CLB) nimisen raakaöljyllä laimennetun bitumin (diluted bitumen; dilbit) ve-



siuutoksen vesifaasin (water-accomodated fraction; WAF) vaikutusta muun muassa kahdella vesikirpulla *Daphnia magna* ja *Ceriodaphnia dubia*. He havaitsivat *Daphnia magna* -vesikirpun kohdalla immobilisaatiota ja matalaa kuolleisuutta tuoreen dilbitin WAF:lla tehdyssä kokeessa (CLB WAF). *Ceriodaphnia dubia* -vesikirpulla tehdyssä kroonisessa altistuskokeessa havaittiin kuolleisuutta tuoreen dilbitin WAF:in kohdalla (LC<sub>50</sub>-arvo oli 6,43 g/l), mutta kuolleisuutta ei havaittu vanhennetun dilbitin WAF:ssa, minkä arveltiin johtuvan vanhennetun dilbitin haihtuvien orgaanisten yhdisteiden (VOC) alentuneesta määrästä. *Daphnia magna* -vesikirpulla tehdyssä akuutissa toksisuuskokeessa kuolleisuutta esiintyi vain korkeimmassa pitoisuudessa 32 g/l. Robidoux ym. (2018) havaitsivat myös lisääntymiskyvyn laskua *Ceriodaphnia dubia* -vesikirpun kohdalla sekä vanhennetussa että tuoreessa dilbitin WAF:ssa. Lisääntymiskyvyn lasku oli suurempaa tuoreen dilbitin yhteydessä. Bitumeissa on vaihtelevasti PAH-yhdisteitä ja niistä löytyy kutakin käyttämäni PAH-yhdistettä. Sörensen & Wichert (2000) tutkivat viittä eri bitumilaatua ja niissä oli antraseeniä noin 0,05–2 mg/kg, kryseeniä oli 0,5–6 mg/kg ja pyreeniä 0,7–5 mg/kg. Long ym. (1995) ovat saaneet merten pohjasedimentissä eläville eliöille alimmaksi haitalliseksi raja-arvoksi PAH-yhdisteille 4022 ng/g.

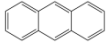
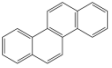

Tässä tutkimuksessa tavoitteena on tutkia ovatko PAH-yhdisteet antraseeni, kryseeni ja pyreeni kemiallisesti herkistäviä aineita ja verrata niitä tunnettuihin MXR-mekanismien toiminnan estäjiin – verapamiiliin ja reversiini 205:een. Hypotesina on, että tutkittavat PAH-yhdisteet ovat MXR-mekanismien inhibiittoreita.

## **AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **1.1 Altistuskokeissa käytettävät aineet**

Altistuskokeissa tutkittavina aineina olivat PAH-yhdisteet: antraseeni (Fluka 10580), kryseeni (Supelco 48565-U) ja pyreeni (Fluka 82648). Ne saatettiin veteen liukeneviksi dimetyylisulfoksidin (DMSO) (Sigma aldrich 276855) avulla. Taulukossa 1 on esitetty käytettyjen PAH-yhdisteiden vesiliukoisuus, massa ja kemiallinen rakenne.

Taulukko 1. tutkittavat altistusaineet.

Aine	S (mg/l) <sup>a</sup>	log k <sub>ow</sub>	Molekyyli- paino	Rakenne- kaava	Rakenne- kuva
Antraseeni	0,073	4,5 <sup>b</sup> / 4,53 <sup>c</sup>	178,23	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	
Kryseeni	0,002	5,8 <sup>b</sup> / 5,71 <sup>c</sup>	228,29	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
Pyreeni	0,135	5,2 <sup>b</sup> / 4,92 <sup>c</sup>	202,25	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	

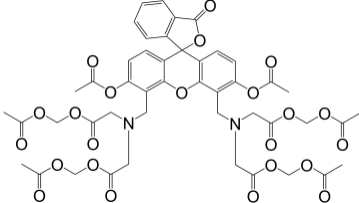
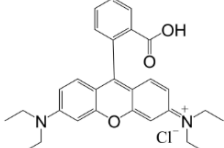
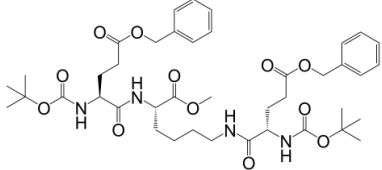
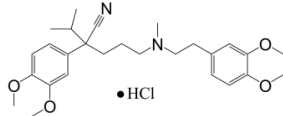
<sup>a</sup> liukoisuus tislattuun veteen (Mackay & Shiu 1977)

<sup>b</sup> (Bayona ym. 1991)

<sup>c</sup> (Di Toro ym. 2000)

Altistuskokeissa MXR-mekanismiin fluoresoivana vierasaineena (substraattina) käytettiin vesikirpulle DMSO-liukoista kalseiini-AM:a (Cal-AM) (Sigma 56496-20X50UG), harvasukamadolle puolestaan vesiliukoista rodamiini B:tä (RhB) (Sigma 6626-25G). Positiivisen vasteen antavana aineena eli MXR-mekanismiin inhibiittorina vesikirpulla käytettiin reversiini 205:ä (Rev 205) (Sigma R1401-10MG) ja harvasukamadolla verapamiilia (Ver) (Sigma V4629). Substraatit ja inhibiittorit on esitelty taulukossa 2.

Taulukko 2. Substraatit (kalseiini-AM ja rodamiini B) ja inhibiittorit (reversiini 205 ja verapamiili)

Aine	$\mu\text{M}$	Liuotin	g/mol	Rakennekuva
<b>Substraatit:</b>				
Kalseiini-AM $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{23}$	1	DMSO	994,87	
Rodamiini B $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_3$	0,5	Vesi	479,01	
<b>Inhibiittorit:</b>				
Reversiini 205 $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$	20	DMSO	798,92	
Verapamiili $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$	10	Etanoli	491,06	

## 1.2 Koe-eläimien saatto kokeita varten

### 1.2.1 Vesikirppu *Daphnia magna*

Vesikirput kasvatettiin eristämällä ensin aikuisia yksilöitä Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen kasvatushuoneen kasvatusaltaista kahden litran kasvatusvuokiin. Kasvatusaltaiden vesikirput *Daphnia magna* on alun perin ostettu lepomunina MicroBio-Test Inc. yhtiöstä ja kasvatettu testipaketin ohjeitten mukaan.

Ensin kasvatusaltaista otettiin lappoletkulla tarpeeksi paljon vesikirppuja, joista poimittiin kasvatusvuokiin 50 kappaletta aikuisia vesikirppua. Kasvatusvuoiissa käytettiin samaa Elendt M7 - vettä (Liite 1.) kuin ylläpitoaltaissa oli ollut. Lämpötilaksi säädettiin  $20 \pm 1$  °C ja valaistussykliksi 18 tuntia valoa ja 6 tuntia pimeää. Valon voimakkuudeksi asetettiin 600 luksia. Vesikirppuja syötettiin päivittäin *Scenedesmus*-viherlevällä.

Ennen ensimmäisiä kokeita vesikirppuja kasvatettiin monia sukupolvia, joista pidettiin päiväkirjaa ja kasvatavuokiin merkittiin poikueen kuoriutumispäivämäärä ja sukupolvi. Altistuskokeisiin käytettiin kyseisen sukupolven toista tai myöhempää poikuetta. Näin taattiin pienempi koon vaihtelu. Kokeissa käytetyt vesikirput olivat 6–7 päivän ikäisiä.

Vesikirput siirrettiin altistusastioihin käyttäen mikropipettiä, jonka kärki oli leikattu isommaksi, jotta eläimet eivät häiriintyisi siirrosta. Siirrostustilavuus oli n. 200 µl / vesikirppu. Kunkin leikatun pipetin kärjen ottama vesimäärä tarkistettiin pipetoimalla - ja punnitsemalla vettä 10 kertaa ja laskemalla niistä keskiarvo, kun pipetti oli säädetty 200 µl:aan.

### 1.2.2 Harvasukamato *Lumbriculus variegatus*

Harvasukamadot *Lumbriculus variegatus* otettiin kokeita varten Ympäristötieteiden osaston ylläpitämästä populaatiosta, jota pidettiin erillisessä kasvatushuoneessa. Ylläpidossa harvasukamatoja kasvatettiin akvaariossa, jonka pohjalla sedimentiksi käytettiin talouspaperia. Valoperiodiksi ja lämpötilaksi asetettiin sama kuin vesikirpulla *D. magna*. Kasvatusaltaan vetenä käytettiin ISO 634:2012 - standardin mukaista keinotekoista makeaa vettä (KTM), jonka kovuus oli 1 mM (ISO 2012). Matoja ruokittiin jauhetulla kalan ruualla (Sera mikropan) päivittäin (Vehniäinen & Kukkonen 2015).

Kokeita varten altaasta otettiin paperisedimenttiä petrimaljalle kärkikatkaistulla haitaripipetillä ja sedimentin seasta kaivettiin pinsettejä ja pientä hammaslääkärin koukkua käyttäen sopivia yksilöitä, jotka eivät olleet liian tummia, vanhalta näyttäviä yksilöitä tai vastalisääntyneitä epäsymmetrisiä pyöreäpäisiä yksilöitä, ja siirrettiin ne koeastioihin.

## 1.3 Altistuskokeet

Koe-eläimiä altistettiin kolmelle PAH-yhdisteelle, antraseenille, kryseenille ja pyreenille. Vesikirppuja altistettiin 24 h ja harvasukamatoja 48 h. Kokeet suoritettiin

puhdasvesi-, liuotinvesi- ja inhibiittorikontrollia vasten kolmella eri konsentraatiolla / PAH-yhdiste. Kaikille PAH-yhdisteille valittiin samat kolme altistuspitoisuutta (500 nM, 200 nM ja 80 nM) kummallekin koe-eläimelle. Kaikista altistuksista tehtiin kolme rinnakkaista altistusta (A, B ja C) ja kaikki suoritettiin kahdella eri rinnakkaisella kokeella. PAH-yhdisteet liuotettiin dimetyylisulfoksidiin (DMSO), joka on orgaaninen aprottinen liuotin. DMSO:n konsentraatio altistuksissa oli 1 µl/ml eli 0,1 %.

### 1.3.1 Vesikirppu *Daphnia magna*

Ensiksi ilmastettiin 2,5 mM KTM:ää tunnin ajan. Sitten M7 - vedessä olleet kokeisiin tulevat vesikirput siirrettiin ilmastettuun KTM:ään. Ilmastetusta KTM:stä vesikirput pipetoitiin tuikepulloihin, joissa altistusaineet olivat. Vesikirput pipetoitiin yksi kerrallaan altistusastiaan mikropipetillä, jonka kärki oli leikattu. Altistuskoe kesti kokonaisuudessaan 24 tuntia ja fluoresenssivärjäys (0,5 µM kalseiini-AM) ja tunnettu inhibiittori (10 µM reversiini 205) laitettiin kahdeksi viimeiseksi tunniksi. Fluoresenssivärjäystä käytettiin kokeen normaalitilannetta kuvaavana normaali-kontrollina ja inhibiittorialtistusta inhibitiota kuvaavana positiivisena kontrollina. Kahdessa kokeessa värjättiin myös liuotinkontrolli, jotta voitiin tutkia, onko liuottimella vaikutusta fluoresoivan aineen kertymiseen. Koe suoritettiin pimeässä folion alla.

Koetta purkaessa otettiin ensin 4 ml:n vesinäyte uuteen tuikepulloon. Sitten vesikirput kaadettiin suppiloon laitetulle havakselle. Havas nostettiin suppilolta pois ja asetettiin käsienkuivauspaperin päälle ja kuivattiin. Vesikirput kerättiin havakselta mikrosentrifugiputkeen ja lisättiin 200 µl ultrapuhdasta vettä ja homogenoitiin muovisilla homogenointisauvoilla. Näytteet säilytettiin jäällä folion alla, jotta proteaasit eivät pilkkoisi proteiineja eikä valo pääsisi vaikuttamaan näytteisiin. Tämän jälkeen mikrosentrifugiputket lingottiin sentrifuugissa (Hitachi himac CT15RE) 4 °C:ssa 5 minuutin ajan 13 000 ×g:n voimalla. Kustakin putkesta pipetoitiin 100 µl supernatanttia jäiden päällä lepäävälle 96-kuoppaiselle mustalle kuoppalevyille, josta fluoresenssi mitattiin fluorometrillä (Labsystems Fluoroskan Ascent) käyttäen

aallonpituuksina 485 nm/538 nm (eksitaatio/emissio). Kuoppalevyt peitettiin kalvolla ja pakastettiin -20 °C. Tämän jälkeen vesinäytteet kestävöitiin lisäämällä niihin 4 ml Etax Aa:ta (99 % etanoli) ja siirrettiin kylmiöön 5±1 °C odottamaan vesianalyyssejä.

### 1.3.2 Harvasukamato *Lubriculus variegatus*

Harvasukamatojen kokeissa käytettiin 1 mM KTM:ä, jota ilmastettiin tunnin ajan ennen kokeen aloittamista. Harvasukamadot siirrettiin petrimaljalta koukulla tuikepulloihin, joissa oli 8 ml nestettä. Harvasukamatoja altistettiin 47 tunnin ajan ja sitten lisättiin fluoresoiva väriaine, joka harvasukamatojen kohdalla oli 1 µM rodamiini B (RhB) (Sigma 6626-25G), ja MXR systeemiä inhibitoiva aine 20 µM verapamiili (Sigma V4629). Fluoresenssivärjäystä käytettiin kokeen normaalitilannetta kuvaavana normaalikontrollina ja inhibiittorialtistusta inhibitiota kuvaavana positiivisena kontrollina. Kahdessa kokeessa värjättiin myös liuotinkontrolli DMSO, jotta voitiin tutkia onko liuottimella vaikutusta fluoresoivan aineen kertymiseen. Värjäys kesti kaksi tuntia. Altistus ja värjäys suoritettiin pimeässä folion alla. Tuikepullojen kannet olivat hieman löysästi kierretty, jotta pieni kaasujen vaihto oli mahdollista.

Altistusastioista otettiin ensin 4 ml altistusvettä pois. Sitten harvasukamadot poimittiin koukulla pois tuikepullosta ja kuivattiin kostutetun paperin avulla, jotta ulkopinnalle jäänyt rodamiini B saatiin pois. Tämän jälkeen harvasukamadot käsiteltiin kuten vesikirputkin. Ne laitettiin mikrosentrifugiputkiin, joissa ne homogenoitiin 200 µl:ssa ultrapuhdasta vettä. Näytteet säilytettiin jäällä folion alla. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 4 °C:ssa 13000 ×g voimalla. Sitten pipetoitiin 100 µl supernatanttia mustalle fluoresenssikuoppalevyille. Fluoresenssi mitattiin käyttäen aallonpituuksina 584nm/612nm (eksitaatio/emissio), jonka jälkeen kuoppalevyt peitettiin kalvolla ja pakastettiin -20 °C. Tuikepulloihin jäänyt 4 ml altistusnestettä kestävöitiin lisäämällä 4 ml 99 % etanolia (Etax Aa) ja siirrettiin kylmiöön 5±1 °C odottamaan vesianalyyssejä.

### 1.3.3 Vertailunäyte

Kustakin PAH-yhdisteestä tehtiin vertailunäyte molemmille koe-eläimelle erikseen eli eri altistusveden konsentraatioihin. Vertailunäytettä käsiteltiin kuin altistuskokeen tuikepulloa, mutta siinä ei ollut kyseistä koe-eläintä. Vertailunäytteiden tarkoitus oli havainnoida sitä kuinka paljon kyseistä PAH-yhdistettä olisi siirtynyt koe-eläimiin tai mitä PAH-yhdisteelle olisi matkan varrella tapahtunut ennen vesianalyysiin päätymistä.

## 1.4 Proteiinimääritys

Proteiinit mitattiin sulatetuista fluoresenssikuoppalevyn supernatanteista. Proteiinimittaukseen käytettiin spektrofotometriä (Labsystems iEMS Reader MF) absorbanssi mitattiin aallonpituudesta 690 nm. Proteiinien värjäykseen käytettiin Bio-Rad DC™ Protein Assay reagensseja. Bio-Rad DC™ proteiinimääritys perustuu emäksisen kuparitartraatin ja Folin-reagenssin reaktioon proteiinin kanssa (Lowry ym. 1951, Bio-Rad 1995). Supernatanttia pipetoitiin 5 µl kolmena rinnakkaisena sarjana läpinäkyvälle kuoppalevyille. Sitten lisättiin reagenssi A ja sekoitettiin hyvin supernatantin kanssa. Sitten lisättiin reagenssi B ja annettiin reagoida 15 minuuttia. Pipetoitaessa käytettiin apuna haravapipettiä. Vertailuproteiinina käytettiin nautaan seerumin albumiini -liuosta (Bovine serum albumin Sigma A-8022), josta tehtiin jokaisella mittauskerralla 8 pisteen (0–1,5 mg/ml) standardisuora.

Harvasukamatonäytteitä piti laimentaa 1:7, jotta ne eivät menisi määritysasteikon yli. Vesikirppunäytteitä ei tarvinnut laimentaa.

## 1.5 Vesianalyysit

Vesianalyyseissä altistusvesistä mitattiin spektrofluorometrillä (Perkinelmer Instruments LS 55 Luminescence { Fluorescence } Spectrometer) PAH-yhdisteiden pitoisuudet käyttäen synkronoitua fluoresenssi spektroskopia (SFS) -tekniikkaa. Mittausparametrien asetukset eri PAH-yhdisteille on esitelty taulukoissa 3 ja 4. Nopeudeksi asetettiin 300 nm/minuutti ja emissio- ja eksitaatorakojen leveydeksi asetettiin 5 nm jokaisen aineen kohdalla.

Standardisuorat tehtiin valmistamalla vahva kantaliuos 1000 nM PAH-yhdistettä kestävästi altistusvesimatriisia vastaavaan liuokseen eli puolet 99 % etanolia ja toinen puoli koe-eläimen vastaavaa KTM-liuosta (2,5 mM vesikirpulle ja 1 mM harvasukamadolle). Vahvaa standardin kantaliuosta alettiin mittaamaan alkuperäisestä vahvuudesta aina laimentamalla puolella (1:1) edellisestä vahvuudesta KTM-etanoliliuoksella. Luminesenssispektrofluorometrin fluoresenssiyksikköjen yläraja oli 1000, joten standardisuoraan valittiin mittauspisteet, joiden arvo oli alle 1000. Standardisuorissa käytettiin 5–8 pistettä riippuen kokeesta.

Taulukko 3. PAH-yhdisteiden altistusvesianalyysien mittaussparametrit vesikirpulle

Yhdiste	mittausalue nm	vastealue nm	$\Delta\lambda$ nm	LOD nM	LOQ nM
Antraseeni	300–400	330,5–389	30	1,8	6,1
Kryseeni	290–350	290–335,5	102	6,4	21,4
Pyreeni	300–400	316–367	37	0,5	1,6

Taulukko 4. PAH-yhdisteiden altistusvesianalyysien mittaussparametrit harvasukamadolle

Yhdiste	mittausalue nm	vastealue nm	$\Delta\lambda$ nm	LOD nM	LOQ nM
Antraseeni	300–400	336–391	30	0,6	2,0
Kryseeni	290–350	290–333	102	4,0	13,4
Pyreeni	300–400	319–359	37	0,6	1,9

## 1.6 Tulosten laskeminen ja tilastollinen testaus

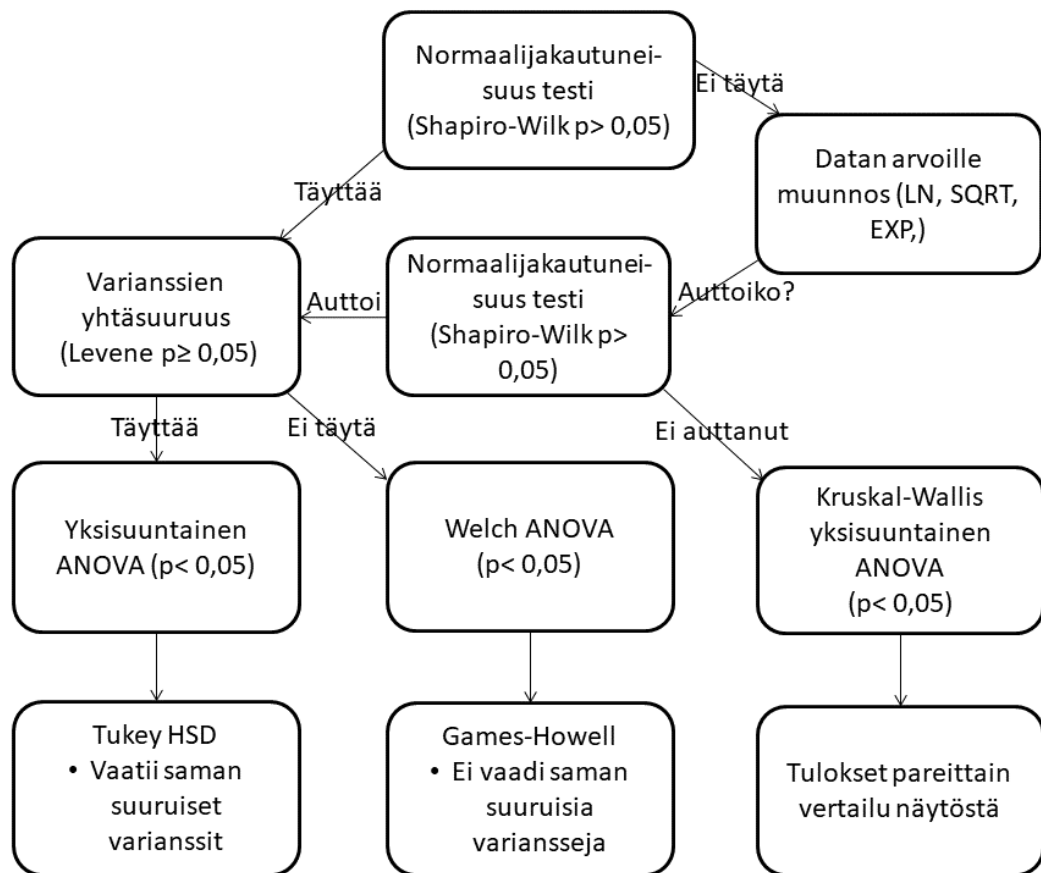
Kokeista saadut tulokset laskettiin Microsoft Excel -ohjelmalla. Fluoresenssin määrät suhteutettiin proteiinin määriin jakamalla fluoresenssin intensiivisyys proteinikonsentraatiolla. Tämän jälkeen tulokset normalisoitiin jakamalla eri käsittelyiden arvot kyseisen kokeen fluoresoivan substraatin (RhB tai Cal-AM) arvolla, jolloin kyseinen värjäysaltistus saa arvoksi yksi ja muut käsittelyt siihen suhteutetun arvon.



Tilastolliset testaukset suoritettiin IBM SPSS Statistics 24 -ohjelmalla. Kuvassa 1 on esiteltyä tilastollisen testauksen erilaiset reitit. Ensin tutkittiin Shapiro-Wilk:in testin avulla aineiston normaalijakautuneisuus. Jos aineisto ei ollut normaalijakautunut se pyrittiin saamaan normaalijakautuneeksi käyttämällä jotakin epälineaarista muunnosta eli transformaatiota. Oikealle vinoutunutta aineistoa saatettiin normaalijakautuneemmaksi luonnollisella logaritmillä (LN) tai ottamalla neliöjuuri (sqrt) ja vasemmalle vinoutunutta aineistoa voitiin yrittää saada normaalijakautuneeksi korottamalla aineisto Neperin luvun ( $e$ ) potensseiksi eli muuntamalla se eksponenttifunktiolla.

Normaalijakautuneiden aineistojen ryhmien varianssien yhtäsuuruudet testattiin Levene:n testillä, ja jos testin tulos oli positiivinen ( $p \geq 0,05$ ) voitiin käyttää tavallista yksisuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA) ja Tukey:n monivertailuita. Jos aineisto ei läpäissyt Levene:n testiä, niin käytettiin Welch:in yksisuuntaista varianssianalyysiä ja Games-Howell-monivertailuita.

Jos Shapiro-Wilk:in ( $p > 0,05$ ) testi ei mennyt aineiston muunnosyrityksistä huolimatta läpi ( $p < 0,05$ ) niin silloin käytettiin parametritonta riippumattomien otosten Kruskal-Wallis:in testiä ja luettiin monivertailujen tulos Bonferroni-korjattujen merkitsevyyksien sarakkeesta.



Kuva 1. tilastollisen testauksen valinnan prosessikaavio

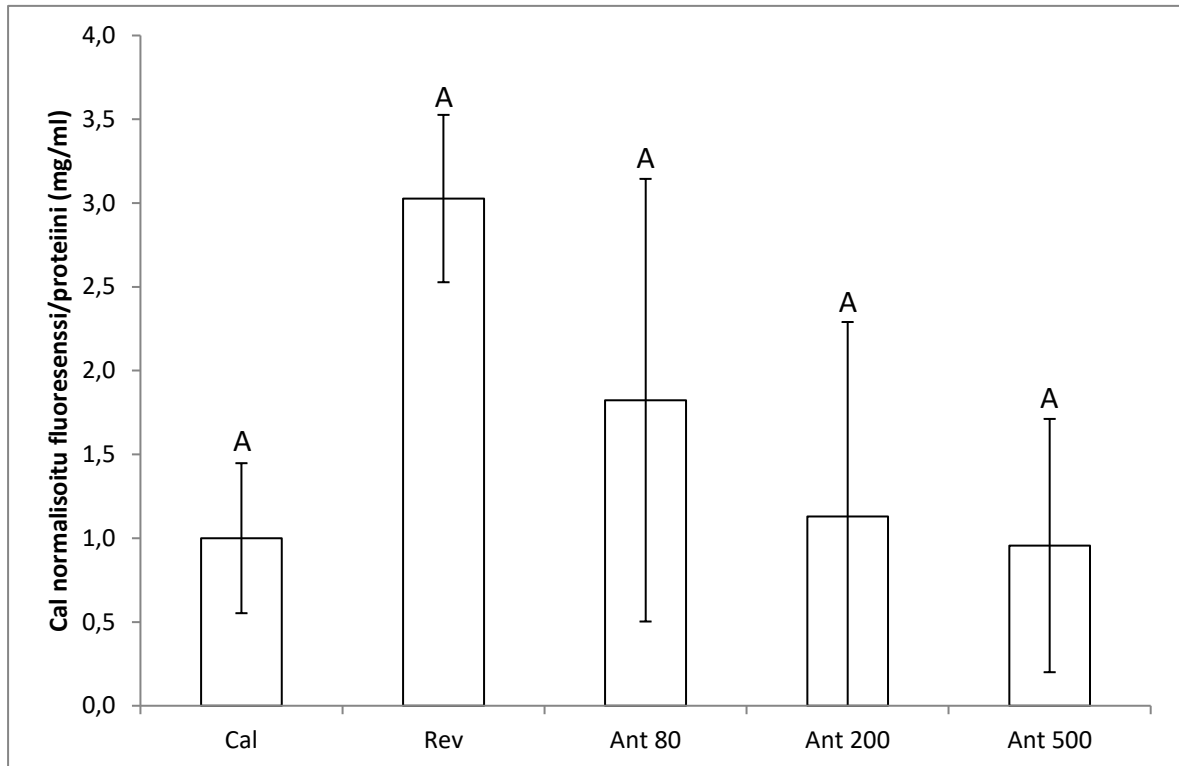
## TULOKSET

### 1.7 MXR-mittaukset

Kuvissa 2–7 on esitetty PAH-yhdisteiden vaikutusta koe-eläinten MRX-aktiivisuuteen. X-akselilla on eri altistukset ja Y-akselilla on kuvattuna fluoresenssin voimakkuus proteiinikonsentraation suhteen.

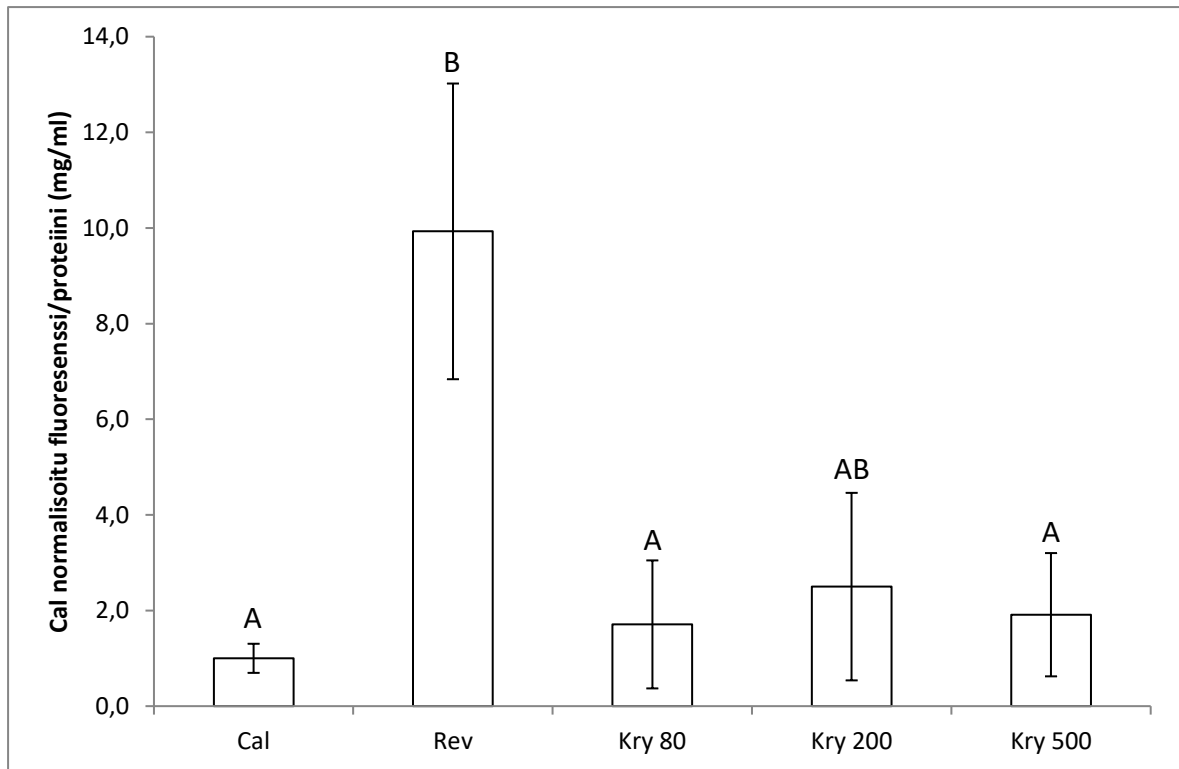
#### 1.7.1 Vesikirppu *Daphnia magna*

Kuva 2 esittää antraseenin vaikutusta vesikirpun *D. magna* MXR-aktiivisuuteen. Aineisto ei ollut normaalijakautunut eikä se ollut muutettavissa normaalijakautuneeksi, joten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin riippumattomien näytteiden -testiä Kruskal-Wallis'in yksisuuntaista ANOVA:aa ( $\chi^2 = 7,567$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,109$ ). Aineiston ryhmien väliltä ei löytynyt tilastollisia eroja.



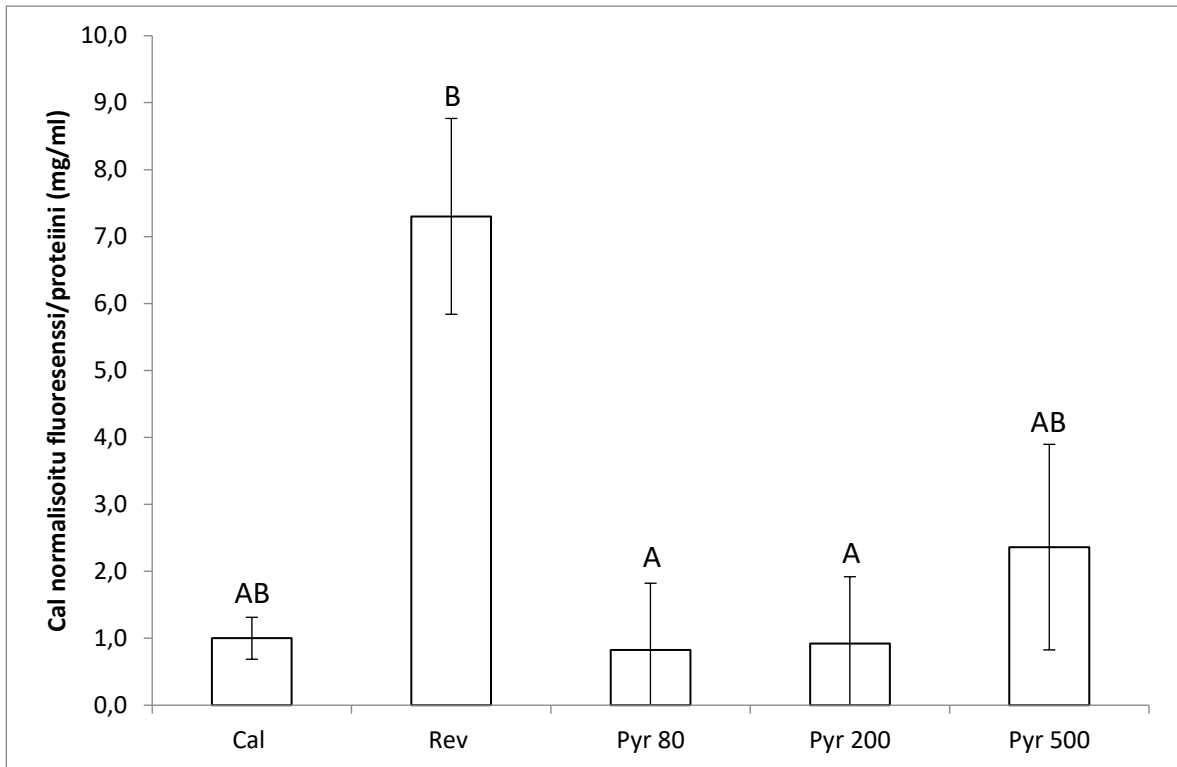
Kuva 2. Antraseenin vaikutus vesikirpun MXR-aktiivisuuteen. Samalla kirjaimella merkityt ryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 7,567$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,109$ ), Cal- ja Rev-ryhmien  $n=3$  ja Ant-ryhmien  $n=6$ .

Kuva 3 esittää kryseenin vaikutusta vesikirpun MXR-aktiivisuuteen. Aineistoa ei saatu normaalijakautuneeksi, joten käytettiin Kruskal-Wallis:in testiä ( $\chi^2 = 14,895$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,005$ ). Ainoastaan positiivinen kontrolli (Rev) erosi normaalikontrollista kalseiini-AM:stä (Cal) ( $p = 0,006$ ) ja kryseeneistä Kry 80 ja Kry 500 ( $p = 0,021$ ,  $p = 0,043$ ). Kryseeni 200 nM ei eronnut kalseiini-AM (Cal) ja reversiini 205 (Rev) ryhmistä tilastollisesti merkitsevästi.



Kuva 3. Kryseenin vaikutus vesikirpun MXR-aktiivisuuteen. Samalla kirjaimella merkityt ryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 14,895$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,005$ ). Positiivinen kontrolli (Rev) erosi normaalikontrollista (Cal) ( $p = 0,006$ ) ja kryseeneistä Kry 80 ja Kry 500 ( $p = 0,021$ ;  $0,043$ ). Kry 200 ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi Cal ja Rev ryhmistä. Jokaisen ryhmän  $n=6$ .

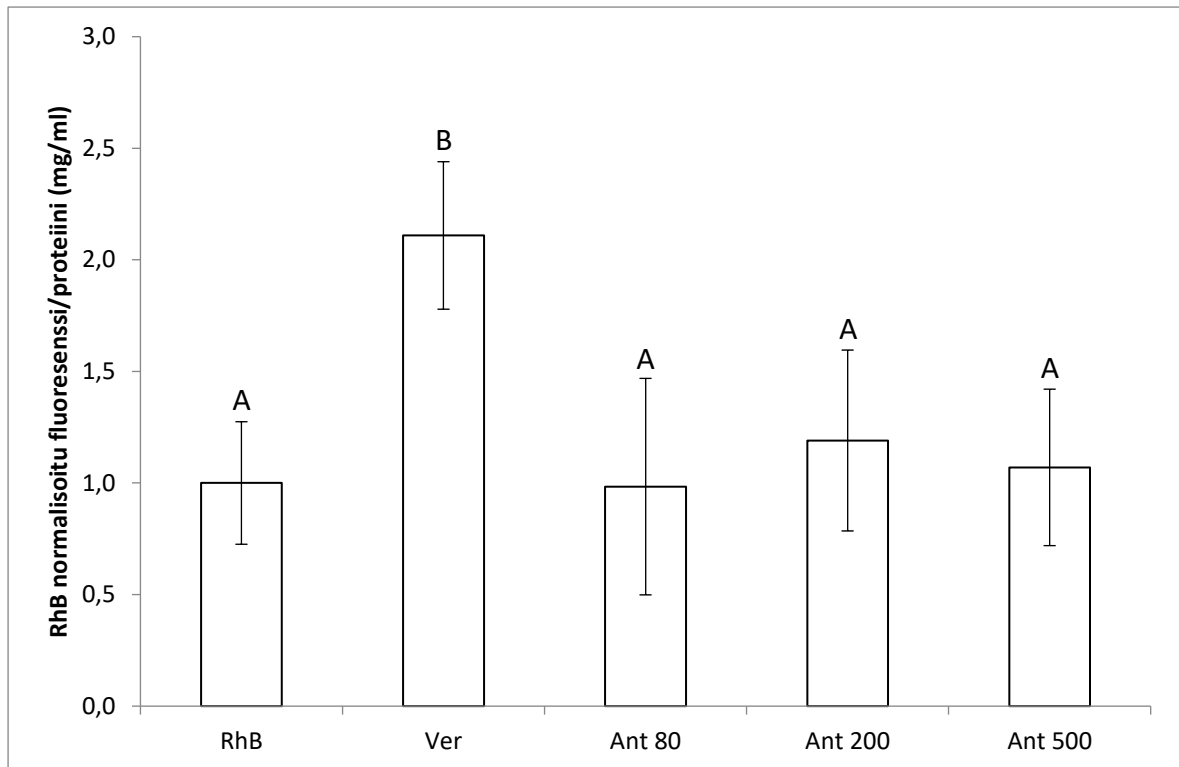
Kuva 4 esittää pyreenin (Pyr) vaikutusta vesikirpun MXR-aktiivisuuteen. Aineisto ei ollut normaalijakautunut eikä se ollut muutettavissa normaalijakautuneeksi, joten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin riippumattomien näytteiden -testiä Kruskal-Wallis'in yksisuuntaista ANOVA:aa ( $\chi^2 = 13,607$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,009$ ). Normaalikontrolli (Cal) ja koeryhmä (Pyr 500) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi positiivisesta kontrollista (Rev). Altistusryhmät (Pyr 80 ja Pyr 200) erosivat positiivisesta kontrollista (Rev) tilastollisesti merkitsevästi ( $p = 0,024$  ja  $p = 0,030$ ), mutta ne eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi normaalikontrollista (Cal).



Kuva 4. Pyreenin vaikutus vesikiripun MXR-aktiivisuuteen. Samalla kirjaimella merkityt ryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 13,607$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,009$ ). Normaalikontrolli (Cal) ja altistusryhmä (Pyr 500) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi positiivisesta kontrollista (Rev). Pyr 80 ja Pyr 200 -ryhmät erosivat Rev -ryhmästä tilastollisesti merkitsevästi ( $p = 0,024$ ;  $0,030$ ). Cal- ja Rev-ryhmien  $n=3$  ja Pyr-ryhmien  $n=6$ .

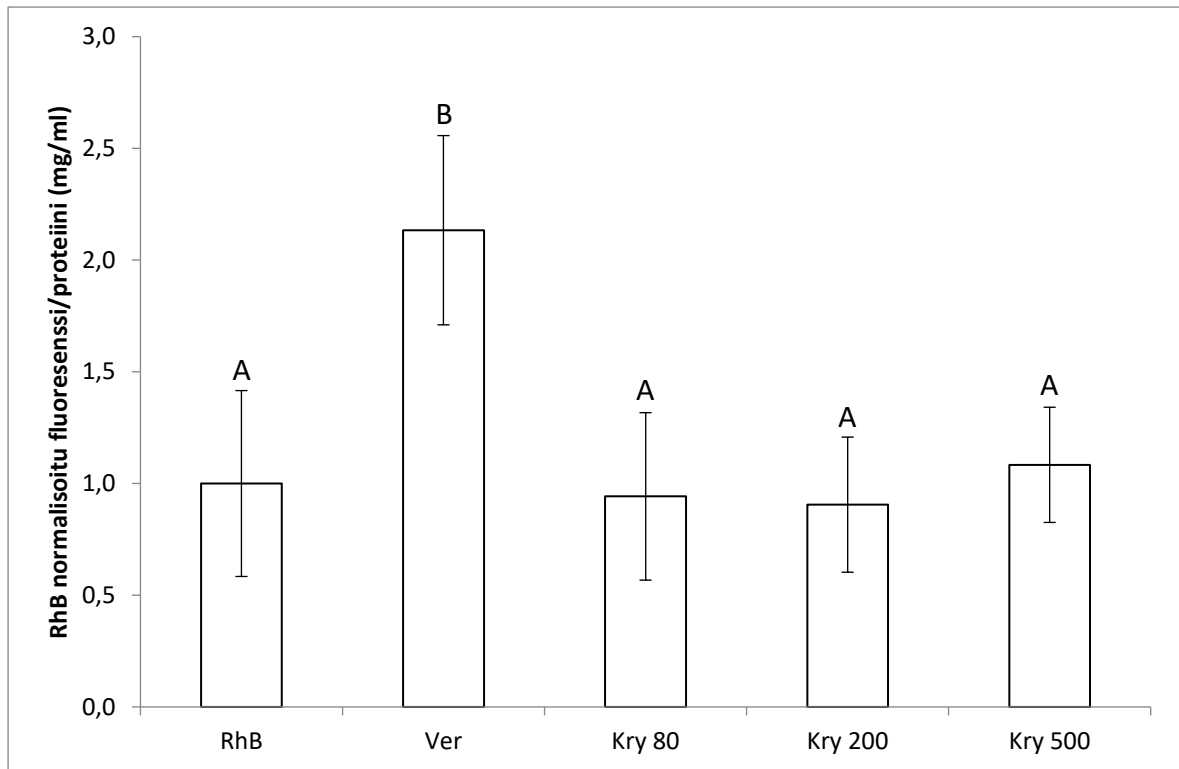
### 1.7.2 Harvasukamato *Lubriculus variegatus*

Antraseenin (Ant.) vaikutukset harvasukamadon (*L. variegatus*) MXR-aktiivisuuteen on esitetty kuvassa 5. Aineisto oli normaalijakautunut, joten yksisuuntaisen varianssianalyysin ehdot täyttyivät (ANOVA  $F = 9,61$ ,  $df = 4, 25$ ,  $p < 0,001$ ). Lisäksi aineiston varianssit olivat yhtä suuret, joten tässä tapauksessa monivertailuna käytettiin Tukey HSD- testiä. Ainoastaan positiivinen kontrolli verapamiili (Ver) erosi tilastollisesti merkitsevästi muista käsitellyistä rodamiini B:stä (RhB) ja antraseenit (Ant 80, Ant 200 ja Ant 500) ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$ ,  $p = 0,001$ ).



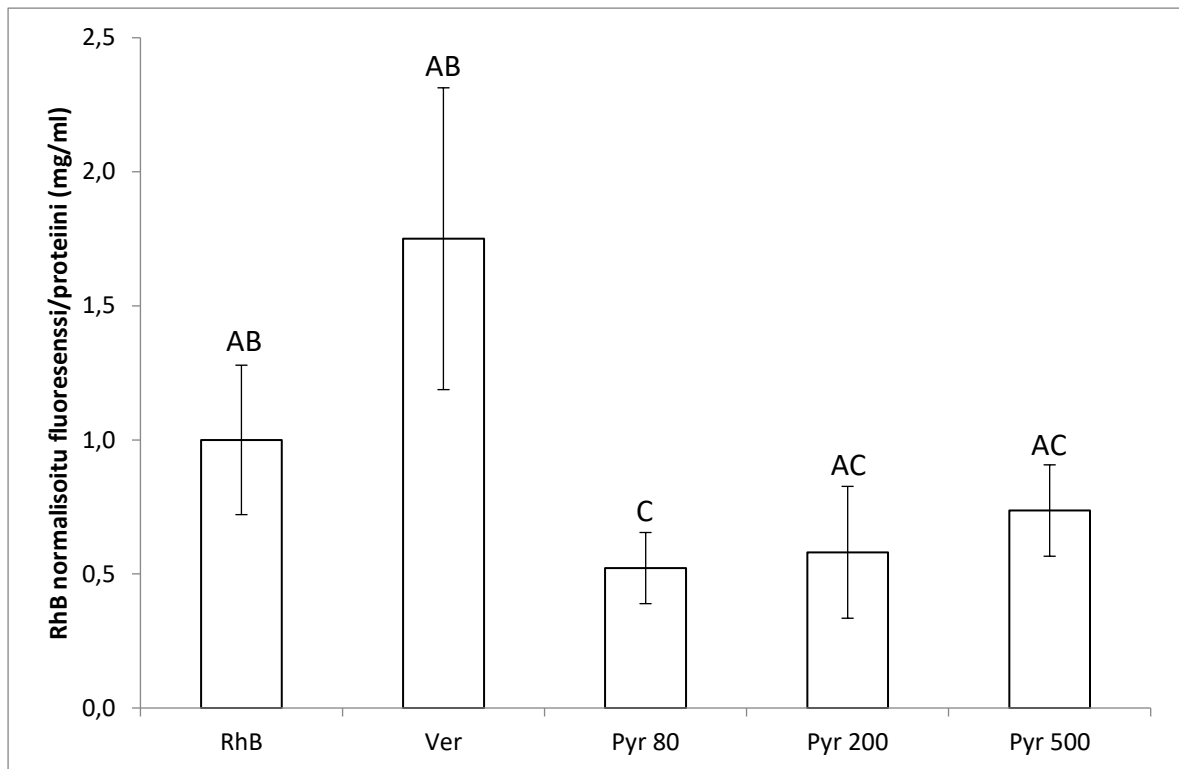
Kuva 5. Antraseenin (Ant) vaikutus harvasukamadon MXR-aktiivisuuteen. Pylväät esittävät keskiarvoja  $\pm$  keskihajontaa. ANOVA ( $F = 9,61$ ,  $df = 4, 25$ ,  $p < 0,001$ ). Tukeyn-testissä positiivinen kontrolli (Ver) erosi muista. Normaalikontrollista RhB ( $p < 0,001$ ) ja antraseeni käsittelyistä Ant 80, 200 ja 500 ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$ ,  $p = 0,001$ ),  $n=6$ .

Kuva 6 kuvaa kryseenin vaikutusta harvasukamadon MXR-aktiivisuuteen. Aineisto saatiin normaalijakautuneeksi ottamalla luonnollinen logaritmi. Aineiston varianssit olivat yhtäsuuret, joten ANOVA ( $F = 12,416$ ,  $df = 4, 25$ ,  $p < 0,001$ ) ja monivertailuna käytettiin Tukey HSD:tä. Ainoastaan positiivinen kontrolli (Ver) erosi muista käsittelyryhmistä (kaikista  $p < 0,001$ ).



Kuva 6. Kryseenin vaikutus harvasukamadon MRX-aktiivisuuteen. Pylväät esittävät keskiarvoja  $\pm$  keskihajontaa. ANOVA ( $F = 12,416$ ,  $df = 4$ ,  $25$ ,  $p < 0,000$ ). Positiivinen kontrolli (Ver) erosi normaalikontrollista (RhB) ja kryseeni käsittelyistä (Tukey HSD  $p < 0,000$ ),  $n=6$ .

Kuva 7 esittää pyreenin vaikutusta harvasukamadon MXR-aktiivisuuteen. Aineisto oli normaalijakautunut, mutta varianssien homogeenisuusehto ei täytynyt. Aineisto tutkittiin Welch'in ANOVA:lla ( $F = 8,1$ ,  $df = 4$ ,  $12,06$ ,  $p = 0,002$ ) ja Games-Howell'in monivertailulla. Normaalikontrolli ja positiivinen kontrolli eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Pyreenit eivät keskenään eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan, mutta ne (Pyr 80, Pyr 200 ja Pyr 500) erosivat positiivisesta kontrollista (Ver) ( $p = 0,014$ ,  $p = 0,014$ ,  $p = 0,031$ ). Lisäksi pyreeni 80 nM (Pyr 80) erosi normaalikontrollista (RhB) tilastollisesti merkitsevästi ( $p = 0,037$ ).

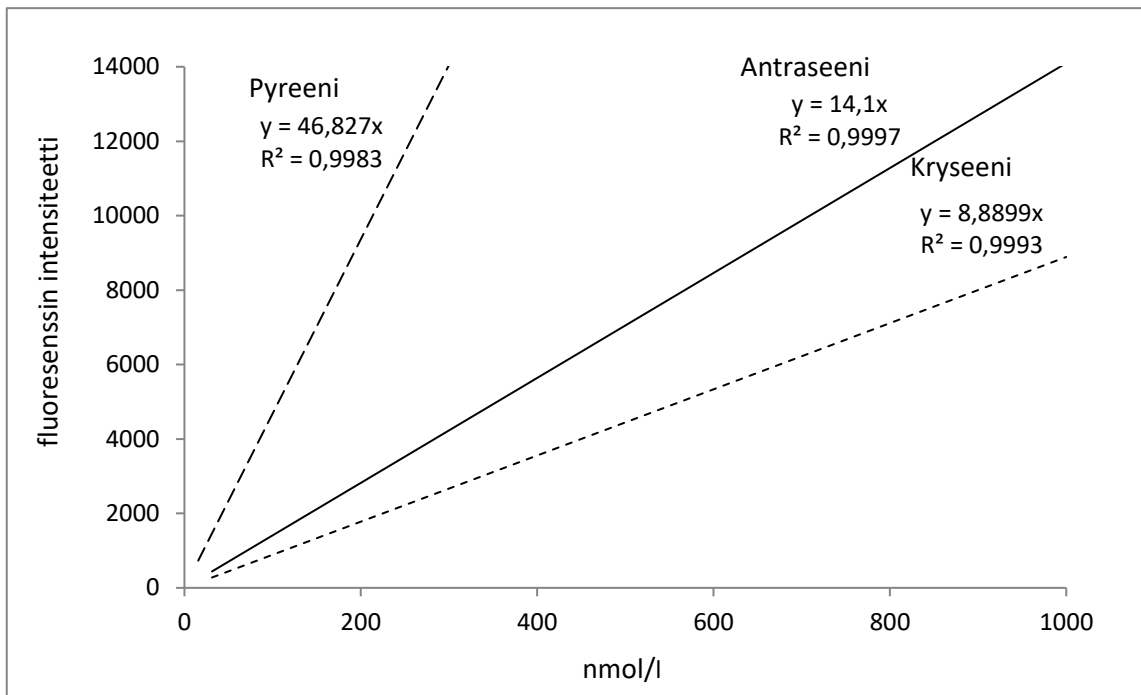


Kuva 7. Pyreenin vaikutus harvasukamadon MXR-aktiivisuuteen. Pylväävät esittävät keskiarvoja  $\pm$  keskihajontaa. Samalla kirjaimella merkityt ryhmät eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Welch'in ANOVA ( $F = 8,51$ ,  $df = 4$ ,  $12,06$ ,  $p = 0,002$ ). Pyreeni 80 nM (Pyr 80) erosi normaalikontrollista (RhB) (Games-Howell  $p = 0,037$ ),  $n=6$ .

### 1.8 Altistusvesianalyysit

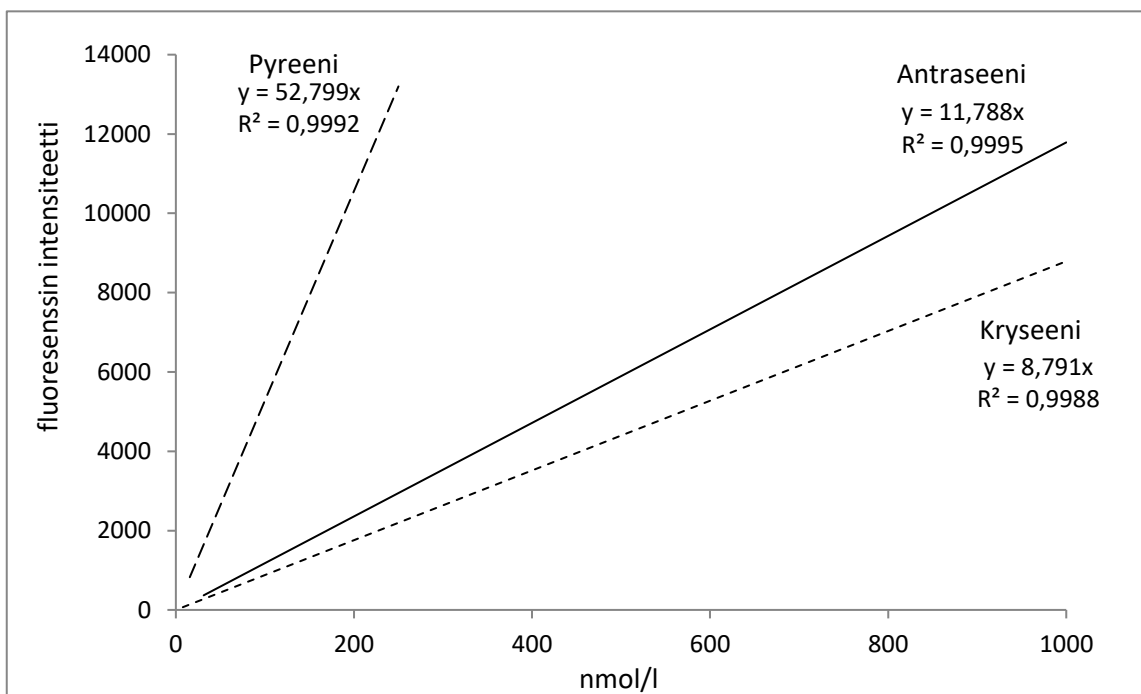
Altistusvesistä ja vertailunäytteistä mitattujen PAH-yhdisteiden määrät laskettiin käyttämällä kuvissa 8 ja 9 esiteltyjä standardisuoria. Kuvassa 8 on esitetty vesikirpulle käytetyt standardisuorat. Antraseenin määrä laskettiin käyttämällä aluetta 330,5 – 389nm, kryseenin 290 – 333,5 nm ja pyreenin 316 – 367 nm.





Kuva 8. PAH-yhdisteiden standardisuorat vesikirpuilla tehtyjen kokeiden altistusvesien PAH-pitoisuuksien mittaamista varten.

Kuvassa 9 on esiteltyä harvasukamadolle käytetyt standardisuorat. Antraseenin määrä laskettiin käyttämällä aluetta 336–391nm, kryseenin 290–333 nm ja pyreenin 319–359 nm.



Kuva 9. PAH-yhdisteiden altistusvesimittauksien standardisuorat harvasukamadolle

Taulukossa 5 on esitettyä altistusvesien ja niiden alkuperäistä tilannetta mallintavien vertailunäytteiden tuloksia PAH-yhdisteiden määristä. Vesikirppukokeen pyreenin määriä altistusvedestä ei voitu mitata, koska vesikirpun altistusvesimittauksissa pyreenin standardin ja altistusvedessä olleen pyreenin metaboliitin tuottamat piikit eivät olleet samalla kohdalla vaan osittain päällekkäin, joten alkuperäisen pyreenin määrä altistusvedessä jäi tuntemattomaksi.

Tauluko 5. Altistusvesistä ja vertailunäytteistä mitatut PAH-pitoisuudet eri altistuksissa. *Daphnia magna* (*D. m.*) ja *Lumbriculus variegatus* (*L. v.*)

Altistus nmol/l	Antraseeni		Kryseeni		Pyreeni	
	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>
500	4532 ± 834 <sup>a</sup>	82 ± 20	304 ± 20	494 ± 52	+	37 ± 10
200	<LOQ	38 ± 14	92 ± 74	167 ± 21	+	14 ± 4
80	<LOQ	19 ± 06	31 ± 38	24 ± 16	+	8 ± 2
Vertailunäytteet (ei koe-eläimiä)						
500	– <sup>b</sup>	584	775	565	433	– <sup>c</sup>
200	68	–	222	–	160	–
80	34	–	62	–	71	–

<sup>a</sup> käytetty vahingossa väkevää kantaliuosta 50000 nM

<sup>b</sup> vertailunäyte tehtiin ja mitattiin, mutta tulokseksi saatiin enemmän kuin 5 µM, joka on antraseenin liukenemisen maksimi arvo (Feldmannová ym. 2006).

<sup>c</sup> tehtiin vertailunäyte, mutta se hylättiin, koska mittauksen arvoksi saatiin 126 joten se poikkesi muista 500 nM vertailunäytteiden mittausarvoista.

+pyreeni metaboloitui, joten piikin paikka siirtyi

Taulukossa 6 on puolestaan esitelty varsinaisten altistusvesien pitoisuudet haluttuun teoreettiseen lähtötasoon verrattuna eli jaettu loppupitoisuus teoreettisella lähtötasolla.

Talukko 6. Altistusten loppupitoisuus suhteessa teoreettiseen lähtötasoon prosentteina. Vesikirpun (*D. magna*) pyreenialtistuksien pitoisuuksia ei voitu mitata metaboloitumisen takia.

Teoreettinen nmol/l	Antraseeni		Kryseeni		Pyreeni	
	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>	<i>D. m.</i>	<i>L. v.</i>
500	9,1 <sup>a</sup>	16,4	60,7	98,8	-	7,3
200	<LOQ	19,0	46,2	83,5	-	7,0
80	<LOQ	23,6	38,3	29,4	-	9,7

<sup>a</sup> verrattu altistusvesimittausta teoreettiseen varastoliuoksesta tehtyyn altistusve-  
teen 50000 nM

Taulukossa 7 on puolestaan esitetty vertailunäytteiden (ei koe-eliötä) pitoisuus ver-  
rattuna teoreettiseen aloituspitoisuuteen eli jaettu mitattu pitoisuus aloituspitoisuu-  
della.

Taulukko 7. vertailunäytteiden suhde vastaavaan teoreettiseen aloitus-  
pitoisuuteen (%).

Teoreettinen nmol/l	Antraseeni		Kryseeni		Pyreeni
	<i>D. m.</i> <sup>a</sup>	<i>L. v.</i> <sup>b</sup>	<i>D. m.</i> <sup>a</sup>	<i>L. v.</i> <sup>b</sup>	<i>D. m.</i> <sup>a</sup>
500	132,2 <sup>c</sup>	116,8	155,0	113,0	86,5
200	34,1	- <sup>d</sup>	111,0	- <sup>d</sup>	79,9
80	42,9	- <sup>d</sup>	77,8	- <sup>d</sup>	88,4

<sup>a</sup> tehty samaan aikaan kokeiden kanssa

<sup>b</sup> tehty kaksi vuorokautta ennen mittauksia

<sup>c</sup> verrattu altistusvesimittausta teoreettiseen varastoliuoksesta tehtyyn altistusve-  
teen 50000 nM

<sup>d</sup> vertailunäytettä ei tehty

## TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkimuksessa tutkittiin ovatko PAH-yhdisteet antraseeni, kryseeni ja py-  
reeni vesikirpun *Daphnia magna* ja harvasukamadon *Lumbriculus variegatus* MXR-  
mekanismiin inhibiittoreita vai eivät. Tutkimuksessa kävi ilmi, että pyreeni indusoi  
harvasukamadon MXR-järjestelmän toimintaa ja vesikirppu eritti pyreenin ulos me-  
taboliittina. Antraseenillä ja kryseenillä ei ollut minkäänlaista vaikutusta MXR-jär-

jestelmän toimintaan kummallakaan tutkimus eliöllä. Mitään merkkiä MXR-järjestelmän inhibitiosta ei havaittu tutkituilla PAH-yhdisteellä, joten tutkimushypoteesi hylätään.

Tuloksista voidaan havaita, että pyreeni eroaa muista tutkituista PAH-yhdisteistä kummallakin koe-eliöllä. Vesikirpulla vaikutusta ei näkynyt suoraan MXR-mekanismia ilmentävässä tutkimusosiossa, vaan altistusvesinäytteistä kävi ilmi, että vesikirppu oli erittänyt ulos jotakin metaboloitunutta pyreeniä. Harvasukamadon vesinäytteestä ei löytynyt pyreenin metaboliittia, joka saattoi johtua siitä, että harvasukamato muodostaa eri metaboliittia ja se ei näkynyt vesinäytteen tutkimuksessa käytetyillä aallonpituusalueilla tai *L. variegatus* metaboloii pyreeniä huonosti kuten Mäenpää ym. (2009) havaitsivat. Joka tapauksessa harvasukamadon kohdalla pyreeni aiheutti MXR mekanismin induktiota matalimmalla pyreenin konsentraatiolla eli monivierasainemekanismin toiminta oli voimistunut.

Induktiota on havaittu myös fenantreenin ja fluoreenin vaikutuksesta hankajalkaiselle (*Paracyclopina nana*), jolla indusoituivat kummatkin monivierasainevastustuskyvystä huolehtivat proteiinit P-gp ja MRP:t (Jeong ym. 2017). Jeong ym. (2017) koikeissa hankajalkaisen MXR-järjestelmän induktio voimistui mitä vahvemmassa altituksesta oli kyse, paitsi voimakkaimman fluoreenialtistuksen vaikutus MRP-proteiineihin oli lievempää kuin toiseksi vahvimman konsentraation. Jeong ym. (2017) selvittivät tutkimuksessaan myös MRX-mekanismien reagoitua PAH-altitukselle geenitasolla lähetti RNA:n kautta ja havaitsivat, että ABCC1-geenin transkriptio voimistui eniten. Hamdoun ym. (2002) havaitsivat, että keinotekoisesti vanhenettu ja biologisesti hajotettu raakaöljy (BWSF) on tähtimadon (*Urechis caupo*) alkion MXR-järjestelmälle inhibiittori tai tähtimadon alkiolla ei ollut P-gp:n kaltaista MXR-proteiinia, kun puolestaan BWSF:llä ei ollut vaikutusta merisiilin (*Lytechinus anamesus*) alkion MXR-järjestelmän toimintaan. Smital ym. (2003) tutkivat dieselöljyn (D2) vesiuutteen vaikutusta kahden simpukan, *Dreissena polymorpha* ja *Mytilus galloprovincialis*, MXR-järjestelmään ja havaitsivat, että MXR-järjestelmän toiminta indusoitui kummallakin lajilla. Yawetz ym. (2010) tutkimuksessa kävi ilmi, että simpukan *Donax trunculus* MXR järjestelmä oli aktiivisempi öljyn pilaamalla alueella

kuin puhtaalla kontrolliryhmällä ja PVC:n pilaaman alueen ryhmällä. Katsumiti ym. (2019) naftteenisen Pohjanmeren raakaöljyn (naphtenic North sea crude oil) vaikutusta simpukalle *Mytilus galloprovincialis*. He havaitsivat MXR-järjestelmän aktivoitumista kaikilla öljyn käsittelyillä, mutta ainostaan ei dispersanttia sisältäneessä koeasetelmassa induktio johtui kiihtyneestä MXR-järjestelmän toiminnasta ja toisten käsittelyjen kohdalla (dispersoitu öljy ja pelkkä dispersantti) kyse saattoi olla myös soluseinämien hajoamisesta ja siten kalseisiin ulos pääsystä kudoksesta.

Tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa tapahtuisiko inhibitiota suuremmilla konsentraatioilla, koska tämä tutkimus tehtiin ympäristön kannalta relevantteilla pitoisuuksilla. Ainoastaan vesikirpun 500 nM:n antraseenikokeissa käytettiin vahingossa suurta konsentraatiota 50000 nM, joka ilmeni antraseenin sakkautumisena tuikepullojen pohjalle ja altistusvesianalyysien tuloksissa.

Vesikirpun *Daphnia magna* vahingossa tehdyn 50000 nM:n antraseenialtistuskokeen tulos on jokseenkin mielenkiintoinen. Altistuskokeessa ei havaittu kuolleisuutta ja yhdessä tuikepulloissa oli syntynyt kolme poikasta kokeen aikana. Antraseenilla tehdyssä kokeessa käytettiin vesikirppuja, joiden ikä oli kuusi tai seitsemän päivää, joten syntyneet kolme poikasta saattoivat olla jonkin kokeen aloituksessa vielä seitsemän päivää vanhan yksilön synnyttämiä, koska koe lopetettiin 24 tunnin kuluttua. Tällöin jokin yksilö on voinut olla jo kahdeksan päivän ikäinen, jolloin havainto olisi yhtenevä Feldmannová ym. (2006) kokeissa raportoidun liuotinkontrollin sekä akridiini-altistuksen sukupolven välin kanssa, joissa sukupolven väli oli 8 päivää.

Feldmannová ym. (2006) tutkimuksesta käy ilmi myös, että antraseenin liukenemisaraja on 5  $\mu\text{M}$  DMSO:n avulla, joka on yhtenevä altistusvesialtistusanalyysin tuloksen kanssa eli keskimäärin 4532 nmol/l. Feldmannová ym. (2006) eivät myöskään havainneet minkäänlaista haittavaikutusta antraseenilla.

Vesikirpun antraseenikokeen suuria hajontoja voi selittää se, että kokeessa käytettiin sekaisin sekä kuuden että seitsemän päivän ikäisiä yksilöitä ja esimerkiksi 200 nM altistusryhmässä oli joitakin vesikirppujen kuoria lopetuksen yhteydessä.

Koska hajonnat olivat suuria niin havaintoyksiköiden määrä olisi pitänyt olla suurempi, jotta tilastollisesti merkitsevä ero oltaisiin saatu edes normaali- ja positiivisen kontrollin välille. Altistuskokeiden havaintoyksiköiden määrä ( $n$ ) oli kontrolliryhmissä vain kolme ja antraseenialtistusryhmissä kuusi. Vesikirpun antraseenikokeiden kontrolliryhmien  $n:n$  olisi pitänyt olla myös suurempi ja lisäksi kokeiden reversiini 205 -ryhmän fluoresenssi oli matalampaa kuin muissa vesikirppukokeissa. Vesikirpuilla tehdyssä kryseeni-kokeessa kaikissa ryhmissä  $n$  oli kuusi, mutta mitään vaikuttavuutta ei havaittu. Ainoastaan kryseenin 200 nM -ryhmä ei eronnut kummastakaan kontrollista, mutta havaintoyksiköiden määrää kasvattamalla voitaisiin parantaa tuloksen luotettavuutta.

Vesikirpuilla tehdyssä pyreenikokeessa kontrolliryhmien ja varsinaisten altistusryhmien havaintoyksiköiden määrät olivat samat kuin antraseenikoeasetelmassa, mutta silti mielenkiintoisia asioita ilmeni. Vesikirpun pyreenikokeessa ei ilmennyt tilastollisesti merkitsevää eroa parittaisvertailuissa kontrolliryhmien välillä, johon liian pienestä havaintoyksiköiden määrästä ( $n=3$ ), mutta pyreenialtistusryhmistä matalimmat konsentraatiot (80 nM ja 200 nM) erosivat tilastollisesti merkitsevästi positiivisesta kontrollista. Tämä kielinee jonkinlaisesta vaikuttavuudesta. MXR-ryhmän proteiinit toimivat metabolittien siirtäjinä ulos soluista (Epel ym. 2008) ja sen vuoksi pyreenin metaboliitin löytyminen vedestä on epäsuora todiste MXR-järjestelmän toiminnasta ja siitä, että pyreenin metaboliitit ovat mahdollisesti järjestelmän substraatteja. Vesikirpun metaboloimattoman pyreenin määrää ei voitu mitata altistusvesianalyysissä, koska mittaustuloksissa standardipiikin ( $\lambda$  316 - 367 nm huippu 334 nm) viereen osittain päällekkäin ilmestyi toinen piikki ( $\lambda$  319-385 nm ja huippu 339 nm), joka saattoi olla jokin vesikirpun tuottamista pyreenin metaboliiteista. Pyreenin metaboliittia ei voitu tunnistaa eikä sen määrää voitu mitata, koska kyseistä metaboliittia ei ollut saatavilla standardin tekoa varten (kts. taulukko 5). Lisäksi standardin ja altistuksen mittauksien piikien ollessa osittain päällekkäiset - jää mahdollinen pieni metaboloitumattoman pyreenin osuus metaboliitin piikin alle tai niitä ei voitu ainakaan erottaa toisistaan. Vesikirppu pysyy muuttamaan pyreenin aineenvaihduntansa kautta ulos eritettäväksi metaboliiti-

tiksi (Ikenaka ym. 2006) tai kuten Watson ym. (2004) tutkima rantataskurapu (*Carcinus maenas*), joka niin ikään kuuluu äyriäisiin. Watson ym. (2004) tutkiman rantataskuravun virtsasta ei löytynyt lainkaan muuntumatonta pyreeniä, mutta heidän tutkimusten altistusvesissä oli 48 tunnin jälkeen muuntumatonta pyreeniä enää noin 5–10 % jäljellä lähtötasosta. Ikenaka ym. (2006) tutkivat pyreenin metaboloitumista vesikirpulla *Daphnia magna*. He havaitsivat, että vesikirppu tuottaa pääosin vaiheen yksi detoksifikaatiotuotteita. Kaikesta vesikirpun metaboloimasta pyreenistä 21 % oli 1-hydroksidipyreeniä ja 52 % oli 1-hydroksidipyreenisulfaattia. Heille jäi kaksi metaboliittia tuntemattomiksi, jotka olivat luultavimmin vaiheen kaksi detoksifikaatiotuotteita. Ottaen omien tulosteni lisäksi huomioon sekä Watson ym. (2004) että Ikenaka ym. (2006) tulokset niin voisi päätellä, että pyreeni on vesikirpulla MXR-järjestelmän substraatti ja aiheuttaisi induktiota MXR-järjestelmälle. Tämän olisi saattanut saada selville, jos vesikirpun pyreenikokeiden havaintoyksiköiden määrä olisi ollut kontrolliryhmissä kuusi tai kaikissa ryhmissä enemmänkin. Toisaalta MXR-kokeiden tuloksesta havaitaan, että 500 nM altistuksen fluoresenssin voimakkuus oli muita pyreenialtistuksia voimakkaampaa ja se ei eronnut kummasakaan kontrolliryhmästä, joten vielä näitä suuremmilla pitoisuuksilla pyreeni saattaisi olla MXR-mekanismiin inhibiittori vesikirpulle.

Toisaalta vesikirpulla tehdyt MXR-tutkimus on sisäisesti ristiriitainen, koska reversiini 205 on P-gp-proteiinin inhibiittori ja P-gp ei siirrä ulos metaboloitneita substraatteja vaan MRP1-proteiini hoitaa metaboliittien siirron (Epel ym. 2008). Joten, jos olisi tänä jo alun pitäen tiennyt, minun olisi pitänyt käyttää tutkimuksissani vesikirpun pyreeni altistukselle inhibiittorina verapamiilia ja fluoresoivan substraattina rodamiini B:tä, jolloin fluoresenssin suhde proteiinipitoisuuteen olisi jäänyt matalaksi ja siten en olisi ehkä saanut tilastollisesti merkitsevää eroa pyreenin kahden matalamman altistuspitoisuuden ja positiivisen kontrollin välille. Vastauksen kysymykseen onko vesikirpun tuottama pyreenin metaboliitti vesikirpun MXR-järjestelmän substraattia – saataisiin selville tekemällä koeasetelma, jossa vesikirpun MXR-järjestelmä inhiboitaisiin ja samalla altistettaisiin vesikirppu pyreenille, jonka jälkeen tutkittaisiin onko altistusvedessä pyreenin metaboliittia vai ei.

Harvasukamato *Lumbriculus variegatus* puolestaan ei juurikaan kykene muuntaamaan pyreeniä saati erittämään metaboliitteja ulos soluista (Leppänen & Kukkonen 2000, Mäenpää ym. 2009). Mäenpää ym. (2009) mittasivat harvasukamadon kudoksista 1–2 % 1-OH-metaboliittia. He havaitsivat 1-OH-pyreeniä kahdella suurimmalla altistuspitoisuudella (803 ja 254 nM) 24 tunnin kuluttua, 90 ja 30 nM altistusrhymissä puolestaan 48 h kohdalla ja laimeimmassa altistuksessa (24 nM) vasta 15. päivänä. Harvasukamato pystyy erittämään pyreeniä, mutta tahti on hidas (Leppänen & Kukkonen 1998, Leppänen & Kukkonen 2000). Minun olisi siis pitänyt pystyä löytämään *Lumbriculus variegatus* kokeista vastaavan kaltainen piikin siirtyminen kuin *Daphnia magna* kokeissa kävi, jos kyseessä oli 1-OH-pyreeni, koska kokeeni olivat 48 h mittaisia ja altistuskonsentraatiot 80–500 nM. Tosin Ikenaka ym. (2006) *D. magna* kokeissa 52 % metaboloituneesta pyreenistä oli 1-hydroksidipyreenisulfaattia. Joten vesikirpulla havaittu metaboliitti ei välttämättä ollut sama ja lisäksi muut mahdolliset metaboliitit eivät ehkä olleet pyreenin altistusvesien SFS-analyyseissä käyttämällä aallonpituusalueilla, jotka olivat vesikirpulla  $\lambda$  316–367 nm ja harvasukamadolla  $\lambda$  316–359 nm (kuvat 8 ja 9). Harvasukamadolla ei havaittu pyreenialtistuksen vesianalyyseissä minkäänlaista metaboliittia. Tämä voi johtua siitä että *L. variegatus* ei kyennyt erittämään ulos metaboliittia mitattavissa olevaa määrää tai lainkaan edes MXR-järjestelmän indusoitumisesta huolimatta. Toisaalta pyreenin aiheuttama fluoresenssin suhde proteiinipitoisuuteen näyttäisi voimistuvan altistuspitoisuuden kasvaessa, joten harvasukamadonkin kohdalla pyreeni saattaisi olla MXR-järjestelmän potentiaalinen inhibiittori vielä suuremmissa pyreenikonsentraatioissa.

Tutkitut PAH-yhdisteet eivät aiheuttaneet MXR-järjestelmän inhibitiota eli kemiallista herkistymistä tutkituilla eliöillä eli ne eivät vaikuttaneet siihen, että vierasaineita alkaisi kertymään tutkittuihin eliöihin. Tämä ei kuitenkaan tarkoita sitä, että PAH-yhdisteillä voisi olla jotain haitallista vaikutusta. Harvasukamadolla havaittiin MXR-järjestelmän indusoitumista eli MXR-järjestelmä toimi aktiivisemmin, joko johtuen siitä, että solujen pintakalvoille oli tuotettu lisää MXR-järjestelmän proteiineja, tai jo oleva MXR-järjestelmä toimi aktiivisemmin – joka tapauksessa jonkin-



laista resurssia kului, oli se sitten proteiinien rakennuspalikoita tai ihan vain energiaa. Energian kulumista puoltasi Hyötyläinen ym. (2002) tutkimus kreosootin pilaaman järven pohjasedimentillä vaikutuksesta häkitettyihin pikkujärvisimpukoihin. Hyötyläinen ym. (2002) havaitsivat pahimmalla kreosootin pilaamalla alueella, ja sen sisältämällä PAH-yhdisteillä mm. pyreeni ja antraseeni, pikkujärvisimpukoiden (*Anodonta anatina*) klykogeenin määrän ja proteiinikonsentraation olleen matalampia kuin puhtaampien vertailualueiden simpukoilla. Simpukoiden kuivapaino oli myös pienempi kuin puhtaammilla vertailualueilla, mutta simpukoiden kuivapainoindeksiä ei mitattu ennen kokeita, joten johtopäätöstä kreosootin vaikutuksesta simpukoiden koon kasvuun ei voitu luoda. Kuten Hyötyläinen ym. (2002) ja Robidoux ym. (2018) ovat tutkineet PAH-yhdisteitä sisältävien seosten haittoja eri eliöillä, niin voisi olla paikallaan tehdä pelkästään PAH-yhdisteistä koostetulla seoksella MXR-kokeita, jotta saataisiin selville PAH-yhdisteiden seosvaikutukset. Seos voisi koostua pelkästään tässä tutkimuksessa olleista PAH-yhdisteistä tai vaikka kaikista 16:sta PAH-yhdisteestä, jotka Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto listasi vuonna 1976 (Keith 2014).

## JOHTOPÄÄTÖKSET

Tukimani PAH-yhdisteet eivät olleet näissä ympäristön kannalta relevanteissa pitoisuuksissa MXR-järjestelmän inhibiittoreita vesikirpulle *Daphnia magna* ja harvasukamadolle *Lumbriculus variegatus*. Pikemminkin tukimani PAH-yhdisteet olivat MXR-järjestelmän substraatteja tai aiheuttivat pelkästään induktiota. Tutkimistani PAH-yhdisteistä ainoastaan pyreeni osittautui tulosten valossa mielenkiintoiseksi yhdisteeksi molemmilla tutkimuseliöllä. Pyreeni osoittautui vesikirpulla *Daphnia magna* selkeästi MXR-järjestelmän substraatiksi, koska erittyi ulos metaboliittina. Puolestaan harvasukamadolle *Lumbriculus variegatus* pyreeni aiheutti MXR-järjestelmän induktiota matalimmassa konsentraatiossa. Toisaalta sekä väkevimmistä pyreenialtistuksesta vesikirpun kohdalla että harvasukamadon fluoresenssin voimistuessa altistuspitoisuuden kasvaessa voisi ajatella, että pyreeni saattaisi alkaa inhiboimaan MXR-järjestelmää vielä suuremmissa pitoisuuksissa, joten tätä voisi tulevaisuudessa tutkia.

Tutkimuksessa mitattiin käyttämieni PAH-yhdisteiden vaikutusta tutkimuseliöiden MXR-järjestelmään suhteuttamalla fluoresenssin voimakkuus kyseisen altistusyksikön proteiinikonsentraatioon eikä märkäpainoon, jota usein on käytetty. Metodissani on ongelmana se, että MXR-järjestelmä koostuu proteiineista, jolloin ne vaikuttavat eliön proteiinikoostumukseen. Fluoresenssin suteuttaminen eliöiden märkäpainoon saattaisi olla robustimpi tapa tutkia PAH-yhdisteiden vaikutusta MXR-järjestelmään. Toisaalta olisi ollut mielenkiintoista tutkia koe-eliöiden MXR-järjestelmän lähetti-RNA-pitoisuuksia, jolloin olisi saatu selville paremmin johtuuko esimerkiksi harvasukamadolla havaitsemani induktio lisääntyneestä MXR-järjestelmän proteiineista harvasukamadon solukalvoilla. Tämän saisi selville proteiinien vasta-aineisiin perustuvalla menetelmällä, jolla voidaan todeta miten proteiinien määrien suhteet ovat muuttuneet eri altistusten välillä.

Tutkimukseni olisi tullut suorittaa suuremmalla joukolla tutkimusyksiköitä, koska nyt jäi osittain epäselväksi, olivatko tutkimani PAH-yhdisteet substraatteja vai eivät. Tämä olisi vaatinut sen, että olisin keskittynyt vain yhteen PAH-yhdisteeseen tai vain toiseen tutkimuseliöön tai vaatinut työparin kokeellisten tutkimusten tekemiseen. Joka tapauksessa tällä valitsemallani tavalla ilmeni mielenkiintoisia asioita pyreenin kohdalta.

Tutkimukseni olivat lyhytaikaisia, joten pitemmän aikavälin krooniset vaikutukset jäivät tutkimatta. Koska MXR-järjestelmään kuluu energiaa substraattien ulospumppaamiseen ja resursseja järjestelmän proteiinien valmistamiseen, niin minkälaisina vasteina MXR-järjestelmän indusoituminen näkyisi. Kenties lisääntymiskyvyn heikentymisenä tai eliöiden koon pienenemisenä. Joka tapauksessa tämän tutkimuksen perusteella harvasukamadon *Lumbriculus variegatus* MXR-järjestelmän indusoitumista voidaan käyttää pyreenialtistuksen biomarkkerina ainakin matalissa pyreenipitoisuuksissa.

## KIITOKSET

Suuret kiitokset ohjalleni filosofian tohtori Eeva-Riikka Vehniäiselle hyvästä ohjauksesta ja henkisestä tuesta pro gradu työn ja kandidaatin tutkielman tekoon. Yliopiston lehtoria Anssi Lenssua kiitän tilastomenetelmien opastuksesta. Laboratoriomestarille Mervi Koistiselle kiitos vesikirppujen ajoittaisesta hoidosta ja laboratoriomestari Leena Siitoiselle kiitos muun muassa M7-veden valmistusavusta. Professori Jussi Kukkoselle ohjastuksesta tukimusten suorittaiseen. Kiitos myös Jyväskylän yliopistolle Konnevesistipendistä.

## LÄHTEET

- Bayona J.M., Fernandez P., Porte C., Tolosa I., Valls M. & Albaiges J. 1991. *Partitioning of urban wastewater organic microcontaminants among coastal compartments*. *Chemosphere*. 23: 313-326.
- Bio-Rad. 1995. *DC Protein Assay Instruction Manual*. , <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>.
- Campos B., Altenburger R., Gómez C., Lacorte S., Piña B., Barata C. & Luckenbach T. 2014. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 148: 139.
- Di Toro D.M., McGrath J.A. & Hansen D.J. 2000. Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1951.
- Douben P.E.T. 2003. *PAHs: an ecotoxicological perspective*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Eisler R. 1987. *Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review* .
- Ekpo B.O., Oyo-Ita O.E., Oros D.R. & Simoneit B.R. 2012. Distributions and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Cross River estuary, SE Niger Delta, Nigeria. *Environ Monit Assess* 184: 1037-1047.
- Epel D., Luckenbach T., Stevenson C.N., Macmanus-Spencer L.A., Hamdoun A. & Smital T. 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ Sci Technol* 42: 3914.
- Feldmannová M., Hilscherová K., Maršálek B. & Bláha L. 2006. Effects of N-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons on survival, reproduction, and biochemical parameters in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology: An International Journal* 21: 425-431.
- Fernandes M.B., Sicre M.-., Boireau A. & Tronczynski J. 1997. *Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary*. *Marine Pollution Bulletin*. 34: 857-867, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X97000635>.
- Hamdoun A.M., Griffin F.J. & Cherr G.N. 2002. *Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter*. *Aquatic Toxicology*. 61: 127-140, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X02000504>.
- Hwang H. & Foster G.D. 2006. *Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff flowing into the tidal Anacostia River, Washington, DC, USA*. *Environmental Pollution*. 140: 416-426, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749105004057>.
- Hyötyläinen T. & Oikari A. 1999. *The toxicity and concentrations of PAHs in creosote-contaminated lake sediment*. *Chemosphere*. 38: 1135-1144, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653598003622>.
- Hyötyläinen T., Karels A. & Oikari A. 2002. *Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment*

- site. *Water Research*. 36: 4497-4504, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135402001562>.
- Igarashi Y., Aoki K.F., Mamitsuka H., Kuma K. & Kanehisa M. 2004. The evolutionary repertoires of the eukaryotic-type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 2149.
- Ikenaka Y., Eun H., Ishizaka M. & Miyabara Y. 2006. *Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 80: 158-165, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X06003353>.
- ISO. 2012. *Water quality Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test*. ISO 6341:2012.
- Jantunen A.P.K., Tuikka A., Akkanen J. & Kukkonen J.V.K. 2008. Bioaccumulation of atrazine and chlorpyrifos to *Lumbriculus variegatus* from lake sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 71: 860.
- Jeong C., Kim D., Kang H., Lee Y.H., Kim H., Kim I. & Lee J. 2017. *Genome-wide identification of ATP-binding cassette (ABC) transporters and their roles in response to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the copepod Paracyclopina nana*. *Aquatic Toxicology*. 183: 144-155, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X16303800>.
- Katsumiti A., Nicolussi G., Bilbao D., Prieto A., Etxebarria N. & Cajaraville M.P. 2019. *In vitro toxicity testing in hemocytes of the marine mussel Mytilus galloprovincialis (L.) to uncover mechanisms of action of the water accommodated fraction (WAF) of a naphthenic North Sea crude oil without and with dispersant*. *Science of The Total Environment*. 670: 1084-1094, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719311751>.
- Keith L.H. 2014. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35: 1-14.
- Koivisto S. 1995. IS DAPHNIA-MAGNA AN ECOLOGICALLY REPRESENTATIVE ZOOPLANKTON SPECIES IN TOXICITY TESTS. *Environmental Pollution* 90: 263-267.
- Kurelec B. 1997. A new type of hazardous chemical: The chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environ Health Perspect* 105: 855-860.
- Kurelec B. 1995. *Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences*. *Science of The Total Environment*. 171: 197-204, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048969795046894>.
- Latimer J. & Zheng J. 2003. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment. Teoksessa: Douben P.E.T. (toim.), *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, s. 9-34.
- Leppänen M.T. & Kukkonen J.V. 1998. Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ Sci Technol* 32: 1503-1508.
- Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. 2000. Fate of sediment-associated pyrene and benzo[a]pyrene in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Aquatic Toxicology* 49: 199-212, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00078-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00078-8).

- Leslie E.M., Deeley R.G. & Cole S.P.C. 2005. *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204: 216-237, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X0400482X>.
- Long E., Macdonald D., Smith S. & Calder F. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Manage* 19: 81-97.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mackay D. & Shiu W.Y. 1977. Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical & Engineering Data* 22: 399-402.
- Mäenpää K., Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. 2009. Sublethal toxicity and biotransformation of pyrene in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Sci Total Environ* 407: 2666.
- Marsalek J., Brownlee B., Mayer T., Lawal S. & Larkin G. 1997. Heavy metals and PAHs in storm-water runoff from the Skyway Bridge, Burlington, Ontario. *Water Quality Research Journal* 32: 815-828.
- Mueller J.G., Chapman P.J. & Pritchard P.H. 1989. Creosote-contaminated sites their potential for bioremediation. *Environ Sci Technol* 23: 1197-1201, doi:10.1021/es00068a003.
- Paumen M.L., Stol P., Ter Laak T.L., Kraak M.H., Van Gestel C.A. & Admiraal W. 2008. Chronic exposure of the oligochaete *Lumbriculus variegatus* to polycyclic aromatic compounds (PACs): bioavailability and effects on reproduction. *Environ Sci Technol* 42: 3434-3440.
- Pelletier M.C., Burgess R.M., Ho K.T., Kuhn A., McKinney R.A. & Ryba S.A. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environmental toxicology and chemistry* 16: 2190-2199.
- Robidoux P.Y., Virginie B., Judith L. & Marc D. 2018. Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf* 164: 331-343.
- Schinkel A.H. & Jonker J.W. 2003. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 3-29, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02001692>.
- Schröder H.C., Badria F.A., Ayyad S.N., Batel R., Wiens M., Hassanein H.M.A., Kurelec B. & Müller W.E.G. 1998. *Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 5: 119-126, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668997100679>.
- Smital T., Luckenbach T., Sauerborn R., Hamdoun A.M., Vega R.L. & Epel D. 2004. Emerging contaminants – pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 101-117.
- Smital T., Sauerborn R. & Hackenberger B.K. 2003. *Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha**.

- Aquatic Toxicology. 65: 443-465, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X03001759>.
- Smital T., Terzic S., Zaja R., Senta I., Pivcevic B., Popovic M., Mikac I., Tollefsen K.E., Thomas K.V. & Ahel M. 2011. *Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 844-851, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310003829>.
- Sörensen A. & Wichert B. 2000. Asphalt and bitumen. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Vehniäinen E. & Kukkonen J. 2015. Multixenobiotic resistance efflux activity in *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 124: 143.
- Viaene K.P., De Laender F., Rico A., Van den Brink, Paul J, Di Guardo A., Morselli M. & Janssen C.R. 2015. Species interactions and chemical stress: Combined effects of intraspecific and interspecific interactions and pyrene on *Daphnia magna* population dynamics. *Environmental toxicology and chemistry* 34: 1751-1759.
- Watson G.M., Andersen O., Galloway T.S. & Depledge M.H. 2004. Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. *Aquatic Toxicology* 67: 127-142, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.006>.
- Yawetz A., Fishelson L., Bresler V. & Manelis R. 2010. *Comparison of the effects of pollution on the marine bivalve *Donax trunculus* in the vicinity of polluted sites with specimens from a clean reference site (Mediterranean Sea)*. *Marine Pollution Bulletin*. 60: 225-229, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X09004044>.

## LITTEET



LIITE 1. M7 VESI

<b>Hivenaineet</b>	<b>g/100ml</b>	<b>ml/l</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,719	0,0125
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,721	0,0125
LiCl	0,612	0,0125
MnCl · 6H <sub>2</sub> O	0,304	0,0125
NaBr	0,032	0,0125
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,126	0,0125
CuCl <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0335	0,0125
	<b>g/250ml</b>	<b>ml/l</b>
ZnCl <sub>2</sub>	0,065	0,05
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,050	0,05
KI	16,25	0,05
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	16,25	0,05
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	2,875	0,05
<b>FeEDTAN VALMISTUS</b>	<b>mg/250 ml</b>	
Nn <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1,25	} 0,25
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,498	
<b>Makroravinteet</b>	<b>g/l</b>	<b>ml/l</b>
FeEDTA		0,25
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	293,8	1
	<b>g/0,5l</b>	<b>ml/l</b>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	123,3	0,5
KCl	29,0	0,1
	<b>g/l</b>	<b>ml/l</b>
NaHCO <sub>3</sub>	64,8	1
	<b>g/0,5l</b>	<b>ml/l</b>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	18,661	0,2
NaNO <sub>3</sub>	1,370	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,715	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,920	0,1
<b>B-Vitamiinit</b>	<b>mg/0,5l</b>	
tiamiini vetykloridi	375	} 0,1
syankobalmiini B <sub>12</sub>	5,0	
Biotiini	3,75	

LIITE 2. KEINOTEKOINEN MAKEAVESI (KTM)

	<b>g/l</b>	<b>ml/l (1 mM)</b>	<b>ml/l (2,5 mM)</b>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	294	0,4	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	123,25	0,4	1
NaHCO <sub>3</sub>	64,75	0,4	1
KCl	5,75	0,4	1