

Pro gradu -tutkielma

**Reteenin ja fluoranteenin yhteisvaikutus
Oncorhynchus mykiss -poikasten varhaiskehitykseen**

Rahkonen Terhi



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

8.5.2018

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

Rahkonen Terhi: Reteenin ja fluoranteenin yhteisvaikutus *Oncorhynchus mykiss* -poikasten varhaiskehitykseen
Pro gradu -tutkielma: 80 s., 3 liitettä (4 s.)
Työn ohjaajat: akatemiatutkija Eeva-Riikka Vehniäinen ja professori Jussi Kukkonen
Tarkastajat: akatemiatutkija Eeva-Riikka Vehniäinen ja yliopistonlehtori Anssi Vähätalo
Toukokuu 2018

Hakusanat: AHR, AHR-agonisti, BSD, *cyp1a1*, CYP1A-inhibiittori, geeniekspressio, kalanpoikanen, kasvu, kehitystoksikologia, kirjolohi, PAH, ruskuaispussitauti

Polyaromaattisest hiilivedyt (PAH) ovat päästöjä öljyperäisistä lähteistä ja epätäydellisen polton prosesseista ja niitä esiintyy yleisesti moninaisina seoksina kaikkialla ympäristössä. Reteeni (1-metyyli-7-isopropyyli-fenantreeni) toimii AHR-agonistina eli aryylihiilivetyreseptorille kiinnittyvänä yhdisteenä, joka käynnistää AHR-signaalireitin ja tuottaa mm. CYP1A1-entsyymiä haitta-ainemetabolialla varten. Fluoranteeni (1,2-benzacenaphthene) toimii soluissa CYP1A-inhibiittorina, joka estää tai vähentää AHR-agonistin metabolialla inhiboimalla CYP1A-entsyymin toimintaa, mikä johtaa emoyhdisteiden puoliintumisajan pidentymiseen. Työssä tutkittiin reteenin (3,2; 10 ja 32 µg/l) ja fluoranteenin (5, 50 ja 500 µg/l) yhteisvaikusta kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasiin yhdeksänpäiväisessä altistuskokeessa, jossa mitattavia vasteita olivat ruskuaispussitautin oireiden ilmeneminen, pituus, ruskuaispussin pinta-ala ja *cyp1a1*-geeniekspression määrä. Reteeni- ja fluoranteenialtistuksen kasvaessa poikaset käyttivät energiaa kasvun sijasta haitta-ainemetabolialla. *Cyp1a1*-geeniekspressio lisääntyi lähes järjestäen, kun yhdisteiden altistuspitoisuudet nousivat. Tulosten mukaan reteenin ja fluoranteenin yhteisaltistus ei vähennä reteenin haitallisuutta kirjolohen poikasilla, vaan niiden yhteisaltistus lisää ruskuaispussitautin oireiden ilmenemistä ja vakavuutta. Tutkimuksen tuloksia voidaan pitää muuten luotettavina paitsi altistusvedestä analysoitujen haitta-ainepitoisuuksien osalta.

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

Rahkonen Terhi: The mixture effect of retene and fluoranthene on the early life stage of *Oncorhynchus mykiss*
MSc thesis: 80 p., 3 appendices (4 p.)
Supervisors: Academic Research Fellow Eeva-Riikka Vehniäinen and Professor Jussi Kukkonen
Inspectors: Academic Research Fellow Eeva-Riikka Vehniäinen and Senior Lecturer Anssi Vähätalo
May 2018

Keywords: AHR, AHR-agonist, BSD, *cyp1a1*, CYP1A-inhibitor, developmental toxicology, fish larval, gene expression, growth, PAH, rainbow trout

Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental contaminants which are formed in petrogenic and pyrogenic processes and occur as complex mixtures. Retene (7-isopropyl-1-methyl phenanthrene) is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) which induces xenobiotic metabolizing enzymes e.g. CYP1A1. The activation of the AHR-pathway by certain PAHs leads to developmental toxicity in fish larvae. Fluoranthene (1,2-benzacenaphthene) is a CYP1A inhibitor which blocks the AHR-mediated induction of CYP1A activity and restrains the metabolism and excretion of some PAHs. In this thesis, the co-exposure of retene (3,2; 10 and 32 µg/l) and fluoranthene (5, 50 and 500 µg/l) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae was studied. The newly hatched larvae were exposed for the compounds and their mixtures for nine days and evaluated for blue sac disease (BSD) symptoms, growth, yolk sac area and *cyp1a1* gene expression. When the concentration of both compounds increased, the larvae used energy for the metabolism of the substances instead of the growth. The expression of *cyp1a1* gene increased as the concentrations of retene and fluoranthene increased. The results show that fluoranthene did not diminish the toxicity of retene on the rainbow trout larvae and the co-exposure of retene and fluoranthene increased the BSD symptoms and their severity.

LÄHDELUETTELO

1	JOHDANTO	1
1.1	Kemikaaliseksi altistuminen	1
1.2	Kalan tutkimuseliöinä.....	2
1.3	Pro Gradu -tutkielman tavoite	3
2	TUTKIMUKSEN TAUSTA	4
2.1	PAH-yhdisteet	4
2.1.1	PAH-päästölähteet.....	5
2.1.2	PAH-pitoisuuksia vesistöissä	6
2.2	Reteeni.....	7
2.3	Fluoranteeni	8
2.4	PAH-yhdisteiden biotransformaatio	9
2.5	Aryylihiilivetyreseptori ja sen toiminta	10
2.5.1	AHR-aktivaatio ja -signaalireitti.....	11
2.5.2	AHR:n indusoimat geenit.....	13
2.6	AHR-ligandeista ja niiden toksisuusvasteesta.....	13
2.7	Kalanpoikasten varhaiskehitys on herkkä vaihe häiriöille	14
2.7.1	Kalan poikasten herkkyys PAH-yhdisteille.....	15
2.7.2	Reteenin kehitystoksiset vasteet kalanpoikasilla	15
2.7.3	Fluoranteenin kehitystoksiset vasteet kalanpoikasilla.....	16
2.8	Ruskuaispussitautin oireet.....	17
2.8.1	Reteenin ja fluoranteenin BSD-oirevasteet.....	18
2.9	PAH-seosten toksisuusvasteet	19
2.9.1	AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin yhteisvaikutus kalanpoikasten toksisuusvasteisiin.....	19

2.9.2 AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin mahdolliset vaikutukset toksisuusvasteisiin.....	22
3 AINEISTOT JA MENETELMÄT.....	22
3.1 Koejärjestelyt.....	23
3.1.1 Reteenin ja fluoranteenin altistuspitoisuudet.....	23
3.2 Koevalmistelut, kokeen aloitus ja vesien vaihto kokeen aikana	25
3.2.1 Kokeen aloitus.....	26
3.2.2 Kokeen ylläpito ja seuranta.....	27
3.3 Kokeen päättäminen	28
3.4 Ruskuaispussitaudin oireiden arviointi ja BSD-%:n laskenta.....	28
3.5 Poikasten pituuksien ja ruskuaispussipinta-alojen mittaaminen kuvista ..	30
3.6 <i>Cyp1a1</i> -geenin lähetti-RNA-määrän analysointi poikasista	30
3.6.1 RNA:n eristys TRI REAGENT®:lla	30
3.6.2 RNA-pelletin pesu etanolilla.....	32
3.7 RNA-pitoisuuden määrittäminen.....	32
3.8 RNA:n puhtauden määrittäminen	33
3.9 RNA:sta cDNA:ta	34
3.9.1 cDNA-synteesi	35
3.9.2 Referenssigeenien määrittäminen ja reaktioseoksen valmistus qPCR:ään..	36
3.9.3 cDNA-näytteiden qPCR-ajot.....	38
3.10 Reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien määrittäminen vesinäytteistä	39
3.10.1 Reteenin ja fluoranteenin standardiliuokset.....	39
3.10.2 Reteenin ja fluoranteenin standardisuorat ja pitoisuuksien määrittäminen vesinäytteistä.....	40
3.11 Tulosten tilastollinen käsittely.....	41

4	TULOKSET	42
4.1	Reteeni- ja fluoranteenipitoisuudet vesinäytteissä.....	42
4.3	Ruskuaispussitaudin BSD-prosentit.....	44
4.3.1	Poikasten kuolleisuus.....	46
4.4	Poikasten pituudet	46
4.5	Ruskuaispussien pinta-alat	48
4.6	qPCR ja <i>cyp1a1</i> -geeniekspressiot.....	49
5	TULOSTEN TARKASTELU	51
5.1	Reteenin ja fluoranteenin pitoisuudet kokeen altistusvesissä	52
5.2	Ruskuaispussitaudin oireiden vertailu	53
5.3	Kirjolohen poikasten pituudet.....	55
5.4	Ruskuaispussien pinta-alat	56
5.5	<i>Cyp1a1</i> -geeniekspressiomäärien vertailu.....	57
6	JOHTOPÄÄTÖKSET	59
	KIITOKSET	62
	KIRJALLISUUS	63
	LIITE 1. Koeastiakartta	70
	LIITE 2. Esimerkkikuvat ruskuaispussitaudin oireiden määrittämisestä sekä pituuden ja pinta-alan mittaamisesta kirjolohen (<i>Ochorhynchus mykiss</i>) poikasista	71
	LIITE 3. Reteenin ja fluoranteenin laimennossarjojen valmistus standardisuorien määrittämistä varten (vesinäytteiden luminesenssispektrometri-analyysit)	73

SANASTO JA LYHENTEET

SANASTO

AHR-agonisti	AH-reseptorin kytkevä yhdiste
AHR-antagonisti	AHR:lle sopiva yhdiste, joka ei indusoi AHR:ää
ANF	alpha-naphthoflavone, CYP1A-inhibiittori
BaP	benzo[a]pyrene, heikko AHR-agonisti
BNF	β -naphthoflavone, AHR-agonisti
CYP1A-inhibiittori	estää tai vähentää CYP1A-entsyymin toimintaa
tPAH	total PAH, PAH-yhdisteiden kokonaismäärä

LYHENTEET

AHR	aryl hydrocarbon receptor
BSD	blue sac disease, ruskuaispussitauti
CYP1A1	sytokromi P450 1A1 -entsyymi
<i>cyp1a1</i>	sytokromi P450 1A1 -geeni
DLC	dioxin like compound, dioksiinin kaltainen yhdiste
FLU, Flu	fluoranteeni, 1,2-benzacenaphthene
hpf	hours post fertilization, tuntia hedelmöityksen jälkeen
ka	kuiva-aine
PAH	polyaromatic hydrocarbon, polyaromaattinen hiilivety
RET, Ret	reteeni, 1-metyyli-7-isopropyylifenantreeni
TCDD	2,3,7,8-tetraklooridibentso- <i>p</i> -dioksiini

1 JOHDANTO

Tällä hetkellä kemikaalien ja haitta-aineiden yhteisvaikutukset herättävät keskustelua ja niitä tutkitaan yhä enemmän. Erilaiset kemikaalipäästöt lisäävät eliöiden altistumista uusille synteettisille yhdisteille, joita ei luonnostaan esiinny ympäristössä. Kemikaalien yhteisvaikutuksia eliöissä ei tunneta riittävän hyvin, ja kullakin kemikaaliyhdistelmällä on tietyssä kohdeorganismissa sille ominaiset toksisuusvasteet. Kemikaaleilla voi kuitenkin olla tunnusomaisia ja yhteneviä toksikologisia vaikutuksia lajien ja jopa lajiryhmien välillä. Esimerkiksi ihmisen kannalta muiden lajien kuten luukalojen tutkimuksilla voidaan saada tietoa, jonka avulla voidaan arvioida kemikaalien vaikutusta ihmiseen tai muihin selkärangkaisiin, kun lajien väliset yhteneväisyydet ja erot tunnetaan.

1.1 Kemikaaliseoksille altistuminen

Ympäristöön on levinnyt lukuisia kemikaaleja eri lähteistä, ja niiden seoksille altistuminen voi olla joko jatkuvaa tai ajoittaista (Mumtaz ym. 2010). Kemikaalialtistuksessa ihminen tai muu eliö ei altistu vain yhdelle kemikaalille kerrallaan vaan useille eri kemikaaleille samanaikaisesti (Mumtaz ym. 2010). Jotta kemikaaliseosten aiheuttamia riskejä voidaan arvoida, täytyy haitta-aineiden vaikutukset tuntea (Schlenk ym. 2008). Kemikaali voi vaikuttaa toisen kemikaalin absorptioon, kulkeutumiseen, metaboliaan ja eritykseen eliössä (Celander 2011). Metaboliaentsyymien tai kuljetuspumppujen inhibitio tai toiminnan muutokset estävät reseptorien välistä viestintää ja aiheuttavat koktailvaikutuksen, joka voi esim. vähentää toisen kemikaalin biomarkkerivastetta ja näin aiheuttaa syntyvän toksisuusvasteen aliarvioinnin (Celander 2011). Kemikaaliseokselle altistuminen voi aiheuttaa additiivisia, synergistisiä tai jopa antagonistisia vaikutuksia tai vasteita eliössä (Wassenberg ja Di Giulio 2004, Gonçalves ym. 2008, Philip ym. 2010, Staskal 2010, Celander 2011, Brown ym. 2014) eikä lopullista

yhteisvaikutusta voidaan päätellä yksittäisten yhdisteiden perusteella (Philip ym. 2010). Myös aineiden suhteelliset määrät toisiinsa nähden vaikuttavat niiden toksisuuteen ja syntyviin vasteisiin (Philip ym. 2010).

Aineen ominaisuuksien lisäksi ympäristöolosuhteet kuten lämpötila, pH, veden ominaisuudet ja suolapitoisuus vaikuttavat sen toksisuuteen (Mohammed 2013). Ympäristö olosuhteet voivat muuttua ja muokata yhdistettä, niin että aineen toksiset vaikutukset joko lisääntyvät tai vähenevät (Mohammed 2013). Vesi on ympäristö, jonka haasteena ovat moninaiset kemikaaliseokset sisältäen sekä yleisiä saasteita, kuten polyaromaattisia hiilivetyjä (PAH), pysyviä orgaanisia yhdisteitä, metalleja, pestisidejä, hormonihäiritsijöitä ja uuden tyyppisiä kemikaaleja kuten lääkkeitä, hygieniatuotteita, uuden sukupolven biosidejä, palonestoaineita, mikromuoveja ja nanohiukkasia (Celander 2011). Turvalliset kemikaalipitoisuudet perustuvat laboratoriotutkimuksiin, mutta vaikka niiden kanssa pysyttäisiin turvatasojen mukaisissa pitoisuuksissa, kemikaalien haitallisuus kasvaa, kun ne esiintyvät seoksina (Celander 2011). Lopulta kemikaalit vaikuttavat yksilöiden kautta lopulta koko populaatioon (Mumtaz ym. 2010).

1.2 Kalan tutkimuseliöinä

Toksikologisissa tutkimuksissa ja kemikaalien haittavaikutusten arvioinnissa käytetään laajalti ja yhä enenemissä määrin mallieliönä kaloja (Hahn ja Hestermann 2008). Kalat ovat vakiintuneet tutkimuseliöinä ja tunnustettu biologisiksi malleiksi, kun tutkitaan kemikaalien mahdollisia haittavaikutuksia ihmisten terveydelle (Hahn 2001, Hahn ja Hestermann 2008). Koska kalat ovat pieniä ja niillä on lyhyt lisääntymiskierto, ne ovat suhteellisen edullisia ylläpitää ja sopivat sekä elinkaaritutkimuksiin että useampien sukupolvien mittaisiin tutkimuksiin (Hahn 2001, Mohammed 2013). Kalat ovat olleet osallisena tärkeissä ja perustavanlaatuisissa tutkimuksissa, jotka ovat auttaneet ymmärtämään neurobiologiaa, endokrinologiaa, kehitysbiologiaa ja biokemiallista adaptaatiota (Hahn 2001). Eko- ja toksikologian tutkimusten lisäksi kaloja käytetään myös

ympäristön monitoroinnissa ja kemikaalien karsinogeenisuustutkimuksissa (Hahn 2001). Kaloilla on myös tutkittu, miten haitta-aineet vaikuttavat niiden käyttäytymiseen (Conçalves ym. 2008). Kalat mahdollistavat myös signaalireittien välisten vuorovaikutusten (cross-talk) tutkimisen ja sitä kuinka vuorovaikutuksessa olevien kemikaalien roolit toimivat mm. kehitystoksikologiassa (Hahn 2001). Monien kalalajien kehityksen ja kehitystoksikologian seuraaminen on helppoa niiden läpikuultavien alkioiden vuoksi (Hahn 2001).

1.3 Pro Gradu -tutkielman tavoite

Työn tavoitteena on määrittää kokeellisesti, kuinka kaksi erilaista PAH-yhdistettä, reteeni (1-metyyli-7-isopropyylifenantreeni) ja fluoranteeni (1,2-benzacenaphthene), yhdessä vaikuttavat kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasten varhaiskehitykseen ruskuaispussivaiheessa. Tutkittavia vasteita ovat ruskuaispussitaudin (blue sac disease, BSD) oireiden ilmentyminen ja vakavuus, poikasten kasvu (pituutena), ruskuaispussin pinta-ala sekä haitta-ainemetaboliantisyymien sytokromi P4501A1 (CYP1A1) lähetti-RNA:n (l-RNA) ekspressiomäärä. Kokeellisessa osuudessa vastakuoriutuneita kirjolohen poikasia altistetaan yhdeksän päivän ajan kolmelle eri pitoisuudelle reteeniä (3,2; 10 ja 32 µg RET/l) ja fluoranteenia (5, 50 ja 500 µg FLU/l) sekä näiden pitoisuuksien kaikille mahdollisille RET-FLU-yhdistelmille ja kokeen aikana seurataan poikasten kuolleisuutta. Kokeen päätteeksi jokainen poikanen kuvataan BSD-oireiden arviointia varten ja pakastetaan yksittäin *cyp1a1*-geenin l-RNA:n määrän määrittystä varten.

Tämän työn yhteydessä ei välttämättä voida suoranaisesti puhua kemikaalien koktailvaikutuksista, mutta nämä molemmat PAH-yhdisteet toimivat eri tavalla aryylihiilivetyreseptorilla (aryl hydrocarbon receptor, AHR) ja vaikuttavat eri tavalla sen toimintakokonaisuuteen metaboloida nämä haitta-aineet ulos elimistöstä. Reteeni indusoi AH-reseptoria (AHR-agonisti) ja tuottaa haitta-

ainemetaboliaan kuuluvia entsyymejä kuten CYP1A1, ja taasen fluoranteeni mm. inhiboi tämän CYP1A-entsyymin toimintaa (CYP1A-inhibiittori). Koska reteenin metaboliassa syntyy haitallisempia välituotteita kuin mitä reteeni itse on, on mahdollista, että fluoranteenin aiheuttama CYP1A-inhibitio vähentää reteenin toksisuusvaikutuksia kirjolohen poikasissa, kun reteenin metabolia estyy tai vähenee. Toisaalta haitta-ainemetabolian estyminen ja muiden solutoimintojen häiriintyminen voi myös lisätä reteenin ja fluoranteenin kehitystoksisia haittavaikutuksia poikasissa. AHR-välitteinen kehitystoksikologia ilmenee ruskuaispussivaiheen poikasilla ruskuaispussitaudin oireina sekä muutoksina CYP1A1-entsyymin toiminnassa ja l-RNA:n määrissä. Toivotaan, että tämän kokeen tulosten avulla voidaan ymmärtää paremmin AHR-agonistin (reteenin) ja CYP1A-inhibiittorin (fluoranteenin) yhteisvaikutusta kirjolohen poikasiin niiden varhaiskehityksen aikana. BSD-oireet ja *cyp1a1*-geenin l-RNA:n määrä toimivat biomarkkereina reteenin ja fluoranteenin toksisuusvaikutuksille ja AHR-välitteiselle kehitystoksisuudelle, jotka heikentävät ja häiritsevät kalanpoikasten kehitystä.

2 TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1 PAH-yhdisteet

Polyaromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet ovat aromaattisia bentseenirenkaista muodostuneita hiilivety-yhdisteitä. Ne ovat erittäin stabiileja, lipofiilisiä ja poolittomia yhdisteitä, joilla on matala vety-hiili-suhde (Ravindra ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010). PAHien fysikaalinen tila on yleensä kiinteässä muodossa ja ympäristössä ne ovat pääsääntöisesti pysyviä yhdisteitä (Manzetti 2013). Ilmassa ja vedessä ne absorboituvat partikkeleihin, etenkin raskaimmat PAHit, jotka liukenevat huonosti veteen (Ravindra ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010). Eliöihin 2-4 renkaiset PAHit akkumuloituvat fosfolipidikalvon läpi diffusiivisesti ja kullakin yhdisteellä on sille ominainen oktanoli-vesi-

jakaantumiskerroin, K_{ow} (the octanol-water partition coefficient; Sikkema ym. 1994, Incardona ym. 2006). K_{ow} ja sen logaritmuunnos ovat parametrejä, joiden avulla voidaan ennustaa PAHien leviämistä ja jakautumiskäyttämistä ympäristössä ja sitä on käytetty myös ennustamaan PAHien bioakkumulaatiota eliöihin (Johnson ym. 2008).

2.1.1 PAH-päästölähteet

PAHit voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden syntyprosessin perusteella: petro- ja pyrogeenisiin PAH-yhdisteisiin (Manzetti 2013). Petrogeenisiin PAH-lähteisiin kuuluvat päästöt mm. öljynporaustoiminnasta, öljyteollisuudesta, ja -onnettomuuksista sekä liikenteensä (Manzetti 2013, Carlson ja Zelikoff 2008). Öljyperäisten lähteiden lisäksi PAHeja löytyy puunkyllästysaineista (Donnelly ja Naufal 2010). PAHit ovat yleisiä palamisen sivutuotteita ja niitä syntyy etenkin epätäydellisestä orgaanisten hiilituotteiden palamisesta kuten avotulista, metsäpaloista ja polttoaineiden poltosta (Carlson ja Zelikoff 2008, Ravinda ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010, Zhang ym. 2012, Manzetti 2013). PAHeja syntyy sekä antropogeenisistä että luonnonlähteistä ja ne voivat olla myös kosmista alkuperää (Ravindra 2008, Zhang ym. 2012). Voidaan yleisesti todeta, että teollistuminen, fossiilisten polttoaineiden käytön lisääntyminen ja urbanisaatio ovat lisänneet PAHien määrää ympäristössä ja vesiekosysteemeissä (Lima ym. 2003, Pikkarainen 2004, van Metre ja Mahler 2005). Toisaalta on myös saatu viitteitä siitä, että PAH-päästöt eivät enää lisääntyisi, mutta tämä on alueriippuvaista (Lima ym. 2003).

PAHeja esiintyy kaikkialla, etenkin kaupungistuneissa ympäristöissä (Lima ym. 2003, Zhang ym. 2012, Stout ym. 2015). Suorien päästöjen lisäksi PAHit päätyvät maaperään, vesistöihin ja niiden sedimentteihin myös ilman kautta laskeutuen (Lima ym. 2003, Carlson ja Zelikoff 2008, Stout ym. 2015). Hydrofobisuuden takia PAHit liukenevat huonosti veteen, mutta ne adsorboituvat herkästi partikkeleihin ja pienhiukkasiin ja voivat sitä myöden lopulta sedimentoitua vesistöihin (Pikkarainen 2004, Van Veld ja Nacci 2008, Donnelly ja Naufal 2010, Le Bihanic

ym. 2014). Vedessä 79–93 % PAHeista on liittyneenä partikkeleihin (Manzetti 2013) ja pintavesissä näiden osuus on kaksi kolmas osaa (Donnelly ja Naufal 2010). PAHien sedimentaatio vesistöihin on yksi keskeisimmistä PAHien akkumulaatioreiteistä ympäristöön (Manzetti 2013). Pohjasedimentti, joka sisältää PAHeja, altistaa pohja- ja muut vesieliöt niiden haittavaikutuksille (Hyötyläinen ja Oikari 1998, Leppänen ja Kukkonen 2000, Pikkarainen 2004, Van Veld ja Nacci 2008, Le Bihanic ym. 2014). Jotkin kalalajit kutevat munat vesistön pohjalle, jossa ne ovat kontaktissa pohjasedimentin kanssa, joten saastunut pohjasedimentti lisää munien, alkioiden ja pienten poikasten riskiä PAH-altistukselle (Brinkworth ym. 2003).

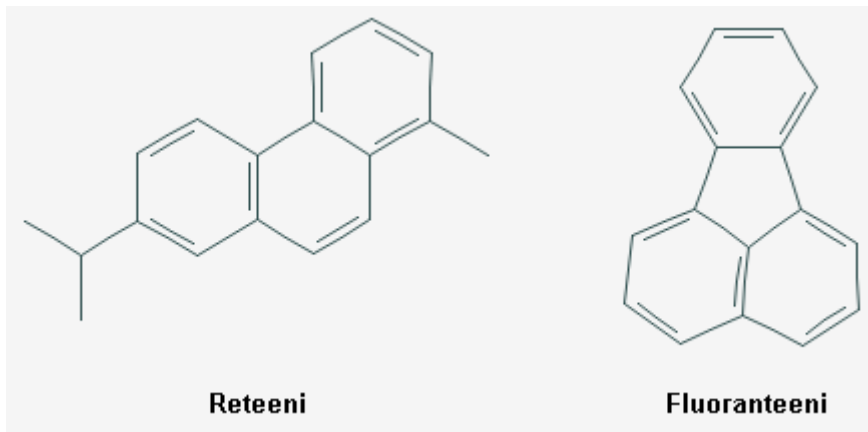
2.1.2 PAH-pitoisuuksia vesistöissä

Koska PAHit päätyvät ensin pintavesiin ja lopulta sedimentoituvat ja kerrostuvat vesistöissä, on niiden pitoisuuksia tutkittu vesistöjen eri osissa. PAHien pitoisuus pintavesissä voi vaihdella 0,01–340 µg/l välillä (Donnelly ja Naufal 2010). Esimerkiksi Kiinan Aojiang-joessa on PAHien kokonaispitoisuus (total PAH, tPAH) ollu keskimäärin 910 ng tPAH/l ja PAHien kokonaispitoisuus on ollut korkeimmillaan 1520 ng tPAH/l (Li ym. 2010). PAH-pitoisuuksia on tutkittu myös järvien ja merien pohjasedimenteistä. Hyötyläinen ja Oikari (1998) mittasivat keskisuomalaisen Jämsänvesi-järven pohjasedimentin pintakerroksesta (0–10 cm) korkeimmillaan 3300 ja 938 µg tPAH/g ka (ka = kuiva-aine) PAH-pitoisuudet. Nämä PAH-päästöt ovat peräisin vuonna 1976 suljetusta kreosoottikyllästysainetehtaalta. Hyötyläinen ja Oikari (1998) uskovat, että nämä aineet voivat aiheuttaa toksisuutta järvenpohjan selkärangattomille ja kaloille. Itämeren pintasedimentissä (1–5 cm) 13 eri PAH-yhdisteen pitoisuus vaihteli 64–5161 ng/g ka välillä riippuen pohjan tyypistä (Pikkarainen 2004). Suomenlahdella PAHien yhteismäärä vaihteli 611–847 ng/g ka välillä (Pikkarainen 2004). Nämä PAHit ovat peräisin sekä pyro- että petrogeenisistä lähteistä, mistä voidaan myös päätellä, että laivaliikenne ja dieselmootoreiden käyttö ovat lisääntyneet Itämerellä

(Pikkarainen 2004). Tällaiset PAH-pitoisuudet Itämerellä tarkoittavat huomattavaa saastumista tietyillä alueilla (Pikkarainen 2004).

2.2 Reteeni

Reteeni (1-metyyli-7-isopropyyli-7-antreni, alkyylifenantreeni; Kuva 1) on alkyloitu hydrofobinen PAH-yhdiste, jonka oktanoli-vesi-jakautumiskerroin, $\log K_{ow}$, on 6,5 (Mu ym. 2014b, Retene 2017; Taulukko 1). Reteeniä muodostuu pihkaisen ja pehmeän puun hartsihappojen (resin acids) epätäydellisessä palamisessa esim. metsäpaloissa ja hartsihaposta anaerobimikrobien toiminnan johdosta (Billiard ym. 1999). Sitä on myös löydetty kunnallisten kaatopaikkojen maaperästä (Legler ym. 2011) ja kivihiilestä, jossa reteenipitoisuus vaihtelee 0–25 % välillä (Achten ja Hofmann 2009). Sellu- ja paperitehtaiden jätevesissä on päätyntä reteeniä järvisedimenttien pintakerroksiin (Leppänen ja Oikari 1999, Vehniäinen ym. 2015). Tällaisessa sellu- ja paperitehtaan jätevesiä vastaanottavassa vesistössä on ollut reteeniä jopa 1600 $\mu\text{g/g}$ kuivattua järvisedimenttiä (Leppänen ja Oikari 1999). Kun Amerikan yhdysvalloissa Rhode Island -osavaltiossa tutkittiin Pettaquamscutt-joen sedimenttiä, voitiin arvioida, että vuonna 1870 reteenipitoisuus on ollut siinä enimmillään n. 350 ng/g (Lima ym. 2003). Vuonna 2000 Pettaquamscutt-joen sedimentin reteenipitoisuus oli laskenut alle 50 ng/g (Lima ym. 2003). Yleensä reteenipitoisuus vaihtelee 0,010–0,1 $\mu\text{g/g}$ ka rannikoiden tai makeiden vesien sedimentissä (Billiard ym. 1999).



Kuva 1. Reteenin ja fluoranteenin kemialliset rakenteet

Taulukko 1. Reteenin ja fluoranteenin kemialliset ominaisuudet

PAH	Kemiallinen kaava	Molekyylipaino, g/mol	Vesiliukoisuus, mg/l	Log K_{ow}
reteeni*	$C_{18}H_{18}$	234,342	< 1	6,5
fluoranteeni**	$C_{16}H_{10}$	202,256	0,20–0,26	5,16

*Lähde: Retene (2017), ** Lähde: Fluoranthene (2017)

2.3 Fluoranteeni

Fluoranteeni (1,2-benzacenaphthene) on erittäin valoherkkä PAH-yhdiste, jossa on kolmen aromaattisen renkaan lisäksi yksi viidestä hiilestä muodostuva rengasrakenne (Fluoranthene 2011, Fluoranthene 2017; Kuva 1). Kuten reteeni myös fluoranteeni liukenee huonosti veteen ja sen log K_{ow} -arvo on 5,16 (Fluoranthene 2017; Taulukko 1). Fluoranteenia voi esiintyä kivihiilessä pieninä määrinä (Achten ja Hofmann 2009) ja sitä muodostuu kivihiilitervan ja raakaöljyn korkealämpötilaisessa poltossa, kun valmistetaan asfalttia (Fluoranthene 2017). Kuten reteeniä myös fluoranteenia on löydetty kunnallisen kaatopaikan maaperästä peräti 13 800 μg FLU/kg ka pitoisuutena (Legler ym. 2011).

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivissä (2008/105/EU) on asetettu 33 prioriteettiaineelle ja tietyille muille pilaantuville aineille ympäristölaatu- ja tietyille muille pilaantuville aineille ympäristölaatu- ja tietyille muille pilaantuville aineille ympäristölaatu-

ja direktiivin (2000/60/EY) tavoitteena on vähentää asteittain näiden prioriteettiaineiden aiheuttamaa ympäristön pilaantumista ja lopettaa niiden päästöt. Fluoranteeni on yksi näistä listatuista aineista ja pintavesissä sitä saa olla enintään 0,1 µg FLU/l vuosikeskiarvona mitattuna ja sallittu enimmäispitoisuus on 1 µg FLU/l (2008/105/EY). Makeissa vesissä on fluoranteenia mitattu 0,05 µg FLU/l ja kaloissa 35,6 µg FLU/kg tp (tuorepaino; Fluoranthene 2011). Juomavedestä ei ole löydetty fluoranteenia, mutta sen raja-arvoksi on asetettu 1,8 µg/l (Fluoranthene 2011).

Itämeren pohjasedimentin pintaosassa fluoranteenin pitoisuus vaihtelee 6,4–589 ng/g ka välillä (Pikkarainen 2004). Keskisuomalaisessa Jämsänvesi-järvestä on pahiten saastuneilta alueilta löydetty sedimentin pintakerroksesta (0–10 cm) jopa 295,3 µg FLU/g ka, mutta sen pitoisuus laskee 20–30 cm syvyydessä 2,32 µg FLU/g ka (Hyötyläinen ja Oikari 1998). Useimmat Jämsänvesi-järvestä otetut näytteet sisälsivät fluoranteenia (Hyötyläinen ja Oikari 1998).

2.4 PAH-yhdisteiden biotransformaatio

Haitta-aineiden biotransformaatio on kaksivaiheinen prosessi, jossa lipofiiliset yhdisteet kuten PAH:t muokataan hydrofiilisemmiksi uloseritystä varten (Gräns ym. 2010). Kun PAH:t ovat absorboituneet kalojen elimistöön (systemic circulation), ensimmäisessä haitta-ainemetabolian vaiheessa ne hapetetaan ja toisessa vaiheessa tapahtuu konjugaatioreaktio entsyymattisten reaktioiden kautta (Donnelly ja Naufal 2010, Gräns ym. 2010). Ensimmäisessä vaiheessa mikrosomaaliset CYP-entsyymit katalysoivat hydroksylaatioreaktioita, joissa aromaattiseen yhdisteeseen liitetään OH-ryhmä (Xu ym. 2005, Schlenk ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010). Nämä prosessit parantavat PAHien polaarisuutta ja vesiliukoisuutta, mikä nopeuttaa niiden detoksifikaatiota ja erityistä ulos elimistöstä (Donnelly ja Naufal 2010, Gräns ym. 2010).

Suurin osa PAHeista on kemiallisesti inerttejä kuten reteeni, mutta haitta-ainemetabolian ensimmäisessä vaiheessa entsyymit muuttavat yhdisteen

kemiallisesti ja biologisesti erittäin reaktiivisiksi välituotteiksi, jotka ovat haitallisempia kuin alkuperäiset yhdisteet (Billiard ym. 1999, Schlenk ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010, Gräns ym. 2010). Tässä metaboliaprosessissa PAHien hapettaminen muuttaa ne erittäin reaktiivisiksi dioli-epoksi-johdannaisiksi, jotka voivat sitoutua kovalenttisesti makromolekyyleihin kuten proteiineihin ja DNA:han tuottaen mm. DNA-addukteja (Hawkins ym. 1999, Donnelly ja Naufal 2010). Esim. CYP1A1 detoksifikoii PAHeja, mutta samalla se voi tuottaa mutageenisia metaboliitteja ja reaktiivista happea (Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003).

2.5 Aryylihiilivetyreseptori ja sen toiminta

Aryylihiilivetyreseptori (aryl hydrocarbon receptor, AHR) kuuluu basic-helix-loop-helix (bHLH)-Per-Arnt-Sim (PAS) transkriptiotekijöiden superperheeseen (Fernandez-Salguero ym. 1996, Powell ja Hahn 2000, Hahn 2002). AH-reseptorilla on tärkeä rooli lääkkeiden ja haitta-aineiden metaboliassa sekä poistamisessa elimistöstä ja se suojaa elimistöä ympäristöhaitoilta (Xu ym. 2005). AHR indusoi ensimmäisen ja toiseen vaiheen metaboliaentsyymejä sekä muita stressientsyymejä mm. maksassa, maksan ulkopuolisissa kudoksissa ja keuhkoissa (Xu ym. 2005, Donnelly ja Naufal 2010). AH-reseptorilla on kolme viestintätapaa: 1) adaptaatioviestitys (adaptation signaling), joka johtaa haitta-aineita metaboloivien entsyymien transkription säätelyyn ja yleensä lisää niiden tuotantoa; 2) toksisuusviestitys (toxic signaling), joka aiheuttaa vastareaktion pysyvien korkean kiinnittymisaffiniteetin ligandeille ja aiheuttaa haittavaikutuksia soluille ja 3) kehityssignaalit (developmental signaling), joita tarvitaan tiettyjen elinten ja kudosten normaalissa kehityksessä (Carney ym. 2006, Tillitt ym. 2008). Koska AH-reseptorilla on biotransformaation lisäksi muitakin elimistön toimintaan vaikuttavia tehtäviä kuten solu-solu-vuorovaikutukset, solusyklin säätely, vuorokausirytmitys ja endokriinisignaalit (King-Heiden ym. 2011), ympäristön haitta-aineet häiritsevät näitä eliön normaaleja fysiologisia

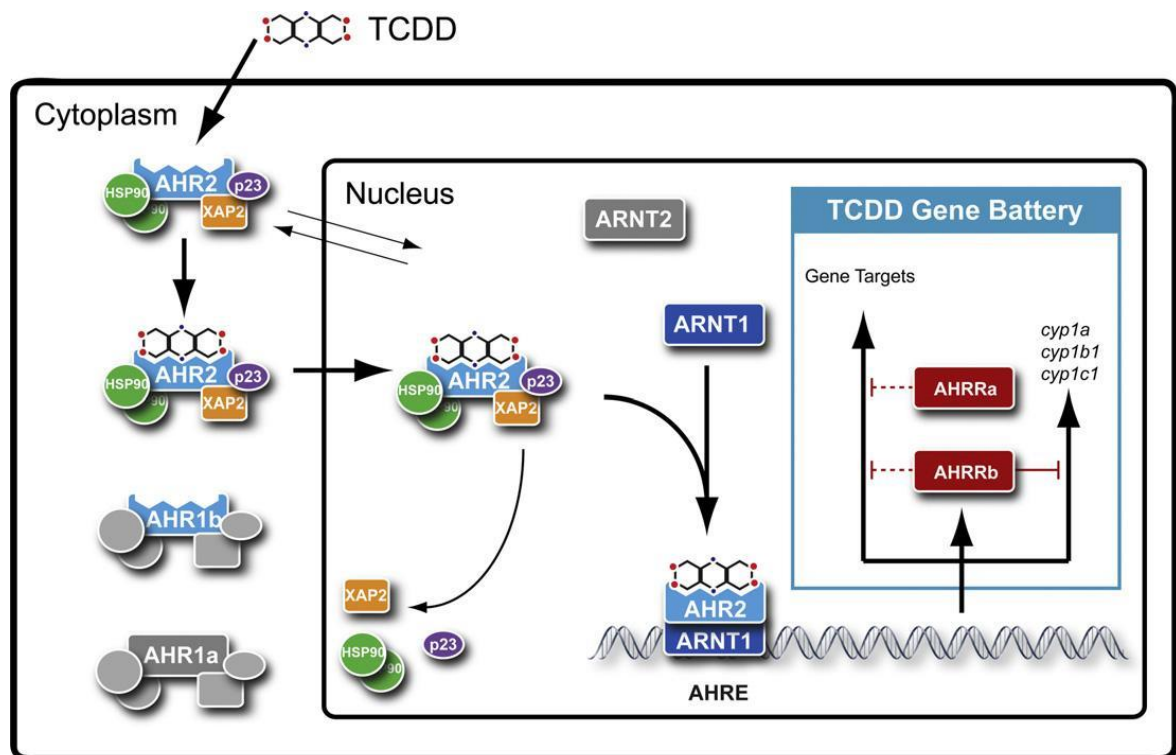
toimintoja (Hahn 2002). AHR:n kaikkia toimintoja ei kuitenkaan vielä täysin tunneta (Staskal ym. 2010).

Eliökunnasta löytyy vähintään viisi AH-reseptoria koodaavaa geeniä (Hahn ym. 2017). Nisäkkäillä on vain yksi *AHR*-geeni, mutta kaloilla niitä on useampi lajista riippuen (Hahn ym. 2005, Hahn ym. 2017). Luukaloilla esiintyy sekä *AHR1*- että *AHR2*-geenit, jotka ovat toistensa duplikaatiopari (Hahn ym. 2017). Näistä *AHR2* on vallitseva muoto luukaloilla ja sitä esiintyy kaikissa kudostyypeissä (Hahn 2002, Carvan ym. 2005). Kirjoloihen *AHR1*-sekvenssiä ei vielä tunneta (Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003, Hahn ym. 2005), mutta kirjolohella on kaksi ortologista *AHR2*-geeniä, *AHR2a* ja *AHR2β* (Abnet ym. 1999a, Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003). Näiden geenien aminohappokoostumus on 95 %:sti samanlainen ja niiden uskotaan vaikuttavan eri toksisuusvasteisiin (Abnet ym. 1999a).

2.5.1 AHR-aktivaatio ja -signaalireitti

AHR:n adaptiivinen, toksinen ja kehityssignaaliviestintä vaativat reseptorin aktivoitumisen ligandin avulla, AHR:n siirtymisen tumaan ja sen liittymisen ARNT:hen (AHR nuclear translocator; Fernandez-Salguero ym. 1996, Carney ym. 2006; Kuva 2). Ilman ligandia AHR on sytosolissa inaktiivisena ja siihen on kiinnittynyt shaperoniproteiineja: kaksi hs90-proteiinia (heat shock protein 90, HSP90) ja AHR-inhibiitioproteiineja (AIP, ARA9, P23 tai XAP9; Abnet ym. 1999b, Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003, Hahn ym. 2005, Hahn ja Hestermann 2008; Kuva 2). Kun ligandi aktivoi AHR:n, siihen liittyneet shaperoniproteiinit yhdistyvät kompleksiksi, mikä helpottaa sen kulkeutumista tumaan (Hahn ym. 2005). Tumassa hs90-proteiinit irtoavat ja jäljelle jäänyt kompleksi muodostaa heterodimeeriparin ARNT-proteiinin kanssa, jolloin syntyy transkriptionaalisesti aktiivinen AHR-ARNT-kompleksi (Powell ja Hahn 2000, Bols ym. 2005, Hahn ym. 2005, Hahn ja Hestermann 2008; Kuva 2). Tämän ligandi-AHR-ARNT-heterodimeerikompleksin AHR:n perusosa on vuorovaikutuksessa DNA-sekvenssin AHR-vaste-elementtien (AHR response elements, AHRE) kanssa (Hahn ja Hestermann 2008; Kuva 2). Tätä AHR-vaste-elementtiä kutsutaan myös

DRE:ksi (dioxin response element) tai XRE:ksi (xenobiotic response element; Mimura & Fujii-Kuriyama 2003, Bols ym. 2005, Hahn ja Hestermann 2008). Tämän heterodimeerikompleksin kiinnittyminen DNA-sekvenssin promoottoriosaan aiheuttaa proteiinien dimerisaation AHR:n HLH-osassa ja muutos kromatiinirakenteessa mahdollistaa toisen transkriptiotekijän (SP1) kiinnittymisen sekvenssin promottorialueelle (Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003, King-Heiden ym. 2011). Tämä indusoi kohdegeenien transkription ja niiden RNA-ekspression (Bols ym. 2005, Hahn ja Hestermann 2008; Kuva 2). AHR-signaali päättyy, kun AHR on siirretty pois tumasta ja ohjattu proteosomaaliseen hajotukseen (Hahn ym. 2005) (Kuva 2).



Kuva 2. Esimerkkinä AHR2-reseptorivälitteinen signaalireitti, joka käynnistyy TCDD-ligandilla (2,3,7,8-tetraklooridibentso-*p*-dioksiini) solulimassa. Tumassa shaperoniproteiinit irtoavat ja AHR-TCDD-kompleksiin kiinnittyy ARNT-proteiiniin. Tämä kompleksi käynnistää kohdegeenien transkription. (Kuva: King-Heiden ym. 2011)

AHR-repressori (aryl hydrocarbon repressor, AHRR) vähentää AHR:n toimintaa (Hahn 2002; Kuva 2). Vaikka sillä on paljon yhteneväisyyksiä AHR:n kanssa, eivät

ligandit pysty kiinnittymään AHR-repressoriin. Taasen ARNT voi kiinnittyä näihin molempiin, mutta AHRR-ARNT-dimeeri ei ole transkriptionaalisesti aktiivinen. AHR:n ja AHRR:n kilpailu ARNT:stä säätelee vähentävästi AHR:n toimintaa. (Hahn 2002)

2.5.2 AHR:n indusoimat geenit

AHR-signaalireitin käynnistäminen indusoi laajaa AHR-geenipatteria, ensimmäisen ja toisen metaboliavaiheen entsyymejä (Kuva 2), jotka metaboloivat monenlaisia orgaanisia yhdisteitä ja ovat elintärkeitä lipofiilisten yhdisteiden biotransformaatiassa (Xu ym. 2005, Billiard ym. 2006, Hodson ym. 2007, Timme-Laragy ym. 2007, King-Heiden ym. 2011). AHR säätelee CYP (sytokromi P450) perheen geenejä, jotka tuottavat katalysoivia entsyymejä kuten CYP1A1, CYP1A2, CYP1A3 ja CYP1B1 biologisiin hapetus- ja pelkistysreaktioihin ensimmäisessä metaboliavaiheessa (Hahn 2002, Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003, Xu ym. 2005, Billiard ym. 2006, Hodson ym. 2007, Schlenk ym. 2008, Celander 2011). *Cyp*-geenejä löytyy selkärankaisten, kasvien ja mikrobien kaikista kudoksista (Schlenk ym. 2008). Vaikka tiedetään, että AHR indusoi CYP1A:ta, sen vaikutus CYP1A:n aktiivisuuteen on vielä epäselvä (Billiard ym. 2006).

2.6 AHR-ligandeista ja niiden toksisuusvasteesta

AHR tunnistaa laajalti erilaisia kemiallisia rakenteita mukaan lukien ei-aromaattisia ja -halogenoituja yhdisteitä (Hahn 2002). Dioksiinin kaltaiset yhdisteet eli DLC-yhdisteet (dioxin like compound) ovat kemikaaleja, jotka toimivat ligandina AH-reseptorilla (Abnet ym. 1999a, Bols ym. 2005, Brown ym. 2014). Jotta yhdiste voidaan lukea dioksiinin kaltaiseksi, sillä täytyy olla samankaltainen kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet kuin TCDD:llä (2,3,7,8-tetraklooridibentso-*p*-dioksiini) ja sen tulee toimia saman mekanismin kautta tuottaen samanlaisen toksikologisten vasteiden sarjan kuin mitä TCDD aiheuttaa (Staskal ym. 2010). Myös PAH:it kuuluvat DLC-yhdisteiden ryhmään (Abnet ym. 1999b, Staskal ym. 2010). TCDD:tä käytetään malliyhdisteenä

AHR:lle kiinnittyvistä ligandeista, koska sillä on korkea AHR-affiniteetti ja useat lajit ovat sille herkkiä (Mimura ja Fujii-Kuriyama 2003, Carvan ym. 2005, Carney ym. 2006). Vaikka TCDD:tä on tutkittu jo viiden vuosikymmenen ajan, sitä miten TCDD aiheuttaa toksisuutta ei täysin tunneta (King-Heiden ym. 2011 ja 2012).

Lisäksi on myös olemassa luonnollisia AHR:lle sopivia ligandeja, joista voidaan sanoa, että ne ovat DLC-yhdisteiden kaltaisia, ja myös ne kilpailevat sitoutumisesta AHR:lle (Staskal ym. 2010). Tällaisia yhdisteitä ovat mm. indolin johdannaiset (heterosyklisiä yhdisteitä ristikkukkaisissa kasveissa), heterosykliset aromaattiset amiinit, hapettuneet aminohapot ja bilirubiini. Toisin kuin teollisesti tuotetut DLC-yhdisteet, jotka ovat kestäviä ja bioakkumuloituvat, näillä luonnollisilla AHR-ligandeilla on lyhyt puoliintumisaika (minuuteista tunneihin), koska niiden metabolia ja hajoitus biologisissa systeemeissä on nopeaa. (Staskal ym. 2010)

DLC-yhdisteiden yhteys ihmisten terveyteen on voitu osoittaa epidemiologisilla tutkimuksilla sekä teollisuusonnettomuuksien ja työntekijöiden kautta (Staskal ym. 2010). Kun TCDD-välitteinen mekanismi tunnetaan paremmin selkärangkaisilla mallilajeilla kuten seeprakaloilla (*Danio rerio*), se voi tarjota hyödyllistä tietoa TCDD- ja DLC-altistuksen vaikutuksista ihmisiin ja mm. oireiden tunnistamiseen (Carney ym. 2006). Useat evoluutiotutkimukset ovat osoittaneet, että nisäkkäiden ja kalojen AHR-signaalireitti on pysynyt samanlaisena (Carvan ym. 2005). Jotta dioksiinien toksikologiassa käytettyjä kalamalleja voidaan hyödyntää ihmisten terveyden kehittämiseen, täytyy AHR-signaalireitin yhteneväisyydet ja erot tuntea kalojen ja ihmisten välillä (Hahn 2001).

2.7 Kalanpoikasten varhaiskehitys on herkkä vaihe häiriöille

Useissa tutkimuksissa on todistettu, että kalojen poikaset ovat herkempiä toksiineille kuin aikuiset täysikasvuiset yksilöt (Mohammed 2013). Voidaan myös tarkentaa, että kalanpoikanen (larval) on herkempi kuin alkio (embryo) haitta-

aineiden toksisille vaikutuksille (Mohammed 2013), koska alkionmunan kuori suojaa alkioita suurimmilta haitta-ainepitoisuuksuilta (Brinkworth ym. 2003). Ero varhaisten kehitysasteiden ja aikuisten välillä johtuu useista tekijöistä mm. elion altistuspinta-alan suhteesta sen tilavuuteen (Mohammed 2013). Nuorilla yksilöillä on pienemmät rasvavarastot kuin aikuisilla eikä niillä sen takia ole kykyä varastoida lipofiilisiä yhdisteitä. Nuorilla yksilöillä on kasvusta johtuen nopeampi metabolia, joka lisää myös toksiinien sisäänottoa ympäristöstä verrattuna täysikasvuisiin yksilöihin. Nuoremmilla yksilöillä on myös kehittymättömät homeostaattiset mekanismit, entsyymitoiminta, immuunijärjestelmä ja sisäelimet (maksat ja munuaiset) toksiinien käsittelyyn, detoksifikaatioon ja eritykseen. Kehitysasteiden välillä on eroa myös käyttäytymisessä, morfologiassa, fysiologiassa ja biokemiallisissa toiminnoissa. (Mohammed 2013)

2.7.1 Kalan poikasten herkkyys PAH-yhdisteille

Kalanpoikasten PAH-herkkyys kriittisten kasvu- ja kehitysvaiheiden aikana johtuu planaarisien PAHien korkeasta bioakkumulaatiosta ja rajoittuneesta biotransformaatiosta (Barron ym. 2003). Kalojen altistuminen PAHeille käynnistää solujen haitta-ainemetabolian (AHR-induktion ja CYP1A-proteiinien tuotannon) ja niillä on subletaali vaikutus kalojen alkioihin ja poikasiin (Barron ym. 2003, Carvan ym. 2005, Xu ym. 2005, Billiard ym. 2006, Donnelly ja Naufal 2010). Jo varsin matalat PAH-pitoisuudet esim. 1–18 µg tPAH/l aiheuttavat kalan poikasille ja alkioille AHR-välitteistä toksisuutta ja vaikuttavat niiden kehitykseen (Carls ym. 2008, Donnelly ja Naufal 2010). Kalanpoikasilla voidaan nähdä samanlaisia toksisia oireita kuin muilla selkärangkaisilla (Billiard ym. 1999, Barron ym. 2003, King-Heiden ym. 2012).

2.7.2 Reteenin kehitystoksiset vasteet kalanpoikasilla

Reteeni on biogeeninen PAH-yhdiste (Achten ja Hofmann 2009, Stout ym. 2015) ja edustaa hyvin sellaista raakaöljytuotetta, joka aiheuttaa DLC-yhdisteiden kaltaisia

kehitystoksikologisia oireita kaloilla (Billiard ym. 1999, Vehniäinen ym. 2015). Reteeni säätelee useita geenejä ja se on heikko AHR-agonisti (Schlenk ym. 2008, Mu ym. 2014b, Vehniäinen ym. 2015). CYP1A-entsyymi metaboloii reteeniä, mistä syntyy uniikkeja reaktiivisia sivutuotteita kuten bentsyylialkoholeja, jotka voivat olla avainasemassa reteenin toksikologiassa ja haittavaikutuksien syntymiselle kaloissa (Hodson ym. 2007). AHR-aktivivaation kautta reteeni aiheuttaa seeprakalan, merimedakan (*Oryzias melastigma*) ja kirjolohen poikasille ruskuaispussitautin (blue sac disease, BSD) oireita niiden varhaiskehityksen aikana (Billiard ym. 1999, Mu ym. 2014b, Vehniäinen ym. 2015). Mun ym. (2014b) kokeen perusteella voidaan olettaa, että reteeni olisi jopa haitallisempaa merikaloille kuin makean veden kaloille. Kirjolohen poikasilla voidaan nähdä BSD-oireita jo seitsemässä päivässä (Vehniäinen ym. 2015). Reteeni vaikuttaa useampien signaalikaskadien kautta kirjolohenpoikasten sydämeen ja todennäköisesti häiritsee prosesseja, jotka vaikuttavat sydän- ja verisuonielimistön kehitykseen (Vehniäinen ym. 2015). Myös Mu ym. (2014b) toteavat omien merimedaka kokeidensa perusteella, että reteenin toksiset vaikutukset kohdistuvat erityisesti sydänkudokseen.

2.7.3 Fluoranteenin kehitystoksiset vasteet kalanpoikasilla

Fluoranteeni ei ole haitallinen yhdiste useille makean veden kaloille kuten kirjolohelle (Spehar ym. 1999). Verrattuna fluoresenssivaloon UV-valo lisää fluoranteenin haitallisuutta kaloille (Spehar ym. 1999). Kirjolohen 96 tunnin akuutissa altistuskokeessa on fluoranteenille saatu LC₅₀-arvoksi yli 91 µg FLU/l, kun testattiin tavallisessa valossa, ja UV-valokäsittelyssä LC₅₀-arvon laskee 7,7 µg FLU/l (Spehar ym. 1999; Fluoranthene 2011). Killikalan (*Fundulus heteroclitus*) alkiokokeessa fluoranteeni vähensi vähän CYP1A:n aktiivisuutta (Wassenberg ja Di Giulio 2004). Fluoranteeni estää tai vähentää CYP1A-entsyymin toimintaa ja lisää AHR-välitteistä toksisuutta seepakalan alkiolla (Brown ym. 2014). Taasen Matsonin ym. (2008) seeprakalojen poikaskokeessa 500 µg FLU/l -altistus ei

vaikuttanut poikasten EROD (etoksiresorufiini-O-de-etylaasi) -aktiivisuuteen DMSO-kontrolliin verrattuna.

2.8 Ruskuaispussitaudin oireet

PAHeille altistuneet hedelmöittyneet kalan alkioit muodostavat aikaisen kehitysvaiheen toksisuusoireita, jotka voidaan nähdä jo ennen kuoriutumista (Abnet ym. 1999b). Samanlaisia oireita voi kehittyä kuoriutuneille ruskuaispussivaiheen kalanpoikasille. Näitä varhaisen kehitysvaiheen toksisuusoireita ovat ruskuais- ja sydänpussin ödeema, ihonalaiset verenvuodot, häiriöt sydämen ja verenkierron toiminnassa ja kehityksessä, kallon, pään sekä selän epämuodostumat, heikentynyt kasvu, evien kuluminen, uintikyvyn heikkeneminen, hermosolujen kuoleminen, anemia, geenimutaatiot (somaattisissa ja sukusoluissa), kuolleisuuden aikaistuminen ja lisääntymiskyvyn heikkeneminen (Barron ym. 2003, Wassenberg ja Di Giulio 2004, Billiard ym. 2006, Hodson ym. 2007, Mu ym. 2014a). Useimmat näistä oireista kuvaavat BSD-syndrooman eli ruskuaispussitaudin oireita (Barron ym. 2003). BSD-syndroomassa on tunnusomaista nesteen kertyminen ruskuaispussin ympärille ulkokalvon alle ruskuaispussivaiheen poikasilla (Carney ym. 2006, King-Heiden ym. 2011). Tällaiseen ödeemaan voi tulla sinistä maitoista väriä, josta "blue sac disease" on saanut nimensä (King-Heiden ym. 2011). Ruskuaispussin ödeeman lisäksi muita BSD-syndrooman oireita ovat sydänpussin ödeema, ääreisverenkierron tukkeumat, verenvuodot, pään ja kallon epämuodostumat, heikentynyt kasvu sekä kuolleisuuden lisääntyminen poikasena ja ennen kuoriutumista (Brinkworth ym. 2003, King-Heiden ym. 2011).

Vaikka BSD-syndrooman toksisuusoireet ovat hyvin tunnettuja ja kuvattuja, niiden syntymekanismia ei vielä tunneta tarpeeksi hyvin (Scott ja Hodson 2008). Kuitenkin BSD-oireiden ilmestyminen tarkoittaa sitä, että CYP1A-entsyymit ovat indusoituneet (Mu ym. 2014a) ja PAHeilla on todistettu selvästi voimakas

positiivinen yhteys AHR:lle kiinnitymisen ja *cyp1a*-induktion välillä (Wassenberg ja Di Giulio 2004).

2.8.1 Reteenin ja fluoranteenin BSD-oirevasteet

Kun reteeni pitkittää *cyp1a*-geeniaktivaatiota, se lisää happiradikaalien syntymistä, mikä johtaa lipidikalvojen hajoamiseen ja aiheuttaa BSD-oireita kalanpoikasille (Billiard ym. 1999, Brinkworth ym. 2003). Yleisimmät BSD-oireet reteenialtistuksessa ovat verenvuodot, ruskuaispussin ödeema ja kuolleisuuden nousu (Brinkworth ym. 2003). Korkeasta reteenipitoisuudesta aiheutuva ödeema aiheuttaa lopulta häiriöitä solukalvoihin ja -rakenteisiin (Billiard ym. 1999). Billiardin ym. (1999) kalakokeissa 32 µg RET/l-vähimmäispitoisuus aiheutti seeprakalan kalanpoikasille pään ja kallon epämuodostumia ja kirjolohen poikasille kuoriutumisen jälkeen ruskuaispussin ödeemaa ja verenpurkauksia sekä evien kulumista. Kirjolohen poikasilla lisääntyi myös EROD-aktiivisuus, joka viittaa lisääntyneeseen *cyp1a*-induktioon (Billiard ym. 1999). Reteenialtistus heikensi kirjolohen poikasten kasvua ja lisäsi pään ja kallon epämuodostumia sekä kuolleisuutta (Billiard ym. 1999). Voidaan todeta, että reteeni aiheuttaa DLC-yhdisteiden kaltaisia kehitystoksisia oireita kaloille niiden varhaisessa kehitysvaiheessa (Billiard ym. 1999).

Pelkän fluoranteenin aiheuttamaa kehitystoksikologiaa on tutkittu varsin vähän. Koska fluoranteeni on CYP1A-inhibiittori, se ei indusoi AH-reseptoria eikä aiheuta samankaltaista toksikologisten vasteiden sarjaa kuten AHR-agonistit, mikä johtaa BSD-oireiden ilmenemiseen. Brownin ym. (2014) mukaan fluoranteenin vaikutusmekanismeja tulisi karakterisoida paremmin ja etenkin sen yhteisvaikutuksia muiden yhdisteiden kanssa. Matsonin ym. (2008) seeprakalan poikasten altistuskokeessa fluoranteeni (100 tai 500 µg FLU/l) ei aiheuttanut sydänpussin vuotamista normaaleissa happiolosuhteissa (20,8 % DO, dissolved oxygen, liuennut happi), mutta vähähappisissa oloissa (7,3 % DO) sydänpussin vuoto lisääntyi selvästi. Tällaisissa vähähappisissa olosuhteissa jo 100 µg FLU/l

aiheutti seeprakalan poikasille notkoselkäsyyttä ja oireet pahenivat sekä yleistyivät, kun altistuspitoisuus nousi 500 µg FLU/l.

2.9 PAH-seosten toksisuusvasteet

Vaikka yksittäisten PAHien haitallisuus ja toksiset vasteet saatetaan tuntea jopa varsin hyvin, niin ympäristössä PAHit esiintyvät moninaisina seoksina ja niiden toksisuusvasteita on vaikeampi ennustaa kuin mitä aiemmin on arveltu (Incardona ym. 2006, Matson ym. 2008). PAH-seosten koostumus voi vaihdella todella paljon riippuen sen päästölähteestä (Incardona ym. 2006). Lisäksi sitä miten muut haitta-aineet ja saasteet vaikuttavat PAHien metaboliareitteihin eri ympäristöolosuhteissa ei myöskään tunneta.

Useat tutkimustulokset osoittavat, että kalojen nykyiset PAH-toksisuusmallit ovat liian yksinkertaistettuja (Incardona ym. 2006). Tällä hetkellä käytössä olevat riskinarviointimenetelmät ja toksisuusvastemallit PAHeille olettavat, että PAH-yhdisteiden seokset lisäävät toksisia vaikutuksia additiivisesti (Conçalves ym. 2008, Staskal 2010, Brown ym. 2014). Nämä mallit perustuvat muutamaa nilviäisillä tehtyihin ekotoksikologisiin kokeisiin, joilla on mitattu kuolleisuutta, ja on vielä epäselvää, että pätevätkö nämä mallit kaloihin (Conçalves ym. 2008). Todellisuudessa PAH-seosten vaikutukset ovat enemmän synergistiä kuin additiivisia mm. alkio toksikologiassa (Brown ym. 2014).

2.9.1 AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin yhteisvaikutus kalanpoikasten toksisuusvasteisiin

AHR-agonistit voidaan jaotella heikkoihin ja vahvoihin AHR-agonisteihin sen mukaan kuinka voimakas niiden ligandiin kiinnittymisaffiniteetti on. Voidaan karkeasti yleistää, että raskaat PAHit ovat vahvempia AHR-agonisteja kuin kevyemmät PAHit (Incardona ym. 2006). AHR-agonistin vastakohta on AHR-antagonisti eli yhdiste, joka sopii ligandille tarkoitettuun paikkaan, mutta ei aktivoi AHR-reseptoria eikä käynnistä sen induktiota. Taasen CYP1A-inhibiittori inhiboi tai estää CYP1A-entsyymin toimintaa (Billiard ym. 2006, Matson ym.

2008). CYP1A:n inhibitio tai syrjäytys hidastaa AHR-agonistien metaboliaa ja nostaa emoyhdisteiden puoliintumisaikaa (Matson ym. 2008).

Kun kaloja on altistettu AHR-agonistille ja CYP1A-inhibiittorille kehitystoksikologisissa kokeissa, on PAHien toksisuus lisääntynyt ja niiden yhteisvaikutus on aiheuttanut synergistisiä vasteita (Billiard ym. 2006, Matson ym. 2008). Tällaisessa yhteisaltistuksessa on CYP1A:n l-RNA:n määrä ollut korkeampi kuin pelkästään AHR-agonistille tai CYP1A-inhibiittorille altistettaessa (Matson ym. 2008). AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin yhteisaltistus on aiheuttanut additiivista suurempia toksisuusvasteita seepra- ja killikalakokeissa, mikä todistaa, ettei käytössä olevat toksisuusmallit päde PAH-seoksille (Wassenberg ja Di Giulio 2004, Vandenbrouck ym. 2010). Celanderin (2011) mukaan CYP1A-inhibiittoreita sisältävien PAH-seosten riski vesiympäristössä yleensä aliarvioidaan.

Sitä kuinka CYP1A-inhibiittorin aiheuttama alkiotoksisuus tapahtuu yhdessä AHR-agonistina toimivan PAH-yhdisteen kanssa, ei tunneta (Wassenberg ja Di Giulio 2004). Matson ym. (2008) ovat selittäneet AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin aiheuttamaa synergististä yhteisvaikutusta kahdella eri tavalla:

1. CYP1A-inhibiittori pitkittää AHR-agonistin toimintaa AH-reseptorilla, mikä lisää l-RNA:n määrää, mutta vähentää CYP1A-entsyymin toimintaa. CYP1A-entsyymin toiminnan estäminen, lisää CYP1A:n l-RNA:n tuotantoa, mutta AHR-agonisti jatkaa altistusta kehitystoksisille oireille, koska AHR-agonistia ei metaboloida CYP1A-inhibition takia (Matson ym. 2008). Tämän myötä alkuperäisten haitta-aineiden puoliintumisaika kasvaa (Matson ym. 2008).
2. CYP1A-inhibiittorit muuttavat PAHien metabolointia niin, että niistä syntyy toksisempia metaboliitteja tai välituotteita kuin normaalilta metaboliareitiltä. Tämä todennäköisesti johtuu siitä, että kun CYP1A-

aktiivisuus vähenee, siirtyy PAH-yhdisteen metabolia muille entsyymeille, jotka eivät ole niin tehokkaita kuin CYP1A (Matson ym. 2008).

Tutkimuksissa on saatu tuloksia, jotka puoltavat joko ensimmäistä tai toista edellä esitetyistä teorioista. Matson ym. (2008) tutkimus tukee ensimmäistä teoriaa, jonka mukaan CYP1A-aktiivisuuden väheneminen hidastaa ensimmäisen vaiheen metaboliaa. Myös Hodsonin ym. (2007) kokeessa korkea ANF-pitoisuus (alpha-naphthoflavone, CYP1A-inhibiittori), vähensi reteenin (AHR-agonistin) metaboliaa ja eritystä kirjolohella. Taasen pieninä tai keskisuurina pitoisuuksina ANF muutti reteenin metaboliaa (Hodson ym. 2007), mikä tukee toista esitetyistä teorioista. Tätä toista teoriaa tukee myös Matsonin ym. (2008) koe, jossa BaP:n (benzo[a]pyrene, heikko AHR-agonisti) ja fluoranteenin (CYP1A-inhibiittorin) synergistisiä vaikutuksia selitetään CYP1A-aktiivisuuden vähenemisellä, jolloin BaP:n metabolia siirtyy muille entsyymeille, jotka ovat vähemmän tehokkaita kuin CYP1A ja tuottavat todennäköisemmin toksisia metaboliitteja. Myös Wassenberg ja Di Giulio (2004) arvelevat, että CYP1A-inhibitio muuttaa PAHien metaboliaa ja tuottaa emoyhdisteitä toksisempia välituotteita.

Tulokset synergistisistä, additiivisista ja jopa antagonistisista haittavaikutuksista kalojen varhaisessa kehitysvaiheessa ovat osittain ristiriitaisia keskenään (Billiard ym. 2006). Voi myös olla niin, että CYP1A:n inhibitio tai proteiinin syrjäytys vähentää synergistisiä vaikutuksia tai ei aiheuta niitä ollenkaan (Billiard ym. 2006). Seeparakalamallitutkimukset osoittavat, että PAH-toksisuus tapahtuu AHR2-reseptorin kautta vähentäen CYP1A-aktiivisuutta (Timme-Laragy ym. 2007). Billiard ym. (2006) toteavat seeparakalojen alkiokeiden pohjalta, että AHR2:n syrjäytys (knockdown) vähensi selvästi toksisuutta, kun alkioita altistettiin saman aikaisesti AHR-agonistille (BNF, β -naphthoflavone) ja CYP1A-inhibiittorille (ANF).

Vaikuttaa siltä, että PAH-altistuksen lopputulos riippuu siitä, mitkä yhdisteet ovat kyseessä. Yhdisteiden vuorovaikutukset AHR:llä ja CYP1A:n toimintaan

vaihtelevat. Timme-Laragyn ym. (2007) kokeessa todennettiin, että ANF on heikko AHR-agonisti, kun se toimii yhdessä AHR-agonistin (BNF) kanssa. Kun taas edellä kerrottiin, että korkeana pitoisuutena ANF toimi CYP1A-inhibiittorina, kun sitä altistettiin yhdessä reteenin kanssa, joka on myös AHR-agonisti (Hodson ym. 2007). Timme-Laragy ym. (2007) seeprakalojen alkiokokeessa kokeessa olevat BNF (AHR-agonisti) ja ANF (heikko AHR-agonisti) kilpailivat paikasta AHR-reseptorissa ja lisäsivät *cyp1a*-geenin l-RNA määrää ennustettua enemmän.

2.9.2 AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin mahdolliset vaikutukset toksisuusvasteisiin

Kalanpoikasten altistaminen reteenille (AHR-agonistille) ja CYP1A-inhibiittorille pitäisi vähentää reteenin metaboliittien muodostumista ja vähentää toksisuutta, jos metaboliitit ovat toksisia (Hawkins ym. 2002). Jos emoyhdisteet ovat toksisia, silloin toksisuus lisääntyy (Hawkins ym. 2002). Fluoranteenin CYP1A-inhibitio voi joko vähentää reteenistä syntyvien välituotteiden haitallisuutta, kun emoyhdisteitä on suhteessa enemmän ja CYP1A-metabolia estyy tai se lisää molempien yhdisteiden toksisia vaikutuksia, koska niiden metabolia estyy tai heikentyy. Myös neutraalit tai toksisuutta pienentävät vaikutukset ovat mahdollisia, mutta epätodennäköisempiä, reteenin (AHR-agonistin) ja fluoranteenin (CYP1A-inhibiittorin) yhteisaltistuksessa.

3 AINEISTOT JA MENETELMÄT

Aineisto kerättiin yhdeksän päivää kestäneestä altistuskokeesta, jossa käytettiin koe-eläiminä vasta kuoriutuneita kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasia. Tutkimuksia varten ei tarvittu koe-eläinlupaa, koska kalanpoikaset elivät kokeen ajan ruskuaispussin varassa. Poikasia altistettiin kolmelle eri pitoisuudelle reteeniä (3,2; 10 ja 32 µg/l) ja fluoranteenia (5, 50 ja 500 µg/l) ja näiden molempien aineiden seoksille. Tutkittavia vasteita olivat *cyp1a1*-geenin l-RNA:n määrä,

ruskuaispussitautin oireiden ilmeneminen ja vakavuus sekä poikasten pituus ja ruskuaispussin pinta-ala, jotka arvioitiin ja mitattiin poikasista otetuista valokuvista kokeen päätteeksi.

3.1 Koejärjestelyt

Kirjolohen poikasille tehtiin Early Life Stage (ELS) eli varhaisen kehitysvaiheen altistuskoe, joka kesti yhdeksän päivää. Koejärjestelyissä huomioitiin OECD guideline for testing of chemicals (1992) ohjeen suosittelemat periaatteet. Kokeen aikana poikaset elivät ruskuaispussin varassa eli niitä ei ruokittu. Koe aloitettiin Jyväskylän yliopiston Ympäristötiedeen osaston kylmähuoneessa tiistaina 9.2.16 ja päätettiin perjantaina 19.2.16. Kylmähuoneen lämpötila pyrittiin pitämään noin 11–12 °C -asteen välillä. Kirjolohen poikaset saatiin hankasalmelaiselta kalalaitokselta, Hanka-Taimen Oy:lta, ja niistä ensimmäiset kuoriutuivat noin pari tuntia ennen altistuskokeen aloitusta. Kaikki koeryhmät perustettiin kolmen tunnin sisällä ensimmäisen ryhmän altistuksen aloituksesta ja poikaset olivat korkeintaan viiden tunnin ikäisiä kokeen alkaessa.

3.1.1 Reteenin ja fluoranteenin altistuspitoisuudet

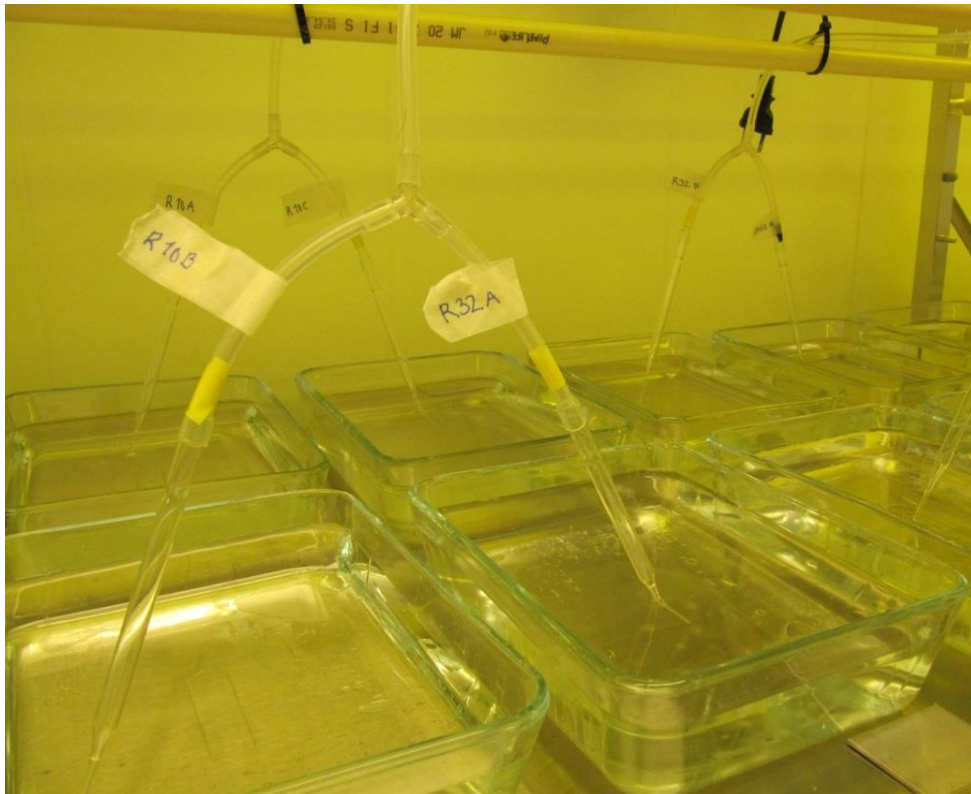
Kokeessa käytettiin altistusvetenä suodatettua (1 µm) Konnevesi-järven järvivettä. Käsittelyjä oli yhteensä 17 mukaan lukien kontrollikäsittely pelkällä järvivedellä ja DMSO-liuotinkontrolli (110 µl DMSO/l = 0,01 % DMSO), koska reteenin ja fluoranteenin kantaliuokset oli liuotettu DMSO:hon. Näistä molemmista haitta-aineista oli kolme eri pitoisuutta ja niiden eri pitoisuuksien RET-FLU-yhdistelmät. Jokaisesta altistuksesta tai käsittelystä oli kolme toistoa paitsi järvivesi-kontrollista neljä. Yhdessä altisastiassa oli kymmenen kirjolohen poikasta yhdessä litrassa järvivettä.

Reteenin pitoisuudet kokeessa olivat 3,2; 10 ja 32 µg RET/l. Korkein reteenipitoisuus (32 µg RET/l) päätettiin Vehniäisen ym. (2015) reteenikokeen perustella, jossa kirjolohen poikasille muodostui seitsemässä päivässä kolme

kertaa suurempi BSD-indeksi kuin kontrolliryhmän poikasille. Koska jo matala reteenipitoisuus (32 µg RET/l) aiheuttaa vahvasti BSD-oireita, valittiin muut pitoisuudet tätä pienemmiksi, jolloin voidaan tutkia miten fluoranteeni vaikuttaa BSD-oireiden kehittymiseen ja *cyp1a1*-geenin l-RNA-määrään matalissa reteenipitoisuuksissa. Fluoranteenin pitoisuudet kokeessa olivat 5, 50 ja 500 µg FLU/l. Fluoranteenin altistuspitoisuudet valittiin kirjallisuusselvityksen perusteella. Matsonin ym. (2008) seeprakalan poikasten altistuskokeessa 500 µg FLU/l vähensi CYP1A-aktiivisuutta, kun poikasia altistettiin samanaikaisesti myös AHR-agonistille (10 µg BaP/l tai 1 µg BNF/l). Yhteisaltistus lisäsi myös seeprakalan poikasten kehityshäiriöitä (Matson ym. 2008). Myös Wassenbergin ja Di Giulion (2004) killikalan alkiokokeessa 1000 µg FLU/l -altistus laski EROD-aktiivisuutta verrattuna kontrolliin, mutta se ei vaikuttanut BSD-oireiden vakavuusindeksiin. Kun alkiota altistettiin fluoranteenin lisäksi myös AHR-agonistille (1 µg BNF/l), vakavuusindeksi alkoi kohota, kun fluoranteenin pitoisuus oli 50 µg FLU/l (Wassenberg ja Di Giulio 2004). Jayasundaran ym. (2015) seeprakalan alkiokokeessa 500 µg FLU/l ei yksinään vaikuttanut alkioiden sydämien kehitykseen, mutta yhteisvaikutuksessa BaP:n kanssa sydänpussin koko kasvoi ja sydämen lyöntitiheys nousi. Näiden tutkimusten perusteella valittiin tähän kokeeseen korkeimmaksi fluoranteenipitoisuudeksi 500 µg FLU/l. Matson ym. (2008) arvioivat, että vaikka 100–500 µg FLU/l on suhteellisen korkea pitoisuus, se on kuitenkin relevantti pitoisuus saastuneessa ympäristössä. Matalammiksi pitoisuuksiksi valittiin maksimipitoisuutta (500 µg FLU/l) kymmenes- ja sadasosan pienemmät pitoisuudet 50 µg FLU/l ja 5 µg FLU/l. Koska vesistöissä voi olla PAHeja korkeampien pistepäästöjen lisäksi myös matalina pitoisuuksina, on tärkeää tuntea myös niiden vaikutus kalanpoikasten varhaiskehitykseen. Yksittäisten reteeni- ja fluoranteenialtistusten lisäksi tutkittiin näiden molempien aineiden eri pitoisuuksien yhdistelmät: Ret_{3,2}+Flu₅; Ret_{3,2}+Flu₅₀; Ret_{3,2}+Flu₅₀₀; Ret₁₀+Flu₅; Ret₁₀+Flu₅₀; Ret₁₀+Flu₅₀₀; Ret₃₂+Flu₅; Ret₃₂+Flu₅₀ ja Ret₃₂+Flu₅₀₀, joissa Ret on lyhenne reteenistä, Flu fluoranteenista ja numero kuvaa aineen pitoisuutta (µg/l).

3.2 Koevalmistelut, kokeen aloitus ja vesien vaihto kokeen aikana

Kokeessa käytetty kylmähuone valmisteltiin koetta varten jo kokeen aloituspäivää edeltävänä päivänä niin, että koeastioihin (lasiin n. 2 litran pyrex-vuokiin) oli rakennettu valmiiksi ilmastukset ja niiden toimivuus oli testattu (Kuva 3). Koeastioiden ilmastuksessa käytettiin ilmastuspumppua, jonka yhdestä ilmanulostuonnista haarautui ilmaletkut neljään eri koeastiaan. Näin jokaisessa koeastiassa oli oma ilmastus ja veteen tuleva osa oli puhdas lasinen pasteur-pipetti (Kuva 3). Järvivettä säilytettiin samassa viileässä altishuoneessa isoissa kannellisissa saaveissa ja myös niissä oli ilmastus. Järviveden pH mitattiin (Mettler Toledo PHM220 Lab pH Meter Meterlab) kolme kertaa ja sähkönjohtokyky (Hanna instruments HI9635) kaksi kertaa eri vesieristä.



Kuva 3. Altistusastioina käytetyt lasivuokat ja niihin haarautuvat ilmastusletkut, joiden päässä on lasinen Pasteur-pipetti.

Koeastioihin mitattiin 1 l järvivettä (2x 500 ± 5 ml muovisella mittalasilla) ja pipetoitiin DMSO, reteeni- ja fluoranteeniliuokset suunniteltujen altistuspitoisuuksien mukaan (Taulukko 2, Taulukko 3, Liite 1). DMSO-liuotinkontrollivuokiin pipetoitiin 110 µl DMSO:ta. Pelkkiin RET- tai FLU-altistusastioihin pipetoitiin kunkin kantaliuoksen lisäksi myös DMSO:ta Taulukoiden 2 ja 3 mukaan, mutta RET-FLU-yhdistelmäaltistusastioihin ei lisätty erikseen DMSO:ta. Laboratoriomestari Mervi Koistinen oli valmistanut reteenin ja fluoranteenin kantaliuokset DMSO:hon (Taulukko 2 ja 3). Kun koeastioihin valmistettiin altistusvedet jo edellisenä päivänä, niiden pinnat pystyivät kyllästymään altistusaineilla ennen varsinaisen altistuskokeen aloitusta, jolloin todennäköisyys altistuspitoisuuden laskulle ensimmäisenä koepäivänä pienenee.

Taulukko 2. Reteenin kantaliuosten ja DMSO:n pipetointimäärät altistusastioihin

Altistus- pitoisuus, µg RET/l	Kanta- liuos, mg/ml	Kantaliuoksen pipetointimäärä, µl	DMSO:n pipetointimäärä, µl
3,2	0,32	10	100
10	1	10	100
3	3,2	10	100

Taulukko 3. Fluoranteenin kantaliuosten ja DMSO:n pipetointimäärät altistusastioihin

Altistus- pitoisuus, µg FLU/l	Kanta- liuos, mg/ml	Kantaliuoksen pipetointimäärä, µl	DMSO:n pipetointimäärä, µl
5	0,05	100	10
50	0,5	100	10
500	5	100	10

3.2.1 Kokeen aloitus

Koe aloitettiin 9.2.2016. Edellisenä päivänä tehty altistusvesi kaadettiin koeastioista lattiaviemäriin, mitattiin 1 l uutta ilmastettua järvivettä ja pipetoitiin uudet aineet koeastioihin kuten edellisenä päivänä. 10 kirjolohen poikasta

poimittiin 50 ml muoviseen sentrifugiputkeen isosuisella pumpettipipetillä, jonka suu oli leikattu saksilla suuremmaksi. Poikasten kunto tarkistettiin silmämääräisesti ennen koeastioihin siirtoa. 50 ml sentrifugiputken mukana siirtyi noin 5 ml järvivettä poikasten mukana. Lopussa ilmastusten toimivuus tarkistettiin ja poikaset laskettiin (10 kpl/altistusastia). Altistushuoneessa oli säädetty päivittäiseksi valorytmiksi 16 tuntia (keltaista) valoa ja kahdeksan tuntia pimeää.

3.2.2 Kokeen ylläpito ja seuranta

Jokaisena koepäivänä 4–6 kontrolli- ja DMSO-käsittelyistä (Liite 1) mitattiin lämpötilat ennen vesien vaihtoa. Kahtena ensimmäisenä päivänä käytettiin lämpömittaria, jonka tarkkuus oli 0,5 °C ja kokeen myöhemminä päivinä 0,1 °C-asteen tarkkuista lämpömittaria. Koeastioiden päivittäisten keskilämpötilojen avulla voitiin laskea lämpösumma (degree days, DD) koeajalle laskemalla yhteen kunkin päivän keskimääräinen lämpötila koeastioissa (Le Bihanic ym. 2014). Koska koeastioiden hapetukset toimivat moitteettomasti koko kokeen ajan, mitattiin varmuuden vuoksi happipitoisuus (VWR DO200) vain kaksi kertaa kontrollikäsittelyistä.

Ennen altistusvesien vaihtoa kunkin käsittelyn (altistuspitoisuuden) koeastiasta otettiin yhdistetty vesinäyte reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien analysointia varten. Kustakin kolmesta rinnakkaisesta altistusastiasta otettiin 1 ml vesinäytettä ja pipetoitiin tuikepulloon, jossa 3 ml etanolia (EtOH; ETAX Aa, min. 99,5 paino-%). Koska kontrollivuokkia oli neljä, pipetoitiin 4 ml:n yhteisnäyte 4 ml:aan etanolia. Etanoliin (1:1) säilytyt vesinäytteet säilytettiin jääkaapissa. Näiden altistusvuorokauden lopulla otettujen näytteiden lisäksi otettiin yhtenä päivänä vesinäytteet myös heti vesien vaihdon jälkeen reteenin ja fluoranteenin lähtöpitoisuuksien määrittämiseksi.

Kokeen aikana koeastioihin vaihdettiin altistusvedet kerran päivässä. Vesien vaihdon ajaksi poikaset pyydystettiin isoilla muovisilla pumpettipipeteillä 50 ml

muovisiin sentrifugiputkiin. Koeastiasta kaadettiin vanha vesi pois lattiaviemäriin ja mitattiin 1 l uutta ilmastettua järvivettä tilalle. Reteeni, fluoranteeni ja DMSO pipetoitiin veteen, kuten jo aiemmin kuvattiin, ja samoja pipetointimääriä (Taulukko 2 ja 3) ja käytänteitä noudatettiin koko kokeen ajan. Kun yhdisteet oli sekoitettu uuteen veteen, kaadettiin poikaset takaisin altistusastiaan. Poikaset joutuivat olemaan 50 ml muovisessa sentrifugiputkessa vain muutaman minuutin ajan ja niiden siirrossa siirtyi 5 ml vanhaa altistusvettä.

3.3 Kokeen päättäminen

Koe päätettiin 19.2.2016 yhdeksän altistuspäivän jälkeen. Poikaset poimittiin isosuisella pumpettipipetillä nukutusliuokseen (100 mg MS-222/l) ja annettiin olla siellä muutaman minuutin ajan, kunnes ne olivat riittävän rauhallisia kuvausta varten. Poikaset aseteltiin petrimaljalle, jonka pohjalla oli silikoonialusta (Iloleipuri, silikooninen leivonta-alusta), johon oli leikattu veitsellä sopivat kolot poikasten asettelua varten. Kuvauksessa käytettiin mikroskooppiin (Olympus GWB) asetettavaa järjestelmäkameraa (Nikon D60 digikamera). Mikroskoopin ja kameran asetukset pidettiin kuvausten ajan samana. Mikroskoopin zoom oli asennossa kaksi ja siinä käytettiin 20x -linssiä. Poikaset kuvattiin tietyssä järjestyksessä, jolloin tietyn kuvan poikanen ja siitä havaitut BSD-oireet oli mahdollista yhdistää analysoituun l-RNA:n määrään. Kuvauksen jälkeen jokainen poikanen laitettiin omaan 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen, jonka kanteen oli tehty neulalla pari reikää. Poikaset jäädytettiin nopeasti nestetyössä ja ne säilytettiin -80 °C pakkasessa analysointia varten.

3.4 Ruskuaispussitaudin oireiden arviointi ja BSD-%:n laskenta

Ruskuaispussitaudin oireet arvioitiin jokaisen poikasen valokuvasta niin, että ne pisteytettiin joko oireen ilmenemisen mukaan tai oireen vakavuuden mukaan, mutta kuitenkin aina niin, että nolla-arvo tarkoitti sitä, että oiretta ei havaittu.

Esimerkkikuvat poikasissa esiintyneistä BSD-oireista ja niiden pisteyksestä löytyvät Liitteestä 2. Ruskuaispussitaudin oireet pisteytettiin seuraavasti:

- ruskuaispussin ödeema (0–3): 0 = ruskuaispussin ödeemaa ei havaittu (ei nestekertymää ruskuaispussin ympärillä eikä ruskuaispussi näyttänyt turvonneelta), 1 = pieni nestekertymä ruskuaispussin takaosassa ja hieman turvonnut ruskuaispussi, 2 = selvästi turvonnut ruskuaispussi ja nestettä kertynyt koko ruskuaispussin ympärille ja 3 = vakava ruskuaispussin ödeema ja suuri nestekertymä sen ympärillä
- sydänpussin ödeema (0–2): 0 = sydänpussin ödeemaa ei havaittu, 1 = sydänpussissa on havaittavissa nestekertymää tai turvotusta ja 2 = nestettä on selvästi kertynyt sydänpussiin ja ödeema on levinnyt ruskuaispussia vasten
- verenpurkaumat (0–1): 0 = verenpurkauksia ei havaittu tai 1 = selviä veren pistepurkauksia havaittiin tai kiduskansien seudulle on selvästi kertynyt verta ja alue on turvonnut
- kallon ja leuan epämuodostumat (0–2): 0 = kallon ja leuan epämuodostumia ei havaittu, 1 = havaittiin muutoksia kallon tai leuan rakenteessa esim. lyhentynyt alaleuka ja 2 = poikasen pään alueella havaittiin vakavia epämuodostumia tai muutoksia rakenteissa (yleensä poikasen suu selvästi ”ammollaan” auki)
- evien kuluminen (0–1): 0 = evien kulumista ei havaittu ja 1 = evät ovat selvästi kuluneet (rasva-, selkä- tai pyrstöevä on kutistunut ja ruodotus heikentynyt) ja
- selkärangan epämuodostuma (0–1): 0 = selässä ei havaittu epämuodostumia tai kaartumista ja 1 = selvä selän epämuodostuma tai kaartuminen havaittiin.

Ruskuaispussioireiden yhteenlaskettu pistemäärä (BSD-pisteet), joka oli enimmillään 10, kuvaa poikasen oireiden vakavuutta ja sen avulla voidaan laskea BSD-indeksi. Kuolleiden poikasten oireita ei arvioitu, vaan BSD-pisteiksi annettiin

suoraan 10,5 pistettä, joka on oireiden maksimipistemäärä (10) lisättynä 0,5 pistettä, kuten Scott ja Hodson (2008) ovat pisteyttäneet. Scottin ja Hodsonin (2008) käyttämän menetelmän pohjalta voitiin yhdelle poikaselle laskea BSD-indeksi havaittujen oireiden perusteella niin, että oireista saadut pisteet laskettiin yhteen ja jaettiin maksimipistemäärällä (10,5), joka on kuolleelle poikaselle annettu suurin mahdollinen pistemäärä. Jokaiselle koeastialle voitiin laskea BSD-indeksi poikasten BSD-indeksien keskiarvosta ja BSD-% kertomalla BSD-indeksin keskiarvo 100 %:lla. Lopullisessa tarkastelussa laskettiin kullekin käsittelylle BSD-%:n keskiarvo ja keskihajonta koeastiakohtaisista keskiarvoista.

3.5 Poikasten pituuksien ja ruskuaispussipinta-alojen mittaaminen kuvista

Poikasten pituuksien ja ruskuaispussipinta-alojen mittaamisessa käytettiin ImageJ (1.45s) -piirto-ohjelmaa. Kuvista puuttui mittaskaala, mutta koska poikaset kuvattiin samoilla mikroskooppi- ja kamera-asetuksilla, voitiin poikasten pituudet ja pinta-alat mitata kuvapikseleinä. Poikasen pituus (pikseliä) mitattiin straight-työkalulla, jolla piirrettiin suora jana poikasen nenän päästä pyrstön päähän (ilman pyrstöevää, Liite 2). Ruskuaispussin pinta-ala (pikseliä) mitattiin polygon-työkalulla (Liite 2).

3.6 *Cyp1a1*-geenin lähetti-RNA-määrän analysointi poikasista

Jokaisesta koeastiasta analysoitiin kolmesta poikasesta *cyp1a1*-geenin tuottama l-RNA-määrä. Analysoitavat poikaset arvottiin täysin satunnaisesti random.org-ohjelman avulla. Siinä arvottavien numeroiden väliksi valittiin 1–10, jolloin ohjelma arpoo, joka kerta minkä tahansa numeron tältä väliltä. Analysoimatta jääneet poikaset jätettiin säilytykseen - 80 °C pakkaseen.

3.6.1 RNA:n eristys TRI REAGENT®:lla

Poikasista eristettiin RNA TRI REAGENT®-reagenssilla (Ohje 2014), jota säilytettiin jääkaapissa. Poikaset otettiin - 80 °C pakkasesta ja niitä säilytettiin jäällä, jos ei toisin ole mainittu. Jokaista näytettä varten merkittiin kaksi uutta 1,5

ml mikrosentrifugiputkea (RNAasittomia), joista toiseen tuli RNA-eristyksessä syntyneet faasit ja toiseen näytteestä eroteltu RNA.

RNA:n eritys aloitettiin lisäämällä poikasnäyteputkeen 1 ml TRI REAGENT®-reagenssia ja poikanen homogenoitiin jäällä mikrosentrifugiputkeen sopivalla hienonnussauvalla, mikä kesti noin 2–5 min/näyte. Jokaiselle näytteelle käytettiin omaa puhdasta homogenointisauvaa. Kun kaikki kerralla käsiteltävät näytteet oli homogenoitu, nostettiin ne pois jäältä näyteputkelineelle ja siirrettiin jokaisesta putkesta 1 ml homogenoitua näytettä puhtaisiin 1,5 ml RNAasittomiin mikrosentrifugiputkiin ja annettiin odottaa 5 min huoneenlämmössä. Odotuksen jälkeen niihin lisättiin 200 µl kloroformia (Chloroform for analysis, EMSURE®, Merck KGaA Germany), kannet suljettiin ja sekoitettiin voimakkaasti käsin 15 sekunnin ajan. Kloroformin sekoituksen jälkeen näytteiden annettiin odottaa huoneenlämmössä vähintään 2–15 min ja sen jälkeen ne sentrifugoitiin (VWR by Hitachi Koki Co., Ltd., CT 15 RE himac). Samaa sentrifugilaitetta käytettiin tämän protokollan kaikissa vaiheissa. Sentrifugointi kesti 15 min (nopeus 12 000 g, 4 °C), jonka aikana näyte erottui kolmeen faasiin, joista ylimmässä kirkkaassa faasissa oli näytteestä eristettyä RNA:ta. Näytteestä pipetoitiin 500 µl ylintä kirkasta faasia uuteen RNAasittomaan 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen ja siihen lisättiin 500 µl 2-propanolia (2-Propanol for analysis, EMSURE®, Merck KGaA Germany) ja putkia sekoitettiin rauhallisesti käännellen 21 kertaa. Tämän seoksen annettiin odottaa huoneenlämmössä 5–10 min ajan, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (12 000 g, 8 min, 4 °C). Tämän sentrifugoinnin aikana RNA pelletöityi mikrosentrifugiputken pohjalle vaaleaksi tai valkoiseksi kiinteäksi sakaksi. Nesteseos (n. 1 ml) poistettiin mikrosentrifugiputkesta ja RNA-pelletti jätettiin putken pohjalle. RNA-pelletin päälle pipetoitiin 1 ml 75 % etanolia. Etanoliliuos valmistettiin joka kerta ETAX Aa -etanolistä ja steriilistä vedestä. Yleensä protokolla keskeytettiin tässä vaiheessa ja ylimääräiset näytefaasi- ja RNA-etanoli-näytteet säilytettiin - 20 °C pakkasessa seuraavaa vaihetta varten.

3.6.2 RNA-pelletin pesu etanolilla

Kun RNA-eristysprotokollaa jatkettiin, 75 % etanolissa säilötyn (- 20 °C) näytteen RNA-pelletti sentrifugoitiin (7 500 g, 5 min, 4 °C), jonka jälkeen etanoli pipetoitiin pois putkesta ja tilalle pipetoitiin uudestaan 1 ml 75 % etanolia ja sekoitettiin vortexilla. On mahdollista, että epähuomiossa osassa näytteitä käytettiin etanolipesussa steriilin veden sijasta PBS-puskuria. Tämän toisen etanolipesun jälkeen näyte sai odottaa huoneenlämmössä vähintään 20 min ja se sentrifugoitiin uudelleen (7 500 g, 5 min ja 4 °C). Sentrifugoinnin jälkeen etanoli pipetoitiin mahdollisimman hyvin pois putkesta. Jos etanolilaimennos oli tehty PBS-puskuriin, sen koostumus oli limaisempi ja paljon hankalampi pipetoida pois putkesta. Etanolin poiston jälkeen sentrifugiputkien annettiin olla huoneenlämmössä korkki auki kuivumassa niin kauan, kunnes pohjalla ollut valkoinen RNA-pelletti oli muuttunut kirkkaaksi tai lähes läpinäkyväksi. Tämä kesti muutaman minuutin riippuen pelletin paksuudesta. RNA-pelletin kuivauksen jälkeen näytteeseen lisättiin 200 µl nukleasitonta vettä (Thermo Scientific molecular biology, Made in EU Lithuania, Water, nuclease free tai BIO-RAD Nuclease-free H₂O, Made in United States). Näitä samoja nukleasittomia vesiä käytettiin myös muissa myöhemmissä analyyseissä. Nukleasitonta vettä pumppailtiin automaattipipetillä näyteputkessa niin kauan, kunnes näyte alkoi vaahdota, mistä tiesi, että RNA on liennut veteen. Nukleasittomaan veteen liuotettu RNA kuumennettiin lämpöblokkissa (Grant Block heater QBD Scientific) 60 °C -asteessa 3 minuutin ajan. Kuumennuksen jälkeen näytteet nostettiin nopeasti jäälle ja jatkossa niitä säilytettiin koko ajan jäällä. Nämä nukleasittomaan veteen liuotetut RNA:t säilytettiin - 80 °C -pakkasessa.

3.7 RNA-pitoisuuden määrittäminen

Nukleasittomaan veteen liuotetun RNA-näytteen RNA-pitoisuus ja puhtaus määritettiin joko NanoDrop® ND-1000 Spectrofotometer -laitteella (NanoDrop 1000 v.3.8.1.) tai Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectrometer -laitteella (NanoDrop 2000). Ohjelmassa valittiin määritettäväksi "nucleid acid"

(nukleiinihappo) ja näytetyypiksi "RNA-40". Ennen näytteiden analysointia laite puhdistettiin steriilillä vedellä niin, että sen näytealustalle pipetoitiin 1 µl steriiliä vettä, kahva käytettiin alhaalla ja nostettiin takaisin ylös ja pinnat puhdistettiin nukkaamattomalla paperilla ennen mittauksia. Ennen varsinaisia näytteiden mittauksia mitattiin nukleaasittomalla vedellä (1 µl) "blank"- eli tausta-arvo mittauksia varten. Kun tausta-arvo oli määritetty ja näytealusta puhdistettu, pipetoitiin laitteelle 1 µl näytettä ja analysoitiin näyte. Näytteiden välillä laite puhdistettiin nukkaamattomalla paperilla. Koneelta kirjattiin ylös näytteen pitoisuus (ng/µl) ja 260/280- sekä 260/230-arvot. Excel-taulukko-ohjelmalla laskettiin RNA-pitoisuuden mukaan, paljonko näytettä tarvitaan, että RNA:ta tulee 1 µg DNAasikäsittelyä varten.

3.8 RNA:n puhtauden määrittäminen

RNA:n puhtaus määritettiin käyttämällä Agilent Bioanalyzer RNA 600 Nano -kittiä, jolla pystytään analysoimaan ja erottamaan elektroforeesilla näytteiden RNA-fragmentit niiden koon mukaan (Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide 2001). Tällä tavalla saatiin selville, onko RNA-eristys näytteestä onnistunut ja onko RNA säilytynyt hajoamatta säilytyksessä. Jos RNA on hajonnut, ei cDNA:n valmistus voi onnistua.

Kaikki tämän menetelmän työvaiheet tehtiin kitin ohjeiden (Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide 2001) mukaisesti. RNA-näytteet analysoitiin Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer -laitteella (ohjelma: 2100 Expert version B.02.08.S1648 (SR1) (c) Copyright 2003-2009 Agilent Technologies Inc., Assay class: Eucaryote total RNA nano version 2.6, 2010). Kun ohjelma oli suorittanut elektroforeesiajon, se antoi näytteelle RIN-arvon, joka oli 1–10 välillä. Mitä suurempi RIN-arvo oli, sitä ehjempää RNA-näyte oli. Jos RIN-arvo oli alle seitsemän tai sille ilmoitettiin arvoksi "N/A", uusittin RNA-näytteen analyysi. Jos nämä ehdot eivät täyttyneet, yleensä myös juosteet ohjelman näytöllä näyttivät epäselviltä. Osa näytteistä, joissa oli korkea RNA-pitoisuus, täytyi laimentaa

nukleasittomalla vedellä (1+4 -laimennoksella eli 2 µl RNA-näytettä ja 8 µl nukleasitonta vettä), jotta ajo saatiin onnistumaan. Valmistajan ohjeen (Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide 2001) mukaan näytteen kokonais-RNA-pitoisuuden tulee olla 5–500 ng/µl tai l-RNA-pitoisuuden 25–250 ng/µl välillä. Viidelle RNA-näytteelle (DMSO C10, Ret3,2+Flu5 B8, Ret3,2+Flu5 C3, Ret3,2+Flu5 C4 ja Ret32+Flu500 B8) uusittiin lämpöhaudekäsittely (70 °C, 2 min), joka avasi mahdollisesti väärin pariutuneet juosteet ja tämän jälkeen niiden RNA-puhtauden määrittäminen onnistui.

3.9 RNA:sta cDNA:ta

RNA-näytteille tehtiin DNAasikäsittely PCR-laitteella (BIO-RAD C1000™ Thermal Cycler), jota käytettiin myös muissa cDNA-valmistuksen työvaiheissa, jos ei toisin ole mainittu. Näytteet pipetoitiin PCR-laitteelle tarkoitettuun kahdeksan näytekaivon liuskalle niin, että RNA-näytettä tuli 1 µg ja nukleasitonta vettä niin paljon, että RNA-näytteen ja veden yhteistilavuus oli 8 µl. Kullekin näytteelle laskettiin erikseen pipetoitavan RNA:n määrä (µl) aiemmin NanoDrop-laitteella analysoitujen RNA-pitoisuuksien (ng/µl) mukaan (Kaava 1). Veden määrä saatiin vähentämällä kahdeksasta mikrolitrasta RNA:n pipetointimäärä (µl, Kaava 2). Osassa näytteistä käytettiin epähuomiossa nukleasittoman veden sijasta steriiliä vettä.

$$V_1 = \frac{1000 \text{ ng}}{c} \quad (1)$$

$$V_2 = 8 \text{ µl} - V_1, \quad (2)$$

joissa V_1 on RNA-näytteen pipetointimäärä (µl), jotta saadaan 1 µg RNA:ta DNAasikäsittelyyn, c on näytteen RNA-pitoisuus (ng/µl) ja V_2 on nukleasittoman veden pipetointimäärä (µl).

DNAasikäsittelyn pipetointijärjestys PCR-liuskan näytekaivoon oli:

1. nukleasiton vesi, x µl (V_2 , Kaavan 2 mukaan),

2. DNAasi I -puskuri (Thermo Scientific 10x Reaction Buffer with MgCl₂ for DNase I), 1 µl,
3. RNA-näyte, x µl (V_1 , Kaavan 1 mukaan) ja
4. DNAasientsyymi (Thermo Scientific DNase I, RNase-free 1 U/µl, 1000 U), 1 µl.

Veden ja RNA-näytteen pipetointimäärät olivat aina näytekohtaisia. PCR-liuskoja, RNA-näytteitä ja reagensseja säilytettiin työvaiheiden aikana jäällä. DNAasientsyymi otettiin pakkasesta vasta ennen sen pipetointia ja vietiin takaisin pakkaseen mahdollisimman pian käytön jälkeen. Kun kaikki aineet oli pipetoitu näytekaivoihin, PCR-liuskan kaivot suljettiin korkeilla ja PCR-liuska lingottiin pienellä sentrifuugin tapaisella laitteella parin sekunnin ajan niin, että näyte-reagenssiseokset asettuivat näytekaivojen pohjalle. PCR-laitteella käytettiin protokollaa DN3710, jossa näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Kun ohjelma oli valmis, näytekaivoliuska nostettiin jäälle.

Ensimmäisen inkuboinnin jälkeen jokaiseen näytekaivoon lisätiin 1 µl EDTA:ta (Thermo Scientific 50 mM EDTA). EDTA:n lisäämisen jälkeen PCR-liuskan näytekaivot suljettiin korkeilla ja näyte-reagenssiseos lingottiin näytekaivojen pohjalle. Kaivoliuska laitettiin takaisin PCR-laitteeseen ja kuumettiin 65 °C:ssa 10 minuutin ajan (ohjelma: DN6511). Kun PCR-ohjelma oli valmis, näytteet nostettiin jäälle.

3.9.1 cDNA-synteesi

cDNA-synteesiä varten valmistettiin reaktioseos, jossa yhdelle näytteelle tuli 4 µl nukleasitonta vettä, 4 µl 5x iScript Reaction Mix (Bio-Rad), 1 µl iScript Reverse Transcriptase (Bio-Rad). Näytteitä, reagensseja ja reaktiotaseosta säilytettiin aina jäällä. Reaktioseosta valmistettiin aina vain sen päivän cDNA-synteesiä varten ja sekoitettiin hyvin vortex-sekoittimella. Tällaista reaktioseosta lisätiin 9 µl jokaiseen PCR-liuskan näytekaivoon DN6511-ohjelman jälkeen. Näytekaivot suljettiin korkeilla ja seos lingottiin kaivojen pohjalle. PCR-laitteella ajettiin

ohjelma ISCRIPIT (25 °C, 5 min; 42 °C, 30 min; 85 °C, 5 min), jossa näytteen tilavuudeksi oli asetettu 20 µl. Kun ohjelma oli suoritettu loppuun, näytteet nostettiin jälle.

cDNA-synteesissä valmistuneet cDNA:t pipetoitiin PCR-näyteliuskalta RNAasittomiin 1,5 ml mikrosentrifugiputkiin ja laimennettiin steriilillä vedellä. Jos cDNA-näytteen saanti oli 20 µl PCR-näytekaivossa, lisättiin siihen 180 µl steriiliä vettä. Jos cDNA:ta oli vähemmän, lisättiin vettä niin, että lopputilavuus oli 200 µl (esim. 18 µl cDNA-näytettä + 182 µg steriiliä vettä) ja sekoitettiin. Laimennetut cDNA-näytteet säilytettiin -20 °C-pakkasessa.

3.9.2 Referenssigeenien määrittäminen ja reaktioseoksen valmistus qPCR:ään

qPCR-menetelmää varten valittiin sopivat referenssigeenit. Referenssigeeneinä voidaan käyttää kaikissa soluissa toimivia geenejä, jotka voivat mm. pitää yllä solun peruselintoimintoja. Referenssigeenien avulla kalibroidaan näytteet samalle tasolle, jolloin kohdegeenin määrä suhteutetaan referenssigeenien määrään ja saadaan hävitettyä pipetoinnissa ja cDNA-synteesissä syntyneet erot.

qPCR-menetelmää varten testattiin viiden eri geenialukkeen *ef1a*, *rl2*, *rl17*, *cyp1a1* ja *ndufa* tehokkuudet cDNA-näytteellä, joka oli seos neljästä erilaisesta cDNA-näytteestä (DMSO C3, Ret3.2+Flu5, Ret32+Flu500 A3 ja Ret32 B3). Kutakin näistä cDNA-näytteistä pipetoitiin 10 µl DNAasivapaaseen mikrosentrifugiputkeen ja laimennettiin 40 µl steriiliä vettä. Tästä 1:1-seoksesta tehtiin 1+4-laimennossarja niin, että pipetoitiin 20 µl vahvempaa cDNA-seos-laimennosta uuteen mikrosentrifugiputkeen ja siihen lisättiin 80 µl steriiliä vettä. cDNA-seos-laimennokset sekoitettiin aina vortex-laitteella ja sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan putkien pohjalle ennen seuraavan laimennoksen pipetointia. Tällä tavalla saatiin 1:2-, 1:10-, 1:50-, 1:250- ja 1:1250-laimennokset cDNA-seoksesta. Laimennossarjojen avulla arvioitiin PCR-reaktion tehokkuus geenialukkeilla. Geenien qPCR-reaktiota varten valmistettiin jokaiselle geenialukkeelle oma reaktioseos, jota valmistettiin 20 µl yhtä PCR-levyn (12x8 kirkas kuoppalevy)

näytekaivoa varten. Reaktioseoksen resepti yhdelle cDNA-näytteelle (5 µl) qPCR-reaktiota varten oli:

- 12,5 µl iQ SYBR Green supermix (BIO-RAD)
- 0,75 µl aluke F (F=forward, Cyril Rigaud valmiiksi tekemät 300 nM laimennokset)
- 0,75 µl aluke R (R=reverse, Cyril Rigaud valmiiksi tekemät 300 nM laimennokset) ja
- 6 µl steriiliä vettä.

Tätä reaktioseosreseptiä käytettiin kaikissa qPCR-ajoissa. Yhteen reaktioseokseen tuli aina saman geenin forward- ja reverse-alukkeita. Koska geenejä oli viisi erilaista, valmistettiin viisi erillistä reaktioseosta. Kunkin geenin (*ef1a*, *rl2*, *rl17*, *cyp1a1* ja *ndufa*) alukkeista valmistettiin 240 µl reaktiososta, joka riitti cDNA-laimennosten, niiden rinnakkaisnäytteiden sekä steriilin veden qPCR-reaktioihin. Reaktioseokset sekoitettiin vortex-laitteella ja sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan putkien pohjalle ennen niiden käyttöä ja niitä säilytettiin jäällä. Kaikissa työvaiheissa huomioitiin iQ SYBR Green supermix-reagenssin valoherkkyys niin, että se tai sitä sisältävät seokset suojattiin mahdollisimman huolellisesti alumiinifoliolla. Näytteet ja reaktioseokset pipetoitiin kirkkaalle PCR-levylle niin, että ensin pipetoitiin näytelaimennokset (5 µl) ja steriili vesi (= no template control, NTC, 5 µl) omiin kaivoihin ja sen jälkeen kunkin geenin reaktioseokset (20 µl). NTC-analyysillä tarkistettiin, etteivät käytetty steriili vesi tai reaktioseokset ole kontaminoituneet cDNA:lla. Kaivoon tullut seos sekoitettiin varovasti automaattipipetillä pari kertaa edestakaisin pumppaillen. Kun kaikki näytteet olivat kaivoissa, suljettiin PCR-levyn näytekaivot liimakalvolla ja PCR-levyn näytteet sentrifugoitiin (Eppendorf Centrifuge 5430) seitsemän sekunnin aikana kaivojen pohjalle ennen kuin ne laitettiin qPCR-laitteeseen (BIO-RAD CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler; Ohjelma: Bio-Rad CFX Manager 3.1, File version: 3.1.1517.0823 ©2012 Bio-Rad Laboratories). Tätä PCR-laitetta ja sen ohjelmaa käytettiin myös myöhemmissä qPCR-ajoissa.

Koska qPCR-ohjelman ajon jälkeen näytti siltä, että kaikki referenssigeenit ovat yhtä hyviä, testattiin niitä vielä erillisillä cDNA-näytteillä, joita ei laimennettu. Tässä seuraavassa vaiheessa käytettiin cDNA-näytteinä: Ctrl B10, Ret32 C1, Flu50 B2 ja Ret10+Flu50 C6. Näytteistä tehtiin kullekin geenille kolme rinnakkaista näytettä ja myös steriilillä vedellä NTC:t. Reaktioseokset (14x määrä) valmistettiin kullekin geenille aiemmin esitetyn reseptin ja protokollan mukaan ja toimittiin samojen seosten valmistelu ja pipetointikäytänteiden mukaan. Tämän ajon perusteella valittiin referenssigeeneiksi *rl17* ja *ndufa* ja päätettiin, että kunkin cDNA-näytteen teknisten replikaattien Ct-arvon keskihajonta (QC) tulee olla alle 0,3 cDNA-näytteiden ajossa.

3.9.3 cDNA-näytteiden qPCR-ajot

Kaikki tämän kokeen cDNA-näytteet testattiin kolmella geenillä *rl17*, *ndufa* (valitut referenssigeenit) ja *cyp1a1* (tutkittava geeni), ja jokaisesta geenistä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. Yhdelle PCR-levylle mahtui kerralla 14 näytettä, ns. positiivinen näyte (Ret32 B3 -näytteestä, jonka poikasella oli valokuvien perusteella BSD-oireita) ja NTC steriilistä vedestä kullekin geenille. Kullekin geenille valmistettiin aiemmin esitetyn reseptin mukainen reaktioseos. Reaktioseosten valmistuksessa, näytteiden pipetoinnissa ja käsittelyissä toimittiin samalla tavalla kuin aiemmin kuvattiin.

Bio-Rad CFX Manager -ohjelmalla voitiin valmiiksi määrittää näytteiden, niissä käytettyjen geenien ja NTC-kaivojen paikat. Jos cDNA-näytteen teknisten replikaattien Ct-arvon hajonta (QC) oli yli 0,3, tehtiin cDNA-näyteelle uusi qPCR-ajo sillä geenillä, jonka rinnakkaisnäytteiden välinen hajonta oli liian suuri. Ohjelmalla voitiin koostaa halutut näytteet yhteen, josta nähtiin kuinka paljon *cyp1a1*-geenin tuottaman l-RNA:n määrä on ollut poikasnäytteessä. Tulokset saatiin näytteiden ekspressiomääränä ja näitä voidaan vertailla näytteiden kesken.

3.10 Reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien määrittäminen vesinäytteistä

Etanoliin säilytetyt (1:1-laimennetut) vesinäytteet analysoitiin 14.9.–20.9.2016 PerkinElmer Instruments LS55 luminescence Spectrometer -laitteella (ohjelma: FL Winlab Molecular Spectroscopy Version 4.00.02 PerkinElmer™ Instruments). Reteenille ja fluoranteenille oli omat mittaussparametrit (Taulukko 4). Ne näytteet, joissa oli molempia aineita, mitattiin molemmilla parametreilla (Taulukko 4). Vesinäytettä pipetoitiin 2 ml kvartsikyvetiin (Hellma Analytics QS High Precision Cell made of Quartz SUPRASIL®, Light Path 10x10 mm, Art. No 111–10–40) ja asetettiin mittaustelineeseen niin, että valo pääsi kulkemaan kyvetin läpi ja analysoimaan veden. Analyysin jälkeen vesinäyte kaadettiin viemäriin, ja kvartsikyvetti huuhdeltiin kerran steriilillä vedellä ja kaksi kertaa vähintään 70 % etanolilla sekä kuivattiin paineilmalla.

Taulukko 4. Reteenin ja fluoranteenin mittaussparametrit luminesenssispektrometrillä

PAH	Aloitus, nm	Lopetus, nm	$\delta\lambda$, nm	ex slit, nm	em slit, nm	Scan speed, nm/min
reteeni	250	350	50	5	5	300
fluoranteeni	200	500	155	2,5	5	240

3.10.1 Reteenin ja fluoranteenin standardiliuokset

Vesinäytteiden reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien määrittämistä varten valmistettiin 13.9.2016 altistuskokeessa käytetystä reteenistä ja fluoranteenistä laimennossarjat (Liite 3). Reteenistä valmistettiin laimennossarja, joissa reteenipitoisuudet olivat 25,6; 5,12; 1,024; 0,2048 ja 0,04096 $\mu\text{g/l}$ (Liite 3). Fluoranteenin laimennossarjassa pitoisuudet olivat 400; 80; 16; 3,2 ja 0,64 $\mu\text{g/l}$ (Liite 3). Negatiivisena kontrollina ja ns. nollanäytteenä käytettiin samaa Konnevesi-EtOH-seosta, jota käytettiin myös laimennossarjojen valmistuksessa (Liite 3). Laimennossarjan liuosten mittaus suoritettiin samalla tavalla kuin vesinäytteiden.

3.10.2 Reteenin ja fluoranteenin standardisuorat ja pitoisuuksien määrittäminen vesinäytteistä

Reteeninäytteille laskettiin fluoresenssien summa aallonpituusalueelta 290–315 nm. Reteenin kunkin standardiliuoksen laimennoksen (25,6; 5,12; 1,024 ja 0,2048 µg RET/l) fluoresenssisummasta vähennettiin 0,04096 µg RET/l-standardiliuoksen fluoresenssisumma. Pienintä standardiliuosta käytettiin tausta-arvon vähennyksessä, koska nollanäyte oli epäonnistunut. Koska tällä luminesenssispektrometri-menetelmällä matalin analysoitava reteenipitoisuus on 2,4 µg RET/l, katsottiin, että oli järkevämpää käyttää tämän määrittämissä olevaa pienintä pitoisuutta kuin epäonnistunutta nollanäytettä. Standardiliuosten reteenipitoisuuksista ja niiden fluoresenssisummasta, josta oli vähennetty pienimmän RET-pitoisuuden fluoresenssisumma, luotiin Excel-tilasto-ohjelmalla standardisuora. Suoran yhtälö oli $Y = 0,0674x - 0,4077$ ($R^2 = 0,9996$), jossa Y on reteenipitoisuus (µg RET/l) ja x on fluoresenssisumma väliltä 290–315 nm. Kun yhtälöön asetetaan x:n paikalle minkä tahansa reteeninäytteen fluoresenssisumma aallonpituusalueelta 290–315 nm, saadaan vastaukseksi näytteen reteenipitoisuus. Tulos (Y) myös kerrottiin kahdella, koska säilötty vesinäyte oli laimennettu puoleen alkuperäisestä.

Fluoranteeninäytteistä katsottiin fluoresenssiarvo, ns. piikin korkeus, aallonpituusalueella 290 nm. Korkein fluoranteenipitoisuus (400 µg FLU/l) jätettiin pois standardisuoran määrittämisestä, koska näytteen fluoresenssikäyrä katkeaa (absorbanssialue oli liian matala) eikä sille voida määrittää todellista arvoa. Kunkin fluoranteenin standardiliuoksen (80; 16; 3,2 ja 0,64 µg FLU/l) fluoresenssiarvosta vähennettiin nollanäytteen fluoresenssiarvo kohdassa 290 nm. Standardiliuosten fluoranteenipitoisuuksista ja niiden fluoresenssiarvoista, joista oli vähennetty nollanäytteen fluoresenssiarvo, luotiin Excel-tilasto-ohjelmalla standardisuora. Suoran yhtälö oli $Y = 1,8991x - 1,3587$ ($R^2 = 0,9992$), jossa Y on fluoranteenipitoisuus (µg FLU/l) ja x on fluoresenssiarvo kohdassa 290 nm. Kun yhtälöön asetetaan x:n paikalle minkä tahansa fluoranteeninäytteen fluoresenssiarvo kohdassa 290 nm, saadaan vastaukseksi näytteen

fluoranteenipitoisuus. Tulos (Y) myös kerrottiin kahdella, koska säilötty vesinäyte oli laimennettu puoleen. Ne näytteet, joissa oli 500 µg FLU/l, laimennettiin vielä uudestaan (1:1), jotta niiden analysointi onnistui. Näiden 1:4-laimennettujen näytteiden tulos (Y) täytyi kertoa neljällä, että laimennukset tuli huomioitua lopullisissa FLU-pitoisuuksien tuloksissa. (Huom. Fluoranteenin yhtälö on luotettava enintään 80 µg FLU/l-pitoisille analyysinäytteille.)

3.10.3 Vesinäytteiden tulosityhteenveto

Vesinäytteiden reteeni- ja fluoranteenipitoisuudet määritettiin standardisuorien yhtälöiden avulla ja koostettiin Excel-taulukko-ohjelmalla. Päivittäisistä reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksista laskettiin keskiarvo ja -hajonta käsittelyittäin. Keskiarvojen laskennasta jätettiin pois negatiiviset arvot ja näytteet (8 kpl), joista etanoli oli haihtunut pois säilytyksen aikana huonon korkin takia. Säilytysaika oli n. 7 kk. Uudesta ns. tuoreesta altistusvedestä otetut vesinäytteet (16.2.2016) esitellään erikseen.

3.11 Tulosten tilastollinen käsittely

Poikasten vavuusindeksit, pituudet, ruskuaispussin pinta-alat ja *cyp1a1*-geeniekspressiot testattiin tilastollisesti. Aineistojen tilastolliseen käsittelyyn käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa (IBM® SPSS® Statistics Version 24, Release 24.0.0.0 64-bit edition). Aineistojen normaalius testattiin Shapiro-Wilk -testillä ja varianssien yhtäsuuruus Levenen testillä. Merkitsevyys- ja riskitasoksi (α) asetettiin 0,05. Vasteiden keskiarvojen välistä eroa voitiin vertailla Oneway-ANOVA:lla tai parametritomalla Kruskal-Wallis *H*-testillä. Reteenin ja fluoranteenin vaikutusta tuloksiin voitiin tarkastella twoway-ANOVA:lla (Univariate). Tukeyn HSD-testillä voitiin tarkastella käsittelyiden samankaltaisuutta tietyllä vasteella.

4 TULOKSET

Kokeessa käytetyn Konnevesi-järviveden pH oli keskimäärin 7,2 (n = 3) ja sähkönjohtokyky oli kahtena mittauskertana 26,4 μS . Kahdesta vesinäytteestä mitattu liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrä oli keskimäärin 7,26 mg/l.

Ilmastukset toimivat moitteettomasti koko kokeen ajan. Altistusvesien happipitoisuus tarkistettiin vain pari kertaa kontrollikäsitteilyistä ollen 97 % ja 114 % eli voidaan olettaa, että ilmastukset ovat olleet riittävät kokeen ajan.

Koeastioiden lämpötila vaihteli kokeen aikana 11,4–13,0 °C välillä, joka sopii hyvin OECD guideline for testing of chemicals (1992) ohjeen asettamalle lämpötilan vaihteluvälille (10–14 °C), kun koe-eläiminä ovat kirjolohen poikaset. Vaihtelu oli yleensä pienempää samassa koeastiassa kuin koehuoneen eri puolilla olleiden koeastioiden välillä. Kymmenen koepäivän lämpösumma oli 121 DD.

4.1 Reteeni- ja fluoranteenipitoisuudet vesinäytteissä

Altistusvesistä analysoitiin reteeni- ja fluoranteenipitoisuudet luminesenssispektrometrillä menetelmällä kerran tuoreesta vasta vaihdetusta vedestä (16.2.16) ja kymmenenä koepäivänä altistusvedestä ennen vesien vaihtoa. Tulosten mukaan tuoreessa vedessä reteenipitoisuus on 30,6–87,4 $\mu\text{g/l}$ välillä, vaikka käsitteilyihin oli lisätty 3,2; 10 tai 32 $\mu\text{g RET/l}$ (Taulukko 5). Fluoranteenille saatiin positiiviset arvot vain Flu500-käsitteilyistä (315–1011 $\mu\text{g FLU/l}$, Taulukko 5). Tuoreen veden Flu50- ja Flu500-käsitteilyiden tulokset hylättiin, koska toisen käsitteilyn fluoresenssikäyrä oli oudon näköinen ja erittäin matala, ja toisesta näytteestä oli etanoli haihtunut säilytyksen aikana huonon korkin takia.

Taulukko 5. Reteenin ja fluoranteenin pitoisuudet vasta valmistetussa altistusvedessä

Käsittely	Ret, µg/l	Flu, µg/l
Flu 5	0	-274
Flu 50	0	-
Flu 500	0	-
Ret 3,2	-68,4	0
Ret 3,2+Flu 5	39,4	-301
Ret 3,2+Flu 50	87,4	-175
Ret 3,2+Flu 500	-82,6	315
Ret 10	45,3	0
Ret 10+Flu 5	30,6	-308
Ret 10+Flu 50	41,0	-82
Ret 10+Flu 500	-82,6	595
Ret 32	46,6	0
Ret 32+Flu 5	51,4	193
Ret 32+Flu 50	34,0	-175
Ret 32+Flu 500	-82,6	1011

Noin vuorokauden vanhoista altistusvesistä (vesinäytteet ennen altistusvesien vaihtoa) on keskiarvojen laskennasta jätetty pois negatiiviset arvot ja sellaiset näytteet, joista etanoli oli haihtunut kokonaan pois huonon korkin takia, minkä takia käsittelyissä on arvoja (n) vähemmän kuin otettuja näytteitä (10 kpl, Taulukko 6). Reteenipitoisuudet ovat joko liian suuria tai liian pieniä käsittelyyn nähden (Taulukko 6). Fluoranteenipitoisuuksilla on kuitenkin oikea suunta eli matalissa käsittelypitoisuuksissa fluoranteenipitoisuudet ovat pienempiä kuin korkeissa käsittelypitoisuuksissa. Käsittelyissä, joissa on 5 µg FLU/l, vaihtelee todellinen fluoranteenipitoisuus 26,4–79,6 µg/l välillä eli fluoranteenipitoisuus on selvästi laskennallista arvoa korkeampi, mutta myös keskihajonta on osassa suurta (Taulukko 6). Käsittelyissä, joissa fluoranteenia on 50 µg/l, vaihtelee pitoisuus lähempänä laskennallista arvoa 47,2–68,8 µg FLU/l (Taulukko 6). Korkeimman fluoranteenipitoisuuden käsittelyssä (500 µg FLU/l) ovat pitoisuudet odotettua

korkeammat vaihdellen välillä 488,1–735,8 µg FLU/l, mutta myös näissä on keskihajonta suurta (Taulukko 6).

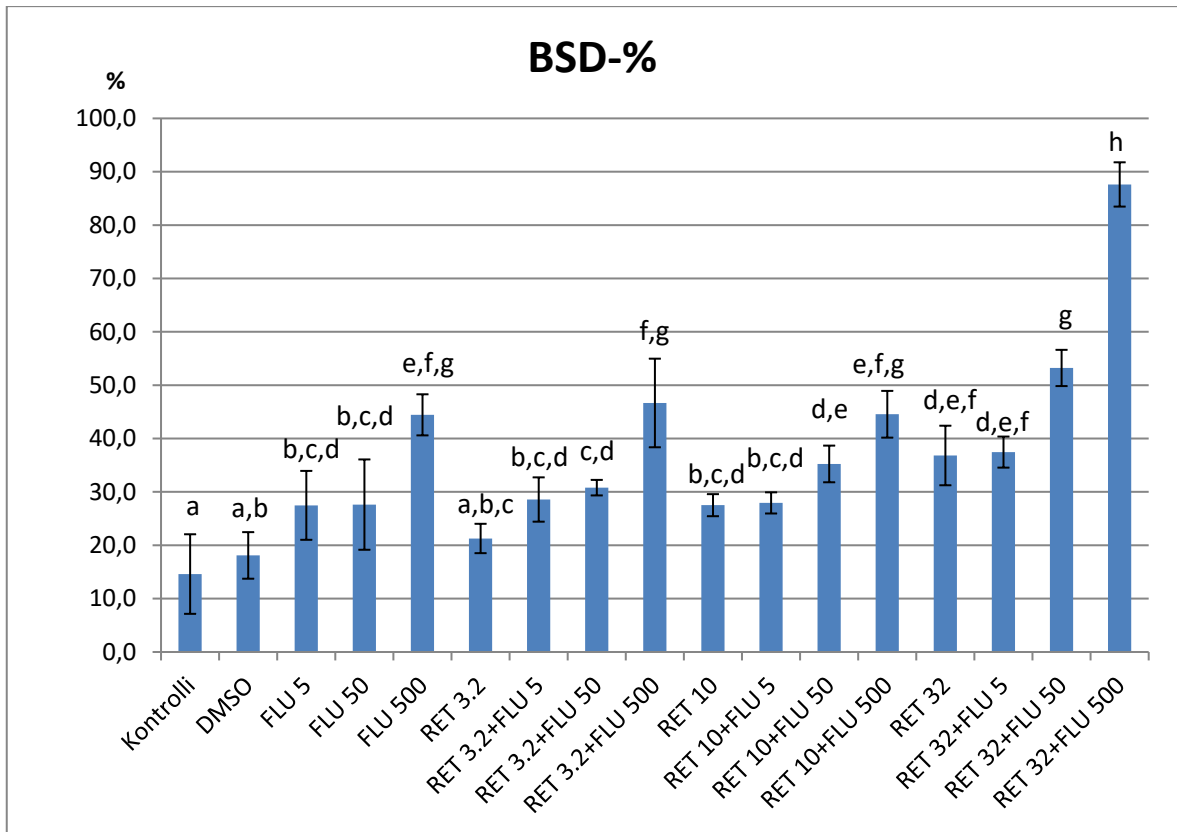
Taulukko 6. Keskimääräiset reteeni- ja fluoranteenipitoisuudet altistusvesissä ennen vesien vaihtoa

Käsittely	Reteeni			Fluoranteeni		
	µg/l	sd	n	µg/l	sd	n
Flu 5	0	-	0	51,2	85,5	3
Flu 50	0	-	0	47,2	31,7	8
Flu 500	0	-	0	488,1	177,9	10
Ret 3,2	65,2	-	1	0	-	0
Ret 3,2+Flu 5	-	-	0	40,8	7,7	3
Ret 3,2+Flu 50	-	-	0	68,8	57,8	8
Ret 3,2+Flu 500	5,6	0	2	612,6	177,0	9
Ret 10	-	-	0	0	-	0
Ret 10+Flu 5	-	-	0	26,4	10,3	3
Ret 10+Flu 50	-	-	0	57,2	36,8	8
Ret 10+Flu 500	58,8	-	1	715,6	149,7	10
Ret 32	-	-	0	0	-	0
Ret 32+Flu 5	-	-	0	79,6	112,1	3
Ret 32+Flu 50	-	-	0	52,9	35,4	8
Ret 32+Flu 500	15,6	-	1	735,8	231,0	9

4.3 Ruskuaispussitaudin BSD-prosentit

Ruskuaispussitaudin oireiden BSD-%:t nousevat varsin järjestelmällisesti, kun fluoranteenin pitoisuus käsittelyissä nousee (Kuva 4). Kun testataan BSD-%:ien normaalisuus käsittelyittäin, Shapiro-Wilk -testin mukaan ei yhdenkään käsittelyn tulokset ole normaalisti jakautuneita ($p < 0,05$). BSD-%:ien log-muunnos ei parantanut tulosten normaalijakautuneisuutta ($p < 0,05$ kaikissa käsittelyissä). Levenen testillä testattuna BSD-%:ien varianssit olivat yhtä suuret käsittelyiden välillä ($p = 0,640$). Parametrittoman Kruskal-Wallis H -testin mukaan käsittelyiden BSD-%:ien keskiarvojen välillä on tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,001$). Twoway ANOVA-testin mukaan reteenin, fluoranteenin ja niiden

molempien yhteispitoisuudella on tilastollisesti erittäin merkitsevä vaikutus ($p < 0,001$ kullakin) kirjolohen poikasten BSD-%:hin. Käsittelyiden samankaltaisuudet testattiin Tukeyn HSD-testillä ja sen tulokset on esitetty kirjainkoodeilla Kuvassa 4. Kontrollin ja DMSO-käsittelyn välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa Tukeyn HSD testin mukaan ($p = 0,998$) eli DMSO-liuotin ei vaikuta BSD-%:iin. Käsittelyissä, joissa fluoranteenipitoisuus on $500 \mu\text{g/l}$, on aina alempia pitoisuuksia vähintään 10 %-yksikköä korkeampi BSD-% (Kuva 4). Se altistetaanko kirjolohen poikasia pelkästään reteenille (10 tai $32 \mu\text{g/l}$) vai myös $5 \mu\text{g FLU/l}$ ei aiheuta eroa BSD-%:iin (Kuva 4).



Kuva 4. Vastakuoriutuneiden kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasten ruskuaispussitautiin oireiden BSD-%:t käsittelyittäin ja tulosten samankaltaisuudet Tukeyn HSD-testin mukaan yhdeksän altistuspäivän jälkeen. (FLU = fluoranteeni, RET = reteeni, numero kuvaa yhdisteen pitoisuutta $\mu\text{g/l}$ ja kirjaimet käsittelyiden samankaltaisuutta)

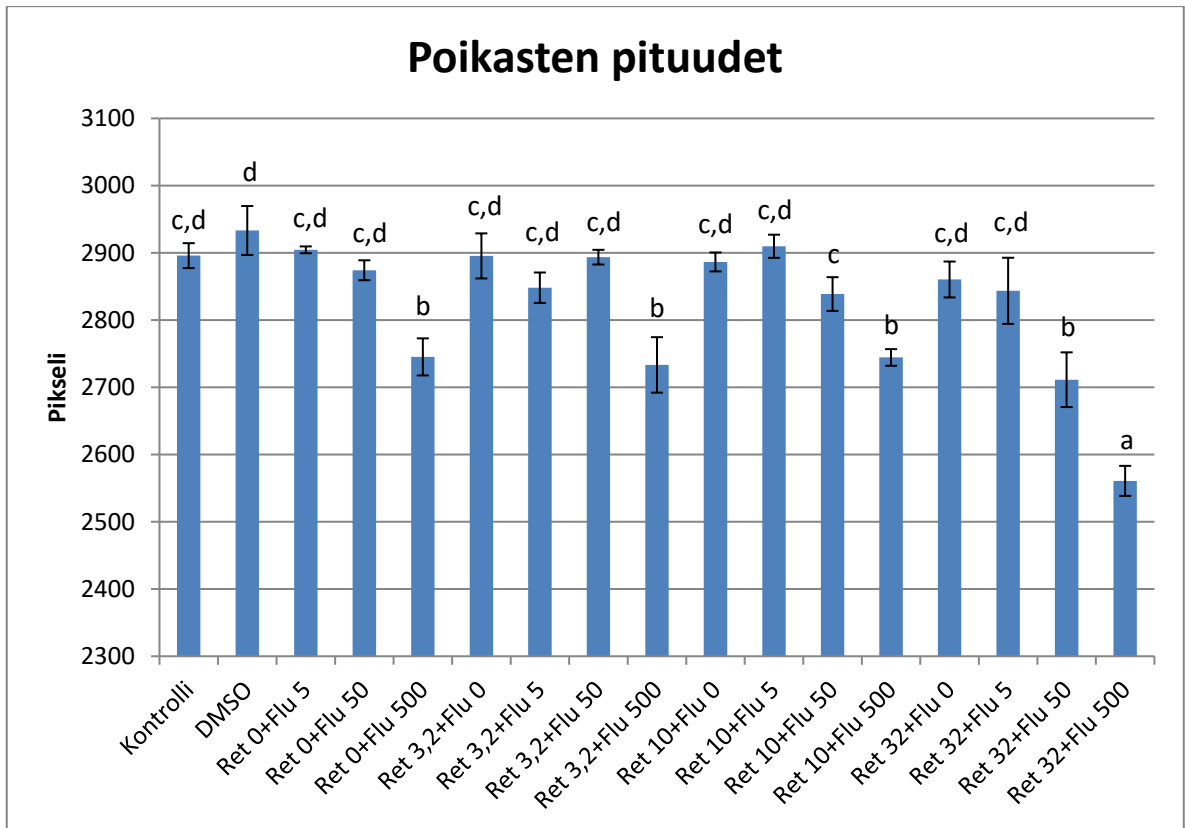
4.3.1 Poikasten kuolleisuus

Vain käsittelyssä Ret32+Flu500 oli kuolleita poikasia (5 + 2 + 4 = 11) kokeen päättöpäivänä. Ret32+Flu500-käsittelyn poikaskuolleisuus on 37 % yhdeksän päivää kestäneessä altistuksessa. Muiden käsittelyiden poikaskuolleisuus oli 0 %.

4.4 Poikasten pituudet

Poikasten pituuksissa on käytetty yksikkönä pikseliä valokuvassa. Tulosten laskennassa käsittelyiden rinnakkaisista altistusastioista saadut pituusarvot yhdistettiin. Pituustuloksista poistettiin yksi muita selvästi pienempi poikkeava tulos (2472,111 pikseliä, käsittelystä Ret32+Flu5, B-astia, poikanen nro 2), jonka jälkeen Shapiro-Wilk -testissä kaikki käsittelyt olivat normaalisti jakautuneita ($p >$

0,05). Levenen testin mukaan käsittelyiden varianssit ovat yhtä suuret ($p = 0,263$). Kuvassa 5 voidaan nähdä, että käsittelyiden välillä on eroa ja Oneway ANOVA:lla testattuna käsittelyiden keskiarvojen välillä on tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ($p < 0,001$). Twoway ANOVA-testin mukaan reteenin, fluoranteenin ja niiden molempien yhteispitoisuudella on tilastollisesti erittäin merkitsevä vaikutus ($p < 0,001$ kullakin) kirjolohen poikasten pituuteen. Tukeyn HSD-testin mukaan kontrollin ja DMSO-käsittelyn välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa ($p = 0,985$) eli DMSO-liuotin ei vaikuta poikasten pituuteen. Käsittelyissä Flu500, Ret3,2+Flu500, Ret10+Flu500 ja Ret32+Flu50 olivat poikaset 6–7 % lyhyempiä kuin DMSO-kontrollissa ja Tukeyn HSD-testin mukaan niiden tulokset ovat samankaltaiset (b-tunnus, Kuva 5). Eniten poikasten pituuteen vaikutti kaikkein suurin altistuspitoisuus Ret32+Flu500, joka lyhensi poikasia n. 13 % verrattuna DMSO-kontrolliin (Kuva 5).

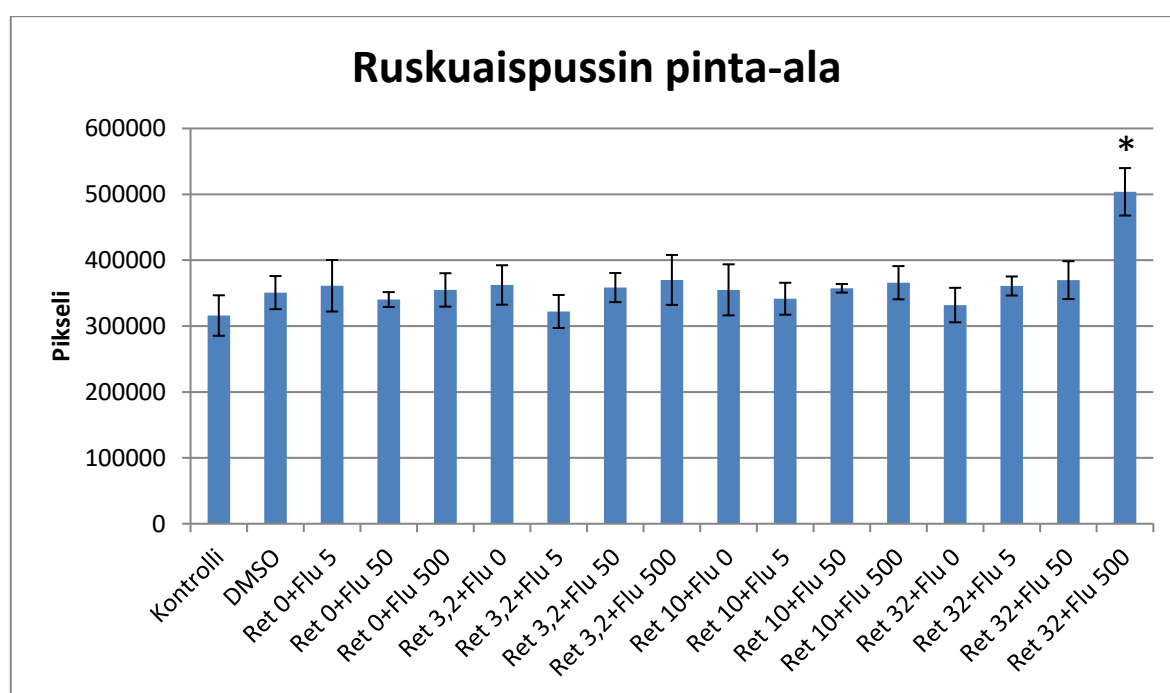


Kuva 5. Kirjoloheen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasten pituudet (valokuvapikseleinä) yhdeksän altistuspäivän jälkeen. (RET = reteeni, FLU = fluoranteeni, numero kuvaa yhdisteen pitoisuutta $\mu\text{g/l}$ altistusvedessä ja kirjaimet tulosten samankaltaisuutta Tukeyn HSD-testin mukaan)

4.5 Ruskuaispussien pinta-alat

Kirjoloheen poikasten ruskuaispussien pinta-aloissa on käytetty yksikkönä pikseliä, joka on pikselien määrä ruskuaispussialalla valokuvasta mitattuna. Tulosten laskennassa rinnakkaisten altistusastioiden tulokset yhdistettiin. Ruskuaispussien pinta-alatuloksista poistettiin yksi muita selvästi suurempi ja poikkeava tulos (736326 pikseliä, käsittely Ret10+Flu50, C-vuoka, poikanen nro 5), jonka jälkeen Shapiro-Wilk-testissä kaikki muut käsittelyt olivat normaalisti jakautuneita ($p > 0,05$) paitsi Flu50-käsittely ($p = 0,036$). Pinta-alojen log-muunnos ei parantanut niiden normaalijakautuneisuutta. Levenen testin mukaan käsittelyiden varianssit ovat yhtä suuret ($p = 0,964$). Kruskal-Wallis H -testin mukaan käsittelyiden keskiarvojen välillä on tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ($p < 0,001$). Twoway

ANOVA:n mukaan reteeni-, fluoranteeni- ja niiden yhteispitoisuus vaikuttavat tilastollisesti erittäin merkitsevästi kirjolohen poikasten ruskuaispussien pinta-alaan ($p < 0,001$ kullakin). Tukeyn HSD-testin mukaan kontrollin ja DMSO-käsittelyn välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa ($p = 0,860$) eli DMSO-liuotin ei vaikuta poikasten ruskuaispussien pinta-alaan. Tukeyn HSD-testin mukaan kaikki muut käsittelyt ovat toisiinsa nähden samankaltaisia paitsi Ret32+Flu500-käsittely, joka poikkeaa tilastollisesti muista käsittelyistä (*, Kuva 6). Ret32+Flu500-altistettujen poikasten ruskuaispussien pinta-ala on 44 % suurempi kuin DMSO-kontrollissa (Kuva 6).



Kuva 6. Kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasten ruskuaispussien pinta-alat (pikselimäärinä) yhdeksän altistuspäivän jälkeen. (RET = reteeni, FLU = fluoranteeni, numerot ovat aineiden pitoisuudet $\mu\text{g/l}$ ja *-merkitty käsittely poikkeaa tilastollisesti muista käsittelyistä Tukeyn HSD-testin mukaan)

4.6 qPCR ja *cyp1a1*-geeniekspressiot

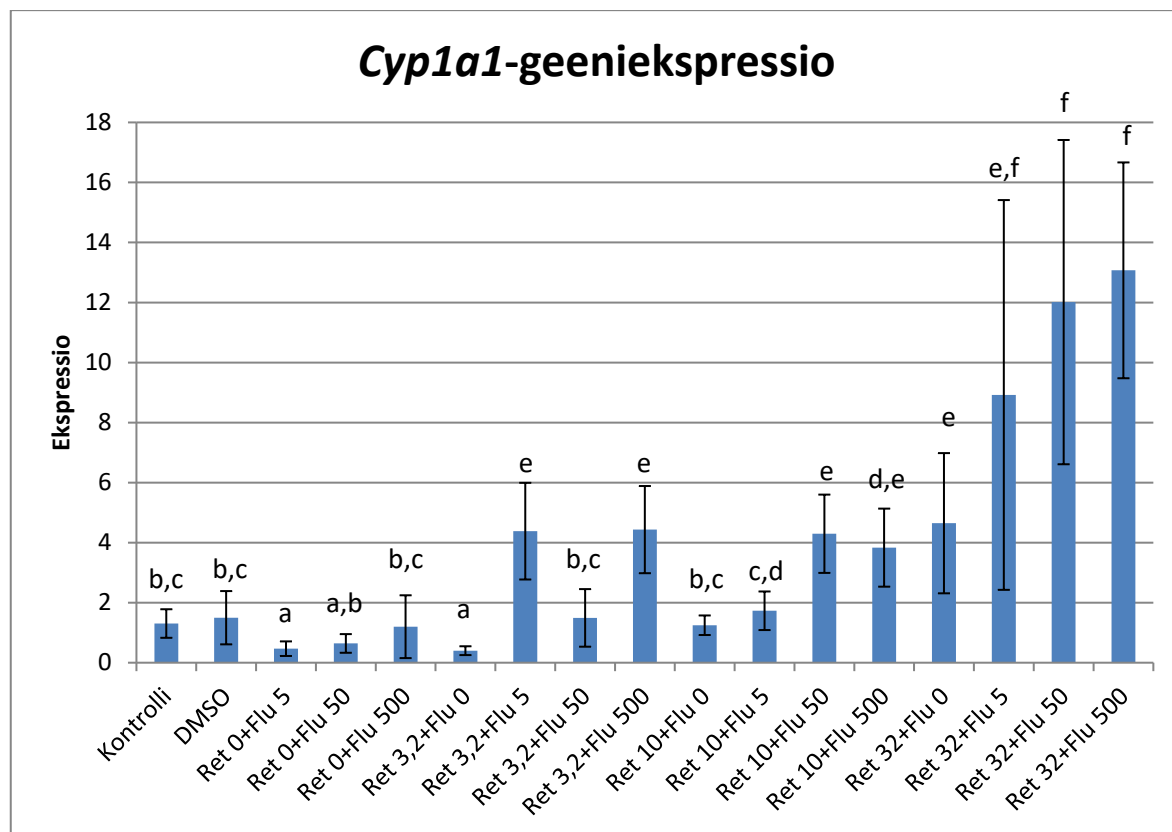
Jokaisesta altistusastiasista analysoitiin kolmesta kirjolohen poikasesta *cyp1a1*-geeniekspression määrä. Ret3,2+Flu50-käsittelyn C-astian 2. poikasen cDNA-näytteessä oli jotain vikaa, koska se ajettiin qPCR:ssä kolme kertaa eikä sen

teknisille replikaateille saatu tarpeeksi pientä hajontaa ($QC < 0,3$). Koska kolmannessakin ajossa Ct-arvon hajonta oli 0,386 huolellisesta työskentelystä huolimatta, jätettiin tämä näyte pois tulosten laskennasta. Ret3,2+Flu50-käsittelyssä on tulos laskettu kahdeksan poikasen analyysituloksista.

Cyp1a1-geeniekspressioaineiston tilastollisissa tarkasteluissa käytettiin log-muunnettua arvoa *cyp1a1*-geeniekspressioista (myöhemmin "log-*cyp1a1*-geeniekspressio"). Aineisto käsiteltiin käsittelyittäin eli kaikki saman käsittelyn rinnakkaisten koeastioiden tulokset yhdistettiin ($n = 9$ paitsi Ret3,2+Flu50-käsittelyssä $n = 8$ ja kontrollissa $n = 12$). Kaksi käsittelyä, kontrolli- ja Ret3,2-käsittely, eivät olleet olleet normaalisti jakautuneita (Shapiro-Wilk, $p = 0,008$ ja $p = 0,005$). Muiden käsittelyiden *cyp1a1*-geeniekspressiot noudattivat normaalijakaumaa ($p > 0,05$). Levenen testin mukaan käsittelyiden varianssit olivat yhtäsuuret ($p = 0,293$). Parametrittoman Kruskal-Wallisin *H*-testin mukaan käsittelyiden keskiarvojen välillä on tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ($p < 0,001$).

Kontrolli- ja DMSO-käsittelyn välillä ei ole selvää eroa eli DMSO:n käyttö liuottimena ei lisännyt *cyp1a1*-geeniekspressiota (Kuva 7). Myös Tukeyn HSD-testi osoittaa, ettei kontrolli- ja DMSO-käsittelyn välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa log-*cyp1a1*-geeniekspressioissa ($p = 1,000$). *Cyp1a1*-geeniekspressio lisääntyy, kun reteenin ja fluoranteenin altistuspitoisuudet kasvavat (Kuva 7). Sekä reteenin ja fluoranteenin pitoisuus että niiden pitoisuuksien yhteisaltistus vaikuttavat log-*cyp1a1*-geeniekspression tilastollisesti erittäin merkitsevästi ($p < 0,001$ kussakin), kun testattiin Two-way ANOVA:lla. Kuvassa 7 nähdään, että *cyp1a1*-geeniekspressio pääsääntöisesti kasvaa, kun reteenin tai fluoranteenin pitoisuudet nousevat. Kun reteenialtistukseen lisätään fluoranteenia, lisääntyy *cyp1a1*-geeniekspressio (Kuva 7). Kuitenkin Ret3,2+Flu50-altistus on tuottanut selvästi seuraavaa pitoisuutta (Ret3,2+Flu50) suuremman *cyp1a1*-geeniekspression, joka on myös korkeampi suhteessa Ret10+Flu50-altistukseen (Kuva 7). Taasen Ret10+Flu500-käsittelyn *cyp1a1*-geeniekspressio jää matalalle tasolle verrattuna

sitä astetta pienempään altistustasoon (Ret10+Flu50, Kuva 7). Selvästi oman ryhmän (f) muodostavat Ret32+Flu-käsittelyt ja niissä keskihajonta on huomattavan paljon suurempaa kuin muissa käsittelyissä (Kuva 7).



Kuva 7. Yhdeksän päivää kestäneen kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasten reteeni- ja fluoranteeni-altistuskokeen *cyp1a1*-geeniekspressiomäärät ja tulosten samankaltaisuudet (Tukey HSD) esitettyinä kirjainkoodeilla. (Ret = reteeni, Flu = fluoranteeni ja numerot kuvaavat kunkin yhdisteen altistuspitoisuutta, $\mu\text{g/l}$)

5 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä Pro gradu -työssä tutkittiin kuinka kahden eri PAH-yhdisteen, reteenin ja fluoranteenin, yhteisaltistus vaikuttaa kirjolohen poikasilla BSD-oireiden ilmenemiseen, poikasten pituuteen, ruskuaispussien pinta-alaan ja *cyp1a1*-geeniekspressioon (l-RNA-määränä mitattuna). Reteeni on AHR-agonisti, joka indusoi *cyp1a1*-geenin tuotantoa ja käynnistää haitta-aineiden metabolian.

Fluoranteeni toimii soluissa CYP1A-inhibiittorina. Kokeen järjestelyt toimivat hyvin ja siitä saatuja tuloksia voidaan pitää kaiken kaikkiaan varsin luotettavina.

5.1 Reteenin ja fluoranteenin pitoisuudet kokeen altistusvesissä

Billiardin ym. (1999) kokeen tulosten pohjalta odotettiin, että reteenin pitoisuus olisi ollut 60 % pienempi kuin odotettu pitoisuus, koska reteeni adsorptoituu lasisten astioiden pinnoille ja poikasiin. Tämän kokeen tuloksia ei reteenipitoisuuden osalta voida verrata muihin tutkimuksiin, koska suurin osa vesinäytteistä lasketuista reteenipitoisuuksista olivat negatiivisia eikä positiivisista pitoisuusarvoista lasketut tulokset olleet loogisia (Taulukko 6). Todennäköisesti vesinäytteiden pitkä seitsemän kuukauden säilytysaika vaikuttaa tuloksiin, ja näytepulloista oli haihtunut etanoli joko kokonaan tai osittain, joten vesinäytteiden tuloksia ei voida pitää luotettavina. Etanolin haihtuminen aiheuttaa näyteveden pinnan laskun ja on mahdollista, että lipofiiliset PAH:t ovat adsorboituneet näytepullon pinnoille, kun nestepinta on laskenut. Koska reteenin ja fluoranteenin standardinäytteet valmistettiin vain päivää ennen mittauksia luminesenssispektrometrillä (Liite 3) ja niistä saadut standardikäyrät onnistuivat hyvin ($R^2 = 0,9996$ ja $0,9992$), voidaan olettaa, että reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien laskenta olisi pitänyt onnistua. Myös vesinäytteiden laimennus huomioitiin laskennassa. Toisaalta standardinäytteet valmistettiin eri erästä Konnevesi-järven järvivettä (Liite 3) kuin mitä altistuskokeessa käytettiin, mikä voi selittää negatiivisiksi reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksiksi lasketut arvot.

Vesinäytteiden fluoranteenipitoisuuksien tulokset ovat jonkin verran johdonmukaisempia kuin reteenin eli pienissä fluoranteenin altistuspitoisuuksissa fluoranteenipitoisuudet olivat pienemmät suhteessa korkeisiin altistuspitoisuuksiin (Taulukko 6). Näissä tuloksissa oli kuitenkin suuret keskihajonnat (Taulukko 6). Fluoranteenipitoisuuksille laskettu standardisuora ja yhtälö toimivat vähän paremmin kuin reteenin, mutta myös fluoranteenipitoisuuksien tuloksiin on vaikuttanut pitkä säilytysaika, jonka takia

myöskään fluoranteenille lasketut pitoisuudet eivät ole luotettavia. Lisäksi tulee huomioida, että standardisuoran laskennassa korkein fluoranteenipitoisuus oli 80 µg FLU/l eli käytännössä suoran yhtälöä voidaan käyttää luotettavasti vain enintään 80 µg FLU/l-pitoisten näytteiden analysointiin. Tämän takia 500 µg FLU/l sisältävät vesinäytteet olisi pitänyt laimentaa enemmän kuin 1:4, koska niissä laskennallinen fluoranteenipitoisuus oli 125 µg/l eli liian korkea käytettävälle yhtälölle.

5.2 Ruskuaispussitaudin oireiden vertailu

Kokeessa BSD-%:t nousevat varsin järjestelmällisesti, kun reteenin ja fluoranteenin pitoisuudet käsittelyissä kasvavat (Kuva 4). Myös Hodsonin ym. (2007) kirjolohen poikasille järjestetyssä altistuskokeessa BSD-pisteet nousivat, kun reteenipitoisuutta nostettiin jopa 300 µg RET/l. Kun Vehniäisen ym. (2015) kokeessa vastakuorituneita kirjolohen poikasista altistettiin 32 µg RET/l reteeniä, oli poikasilla seitsemäntenä altistuspäivänä kolme kertaa suurempi BSD-indeksi kuin kontrolliryhmän poikasilla. Taasen tässä yhdeksän päivää kestäneessä kokeessa 32 µg RET/l-altistus aiheutti kirjolohen poikasille vain kaksi kertaa suuremman BSD-% verrattuna DMSO-kontrolliin, vaikka altistusaika oli pari päivää pidempi kuin Vehniäisen ym. (2015) kokeessa. Myös Brinkworth ym. (2003) kokeessa osoitettiin, että reteeni aiheuttaa BSD-oireita kirjolohen poikasille. Verenvuodot ja ruskuaispussin ödeema lisääntyivät jo muutamassa päivässä kirjolohen poikasten kuoriutumisen jälkeen ja jo viikossa oireita oli 60–100 %:lla kirjolohen poikasista, kun reteenipitoisuus oli 9 ± 3 µg/l (Brinkworth ym. 2003). Myös Hawkinsin ym. (2002) 22 päivää kestäneessä kirjolohen poikasten altistuskokeessa reteeni (100 µg RET/l) lisäsi poikasten pään ja kallon epämuodostomia, verenpurkaumia päässä ja silmissä sekä ruskuaispussin ödeemaa verrattuna liuotinkontrolliin. Tämä myös todistaa, että reteeni aiheuttaa BSD-oireita kirjolohen poikasille, vaikka BSD-indeksiä tms. tunnuslukua ei ole laskettu.

Brown ym. (2014) toteavat tuloksissaan, että kun fluoranteenia altistetaan yhdessä heikon AHR-agonistin kanssa, lisäntyy sydänpussin ödeema ja sydäntoksisuus seeprakalojen alkioidilla verrattuna altistukseen vain yhdellä haitta-aineella. Kun Hodsonin ym. (2007) kokeessa kirjolohen poikasia altistettiin reteenin lisäksi ANF:lle, joka on CYP1A-inhibiittori, BSD-pisteet nousivat reteenipitoisuuden noustessa, mutta vähemmän kaikkein korkeimmissa ANF-pitoisuuksissa (100 ja 320 µg/l) kuin pelkälle reteenille altistettaessa. Tämä suunta CYP1A-inhibiittoria lisättäessä on päin vastainen tämän kokeen tuloksiin, jossa BSD-% kasvaa, kun reteenin ja fluoranteenin pitoisuudet nousevat (Kuva 4). Reteenin (100 µg/l) ja CYP1A-inhibiittori PBO:n (piperonylibutoksidi, 338 µg/l) yhteisaltistus lisäsi kirjolohen poikasten BSD-oireita kuten ruskuaispussin verenpurkauksia merkittävästi verrattuna pelkkään reteenialtistukseen (Hawkins ym. 2002). Hawkinsin ym. (2002) kokeen tuloksista ei ole laskettu BSD-indeksiä tmv. tunnuslukua, mutta ne tukevat tämän kokeen tuloksia. Wassenbergin ja Di Giulion (2004) killikalojen alkiokokeessa BNF- ja ANF-pitoisuuksien noustessa myös vakavuusindeksi nousi jyrkästi 1,1 µg BNF/l+100 µg ANF/l asti, mutta se jäi jonkin verran alle sadan. Kun BNF-pitoisuutta lisättiin, saavutti vakavuusindeksi maksimiarvon 100 (Wassenberg ja Di Giulio 2004). Todennäköisesti, jos tässäkin kokeessa olisi käytetty vielä yhden pykälän suurempaa reteenipitoisuutta (esim. 60 µg/l) 500 µg FLU/l kanssa, olisi saavutettu BSD-% 100 ja varmaan myös poikasten kuolleisuusprosentti olisi noussut. Ret32+Flu500-käsittelyssä saavutettiin BSD-% 88 (Kuva 4) ja poikasten kuolleisuus oli 37 %. Hodsonin ym. (2007) kokeessa kirjolohen poikasten kuolleisuus oli 100 % 22 päivää kestäneessä kokeessa, kun niitä altistettiin 320 µg RET/l ja 32 µg ANF/l. Hawkinsin ym. (2002) kirjolohikokeessa 100 µg RET/l ja 338 µg PBO/l yhteisaltistus nosti nuorten kirjolohen poikasten kuolleisuutta 60 %:iin 19. altistuspäivän jälkeen, kun pelkässä reteenialtistuksessa kuolleisuus oli alle 20 %. Tässä kokeessa 32 µg RET/l-altistuspitoisuus ei aiheuttanut poikaskuolleisuutta.

Eri kokeiden tulosten välille aiheuttavat eroa niissä käytetyt eri AHR-agonistit ja CYP1A-inhibiittorit sekä niiden pitoisuudet ja BSD-oireiden pisteytystapa. BSD-oireiden pisteytyksessä ja laskennassa voidaan päättää oireet, jotka otetaan mukaan laskentaan ja miten ne pisteytetään esim. oire saa pisteen, jos se ilmenee tai mitä vakavampi oire on, sitä suuremman pistearvon se saa. Tähän ei ole olemassa standardimenetelmää tms., vaan BSD- ja vakavuus-indeksien laskentatapa vaihtelee kokeiden välillä. Laskentamenetelmät kuitenkin perustuvat samaan laskentamalliin, jota käyttivät mm. Scott ja Hodson (2008), ja tätä laskentatapaa on käytetty myös tässä työssä. Myös arvioijan "silmä" vaikuttaa oireiden pisteytykseen ja joissakin kokeissa oireet arvioidaan heti kokeen päätteeksi eikä valokuvien perusteella, jolloin niihin ei voida enää palata tai miettiä mikä arvointitarkkuus sopisi parhaiten sen kokeen poikasten arviointiin.

5.3 Kirjoloihen poikasten pituudet

Kun tarkastellaan reteenin vaikutusta kirjoloihen poikasten pituuteen (pikseliä), ei tässä kokeessa saatu tilastollisesti merkitsevää eroa suurimmakaan reteenipitoisuuden (32 µg/l) ja DMSO-kontrollin välille (Kuva 5). Tämä tulos eroaa Kujalan (2012) Pro gradu -tutkielman tuloksista, joissa positiivisessa kontrollikäsitelyssä 32 µg RET/1 -altistus aiheutti 12 päivässä kirjoloihen poikasille tilastollisesti merkitsevän eron ($p < 0,001$) poikasten pituuteen (mm) ja reteenikäsitely lyhensi poikasia. Kujalan (2012) koe oli kolme päivää pidempi kuin tämä koe, mikä voi vaikuttaa eroon koetulosten välillä.

Matalimmat fluoranteenipitoisuudet (5 ja 50 µg/l) eivät vaikuttaneet kirjolenpoikasten pituuksiin tässä yhdeksän päivän altistuskokeessa ja poikasten pituudet (pikseliä) olivat samankaltaisia DMSO-kontrollissa kasvaneiden poikasten kanssa (samankaltaisuustunnus d, Kuva 5). Ihan vastaavia kokeita ei ole tehty, mutta esim. Le Bihanicin ym. (2014) kirjoloihen poikasten sedimenttialtiskokeessa 3 µg FLU/g ka-altistuspitoisuus ei vaikuttanut 22 päivän aikana kirjoloihen poikasten pituuteen (mm).

Koska poikasten pituusyksikkönä käytettiin tässä kokeessa pikseleitä, ei voida suoraan verrata poikasten pituuksia toisiinsa. Vasteiden samansuuntaisuutta ja suuruusluokkia sekä sitä ovatko erot tilastollisesti merkitseviä voidaan vertailla. Reteenin ja jonkun CYP1A-inhibiittorin tai jonkun AHR-agonistin ja fluoranteenin yhteisvaikutusta kalanpoikasten pituuksiin ei ole tutkittu, eikä näin ollen voitu tehdä pituustulosten vertailua.

5.4 Ruskuaispussien pinta-alat

Tutkimuksia, joissa olisi tutkittu AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin yhteisvaikutusta kalan poikasten ruskuaispussin pinta-alaan, ei ole tehty. Matson ym. (2008) ovat tutkineet fluoranteenin vaikutusta sydänpussin pinta-alaan seeprakalan alkioilla (24–96 hpf, hours post fertilization, tuntia hedelmöityksen jälkeen). Pelkkä 100 ja 500 µg FLU/l ei kasvattanut sydänpussin pinta-alaa seeprakaloilla (Matson ym. 2008) eli tulos on samankaltainen kuin tässä kokeessa, kun tutkittiin fluoranteenin vaikutusta ruskuaispussin pinta-alaan kirjolohen poikasilla. Korkeakaan fluoranteenipitoisuus ei vaikuttanut ruskuaispussin pinta-alaan (Kuva 6). Matsonin ym. (2008) seeprakalan poikaskokeessa vähähappiset olosuhteet kasvattivat sydänpussin pinta-alaa fluoranteenialtistuksessa (100 ja 500 µg FLU/l) ja ero oli tilastollisesti merkitsevä normaalihappisiin oloihin verrattuna. Olisiko mahdollista, että vähähappiset olosuhteet kasvattaisivat myös ruskuaispussin pinta-alaa fluoranteenialtistuksessa?

Matsonin ym. (2008) seeprakalan alkiokokeessa 500 µg FLU/l-altistus yhdessä 10 µg BaP/l kanssa kasvatti sydänpussin pinta-alaa verrattuna DMSO-kontrolliin tai pelkkään BaP-altistukseen ja erot olivat tilastollisesti merkitseviä eli seeprakalan poikasten altistaminen heikolle AHR-agonistille yhdessä CYP1A-inhibiittorin kanssa lisäsi sydänpussin pinta-alaa. Matsonin ym. (2008) tulos on saman suuntainen tämän kokeen tuloksen kanssa, jossa korkea AHR-agonistipitoisuus (32 µg RET/l) yhdessä korkean CYP1A-inhibiittoripitoisuuden (500 µg FLU/l)

kanssa kasvatti ruskuaispussin pinta-alaa 44 % verrattuna DMSO-kontrolliin ja se erosi tilastollisesti muista käsittelyistä (Kuva 6).

5.5 *Cyp1a1*-geeniekspressiomäärien vertailu

Tässä yhdeksän päivää kestäneessä kirjolohen poikasten altistuskokeessa *cyp1a1*-geeniekspressio kasvoi, kun reteenipitoisuus nousi 10 ja 32 µg RET/l (Kuva 7). Myös Hodsonin ym. (2007) kirjolohen poikasten altistuskokeessa reteenipitoisuuden nousu lisäsi CYP1A-proteiinien määrää. Koska reteeni on AHR-agonisti, sen tiedettiin lisäävän CYP1A-ekspressiota, kun altistuspitoisuus nousee.

Koska fluoranteeni on CYP1A-inhibiittori, niin lähtöoletus oli, että fluoranteeni ei lisää *cyp1a1*-ekspressiota. Myös tässä kokeessa todistettiin, etteivät korkeatkaan fluoranteenipitoisuudet (50 ja 500 µg FLU/l) lisänneet *cyp1a1*-ekspressiota kirjolohen poikasilla (Kuva 7). Matalimmassa fluoranteenipitoisuudessa (5 µg FLU/l) *cyp1a1*-geeniekspressio jopa laski alle kontrollitasojen ja Tukeyn HSD -testin mukaan niiden tulokset eivät olleet samankaltaiset (Kuva 7). Myös Matsonin ym. (2008) seeprakalojen alkiokokoon tulokset tukevat tämän kokeen tuloksia. Matsonin ym. (2008) seeprakalokokeessa ei korkea fluoranteenipitoisuus (500 µg/l) lisännyt alkioiden CYP1A-aktiivisuutta (EROD-aktiivisuutena mitattuna) verrattuna DMSO-kontrolliin. Taasen Hodsonin ym. (2007) kokeessa pelkkä ANF (CYP1A-inhibiittori) nosti CYP1A-proteiniipitoisuuden suuremmaksi kuin pelkkä reteenialtistus, mutta niiden yhteisvaikutus aiheutti kaikkein suurimman CYP1A-proteiiniipitoisuuden nousun kirjolohen poikasissa. Kun tässä kokeessa kirjolohen poikasia altistettiin yhdeksän päivän ajan reteenin lisäksi myös fluoranteenille, *cyp1a1*-geeniekspressio oli suurempi kuin pelkässä reteenialtistuksessa (Kuva 7). Taasen Hodsonin ym. (2007) kirjolohikokeessa myös ANF (CYP1A-inhibiittori) lisäsi CYP1A-proteiinien määrää alkioissa ($p = 0,006$), mutta CYP1A-proteiinituotanto oli suurempaa reteeni-ANF-yhteisaltistuksessa kuin yksittäisten yhdisteiden.

Matsonin ym. (2008) ja Hodsonin ym. (2007) tutkimustulokset ovat erisuuntaiset, joista toinen (Matson ym. 2008) tukee ja toinen (Hodson ym. 2007) ei tue tämän kokeen tuloksia, joissa *cyp1a1*-geeniekspressiomäärä lisääntyy, kun yhteisaltistuspitoisuudet kasvavat. Hodsonin ym. (2007) kokeessa tutkittiin CYP1A-proteiinipitoisuuksia myös todella korkeissa haitta-ainepitoisuuksissa jopa 300 µg RET/l ja 320 µg ANF/l. Selvä taitekohta, jossa CYP1A-proteiinipitoisuudet lähtivät laskuun, huomattiin siinä kohti, kun reteenipitoisuus oli 100 µg/l. Jos tässäkin kokeessa olisi testattu reteenin ja fluoranteenin yhteisvaikusta vielä suuremmissa reteenipitoisuuksissa kuten 150 µg RET/l, olisiko *cyp1a1*-geeniekspressiota lähtenyt vähentymään esim. Ret150+Flu500-altistuksessa? Tässä kokeessa voitiin nähdä vain *cyp1a1*-geeniekspression kasvu reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksien noustessa. Taasen Matsonin ym. (2008) seeprakalakoikeessa jo matala BaP-pitoisuus (10 µg/l) yhtä korkean fluoranteenipitoisuuden kanssa kuin tässä kokeessa (500 µg/l) vähensi CYP1A:n induktiota 46 % pelkkään BaP-altistukseen verrattuna. Erot tämän ja näiden muiden kokeiden (Hodson ym. 2007 ja Matson ym. 2008) voivat johtua sekä eri AHR-agonisti–CYP1A-inhibiittori-pareista sekä Matsonin ym. (2008) kokeen eri kalalajista (seeprakala). Kuitenkin Hodsonin ym. (2007) kokeen tulosten perusteella olisi voitu olettaa, että tässäkin kokeessa korkea fluoranteenipitoisuus (500 µg/l) yhdessä reteenin kanssa olisi selvästi vähentänyt *cyp1a1*-geeniekspressiota.

Timme-Laragy ym. (2007) tutkivat seeprakalakoikeessa, miten 1 µg BNF/l (AHR-agonisti) yhdessä 100 µg ANF/l (CYP1A-inhibiittorin) kanssa vaikuttavat alkioden CYP1A:n l-RNA määriin vuorokauden altistuksessa (24–48 hpf välillä). Timme-Laragy ym. (2007) kokeessa syntyi seeprakalojen alkioihin moninkerroin enemmän CYP1A:n l-RNA:ta kuin pelkässä BNF- tai ANF-altistuksessa. Vaikka tässä Timme-Laragyn ym. (2007) seeprakalojen alkiokoikeessa oli eri PAH-yhdisteet kuin tässä tutkimuksessa, tukevat tulokset sitä teoriaa, että PAH-yhdisteiden yhteisvaikutus on suurempi kuin altistus yksittäisille yhdisteille.

Myös nuorien ja tätä koetta isompien kirjolohen poikasten (1–3 g) altistaminen reteenille ja CYP1A-inhibiittorille (PBO) lisäsivät EROD-aktiivisuutta ja reteenin pitoisuutta poikasten kudoksissa (Hawkins ym. 2002). Reteenipitoisuuden nousu kudoksissa viittaa siihen, että reteenin metabolia ja erityisesti ovat estyneet, vaikka samaan aikaan EROD-aktiivisuus on lisääntynyt (Hawkins ym. 2002).

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Koska koejärjestelyt toimivat hyvin, voidaan tämän kokeen tuloksia kirjolohen poikasista mitattujen vasteiden osalta pitää varsin luotettavina. Vaikka reteeni- ja fluoraneenipitoisuuksien analysointi vesinäytteistä epäonnistui, niiden tulokset eivät kuitenkaan ole tämän työn keskiössä. Analysoitujen pitoisuuksien avulla olisi voitu todentaa käsittelyiden todelliset altistuspitoisuudet. Nyt tämän työn tulosten analysoinnissa ja käsittelyssä on käytetty laskennallisia reteeni- ja fluoranteenipitoisuuksia.

Tämän kokeen perusteella voidaan todeta, että reteeni ja fluoranteeni yhdessä vaikuttavat kirjolohen poikasten kasvuun, ja mitä suurempia altistuspitoisuudet ovat, sitä lyhyempiä poikaset ovat. Koska ruskuaispussien pinta-aloissa ei ollut käsittelyiden välillä eroa kuin vasta korkeimmassa Ret32+Flu500-altistuksessa, mutta poikasten pituuksissa oli eroa jo pienemmissäkin altistuspitoisuuksissa, voidaan tästä päätellä, että altistuspitoisuudesta riippumatta poikasilla on kulunut yhtä paljon energiaa, mutta energiaa on käytetty kasvun sijaan haitta-ainemetaboliaan. Korkeimmassa altistuksessa (Ret32+Flu500) oli ruskuaispussin ödeema jo niin vakava, että ruskuaispussiin kertynyt nestemäärä lisäsi ruskuaispussin pinta-alaa selvästi verrattuna matalampiin altistuspitoisuuksiin. Kun ruskuaispussin ödeema on näin vakava, se aiheuttaa poikaselle kudosaivourioita, ja sen takia on aika epätodennäköistä, että poikanen selviää aikuiseksi asti.

Koska molemmat PAH-yhdisteet reteeni ja fluoranteeni aiheuttivat kirjolohen poikasille BSD-oireita, joiden määrä sekä vakavuus lisääntyivät altistuspitoisuuksien noustessa, voidaan todeta, että ne ovat haitallisia kirjolohen poikasten varhaiskehitykselle ja niiden vaikutukset ovat todennäköisesti pitkäaikaisia ja peruuttamattomia. BSD-oireet heikentävät poikasten kuntoa ja pienentävät niiden selviytymismahdollisuuksia luonnossa. Selvät kehityshäiriöt esim. leuan epämuodostumat ja evien kuluminen voivat vaikuttaa mm. poikasten kykyyn syödä ja liikkua. On myös mahdollista, että häiriöt poikasten kehityksessä lisäävät niiden kuolleisuutta myöhemmissä elämän vaiheissa. Koska PAH-yhdisteet ovat tutkitusti haitallisia kalanpoikasille ja muille eliöille myös matalissa pitoisuuksissa, tulisi niiden päästöjä ympäristöön rajoittaa tiukemmin.

BSD- ja vakavuusindeksit sekä -prosentit ovat hyvä tapa kuvata BSD-oireiden määrää ja niiden vakavuutta, mutta BSD-oireiden arvioimiseen ja pisteytykseen ei ole tällä hetkellä olemassa selkeää ja yhtenevää tapaa eikä ohjeistusta, mikä aiheuttaa haasteita tutkimustulosten vertailulle. Koska jokainen PAH-yhdiste aiheuttaa sille tyypillisiä BSD-oireita kalanpoikasilla, myös esim. niiden esiintymistiheyksien vertailu olisi ollut kiinnostavaa tässä työssä.

Kustakin altistusastiasta analysoitiin vain kolmen kirjolohen poikasen *cyp1a1*-geeniekspressiot. Kunkin altistuskäsittelyn tulos oli aina yhdeksän poikasen keskiarvo, joka laskettiin kolmen rinnakkaisen koeastian poikasista. Jos loputkin 21 poikasta analysoitisiin, pienenesi *cyp1a1*-geeniekspressiomäärätulosten epävarmuus. Koska ainakin kahden käsittelyn (Ret3,2+Flu5 ja Ret10+Flu500) *cyp1a1*-geeniekspressiotulokset poikkesivat "viereisistä" pitoisuuksista, saataisiin analysoitujen poikasten määrää kasvattamalla lisättyä tulosten varmuutta. Myös poikasnäytteiden analysoinnissa tapahtuneet sekaannukset nukleaasitoomien ja steriilien vesien kanssa cDNA:n valmistuksessa ja PBS-puskuriveden käyttö joissakin RNA-näytteen etanolipesuissa voivat vaikuttaa epäloogisiin tuloksiin *cyp1a1*-geeniekspressiomäärissä käsittelyiden välillä.

Tutkimuksissa on saatu osittain ristiriitaisia tuloksia eri PAHien vaikutuksesta kalanpoikasten *cyp1a1*-geeniekspressiomääriin, CYP1A- tai EROD-aktiivisuuksiin sekä CYP1A-entsyymimääriin. PAH-seoksilla haitta-ainevasteet ja niiden voimakkuudet ovat aina erilaisia riippuen kalanpoikasen lajista, iästä, altistuksen kestosta sekä voimakkuudesta ja lisäksi poikasten välillä on yksilöllisiä eroja. PAHien toksisuusvasteisiin vaikuttavat sekä yksittäiset yhdisteet ja niiden ominaisuudet että erilaiset AHR-agonisti-CYP1A-inhibiittori-parit. Pelkästään AHR-agonistit voivat toimia joko heikkoina tai vahvoivat AHR-agonisteina riippuen siitä millainen toinen AH-reseptoriin tai solun toimintaan vaikuttava PAH-yhdiste on. Moninaiset seokset aiheuttavat monimutkaisia vasteita altistuseliöissä eikä niiden kaikkia mahdollisia vaikutuksia vielä edes tunneta.

Tämän työn tulokset AHR-agonistin ja CYP1A-inhibiittorin yhteisvaikutuksesta viittaavat siihen, että ne yhdessä lisäävät kirjolohen poikasilla kehitystoksisia oireita eikä CYP1A-inhibiittori vähennä reteenin metaboliatuotteiden haitallisuutta. Sekä reteeni että fluoranteeni lisäsivät kalanpoikasten BSD-oireita, mutta niiden täytyy toimia eri mekanismin kautta, koska fluoranteeni ei indusoi AH-reseptoria. Tämän kokeen tulokset antavat viitteitä siitä, että fluoranteeni inhiboi CYP1A-entsyymien toimintaa ja vähentää molempien haitta-aineiden metaboliaa, mikä johtaa pidentyneeseen AHR-aktivaatioon, kun AHR-agonisti (reteeni) pakotetaan toimimaan pidempään AH-reseptorilla. Tämä johtaa siihen, että "emoyhdisteiden" puoliintumisaika pitenee ja BSD-oireet lisääntyvät poikasilla.

Tätä samaa reteeni-fluoranteeni-altistusta voisi tutkia myös muillakin kalalajeilla ja vertailla ovatko toksisuusvasteet samanlaisia lajista riippumatta. Myös sitä voisi tutkia, että aiheuttaako reteeni korkeammissa pitoisuuksissa (> 32 µg RET/l) taitteen tai notkahduksen *cyp1a1*-geeniekspressiomääriin vai lisäisikö se vain poikasten kuolleisuutta? Lisäksi voisi tutkia eri PAH-yhdisteillä AHR-agonistin CYP1A-inhibiittorin yhteisvaikusta. Ovatko toksisuusvasteet samanlaisia? Myös AHR-antagonistin vaikutusta yhdessä toisen PAH-yhdisteen kanssa voisi tutkia.

Kuinka AH-reseptorille sopiva AHR-antagonisti, joka ei indusoi AH-reseptoria, vaikuttaa haitta-ainemetaboliaan ja toksisuusvasteisiin yhdessä AHR-agonistin (esim. reteeni) tai CYP1A-inhibiittorin (esim. fluoranteeni) kanssa?

KIITOKSET

Suurimmat kiitokset kuuluvat graduohjaajalleni Eeva-Riikka Vehniäiselle, joka on opettanut minulle paljon uusia laboratoriomenetelmiä vesi- ja poikasnäytteiden analysointia varten ja on jaksanut ohjata ja neuvoa sekä gradun kirjoitusprosessissa että tulosten analysoinnissa. Kiitos myös toiselle graduohjaajalleni Jussi Kukkoselle neuvoista ja näkökulmista työn suhteen sekä tsemppauksesta kirjoitusvaiheessa. Kiitän myös Jyväskylän yliopistoa Konnevesi-stipendistä, joka mahdollisti viikon ajan rauhallisen työskentelyn Konneveden tutkimusasemalla ja Ympäristötieteen laitosta tiloista, joissa Pro Gradun kokeellinen osuus voitiin suorittaa. Kiitokset kuuluvat myös kokeen valmistelevista töistä ja avusta laboratoriossa molemmille laboratoriomestareille Mervi Koistiselle ja Leena Siitolalle. Altistuskokeen aikana Cyril Rigaud auttoi minua vesien päivittäisessä vaihdossa ja kokeen päättämisessä. Hän myös pyyteettömästi oikoluki ja kommentoi englanninkielisen tiivistelmän eli iso kiitos myös Cyrilille avusta tämän Pro gradu -tutkielman kanssa.

KIRJALLISUUS

- Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Hahn, M.E., Heideman, W. & Peterson, R.E. 1999a. Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Evidence for differential expression and enhancer specificity. *The Journal of Biological Chemistry* (1999) 274(21):15159–15166.
- Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Heideman, W. Peterson, R.E. 1999b. Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells: Greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners. *Toxicology and Applied Pharmacology* (1999) 159:41–51.
- Achten, C. & Hofmann, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - A hardly recognized source of environmental contamination. *Science of the Total Environment* (2009) 407(8):2461–2473.
- Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide. 2001. Agilent Technologies, Inc. Edition 01/2013. Printed in Germany.
- Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R. & Rice, S. D. 2003. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicological Sciences* (2004) 78:60–67.
- Billiard, S.M., Querbach, K. & Hodson, P.V. 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* (1999) 18:2070–2077.
- Billiard, S. M., Timme-Laragy, A. R., Wassenberg, D. M., Cockman, C. & Di Giulio, R. T. 2006. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicological Sciences* 92(2):526–536.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J. & Schirmer, K. 2005. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Teoksessa: Mommsen T. P. & Moon T. W. (toim.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, The Netherlands, pp. 43–84.
- Brinkworth, L.C., Hodson, P.V., Tabash, S. & Lee, P. 2003. CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* (2008) 66(7):627–646.
- Brown, D.R., Bailey, J.M., Oliveri, A.N., Levin, E.D. & Di Giulio, R.T. 2016. Developmental exposure to a complex PAH mixture causes persistent behavioral effects in naive *Fundulus heteroclitus* (Killifish) but not in a

- population of PAH-adapted killifish. *Neurotoxicology and Teratology* (2016) 53:55–63.
- Brown, D.R., Clark, B.W., Garner, L.V.T. & Di Giulio, R.T. 2014. Zebrafish cardiotoxicity: the effects of the CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environmental Science Pollution Research* (2015) 22:8329–8338.
- Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M. & Collier, T.K. 2008. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic Toxicology* (2008) 88:121–127.
- Carlson, E. & Zelikoff, J.T. 2008. The immune system of fishes: A target organ of toxicity. Teoksessa: Di Giulio, R.T. & Hinton, D.E. (toim.), *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 489–529.
- Carney, S.A., Prasch, A.L., Heideman, W. & Peterson, R.E. 2006. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish Model. *Birth Defects Research, Part A* 76:7–18.
- Carvan, M.J., King-Heiden, T. & Tomasiewicz, H. 2005. Chapter 1 The utility of zebrafish as a model for toxicological research. Teoksessa: Mommsen T. P. & Moon T. W. (toim.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, The Netherlands, pp. 3–41.
- Celander, M.C. 2011. Cocktail effects of biomarker responses in fish. *Aquatic toxicology* (2011) 1055:72–77.
- Direktiivi 2000/60/EY. Neuvoston direktiivi 2000/60/EY yhteisön vesipolitiikan puitteista 23.10.2000. Saatavissa: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=celex:32000L0060>.
- Direktiivi 2008/105/EY. Neuvoston direktiivi 2008/105/EY ympäristönlaatuunormeista vesipolitiikan alalla 16.12.2008. Saatavissa: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=celex:32008L0105>.
- Donnelly, K.C. & Naufal, Z.S. 2010. Toxic and genotoxic effects of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. Teoksessa: Mumtaz, M. (toim.), *Principles and Practice of Mixtures Toxicology*, Germany: WILEY-VCH GmbH & Co., Germany, pp.485–512.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* (1996) 140:173–179.
- Fuoranthene. 2011. Fluoranthene EQS dossier. https://circabc.europa.eu/webdav/CircaBC/env/wfd/Library/framework_directive/thematic_documents/priority_substances/supporting_substances/eqs_dossiers (luettu 26.11.2017)

- Fluoranthene. 2017. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. CID=9154. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9154> (luettu 25.12.2017)
- Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M. & Correia, A.D. 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* (2008) 108:205–213.
- Gräns, J., Wassmur, B. & Celander, M.C. 2010. One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology* (2010) 100:263–270.
- Hahn, M.E. 2001. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: Insights from fish and other non-traditional models. *Marine Biotechnology* (2001) 3:S224–S238.
- Hahn, M.E. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* (2002) 141:131–160.
- Hahn, M.E., Merson, R.R. & Karchner, S.I. 2005. Chapter 7 Xenobiotic receptors in fish: Structural and functional diversity and evolutionary insights. Teoksessa: Mommsen T. P. & Moon T. W. (toim.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, The Netherlands, pp. 191–228.
- Hahn, M.E. & Hestermann, E.V. 2008. Receptor-mediated mechanisms of toxicity. Teoksessa: Di Giulio, R.T. & Hinton, D.E. (toim.), *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 235–272.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I. & Merson, R.R. 2017. Diversity as opportunity: Insights from 600 million years of AHR evolution. *Current Opinion in Toxicology* (2017) 2:58–71.
- Hawkins, S.A., Billiard, S.M., Tabash, S.P., Brown, R.S. & Hodson, P.V. 2002. Altering cytochrome P450 activity effects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in Rainbow trout (*ONCORHYNCHUS MYKISS*). *Environmental Toxicology and Chemistry* (2002) 21(9):1845–1853.
- Hodson, P.V., Qureshi, K., Noble, C.A.J., Akhtar, P. & Brown, R.S. 2007. Inhibition of CYP1A enzymes by α -naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* (2007) 81:275–285.
- Hyötyläinen, T. & Oikari, A. 1998. The toxicity and concentrations of PAHs in creosote-contaminated lake sediment. *Chemosphere* (1999) 38(5):1135–1144.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K. & Scholz, N.L. 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2006) 217:308–321.

- Johnson, L.L., Arkoosh, M.R., Bravo, C.F., Collier, T.K., Krahn, M.M., Meador, J.P., Myers, M.S., Reichert, W.L. & Stein, J.E. 2008. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from Puget Sound, Washington. Teoksessa: Di Giulio, R.T. & Hinton, D.E. (toim.), *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 877–923.
- Jayasundara, N., Van Tiem Garner, L., Meyer, J.N., Erwin, K.N. & Di Giulio R.T. 2015. AHR2-mediated transcriptomic responses underlying the synergistic cardiac developmental toxicity of PAHs. *Toxicological Sciences* (2015) 143(2):469–481.
- King-Heiden, T.C., Mehta, V., Xiong, K.M., Lanham, K.A., Antkiewicz, D.S., Ganser, A., Heideman, W. & Peterson, R.E. 2011. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2012) 354:121–138.
- King-Heiden, T.C., Vatsal, M., Xiong, K.M., Kevin, A.L., Antkiewicz, D.S., Ganser, A., Heideman, W. & Peterson, R.E. 2012. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2012) 354:121–138.
- Kujala, S. 2012. Metsäteollisuuden saastuttaman sedimentin vaikutus kirjoloohen (*Oncorhynchus mykiss*) varhaiskehitykseen. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto.
- Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H. & Cachot, J. 2014. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environmental Science and Pollution Research* (2014) 21:13720–13731.
- Legler, J., van Velzen, M., Cenijn, P.H., Houtman, C.J., Lamoree, M.H. & Wegener, J.W. 2011. Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* (2011) 45(19):8552–8558.
- Leppänen, H. & Oikari, O. 1999. Occurrence of retene and resin acids in sediments and fish bile from a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* (1999) 18:1498–505.
- 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* (2000) 49:199–212.
- Li, J., Shang, X., Zhao, Z., Tanguay, R.L., Dong, Q. & Huang, C. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil and plants of the Aojiang river waterway in Wenzhou, China. *Journal of Hazard Materials* (2010) 173(1–3):75–81.
- Lima, A.L.C., Eglinton, T.I. & Reddy, C.M. 2003. High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century. *Environmental Science Technology* (2003) 37:53–61.

- Manzetti, S. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: Environmental fate and transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds* (2013) 33(4):311–330.
- Matson, C.W., Timme-Laragy, A.R. & Di Giulio, R.T. 2008. Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* (2008) 74:149–154.
- Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. 2003. Functional role of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003) 1619:263–268.
- Mohammed, A. 2013. Chapter 3 Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults? New Insights into toxicity and drug testing. Sivakumar Gowder (toim.) InTech. <https://www.intechopen.com/books/new-insights-into-toxicity-and-drug-testing/why-are-early-life-stages-of-aquatic-organisms-more-sensitive-to-toxicants-than-adults-> (luettu 2.2.2018)
- Mu, J., Jin, F., Ma, X., Lin, Z. & Wang, J. 2014a. Comparative effects of biological and chemical dispersants on the bioavailability and toxicity of crude oil to early life stages of marine medaka (*Oryzias Melastigma*). *Environmental Toxicology and Chemistry* (2014) 33(11):2576–2583.
- Mu, J., Wang, J., Jin, F., Wang, X. & Hong, H. 2014b. Comparative embryotoxicity of phenanthrene and alkyl-phenanthrene to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Marine Pollution Bulletin* (2014) 85(2):505–515.
- Mumtaz, M.M., Suk, W.A. & Yang, R.S. H. 2010. Introduction to mixtures toxicology and risk assessment. Teoksessa: Mumtaz, M. (toim.), *Principles and Practice of Mixtures Toxicology*, WILEY-VCH GmbH & Co., Germany pp. 1–25.
- OECD guideline for testing or chemicals. 1992. Fish, early-life stage toxicity test, 210. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948269.pdf> (luettu 25.3.2018).
- Ohje. 2014. Product: TRI REAGENT® - RNA/DNA/Protein isolation reagent. Cat. No: TR 118. May 2014.
- Peterson, R.E., Theobald, H.M. & Kimmel, G.L. 1993. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparison. *Critical Reviews in Toxicology* (1993) 23(3):283–335.
- Philip, B.K., Anand, S.S. & Mehendale, H.M. 2010. Toxicodynamic interactions. Teoksessa: Mumtaz, M. (toim.), *Principles and practice of mixtures toxicology*, WILEY-VCH GmbH & Co., Germany, pp. 159–206.
- Pikkarainen, A.-L. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Baltic Sea sediments. *Polycyclic aromatic compounds* (2004) 24(4-5):667–679.
- Powell, W.H. & Hahn, M.E. 2000. The evolution of aryl hydrocarbon signaling proteins: diversity of ARNT isoforms among fish species. *Marine Environmental Research* (2000) 50:39–44.

- Ravindra, K., Sokhi, R. & Van Grieken, R. 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* (2008) 42:2895–2921.
- Retene. 2017. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. CID=10222. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10222> (luettu 25.12.2017).
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., van den Hurk, P. & Willett, K. 2008. Bioinformatics in fishes. Teoksessa: Di Giulio, R.T. & Hinton, D.E. (toim.), *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 153–234.
- Scott, J.A. & Hodson, P.V. 2008. Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and α -naphthoflavone. *Aquatic Toxicity* (2008) 88:200–206.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. & Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(11):8022–8028.
- Spehar, R.L., Poucher, S., Brooke, L.T., Hansen, D.J., Champlin, D. & Cox, D.A. 1999. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1999) 37:496–502.
- Staskal, D.F., Birnbaum, L.S. & Haws L.C. 2010. Application of a relative potency factor approach in the assessment of health risks associated with exposures to mixtures of dioxin-like compounds. Teoksessa: Mumtaz, M. (toim.), *Principles and practice of mixtures toxicology*, WILEY-VCH GmbH & Co., Germany, pp. 67–97.
- Stout, S.A., Emsbo-Mattingly, S.D., Douglas, G.S., Uhler, A.D. & McCarthy, K.J. 2015. Beyond 16 priority pollutant PAHs: A review of PACs used in environmental forensic chemistry. *Polycyclic aromatic compounds* (2015) 35(2–4):258–315.
- Timme-Laragy, A.R., Cockman, C.J., Matson, C.W. & Di Giulio, R.T. 2007. Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. *Aquatic Toxicology* (2007) 85:241–250.
- van Metre, P.C. & Mahler, B.J. 2005. Trends in hydrophobic organic contaminants in urban and reference lake sediments across the United States, 1970–2001. *Environmental Science and Technology* (2005) 39(15):5567–5574.
- Van Veld, P.A. & Nacci, D.E. 2008. Toxicity resistance. Teoksessa: Di Giulio, R.T. & Hinton, D.E. (toim.), *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 597–641.

- Vandenbrouck, T., Jones, O.A.H., Dom, N., Griffin, J.L. & De Coen, W. 2010. Mixtures of similarly acting compounds in *Daphnia magna*: From gene to metabolite and beyond. *Environmental International* (2010) 36:254–268.
- Vehniäinen, E.-R., Bremer, K., Scott, J.A., Junttila, S., Laiho, A., Gyenesei, A., Hodson, P.V. & Oikari, A.O.J. 2015. Retene causes multifunctional transcriptomic changes in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2016) 41:95–102.
- Wassenberg, D.M. & Di Giulio, R.T. 2004. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Health Perspectives* (2004) 112(17):1658–1664.
- Zhang, Y., Wang, C., Huang, L., Chen, R., Chen, Y. & Zuo, Z. 2012. Low-level pyrene exposure causes toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* (2012) 114–115:119–124.
- Xu, C., Yong-Tao, C. & Kong A.-N.T. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* (2005) 28(3):249–268.

LIITE 1. Koeastiakartta

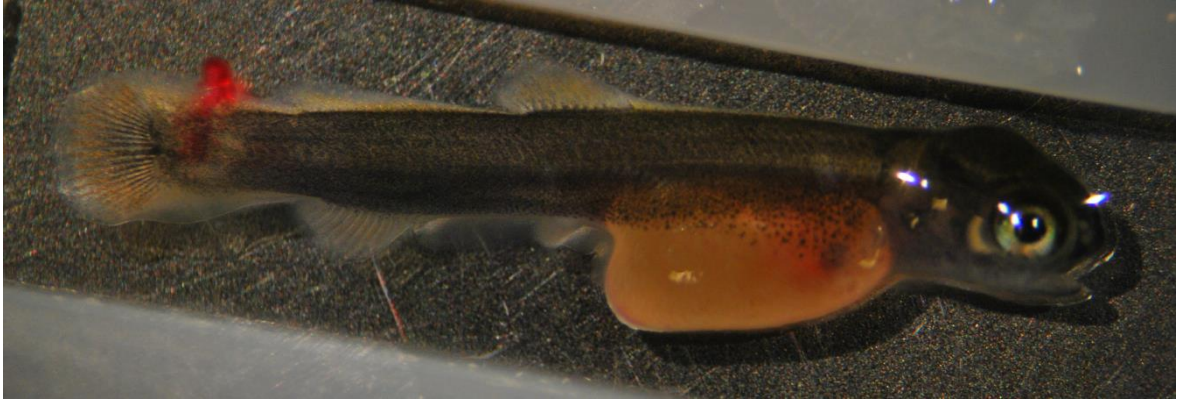
takaseinä

R3,2+F5 C	Ctrl B		R10+F5 B	R10+F5 A
R3,2+F5 A	R3,2+F5 B		R32+F5 A	R10+F5 C
F500 B	F500 C		R32+F5 C	R32+F5 B
F50 C	F500 A		R3,2+F50 A	DMSO B
F50 A	F50 B		R3,2+F50 C	R3,2+F50 B
F5 B	F5 C		R10+F50 B	R10+50 A
DMSO A	F5 A		R32+F50 A	R10+F50 C
R32 B	R32 C		R32+F50 C	R32+F50 B
R10 C	R32 A		R3,2+F500 B	R3,2+F500 A
R10 A	R10 B		Ctrl C	R3,2+F500 C
R3,2 C	Ctrl A		R10+F500 B	R10+F500 A
R3,2 A	R3,2 B		R32+F500 A	R10+F500 C
			R32+F500 C	R32+F500 B
			Ctrl D	DMSO C

R=reteeni
 F=fluoranteeni
 A,B,C=rinnakkaiskäsitteyt, toistot

ovi

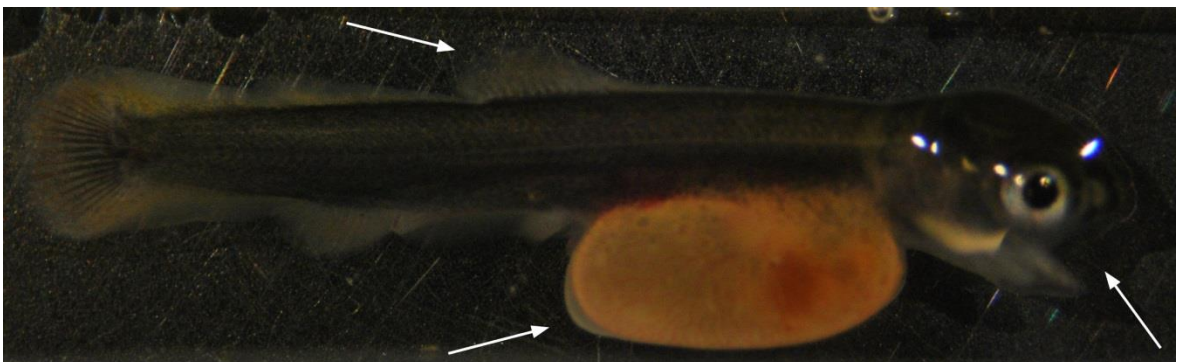
LIITE 2. Esimerkkikuvat ruskuaispussitaudin oireiden määrittämisestä sekä pituuden ja pinta-alan mittaamisesta kirjolohen (*Ochorhynchus mykiss*) poikasista



Poikanen 1. DMSO-kontrollivuu'an poikanen, jolla ei ole ruskuaispussitaudin oireita. Pyrstön verenvuoto johtuu liian voimakkaasti käsittelystä pinseteillä.

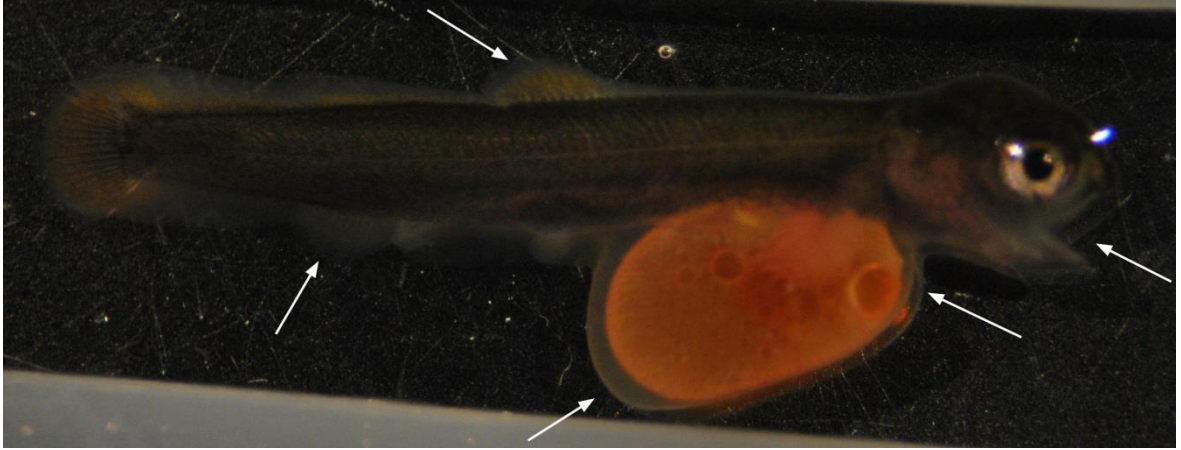


Poikanen 2. Reteenialtistuksessa ($3,2 \mu\text{g RET/l}$) ollut poikanen, jolla on verenpurkauma silmän vieressä (ylempi nuoli, oirepiste: 1) ja pientä nestekertymää sydänpussissa (alempi nuoli, oirepiste: 1).

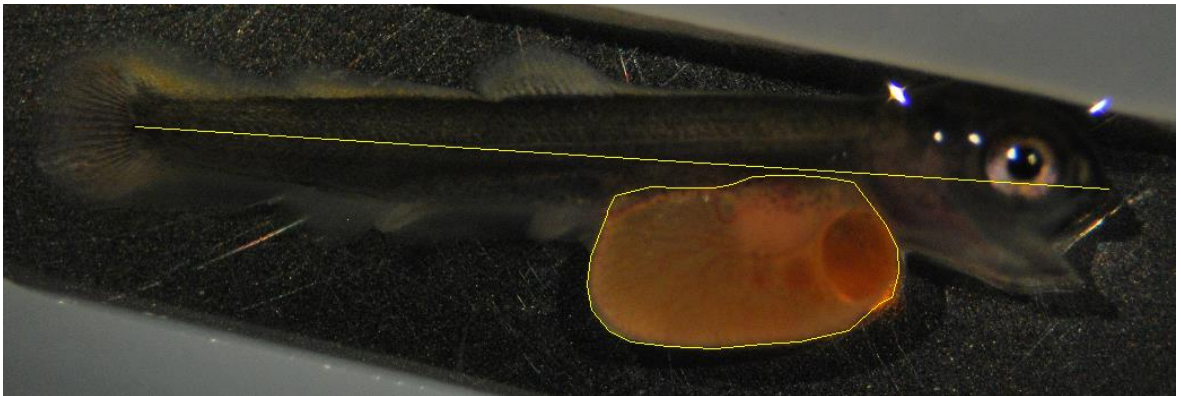


Poikanen 3. Fluoranteenialtistuksessa ($500 \mu\text{g FLU/l}$) ollut poikanen, jolla on hieman ruskuaispussin ödemaa, jonka huomaa pyöreästä ruskuaispussin

muodosta ja nestekertymästä ruskuaispussin takaosassa (alempi nuoli, oirepiste: 1). Vaikka poikasella ei ole pään alueella verenpurkauksia, on päässä epämuodostumia todennäköisesti alaleuan rakenteessa, jotka aiheuttavat selvän muutoksen suun asentoon (nuoli oikealla, oirepiste: 2). Selkäevä näyttää normaalilta (oirepiste: 0).



Poikanen 4. Poikaselle, joka on ollut korkeimmassa reteenin ja fluoranteenin yhteisaltistuksessa ($32 \mu\text{g RET/l} + 500 \mu\text{g FLU/l}$), on tullut useita ruskuaispussitautin oireita. Ruskuaispussin ympärille on kertynyt selvästi nestettä (nuoli alhaalla keskellä, oirepiste: 2). Myös sydänpussiin on kertynyt runsaasti nestettä ja se on levinnyt ruskuaispussia myöten alaspäin (toinen nuoli oikealta, oirepiste: 2). Poikasen pää ja leuka ovat epämuodostuneet (oikeanpuoleinen nuoli, oirepiste: 2). Myös selkä- ja rasvaevä ovat selvästi kuluneet (ylin nuoli ja vasen alanuoli, oirepiste: 1).



Poikanen 5. Poikasten pituus mitattiin nenän päästä pyrstön päähän ja tulos saatiin pikselinä. Ruskuaispussin pinta-ala mitattiin piirtämällä ImageJ-piirto-ohjelman polygon-työkalulla ruskuaispussin ääriviivat ja pinta-alan tulos saatiin pikselimääränä.

LIITE 3. Reteenin ja fluoranteenin laimennossarjojen valmistus standardisuorien määrittystä varten (vesinäytteiden luminesenssispektrometri-analyysit)

Reteeni- ja fluoranteenilaimennokset tehtiin Konnevesi-järven järviveden ja EtOH (ETAX Aa, min. 99,5 paino-%) 1+1-seoksella, joilloin järviveden etanolipitoisuus oli 50 %.

Reteenin laimennossarjan valmistus:

Kantaliuos 1: $3,2 \text{ mg RET/ml} = 3,2 \text{ } \mu\text{g RET}/\mu\text{l}$

Kantaliuos 2: $10 \text{ } \mu\text{l kantaliuos1} + 25 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 10 \text{ } \mu\text{l} * 3,2 \text{ } \mu\text{g RET}/\mu\text{l} / 25 \text{ ml} = 1,28 \text{ } \mu\text{g RET/ml} = 1280 \text{ } \mu\text{g RET/l}$

Kantaliuos 3: $1 \text{ ml kantaliuos2} + 9 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 1280 \text{ } \mu\text{g RET/l} / 10 = 128 \text{ } \mu\text{g RET/l}$

1:5 -laimennos: $2 \text{ ml kantaliuos3} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 128 \text{ } \mu\text{g RET/l} / 5 = 25,6 \text{ } \mu\text{g RET/l}$

1:25 -laimennos: $2 \text{ ml 1:5-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 5,12 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:125 -laimennos: $2 \text{ ml 1:25-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 1,024 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:625 -laimennos: $2 \text{ ml 1:125-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 0,2048 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:3125 -laimennos: $2 \text{ ml 1:625-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 0,04096 \text{ } \mu\text{g/l}$

Fluoranteenin laimennossarjan valmistus:

Kantaliuos 1: $5,0 \text{ mg FLU/ml}$

Kantaliuos 2: $8 \text{ } \mu\text{l kantaliuos1} + 20 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 0,008 \text{ ml} * 5 \text{ mg FLU/ml} = 0,04 \text{ mg FLU/ml} / 20 \text{ ml} = 0,002 \text{ mg FLU/ml} = 2 \text{ mg FLU} / 1 = 2000 \text{ } \mu\text{g FLU/l}$

1:5 -laimennos: $2 \text{ ml kantaliuos2} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 400 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:25 -laimennos: $2 \text{ ml 1:5-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 80 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:125 -laimennos: $2 \text{ ml 1:25-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 16 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:625 -laimennos: $2 \text{ ml 1:125-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 3,2 \text{ } \mu\text{g/l}$

1:3125 -laimennos: $2 \text{ ml 1:625-laimennosta} + 8 \text{ ml Konnevesi-EtOH} = 0,64 \text{ } \mu\text{g/l}$