



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Iida Huovinen

Trinitrotolueenin vaikutus sinisimpukan (*Mytilus trossulus*) metabolia- entsyymiaktiivisuuteen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

28.10.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	lida Huovinen Trinitrotolueenin vaikutus sinisimpukan (<i>Mytilus trossulus</i>) metaboliaentsyymiaktiivisuuteen 28 sivua 28.10.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	tutkijatohtori Raisa Turja lehtori Tiina Soininen
<p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön menetelmät kolmen eri metaboliaentsyymien aktiivisuuden määrittämiseksi trinitrotolueenille (TNT) altistettujen sinisimpukoiden (<i>Mytilus trossulus</i>) lihasnäytteistä. Kiinnostuksen kohteena olivat anaerobiseen energia-aineenvaihduntaan osallistuvat oktopiinidehydrogenaasi (ODH) ja fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi (PEPCK) sekä aerobiseen energia-aineenvaihduntaan osallistuva pyruvaattikinaasi (PK). Työn tavoitteena oli myös tutkia, ilmentääkö TNT:lle altistuminen muutoksia simpukan normaalissa energia-aineenvaihdunnassa. Työ tehtiin Suomen ympäristökeskuksen merikeskuksessa.</p> <p>Sinisimpukat altistettiin erilaisille TNT-pitoisuuksille kahdessa kestoltaan erilaisessa kokeessa: kroonisessa ja akuutissa altistuskokeessa. Metaboliaentsyymiaktiivisuudet määritettiin simpukoiden lihasnäytteistä spektrofotometrisillä menetelmillä. PK- ja PEPCK-aktiivisuudet määritettiin valmiilla kaupallisilla tuotteilla ja ODH-aktiivisuus tieteellisten artikkelien pohjalta kootulla menetelmällä.</p> <p>Entsyymiaktiivisuusanalyysissä tilastollisesti merkitseviä eroja havaittiin kaikissa TNT-pitoisuuksissa PEPCK-aktiivisuuksien osalta kontrollikäsittelyjen sekä näytekäsittelyjen välillä. PK-aktiivisuuksien osalta tilastollisesti merkitsevästi erosi yksi näytekäsittely, jossa TNT-pitoisuus oli 0,62 mg/l. ODH-aktiivisuuksissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja kontrolli- ja näytekäsittelyjen välillä.</p> <p>Menetelmät osoittautuivat toimiviksi, ja entsyymiaktiivisuudet saatiin määritettyä jokaisen metaboliaentsyymien osalta. Toimivuudesta huolimatta kaupallisten tuotteiden käytön mielekkyyttä tulevaisuudessa tulee kuitenkin vielä arvioida, sillä tässä työssä käytettyjen tuotteiden protokollien reaktiolämpötilat erosivat toisistaan. Käyttöön tulisi valita sellaiset menetelmät, joissa mittaukset voitaisiin suorittaa samassa lämpötilassa, mikä tekisi saaduista tuloksista keskenään vertailukelpoiset.</p>	
Avainsanat	biomarkkeri, entsyymiaktiivisuus, <i>Mytilus trossulus</i> , ODH, PEPCK, PK, TNT

Author Title	Iida Huovinen The Effect of Trinitrotoluene on the Metabolic Enzyme Activity of the Blue Mussel (<i>Mytilus trossulus</i>).
Number of Pages Date	28 pages 28 October 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Raisa Turja, Scientist Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The aim of this thesis project was to introduce methods for determination of metabolic enzyme activity in muscle tissue samples of the blue mussel (<i>Mytilus trossulus</i>) after the mussels were exposed to trinitrotoluene (TNT). The enzymes studied were octopine dehydrogenase (ODH) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which function in the anaerobic metabolic pathways, and pyruvate kinase (PK) which is involved in aerobic glycolysis. The goal of the study was to evaluate the effect of a harmful substance to mussels' normal energy metabolism. This thesis project was implemented in the Marine Research Centre of the Finnish Environment Institute.</p> <p>The mussels were exposed to variable TNT concentrations in two different experiments: Acute Toxicity and Chronic Toxicity. The enzyme activity analyses were performed with spectrophotometric methods. The activity of PK and PEPCK were measured with commercial products and the method for measuring ODH activity was developed after literature review of scientific publications.</p> <p>Significant differences in PEPCK activity results were observed in all sample treatments within both acute and chronic toxicity experiments. In acute toxicity experiment, one sample treatment showed significant differences in PK activity results in TNT concentration of 0.62 mg/L. No significant differences were observed in ODH activity results.</p> <p>The methods implemented in enzyme activity analyses proved to be suitable for intended use, and all enzyme activities were determined successfully. However, the utilization of the two commercial products in the future should be evaluated carefully. The reaction temperature between the two tested protocols differed, which makes the obtained results incomparable. Compatible methods should be chosen to properly evaluate the PK/PEPCK ratio in the samples.</p>	
Keywords	biomarker, enzyme activity, <i>Mytilus trossulus</i> , ODH, PEPCK, PK, TNT

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Itämereen upotetut sotatarvikkeet ja taistelukemikaalit	2
3	Itämeren sinisimpukka (<i>Mytilus trossulus</i>)	4
4	Energiatasapainon vaikutus eliön stressinsietokykyyn	5
5	Biomarkkerit	6
5.1	Pyruvaattikinaasi	7
5.2	Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi	8
5.3	Oktopiinidehydrogenaasi	9
6	Materiaalit ja menetelmät	10
6.1	Näytteiden homogenisointi	12
6.2	Totaaliproteiinipitoisuuden määrittäminen	13
6.3	ODH-aktiivisuuden määrittäminen	13
6.4	PEPCK-aktiivisuuden määrittäminen	14
6.5	PK-aktiivisuuden määrittäminen	14
6.6	Tilastolliset menetelmät	15
7	Tulokset ja tilastollinen analyysi	15
7.1	Akuutti toksisuus	15
7.2	Krooninen toksisuus	18
7.3	PK/PEPCK-suhde	22
8	Yhteenveto ja johtopäätökset	23
	Lähteet	26

Lyhenteet

2-ADNT	2-aminotrinitrotolueeni. Trinitrotolueenin hajoamistuote.
4-ADNT	4-aminotrinitrotolueeni. Trinitrotolueenin hajoamistuote.
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> . Naudan seerumialbumiini. Veren plasmassa esiintyvä proteiini.
DDT	Diklooridifenyylitrikloorietaani. Hyönteismyrkky.
DTT	Ditiotreitoli. Biokemiallisessa analytiikassa käytettävä reagenssi.
HELCOM	<i>Baltic Marine Environment Protection Commission</i> . Itämeren merellisen ympäristön suojelukomissio (Helsinki-komissio).
NAD+	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi. Monissa biokemiallisissa reaktioissa hapetus-pelkistystasapainon säätelyyn osallistuva koentsyymi.
NADH	NAD+:n pelkistynyt eli elektronin vastaanottanut muoto.
ODH	<i>Octopine dehydrogenase</i> . Oktopiinidehydrogenaasi. Solun hapetus-pelkistystasapainon ylläpitoon osallistuva entsyymi.
PEP	<i>Phosphoenolpyruvate</i> . Fosfoenolipyruvaatti.
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> . Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi. Anaerobisiin metaboliareaktioihin osallistuva entsyymi.
PK	<i>Pyruvate kinase</i> . Pyruvaattikinaasi. Glykolyysin viimeistä vaihetta katalysoiva entsyymi.
SYKE	Suomen ympäristökeskus.
TNT	Trinitrotolueeni. Vesiliukoinen räjähdysaine.

1 Johdanto

Itämeri on yksi maailman suurimmista murtovesialueista. Se on pinta-alaltaan noin 420 000 km², ja sen valuma-alue lähes neljä kertaa suurempi. Suuren valuma-alueensa ja eristäytyneen sijaintinsa vuoksi Itämeren suolapitoisuus on matala, ja veden vaihtuminen tapahtuu hitaasti. Suolapitoisuus on suurinta meren länsiosissa, jossa meri yhtyy Pohjanmereen, sekä sen sisäosien syvimmissä kohdissa. Kolmannes Itämerestä on kuitenkin syvyydeltään vain alle 30 metriä. [1, s. 12.] Ominaisuuksiensa ansiosta Itämeri muodostaa ainutlaatuisen, mutta myös haavoittuvaisen ekosysteemin.

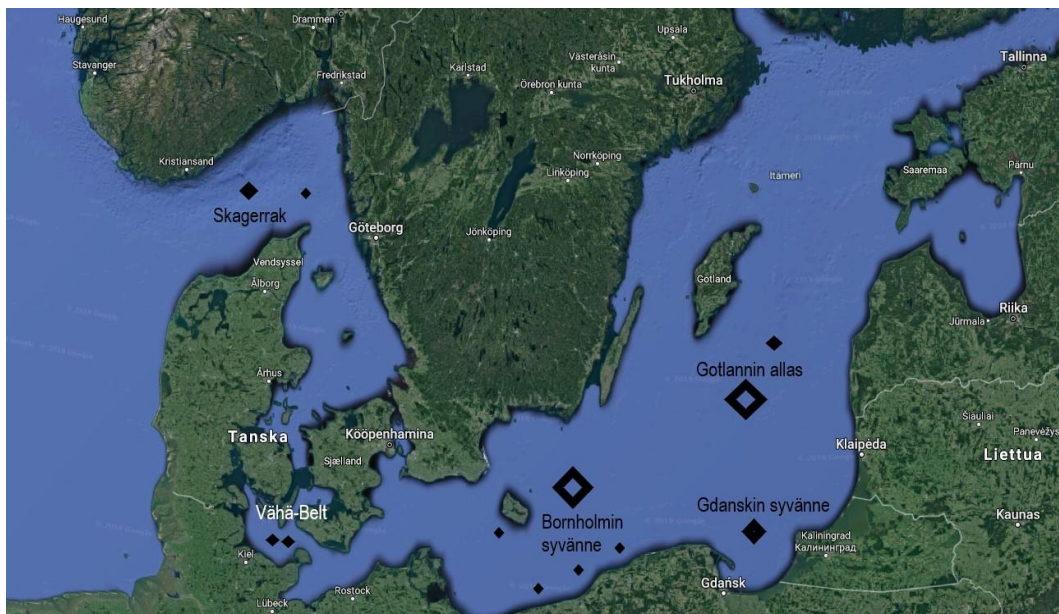
Itämeren valuma-alueella asuu noin 85 miljoonaa ihmistä, jolloin ihmistoiminta asettaa suuren paineen meren hyvinvointia kohtaan. Huomionarvoisia Itämeren tilaan vaikuttavia tekijöitä on sekä luonnollisista että ihmisperäisistä syistä johtuva rehevöityminen, mutta myös täysin ihmistoiminnasta aiheutuva roskien ja haitallisten aineiden kulkeutuminen mereen. [1, s. 4–7.] Osa näistä haitallisista aineista pitää sisällään mereen upotettuja ensimmäisen ja toisen maailmansodan aikaisia räjähd- ja ammustarvikkeita.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa käyttöön menetelmät kolmen eri metaboliaentsyymin aktiivisuuden määrittämiseksi trinitrotolueenille (TNT) altistettujen sinisimpukoiden lihasnäytteistä. Tuloksia lähestyttiin biomarkeritutkimuksen näkökulmasta, ja työn tavoitteena oli myös arvioida TNT:n vaikutusta eliön aerobisen energia-aineenvaihdunnan säätelyyn. Työ tehtiin SYKEN merikeskuksessa Merien saastuminen -yksikössä.

2 Itämereen upotetut sotatarvikkeet ja taistelukemikaalit

Toisen maailmansodan jälkeen Potsdamin konferenssissa Yhdysvallat, Neuvostoliitto ja Iso-Britannia päättivät sodan hävinneen Saksan demilitarisoinnista. Potsdamin sopimuksen seurauksena Saksan oli hankkiuduttava eroon suuresta määrästä ammuksia, räjähteitä sekä taistelukemikaaleja loppusijoittamalla näistä osa Itämereen. [2, s. 15.] Kokonaisuudessaan sotatarvikkeita takavarikoitiin Saksan alueelta lähes 300 000 tonnia, mutta puutteellisen dokumentoinnin vuoksi tuhottujen, maalle säilyttyjen tai mereen upotettujen ammusten ja taistelukemikaalien määriä ei ole voitu eritellä tarkasti. [3, s. 9.]

Arvioiden mukaan 50 000 tonnia ammus- ja räjähdetarvikkeita on upotettu eri puolille Itämeren. Määrän arvioidaan sisältäneen noin 15 000 tonnia taistelukemikaaleja, kuten sinappikaasua ja tabuunia. Suurin osa ammustarvikkeista on upotettu Bornholmin syvänteeseen ja sen lähiympäristöön, mutta muita upotuspaikkoja ovat Tanskan Vähä-Belt, Gotlannin allas ja Gdanskin syvänte, joista viimeksi mainittu on toiminut epävirallisena upotuspaikkana. Osa hävitettävistä materiaaleista on tiedettävästi heitetty mereen jo laivareittien varrelle, kun alukset ovat olleet vielä matkalla varsinaisille upotuspaikoille. [2, s. 16.] Kuvassa 1 on esitetty merkittävimmät viralliset sekä epäviralliset upotuspaikat Itämerellä ja Pohjanmeren itäosissa.

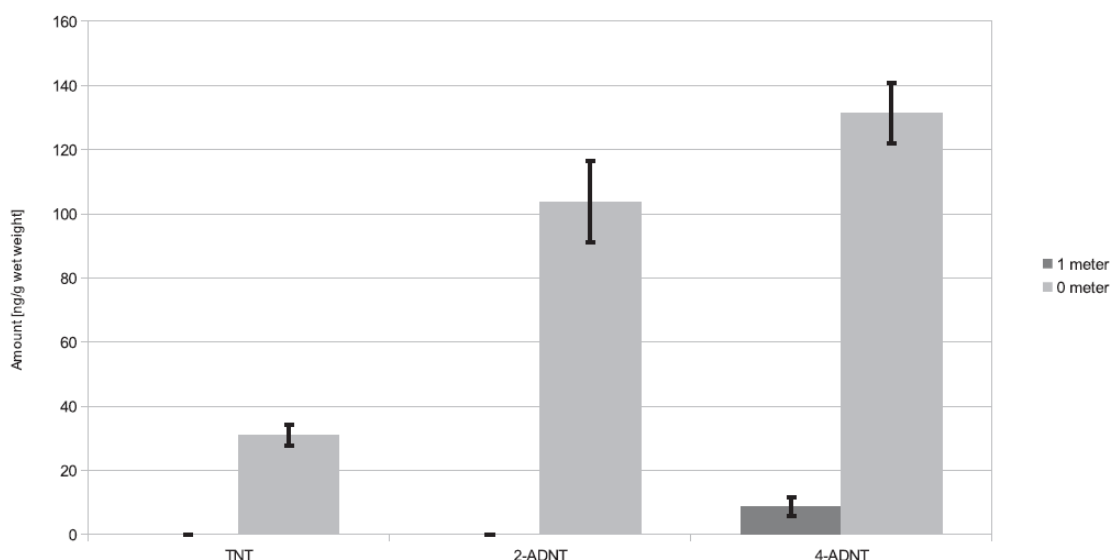


Kuva 1. Merkittävimmät sotatarvikkeiden upotuspaikat Itämerellä ja Pohjanmeren itäosassa. [2, s. 17.] Karttapohja on peräisin Google Maps -palvelusta.

Ammus- ja räjähdetarvikkeet sekä niiden sisältämät taistelukemikaalit vaihtelevat jonkin verran upotuspaikan mukaan. Bornholmin syvänteeseen on upotettu noin 90 % kaikista upotetuista taistelukemikaaleista, ja niistä suurin osa on sinappikaasua. Tanskan Vähä-Beltin alueelle on upotettu noin 5 000 tonnia ammustarvikkeita, jotka sisälsivät arviolta 750 tonnia taistelukemikaaleja. [2, s. 18.] Kaikki ammustarvikkeet sisälsivät myös räjähdysaineita, kuten TNT:tä, joten upottamisen seurauksena sitä päätyi mereen arviolta satoja tonneja. Mereen päätyneen TNT:n lopullista määrää on vaikea arvioida.

Suomenlahti puolestaan oli toisen maailmansodan jälkeen raskaasti miinoitettu, ja lahden pohjalla makaa sotalaivojen ja sukellusveneiden hylkyjä, jotka sisältävät runsaasti ammuksia. Upotetuista ammuksista ja räjähtämättömistä miinoista tiedetään vapautuvan TNT:tä ympäristöön, minkä vuoksi TNT:n toksiset vaikutukset merieliöihin on kiinnostava tutkimuskohde myös Suomen merialueilla.

TNT on vesiliukoinen räjähdysaine, jonka vaikutuksia merieliöiden hyvinvointiin on selvitetty suhteellisen vähän. TNT:tä vapautuu ympäristöön upotetuista ammustarvikkeista esimerkiksi korroosion seurauksena, kun ammusten tai niiden säilytystynnyreiden kuoret hapettuvat ja rikkoutuvat. [4, s. 117.] Tutkimuksissa on pystytty osoittamaan TNT:n myrkyllisyys useille eri merieliölajeille, joten veteen liukenevien räjähdysaineiden voidaan sanoa uhkaavan merieliöiden hyvinvointia. [5.] Simpukkatutkimuksissa on myös havaittu, että TNT ja erityisesti sen hajoamistuotteet kertyvät tehokkaasti simpukan kudoksiin, eli eliöt altistuvat sedimenttiin ja veteen liuenneelle räjähdysaineelle. [4, s. 118.] Kuvassa 2 on esitetty eräässä tutkimuksessa osoitettu TNT:n ja sen hajoamistuotteiden 2-aminodinitrotolueenin (2-ADNT) sekä 4-aminodinitrotolueenin (4-ADNT) biokertyminen sinisimpukoissa.



Kuva 2. TNT:n ja sen hajoamistuotteiden biokertyminen simpukoissa (*Mytilus edulis*) sedimentissä ja vesikerroksessa. [4, s. 121.]

Kuvassa on esitetty TNT:n ja sen hajoamistuotteiden kertyminen simpukoihin eri syvyyksissä, sedimentissä (0 m) sekä vesikerroksessa (1 m pohjasta). Kuvasta voidaan nähdä TNT:n hajoamistuotteiden kertyminen simpukoihin sedimentissä, sillä 2-ADNT- ja 4-ADNT-pitoisuudet ovat huomattavasti lähtöaineen pitoisuutta korkeammat. Vesikerroksessa simpukoihin on kertynyt vain hajoamistuotetta (4-ADNT:tä), mikä kertoo siitä, että TNT kertyy eliöihin tehokkaammin sedimentin välityksellä.

Lisää tutkimusta tarvitaan, jotta voidaan ymmärtää paremmin räjähdysaineiden vaikutuksia eliöiden hyvinvointiin yksilö-, populaatio- sekä ekosysteemitasolla niiden luonnollisessa elinympäristössä.

3 Itämeren sinisimpukka (*Mytilus trossulus*)

Itämeren sinisimpukkaa (Kuva 3) on pidetty alkujaan *Mytilus*-suvun *M. trossulus* ja *M. edulis* -lajien risteymänä, mutta nykyään laji edustaa alueellisesti yhtenäistä, sekä maantieteellisesti suhteellisen homogeenistä geenipoolia. Itämeren ja Pohjanmeren simpukkapopulaatioiden DNA-markkeri- ja allotsyymitutkimuksen perusteella on havaittu, että esimerkiksi Suomenlahden ja Baltian alueilla esiintyvät sinisimpukkapopulaatiot edustavat genotyypiltään puhdasta *M. trossulusta*. [6, s. 821, 823.] Sinisimpukka kasvaa Itämeressä noin 1–4 cm:n mittaiseksi, ja se voi elää jopa 15 vuotta. Ravinnokseen sinisimpukka käyttää pääasiassa kasviplanktonia.



Kuva 3. Itämeren sinisimpukka (*M. trossulus*). Kuvassa näkyy simpukan putkimainen sifoni, eli hengityspotki. [7.]

Mytilus-suvun simpukkalajeja on tutkittu paljon ympäristötieteiden alalla, ja niitä pidetäänkin yleisesti merkittävänä malliorganismeina ja bioindikaattorilajeina tutkittaessa meriekosysteemien hyvinvointia. Pitkäikäinen sinisimpukka suodattaa vuosittain huomattavan määrän merivettä kidustensa läpi, jolloin erilaisten haitallisten aineiden kertyminen eliön kudoksiin on todennäköistä. Sinisimpukka toimii myös tärkeänä ravinnonlähteenä monille petokaloille ja merilinnuille, minkä vuoksi se on tärkeä laji tutkittaessa haitallisten aineiden siirtymistä ja rikastumista ravintoketjussa. [8, s. 27.]

4 Energiatasapainon vaikutus eliön stressinsietokykyyn

Energia-aineenvaihdunnan säätely vaikuttaa keskeisesti eliön kykyyn sietää ympäristöperäisiä stressitekijöitä, kuten lämpötilan ja happipitoisuuden vaihtelua, ravinnonpuutetta, tauteja tai altistumista haitallisille aineille. Vastavuoroisesti ympäristöperäinen stressi vaikuttaa eliön energiatasapainoon, kun ylimääräistä energiaa kuluu stressistä toipumiseen ja homeostaasin ylläpitämiseen. [9, s. 1–2.]

Energiatasapainon ja stressin voimakkuuden välistä suhdetta on tarkasteltu Hans-Otto Pörtnerin esittämässä mallissa *oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance* (OCLTT) [10.] Mallin mukaan eliön kyky ylläpitää aerobista energia-aineenvaihduntaa toimii kriteerinä, joka erottaa eliön kokeman kohtuullisen ja äärimmäisen ympäristöperäisen stressin toisistaan.

Optimaalisella tasolla aerobinen energiantuotanto kattaa peruselintoimintoihin ja homeostaasin ylläpitämiseen tarvittavan energian lisäksi energian, jonka eliö käyttää esimerkiksi kasvuun ja lisääntymiseen. Eliön kohdatessa kohtuullista stressiä sen energiantarve homeostaasin ylläpitämiseksi kasvaa, jolloin aerobinen energiantuotanto kiihtyy, ja eliö voi joutua käyttämään varastoituja lipidejä, hiilihydraatteja ja proteiineja riittävän energiansaannin turvaamiseksi. Tällöin kasvuun ja lisääntymiseen käytettävissä olevan energian määrä vähenee. Kohdatessaan äärimmäistä stressiä aerobinen energiantuotanto ei enää riitä stressin vaikutusten torjuntaan ja homeostaasin ylläpitämiseen, jolloin eliö siirtyy hyödyntämään anaerobisia metaboliareittejä. [9, s. 3.]

5 Biomarkkerit

Alkujaan lääketieteestä peräisin olevalla termillä ”biomarkkeri” tarkoitetaan jotakin mitattavissa olevaa ominaisuutta, esimerkiksi solu- tai molekyyalitasolla ilmenevää fysiologista tai biokemiallista muutosta. Havaitut muutokset voivat indikoida altistumista haitalliselle yhdisteelle, antaa tietoa aineen vaikutuksista eliön normaaleihin toimintoihin, tai kertoa eliön yleisestä herkkyydestä reagoida ympäristössä tapahtuviin muutoksiin. [11, s. 3.]

Yksi tunnetuimmista ekotoksikologiassa tutkituista biomarkkereista lienee hyönteismyrkky DDT:n aiheuttamat vaikutukset petolintujen pesintöjen epäonnistumiseen. Emolintujen altistuminen DDT:lle johti linnunmunien kuorirakenteen ohenemiseen, jolloin kehittyvä alkio altistui herkemmin erilaisia kehityshäiriöitä aiheuttaville tekijöille. Useissa tapauksissa pesinnät epäonnistuivat täysin, mikä pienensi lintupopulaatioiden kokoa huomattavasti. [8, s. 17.] Esimerkissä esitetyssä tapauksessa biomarkkeri, eli munankuoren oheneminen voitiin yhdistää suoraan tiettyyn haitalliseen aineeseen, mutta tavallisemmin biomarkkerit eivät välttämättä ole tietyille vaikuttaville aineille spesifejä, vaan ilmentävät enemmänkin eliön yleisten stressimekanismien aktivoitumista.

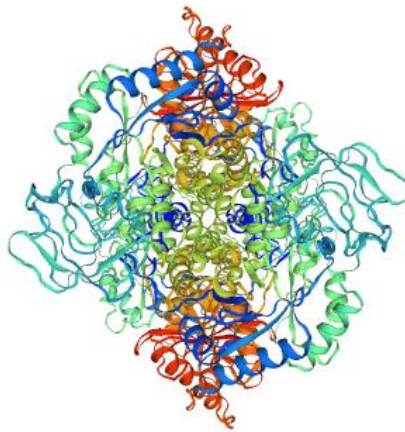
Biomarkkeritutkimukseen liittyy myös haasteita, sillä mitattavaan vasteeseen vaikuttavat olennaisesti eliöyksilöiden väliset fysiologiset erot. Tällöin ulkoisesti samanlaisista, samoissa olosuhteissa eläneistä eliöistä voidaan saada keskenään hyvinkin vaihtelevia tutkimustuloksia. Myös ympäristötekijät kuten ravinnon saatavuus,

vuodenaika, veden lämpötila ja suolapitoisuus vaikuttavat erilaisten biologisten vasteiden ilmenemiseen. [12, s. 57.]

Biomarkkereina voidaan tutkia sinisimpukan aerobisessa energia-aineenvaihdunnassa tapahtuvia muutoksia haitalliselle aineelle altistumisen seurauksena. Muutoksia voidaan tutkia esimerkiksi metaboliaentsyymien aktiivisuutta mittaamalla. Haitalliselle aineelle altistuminen voi vaikuttaa suuresti eliön kykyyn ylläpitää normaalia homeostaasia, kun energiaa kuluu stressitekijästä aiheutuvien vaikutuksien hallitsemiseen ja haittojen vähentämiseen. [13, s. 100.] Aiemmissä tutkimuksissa on raportoitu muutoksia sinisimpukoiden energiametaboliaentsyymien toiminnassa, kun simpukat olivat altistuneet erilaisille stressitekijöille, kuten lämpötilan vaihtelulle ja haitallisille aineille. [20; 23.]

5.1 Pyruvaattikinaasi

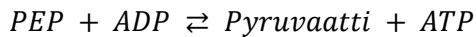
Pyruvaattikinaasi (PK) on glykolyysiin osallistuva entsyymi. Entsyymien rakenne on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. 3D-mallinnettu kuva pyruvaattikinaasista, joka on peräisin tyynenmerenosterista (*Crassostrea gigas*). [14.]

Pyruvaattikinaasi osallistuu glykolyysin viimeiseen vaiheeseen katalysoimalla reaktiota, jossa fosfoenolipyruvaatti (PEP) muunnetaan pyruvaatiksi ja ATP-molekyyliksi.

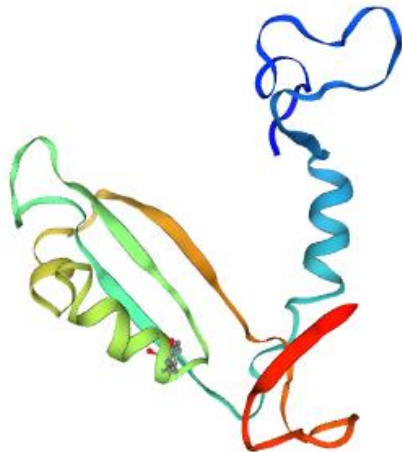
Reaktiossa tuotetaan energiaa Krebsin sykliä, eli sitruunahappokiertoa varten. [15, s. 88.] Reaktio on esitetty alla reaktioyhtälössä:



Vähähappisissa (hypoksia) tai täysin hapettomissa (anoksia) olosuhteissa PK:n toiminta estyy, jolloin metaboliareaktio vaihtuu anaerobiseksi ja entsyymi korvautuu fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasilla (PEPCK). [16, s. 372.] Aerobisen ja anaerobisen energiantuotannon välillä tapahtuvan siirtymän mekanismeja meriselkärangattomissa on selvitetty tutkimalla muun muassa ostereita, ja PK:n sekä PEPCK:n aktiivisuuksien suhteen muutosta on pidetty indikaattorina tästä aineenvaihdunnassa tapahtuvasta siirtymästä. [15, s. 88.]

5.2 Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi

Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi (PEPCK) on lyaaseihin lukeutuva entsyymi, joka osallistuu glukoneogeneesiin. Entsyymistä esiintyy kaksi muotoa, joista toinen toimii solun mitokondriossa ja toinen solun sytosolissa. [16, s. 372.] Entsyymien rakenne on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. 3D-mallinnettu kuva PEPCK:n rakenteesta. Kuvan entsyymi on peräisin välimerensinisimpukasta (*Mytilus galloprovincialis*). [17.]

PEPCK osallistuu glukoneogeneesiin sekä anaerobisiin metaboliareitteihin katalysoimalla reversiibeliä reaktiota, jossa oksaaliasetaatti dekarboksyloidaan

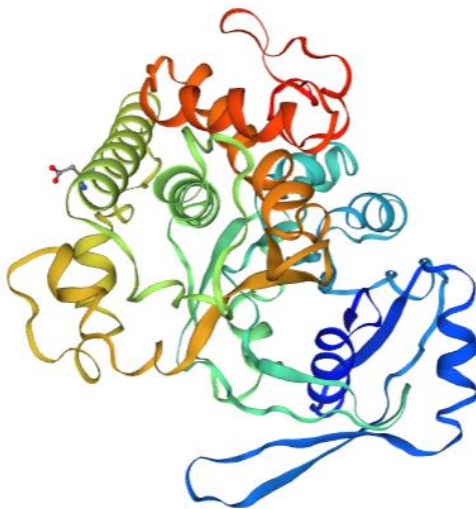
PEP:ksi. Hypoksisissa tai anoksisissa olosuhteissa reaktio on käänteinen, jolloin PEPCK muuntaa PEP-molekyylin oksaaliasetaatiksi. [18, s. 127.] Oksaaliasetaatin dekarboksylaatio on esitetty alla reaktioyhtälössä:



Käänteisessä reaktiossa muodostunut oksaaliasetaatti pelkistyy solun mitokondriossa malaatiksi. Malaatti kuljetetaan mitokondriosta solun sytoplasmaan, jossa se hapetuu takaisin oksaaliasetaatiksi. Reaktioketju säätelee solun normaalia hapetus-pelkistystasapainoa. [19, s. 381–382.] Eräessä tutkimuksessa osoitettiin PEPCK:n aktiivisuuden kasvavan sinisimpukoilla, jotka kokivat veden lämpötilavaihteluista aiheutuvaa stressiä. [20.]

5.3 Oktopiinidehydrogenaasi

Oktopiinidehydrogenaasi (ODH) on opiinidehydrogenaasien ryhmään lukeutuva entsyymi, joka esiintyy tavallisesti monilla meriselkärangattomilla. Selkärangattomien opiinidehydrogenaasit ovat kooltaan tyypillisesti 40–45 kDa, ja niillä on tärkeä rooli näiden eliöiden anaerobisessa energia-aineenvaihdunnassa. [21, s. 6330.] ODH:n rakenne on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. 3D-mallinnettu kuva ODH:n rakenteesta. Kuvan entsyymi on peräisin sinisimpukasta (*Mytilus trossulus*). [22.]

ODH vastaa toiminnaltaan selkärankaisten laktaattidehydrogenaasia, jonka päätehtävä on toimia anaerobisen glykolyysin pääte-entsyyminä. ODH:n tehtävänä on säilyttää kudoksen hapetus-pelkistystasapaino eliön kohdatessa väliaikaista hapenpuutetta. Tasapaino saavutetaan pelkistämällä soluliman NADH:ta NAD⁺:ksi. Mekanismi on elintärkeä erityisesti vuorovesialueilla eläville merieliöille, kuten simpukoille, jotka altistuvat säännöllisesti elinympäristönsä happipitoisuuden vaihtelulle. [23, s. 1231.]

Oktopiinidehydrogenaasi katalysoi kondensaatioreaktiota, jossa pyruvaatti ja arginiini muuttuvat oktopiiniksi ja vedeksi. Pelkistymiseen tarvittava elektroni saadaan NADH:sta, joka elektronin luovutettuaan pelkistyy NAD⁺:ksi alla esitetyn reaktioyhtälön mukaan:



6 Materiaalit ja menetelmät

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia TNT:n vaikutusta sinisimpukan metaboliaentsyymien aktiivisuuteen. Tässä työssä tutkitut simpukat oli altistettu TNT:lle laboratorio-olosuhteissa kahdessa eri altistuskokeessa, joissa TNT-pitoisuudet vaihtelivat. Tutkimuksessa oltiin myös kiinnostuneita siitä, näkyykö simpukan metabolianentsyymiaktiivisuuksissa eroja tilanteissa, joissa simpukka on joutunut sulkemaan kuorensa (korkeat pitoisuudet), verrattuna tilanteisiin, joissa simpukat pitävät kuorensa auki (matalat pitoisuudet). Sulkiessaan kuorensa simpukat turvautuvat anaerobisiin metaboliareitteihin, mutta ei kuitenkaan ole tiedossa, kuinka nopeasti mahdolliset muutokset metaboliaentsyymien aktiivisuudessa ilmenisivät. ODH-aktiivisuusanalyysissä otoskoko oli 12 simpukkayksilöä, ja PK- sekä PEPCK-analyysissä otoskoko oli 6 simpukkayksilöä.

Sinisimpukat altistettiin TNT:lle kahdessa laboratorio-olosuhteissa suoritettua altistuskokeessa marraskuussa 2017 ja tammikuussa 2018. Ensimmäisessä, akuutin toksisuuden altistuskokeessa tutkittiin lyhytaikaista altistumista korkeille TNT-pitoisuuksille. Akuutti altistuskoe (*Acute Toxicity*, AT) kesti 96 tuntia. Taulukossa 1 on esitetty TNT-pitoisuus näytekäsittelyä kohti.

Taulukko 1. *Acute Toxicity* -altistuskokeessa käytetyt TNT-pitoisuudet.

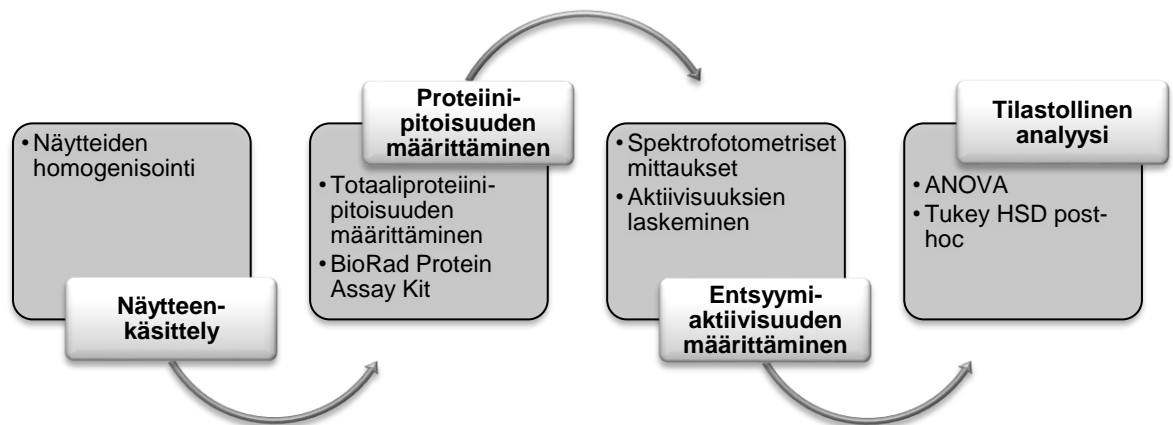
Näytekäsitely	TNT-pitoisuus (mg/l)
K0	0
K1	0,31
K2	0,62
K3	1,25
K4	2,5
K5	5
K6	10

Kroonisen toksisuuden altistuskokeessa (*Chronic Toxicity*, CT) haluttiin selvittää pitkän aikavälin ja matalan TNT-pitoisuuden vaikutuksia sinisimpukoiden kokemaan stressiin. Kokeen kesto oli 21 vuorokautta. Taulukossa 2 on esitetty TNT-pitoisuus näytekäsitelyä kohti.

Taulukko 2. *Chronic Toxicity* -kokeessa käytetyt TNT-pitoisuudet.

Näytekäsitely	TNT-pitoisuus (mg/l)
K0	0
K1	0,31
K2	0,62
K3	1,25
K4	2,5

Altistuskokeiden jälkeen simpukat preparoitii, ja eri analyysjä varten valitut kudoksenäytteet säilöttiin -80 °C:n lämpötilaan. Tämän opinnäytetyön analyysjä varten käytettiin pakastettuja lihasnäytteitä. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden aikana suoritettut työvaiheet on esitetty virtauskaaviona kuvassa 7.



Kuva 7. Työn vaiheet virtauskaaviona esitettynä. Lihasnäytteiden homogenisoinnin jälkeen näytteistä mitattiin totaaliproteiinipitoisuus, minkä jälkeen määritettiin entsyymiaktiivisuus kolmen eri entsyymin osalta. Tilastollinen analyysi suoritettiin R-analyysiohjelmalla käyttämällä yhden muuttujan varianssianalyysiä (ANOVA) ja Tukey HSD post-hoc-testiä.

6.1 Näytteiden homogenisointi

Sinisimpukan lihaspalat punnittiin, ja noin 140–200 mg näytettä siirrettiin 2 ml:n näyteputkeen. Näytepalan tarkka massa kirjattiin ylös. Homogenisointia varten 2 ml:n näyteputkeen lisättiin homogenisointipuskuria (10 mM Tris-HCl, 5 mM Na₂EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMS; pH 7,2) kolminkertainen määrä (µl) näytepalan massaan nähden. Puskurin lisäämisen jälkeen lihasnäytteet homogenisoitiin mekaanisesti metallikuulien avulla käyttämällä homogenisaattoria (Tissue Lyser II, QIAGEN). Homogenisointiprotokollaan sisältyi ravistelu 45 s:n ajan 30 1/s:n taajuudella. Ravistelu toistettiin kahdesti.

Homogenisoinnin jälkeen metallikuulat poistettiin, ja näyteputket sentrifugoitiin 16 000 G:n voimalla 25 minuutin ajan 4 °C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kerättiin talteen ja jaettiin neljään eri putkeen jatkoanalyysijä varten. Homogenaattinäytteet säilytettiin -70 °C:ssa.

6.2 Totaaliproteiinipitoisuuden määrittäminen

Sinisimpukan lihasnäytteiden totaaliproteiinipitoisuus määritettiin homogenaattinäytteistä Bradfordin menetelmään perustuvalla kaupallisella kitillä (Protein Assay, BioRad, Yhdysvallat). [24.] Proteiinipitoisuuden määrittämisessä standardina käytettiin BSA-standardiliuoksia.

6.3 ODH-aktiivisuuden määrittäminen

Jokaista työkertaa varten valmistettiin tuoret NADH-, arginiini- ja pyruvaattilyöliuokset. Työssä käytetyt reagenssit, yhteen reaktioon tarvittavat tilavuudet, sekä reagenssien loppukonsentraatiot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. ODH-mittauksissa yhteen reaktioon käytetyt reagenssimäärät ja reaktioiden loppukonsentraatiot. *Blank*-kaivoihin pipetoitiin näytteen sijasta imidatsoli-HCl-puskuria.

Liuos	Blank	Näytekaivo	Lopullinen konsentraatio
Imidatsoli-HCl-puskuri (100 mM)	70 µl	50 µl	100 mM
Näyte	-	20 µl	0,2 (tilavuusfraktio)
NADH (3 mM)	3 µl	3 µl	0,1 mM
Arginiini (50 mM)	10 µl	10 µl	5 mM
Pyruvaatti (20 mM)	10 µl	10 µl	2 mM

Näytteet pipetoitiin jäillä *half-area*-levylle pipetointikaavion mukaisesti neljänä replikaattina. Puskuriliuoksen, NADH-liuoksen ja arginiiniliuosten lisäämisen jälkeen levyä inkuboitiin ravistelussa 25 °C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen näytetuoppiin lisättiin pyruvaattiliuos monikanavapipetillä, ja mittaus aloitettiin heti lisäyksen jälkeen. Absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä (Infinite 200 PRO, Tecan) aallonpituudella 340 nm 30 s:n välein 7 minuutin ajan.

6.4 PEPCK-aktiivisuuden määrittäminen

PEPCK-aktiivisuus määritettiin käyttämällä kaupallista tuotetta (*Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity Assay Kit*, BioVision Incorporated, Yhdysvallat). Menetelmää sovellettiin käytettäväksi *half-area*-kuoppalevyformaattilla, jolloin analyyseissä käytettiin valmistajan ohjeesta poiketen kaksi kertaa pienempiä reaktiutilavuuksia ja reagenssimääriä.

Entsyimin aktiivisuus määritettiin mittaamalla reaktiossa syntyvä pyruvaatin määrä, mikä määritettiin pyruvaattistandardiliuosten avulla. Standardiliuokset pipetoitiin jokaiselle analysoitavalle kuoppalevyille, jolloin kaikille eri ajoille saatiin omat standardisuorat. Absorbanssi mitattiin aallonpituudella 570 nm 37 °C:n lämpötilassa 30 s:n välein 30 minuutin ajan. Taustakohinan vaikutus mittaustuloksiin huomioitiin vähentämällä 0-standardin absorbanssien keskiarvo kaikista mitatuista absorbanssiarvoista.

6.5 PK-aktiivisuuden määrittäminen

PK-aktiivisuuden määrittäminen suoritettiin kaupallisella tuotteella (*Pyruvate Kinase Activity Assay Kit*, Sigma Aldrich, Yhdysvallat). Menetelmää sovellettiin käytettäväksi *half-area*-kuoppalevyformaattilla, jolloin analyyseissä käytettiin valmistajan ohjeesta poiketen kaksi kertaa pienempää reaktiutilavuutta.

Työohjetta soveltamalla valmistettiin erilliset reaktioliuokset näytteille ja nollanäytteille. Nollanäytteiden reaktioliuoksesta jätettiin pois substraatti, jolloin haluttua reaktiota ei päässyt tapahtumaan. Nollanäytteistä mitattuja absorbansseja käytettiin myöhemmin taustasignaalin vähentämiseksi tuloksista. Nollanäytteenä käytettiin poolattua näytettä, mikä valmistettiin pipetoimalla 5 µl jokaista analysoitavaa näytettä yhteen näyteputkeen.

Näytteiden absorbanssi mitattiin 25 °C:ssa aallonpituudella 570 nm minuutin välein, kunnes aktiivisimman näytteen absorbanssiarvo ylitti vahvimman standardiliuoksen absorbanssiarvon.

6.6 Tilastolliset menetelmät

Tulosten tilastollisessa analyysissä hyödynnettiin yksisuuntaista varianssianalyysiä (yksisuuntainen ANOVA). Analyysin avulla haluttiin selvittää, löytyikö tuloksista tilastollisesti merkitseviä eroja näytekäsittelyjen välillä, kun muuttujana oli TNT-pitoisuus. ANOVAa täydennettiin post hoc -testillä, jotta aineistosta voitiin tunnistaa kontrollikäsittelyistä tilastollisesti merkitsevästi eroavat käsittelyt. Tilastolliset testit suoritettiin käyttämällä RStudio-analyysiohjelmaa (versio 1.2.1335).

7 Tulokset ja tilastollinen analyysi

7.1 Akuutti toksisuus

Näytteiden entsyymiaktiivisuus laskettiin kaavassa 1 esitetyn yhtälön mukaan:

$$\text{Entsyymiaktiivisuus} = \frac{OD/min}{\epsilon_{NADH} \cdot V \cdot \text{valotien pituus}} = \text{nmol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \quad (1)$$

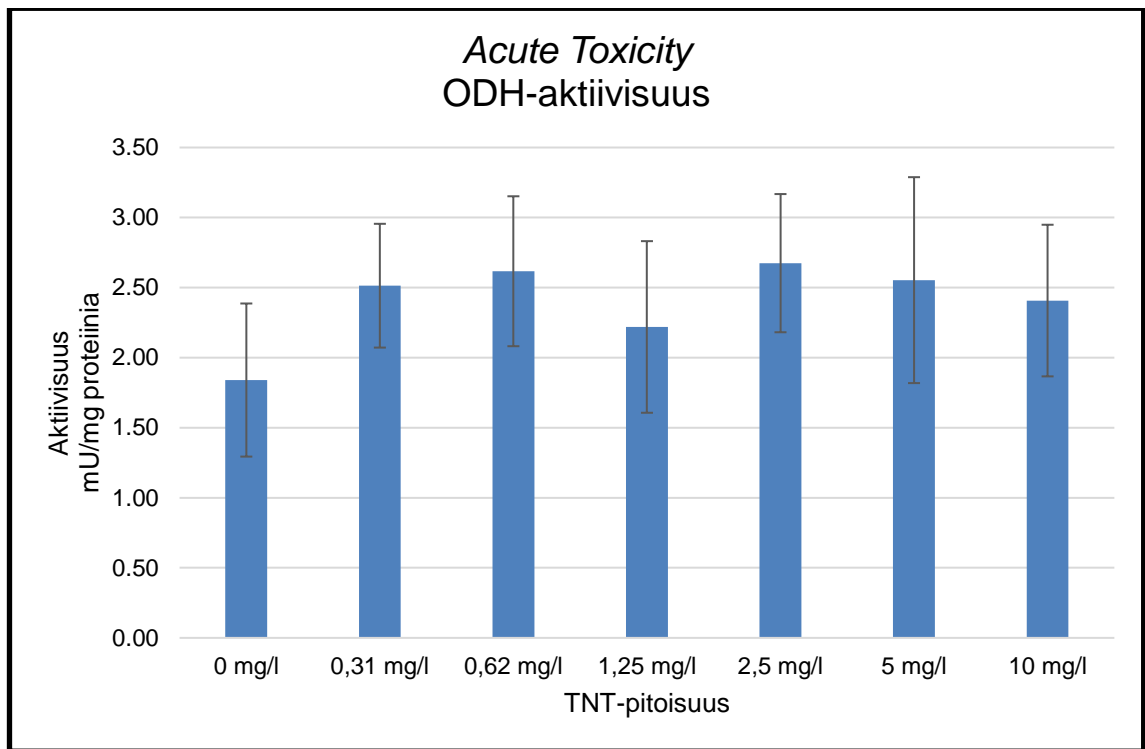
$$\epsilon_{NADH} = \text{absorptiokerroin} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$V = \text{näytteen tilavuus (ml)}$$

$$\text{valotien pituus} = 0,289 \text{ cm}$$

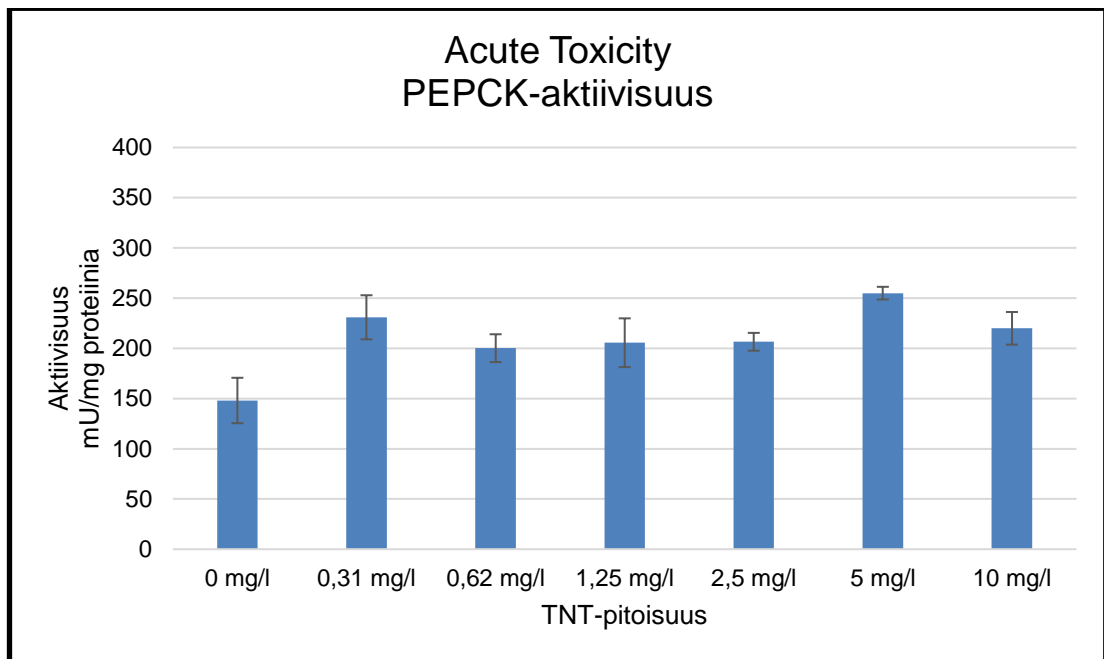
Yksi mU on se määrä entsyymiä, mikä katalysoi reaktion jossa 1 μmol substraattia muunnetaan tuotteeksi yhdessä minuutissa ($\text{nmol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$). Saatu entsyymiaktiivisuus (mU/ml) jaettiin aiemmin määritetyllä näytekohteisella proteiinipitoisuudella (mg/ml), jolloin lopulliset tulokset saatiin yksikössä mU/mg proteiinia.

Akuutin altistuskokeen osalta määritetyt entsyymiaktiivisuustulokset on esitetty pylväsdiagrammeina kuvissa 8, 9 ja 10.



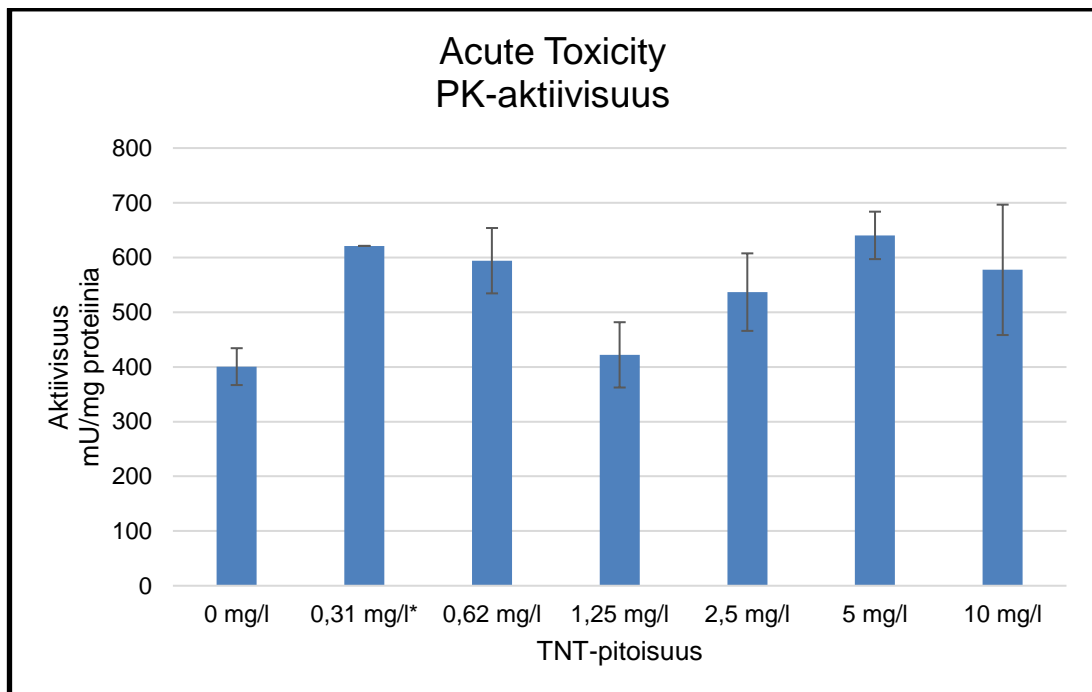
Kuva 8. ODH-aktiivisuuksien keskiarvot ja keskihajonnat eri näytekäsittelyissä.

Kontrollikäsittelyssä ODH-aktiivisuus on alle 2 mU/mg proteiinia. TNT-pitoisuuden kasvaessa ODH-aktiivisuus kasvaa yli kontrolliaktiivisuuden, mutta pitoisuudessa 1,25 mg/ml aktiivisuus palautuu lähelle kontrollitasoa. Viimeisissä käsittelyissä aktiivisuus kasvaa jälleen yli kontrollikäsittelyn aktiivisuuden.



Kuva 9. PEPCK-aktiivisuuksien keskiarvot ja keskihajonnat eri näytekäsittelyissä.

AT-näytesarjassa kontrollikäsitellyssä PEPCK-aktiivisuus on hieman alle 150 mU/mg. TNT-pitoisuuden kasvaessa myös PEPCK-aktiivisuus kasvaa kontrollikäsitteeseen verrattaessa. Korkein PEPCK-aktiivisuus on mitattu käsitteystä K5 (5 mg/l).



Kuva 10. PK-aktiivisuuksien keskiarvot ja keskihajonnat eri näytekäsittelyissä. *Pitoisuudessa 0,31 mg/l tulos perustuu vain yhdestä replikaatista saatuun aktiivisuustulokseen.

Kontrollikäsittelyssä PK-aktiivisuus on noin 400 mU/mg. Aktiivisuus kasvaa TNT-pitoisuuden kasvaessa, mutta käsittelyssä 3 (1,25 mg/l) aktiivisuus palautuu lähelle kontrolliaktiivisuutta. Entsyymiaktiivisuus on korkeimmillaan TNT-pitoisuudessa 5 mg/l.

Käsittelyjen välisten erojen tilastollinen merkitsevyys määritettiin statistiikkaohjelma RStudiolla. Varianssianalysillä ja post-hoc-testillä määritetyt tulosten tilastolliset merkitsevyyserot on esitetty taulukossa 4.

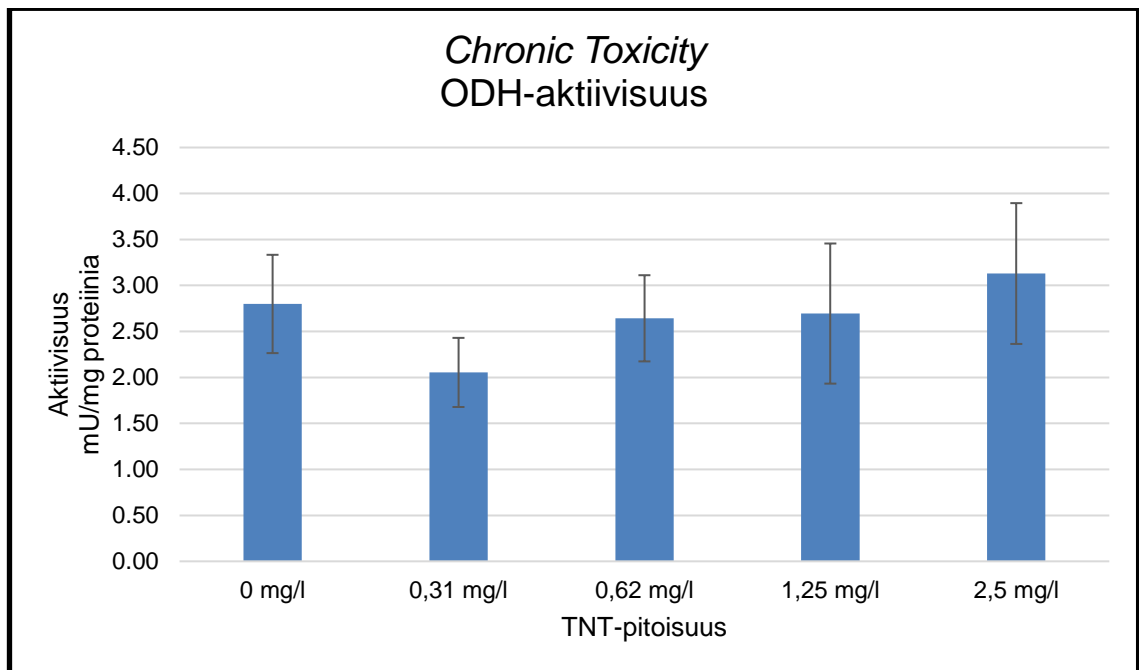
Taulukko 4. Käsittelyjen välisten erojen tilastollinen merkitsevyys akuutissa altistuskokeessa. Ero kontrollikäsittelyyn on tilastollisesti merkitsevä, jos p-arvo < 0,05.

Näytekäsittely	ODH p-arvo	PEPCK p-arvo	PK p-arvo
AT K1 (0,31 mg/l)	0,2344	0,0000132	1,000
AT K2 (0,62 mg/l)	0,2230	0,0082914	0,037
AT K3 (1,25 mg/l)	0,8737	0,0017305	0,991
AT K4 (2,5 mg/l)	0,1585	0,0057435	0,070
AT K5 (5 mg/l)	0,2121	0,0000005	0,051
AT K6 (10 mg/l)	0,5196	0,0001054	0,224

ODH-aktiivisuuksien osalta ei havaittu tilastollisia merkitsevyyseroja eri näytekäsittelyjen välillä. PEPCK-aktiivisuudet puolestaan erosivat kontrollikäsittelystä tilastollisesti merkitsevästi. Käsittelyssä 2 (0,62 mg/l) PK-aktiivisuus erosi tilastollisesti merkitsevästi kontrollikäsittelystä, ja käsittely 5:stä mitattu aktiivisuus on lähellä merkitsevyyden rajaa ($p = 0,051$).

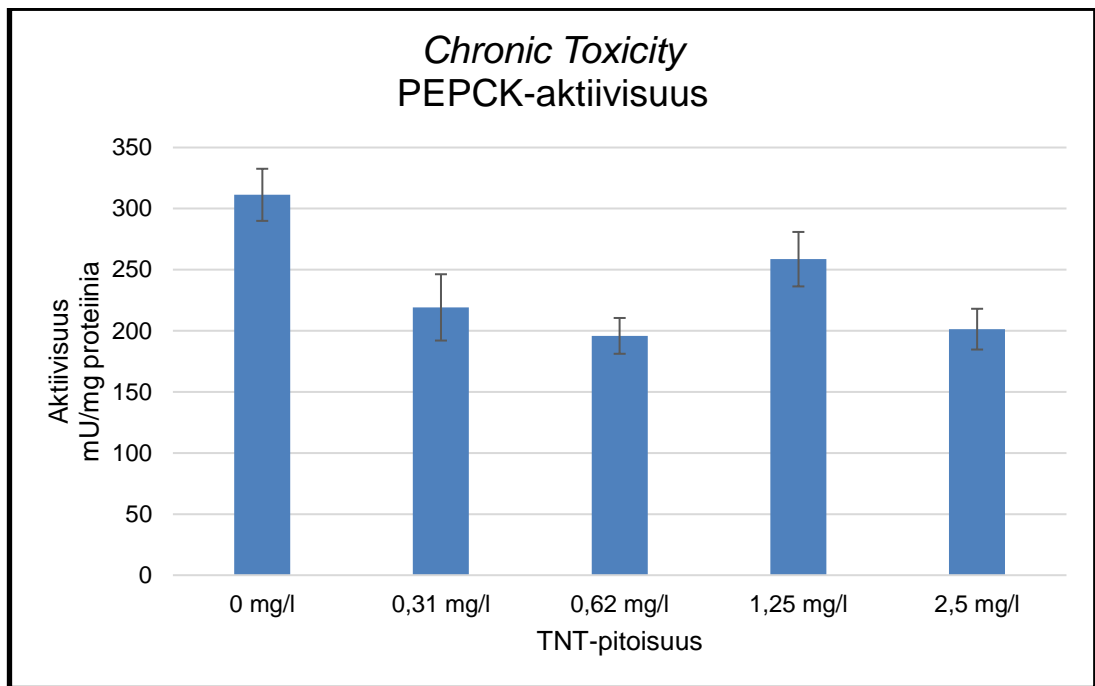
7.2 Krooninen toksisuus

Kroonisessa altistuskokeessa määritetyt entsyymiaktiivisuudet jokaisen entsyymin osalta on esitetty alla kuvissa 11, 12 ja 13.



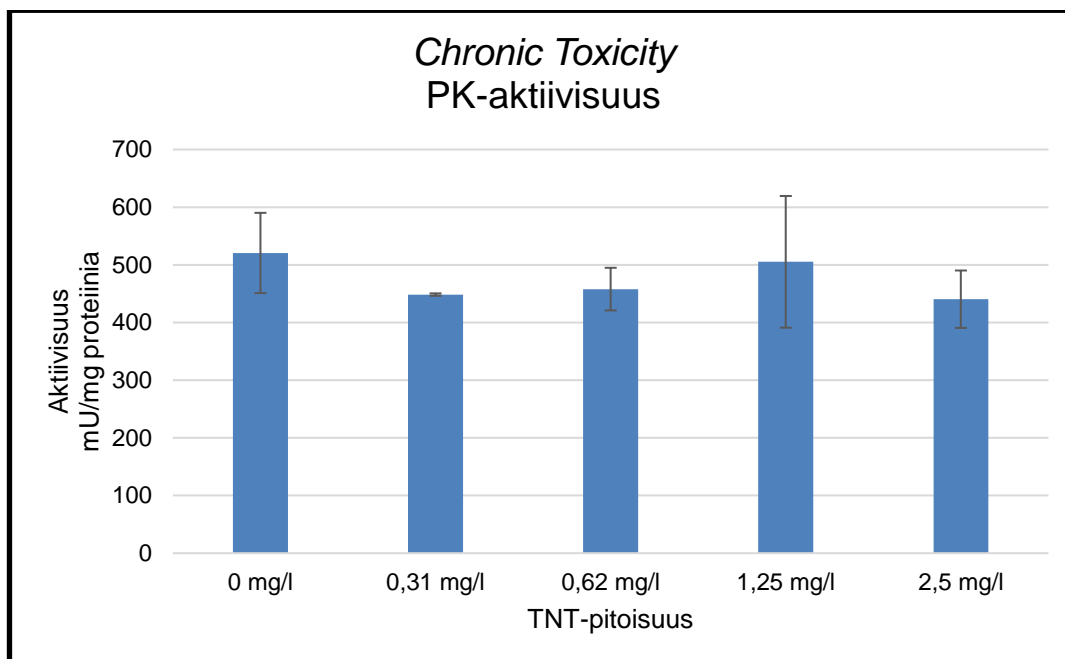
Kuva 11. ODH-aktiivisuus kroonisessa altistuksessa. Pylväsdiagrammissa on esitetty eri näytekäsittelyistä lasketut tulosten keskiarvot ja keskihajonnat.

Kontrollikäsittelyssä (K0) ODH-aktiivisuuden keskiarvo on noin 2,8 mU/mg proteiinia. Pitoisuudessa 0,31 mg/l entsyymin aktiivisuus laskee, jolloin kyseisessä käsittelyssä aktiivisuuden keskiarvo on noin 2,05 mU/mg. Pitoisuudessa 0,62 mg/l ODH-aktiivisuus palautuu kontrollikäsittelyn tasolle, ja pitoisuudessa 2,5 mg/l entsyymin aktiivisuus nousee hieman yli kontrolliaktiivisuuden. Pitoisuuksissa 1,25 mg/l ja 2,5 mg/l keskihajonta on runsainta.



Kuva 12. PEPCK-aktiivisuuksien keskiarvot ja keskihajonnat.

PEPCK-aktiivisuus kontrollikäsitelyssä on noin 300 mU/mg. TNT-pitoisuuden kasvaessa PEPCK-aktiivisuus lähtee laskuun. Käsitelyssä 3 (1,25 mg/l) aktiivisuus kasvaa yli 250 mU/mg:n, ja viimeisessä näytekäsitelyssä entsyymiaktiivisuus jälleen laskee, jolloin aktiivisuus on noin 200 mU/mg.



Kuva 13. PK-aktiivuuksien keskiarvot ja keskihajonnat eri näytekäsittelyissä kroonisessa altistuskokeessa.

Kontrollikäsittelyssä PK:n aktiivisuus on noin 500 mU/mg. TNT-pitoisuuden kasvaessa aktiivisuus laskee kontrollikäsittelyyn verrattaessa, ja matalimmillaan entsyymiaktiivisuus on TNT-pitoisuudessa 2,5 mg/l.

Käsittelyjen välisten erojen tilastollinen merkitsevyys on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Tilastoanalyysin tulokset kroonisessa altistuskokeessa. Ero kontrollikäsittelyyn on tilastollisesti merkitsevä, jos p-arvo < 0,05.

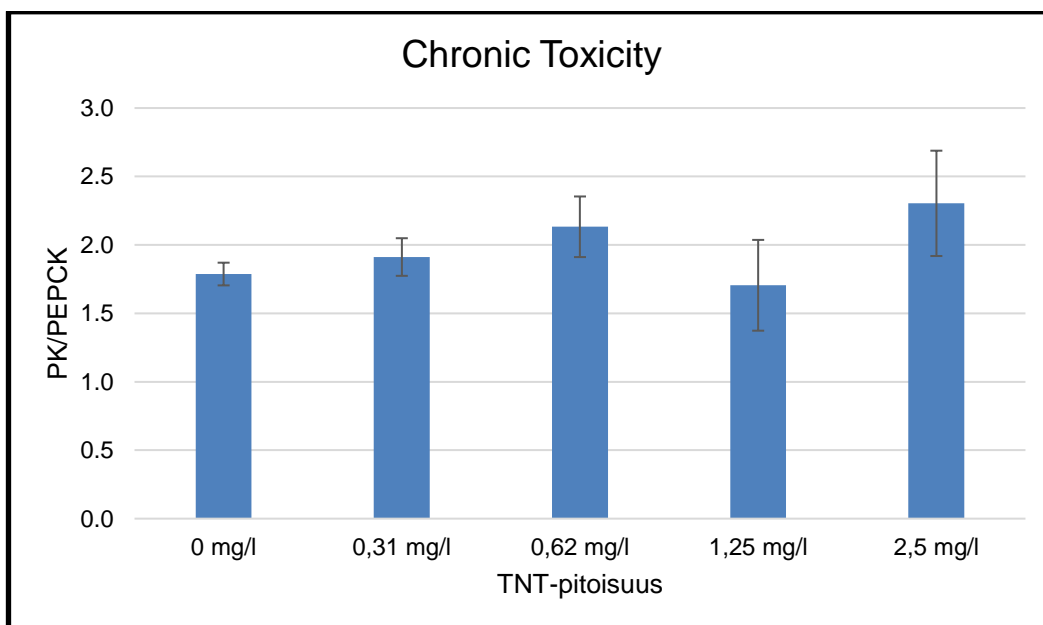
Näytekäsittely	ODH p-arvo	PEPCK p-arvo	PK p-arvo
CT K1 (0,31 mg/l)	0,0915	0,000018	0,118
CT K2 (0,62 mg/l)	0,9838	0,0000018	0,564
CT K3 (1,25 mg/l)	0,9959	0,0125	0,940
CT K4 (2,5 mg/l)	0,8480	0,0000016	0,670

ODH-aktiivuuksissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. PEPCK-aktiivisuudet erosivat tilastollisesti merkitsevästi kontrollikäsittelystä PEPCK:n osalta. PK-aktiivisuudet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi.

7.3 PK/PEPCK-suhde

Laskemalla PK- ja PEPCK-aktiivisuuksien välinen suhdeluku voidaan havainnollistaa aerobisen ja anaerobisen aineenvaihdunnan määrän suhteelliset osuudet eliön energiantuotannossa. Suhdeluvussa havaittu muutos indikoi eliön energia-aineenvaihdunnassa tapahtuvaa muutosta. Esimerkiksi, jos suhdeluku laskee, anaerobisen metabolian osuus suhteessa aerobiseen aineenvaihduntaan kasvaa, mikä taas saattaa kertoa eliön kokeman stressitason noususta.

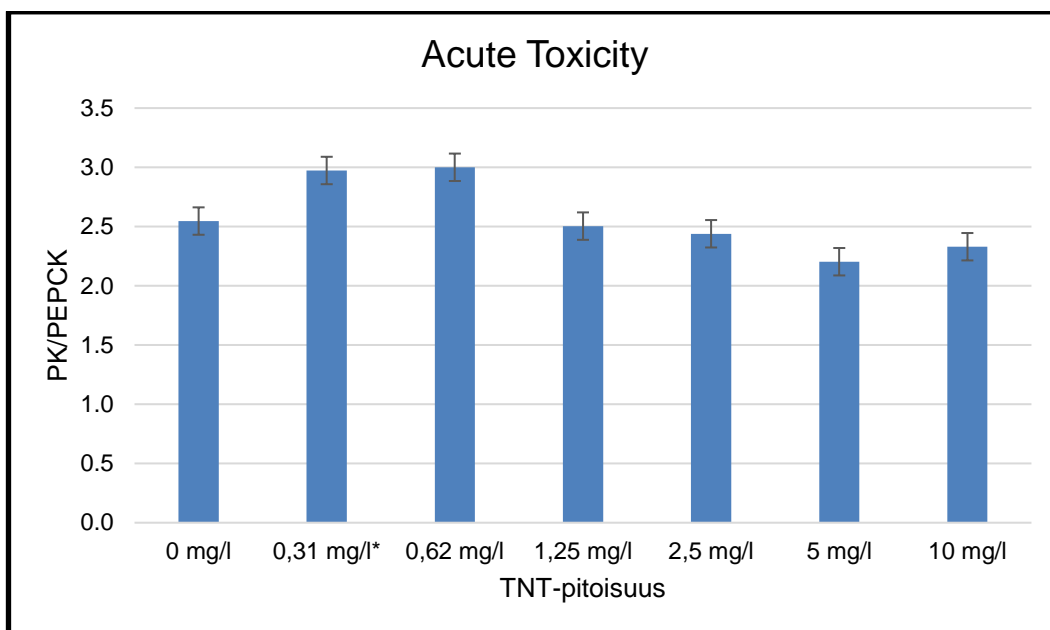
Tässä työssä käytetyt menetelmät eivät olleet täysin yhteensopivat todellisen PK/PEPCK-suhdeluvun laskemiseksi, sillä menetelmien reaktiolämpötilat poikkesivat toisistaan. PEPCK-aktiivisuudet mitattiin korkeammassa lämpötilassa, ja teoriassa lämpötilan kasvaessa myös entsyymiaktiivisuus kasvaa. Tulokset eivät siis ole täysin vertailukelpoiset keskenään. Kuvissa 14 ja 15 on kuitenkin havainnollistettu, kuinka sinisimpukoiden anaerobisen ja aerobisen energia-aineenvaihdunnan välinen suhde muuttui eri TNT-pitoisuuksissa.



Kuva 14. PK/PEPCK-suhde kroonisessa altistuskokeessa.

Pylväsdiagrammista voidaan nähdä, kuinka aerobisen aineenvaihdunnan osuus (PK) suhteessa anaerobiseen aineenvaihduntaan (PEPCK) kasvaa hieman kontrollitasosta TNT-pitoisuuden kasvaessa. Suhdeluku putoaa lähelle kontrollitasoa, mikä kertoo anaerobisen energia-aineenvaihdunnan osuuden kasvusta TNT-pitoisuudessa 1,25

mg/l. Kuvaajaa tarkasteltaessa tulee kuitenkin huomioida, ettei suhdeluvun taso ole välttämättä oikea. Mittausolosuhteista johtuen PEPCK-aktiivisuuden osuus voi olla todellista aktiivisuutta suurempi.



Kuva 15. PK/PEPCK-suhde akuutissa altistuskokeessa. *Tulos pitoisuudessa 0,31 mg/l perustuu vain yhdestä replikaatista määritettyyn aktiivisuustulokseen.

Pylväsdiagrammista voidaan nähdä, että TNT-pitoisuuksissa 0,31 mg/l ja 0,62 mg/l suhdeluku kasvaa, eli aerobisen energia-aineenvaihdunnan osuus lisääntyy. Tämän jälkeen suhdeluku kääntyy laskuun, eli anaerobisen energia-aineenvaihdunnan osuus kasvaa. Kuvaajaa tarkasteltaessa tulee kuitenkin huomioida, ettei suhdeluvun taso ole välttämättä oikea erilaisten mittausolosuhteiden vuoksi.

Toisistaan poikkeavien mittausolosuhteiden vuoksi käsittelyjen välisiä merkitsevyyseroja ei tässä tapauksessa määritetty tilastollisten testien avulla.

8 Yhteenveto ja johtopäätökset

ODH-aktiivisuustuloksissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja kontrolli- ja näytekäsittelyjen välillä. PK-aktiivisuuksien osalta tilastollisesti merkitsevästi kontrollitasosta erosi vain akuutin altistuskokeen käsittely 2, jossa TNT-pitoisuus oli 0,62 mg/l. PEPCK-aktiivisuuksissa tulokset erosivat kontrollikäsittelyistä tilastollisesti merkitsevästi molemmissa altistuskokeissa kaikkien näytekäsittelyjen osalta. Akuutissa

altistuskokeessa PEPCK-aktiivisuus kasvoi kontrollitasosta, mikä kertoo anaerobisen energia-aineenvaihdunnan lisääntymisestä ja voi indikoida eliön stressimekanismien aktivoitumista. Kroonisessa altistuskokeessa entsyymiaktiivisuus laski kontrollitasosta.

Kaiken kaikkiaan havaitut erot metaboliaentsyymien aktiivisuuksissa olivat vähäisiä, eivätkä tutkimushypoteesin mukaiset odotukset täyttyneet. Akuutissa altistuskokeessa TNT-pitoisuuden noustua pisteeseen 1,25 mg/l suurin osa simpukoista reagoi sulkemalla kuorensa, jolloin eliöt eivät välttämättä ole altistuneet kaikelle veteen lisätylle TNT:lle. Kuoren kiinnittäminen lyhyen altistuskokeen ajan ei myöskään näyttäisi vaikuttaneen metaboliaentsyymien aktiivisuuteen. Kroonisesta altistuskokeesta määritettyjen entsyymiaktiivisuuksien erot olivat vähäisiä, mikä voi selittyä simpukoiden hyvällä sopeutumiskyvyllä. Sinisimpukoiden sitkeys (*robustness*) matalissa räjähdysainepitoisuuksissa on osoitettu muun muassa Rosenin ja Lotufon tutkimuksessa, jossa selvitettiin räjähdysaineiden toksisia vaikutuksia simpukoihin (*Mytilus galloprovincialis*). [25.]

Tässä työssä esitetyt tulokset havainnollistavat hyvin tutkimukseen liittyvät haasteet, kun tavoitteena on määrittää biologisia vasteita luonnonvaraisista eliöistä. Jokaisessa entsyymiaktiivisuusmäärittämisessä havaittiin simpukkayksilöiden välistä vaihtelua, mikä vaikuttaa tilastollisessa analyysissä arvioitavaan käsittelyjen väliseen vaihteluun. On myös otettava huomioon, että laboratorio-olosuhteissa suoritettua simulaatiotyyppisestä asetelmasta saatujen tulosten perusteella ei voida vetää yksiselitteisiä johtopäätöksiä siitä, miten TNT:lle altistuminen vaikuttaa simpukan metaboliaentsyymien toimintaan luonnossa. Laboratorion kontrolloidut olosuhteet eroavat vastaavista luonnollisista olosuhteista, ja laboratoriossa tutkittavaan ilmiöön vaikuttavia tekijöitä on huomattavasti vähemmän. On myös huomioitava, että tutkimustulosten perusteella ja laboratorio-olosuhteista aiheutuva stressi voi vaikuttaa eliön normaaleihin biologisiin toimintoihin, ja sitä kautta analyysistä saataviin tuloksiin.

Valitut menetelmät osoittautuivat toimiviksi, ja entsyymiaktiivisuudet saatiin määritettyä onnistuneesti jokaisen valitun entsyymin osalta. Toimivuudesta huolimatta kaupallisten tuotteiden tilalle voisi kuitenkin valita paremmin yhteensopivat menetelmät PK- ja PEPCK-aktiivisuuksien määrittämiseksi. Työssä käytettyjen tuotteiden protokollissa esitetyt mittaustulokset erosivat toisistaan, jolloin PK/PEPCK-suhteen laskeminen ei ole mielekäästä. Korkeamman mittaustuloksen vaikutus entsyymiaktiivisuuteen huomattiin, kun havaittiin saatujen tulosten eroavan selkeästi muissa julkaisuissa esitetyistä tutkimustuloksista, missä oli raportoitu PK- ja PEPCK-aktiivisuuksia

sinisimpukoissa. [20; 23.] Jatkoa ajatellen olisi hyvä saada käyttöön menetelmät, joissa mittaukset voidaan suorittaa samassa lämpötilassa. Tulostenkäsittelyn kannalta on oleellista, että edellä mainittujen entsyymien aktiivisuuksia voidaan verrata toisiinsa. Kaupallisia tuotteita käytettäessä myös kustannukset nousevat helposti korkeiksi, sillä yhden kitin reagenssit riittävät loppujen lopuksi suhteellisen pienen näytemäärän analysointiin. Kustannusnäkökulmasta hyvät menetelmät kaupallisten tuotteiden tilalle olisi ODH-analyysiä vastaava menetelmä, jossa työliuokset voidaan valmistaa itse tarpeen mukaan.

Lähteet

- 1 Baltic Marine Environment Protection Commission. 2018. State of the Baltic Sea – Second HELCOM holistic assessment 2011-2016. Verkkoaineisto. <http://stateofthebalticsea.helcom.fi/wp-content/uploads/2018/07/HELCOM_State-of-the-Baltic-Sea_Second-HELCOM-holistic-assessment-2011-2016.pdf>. Luettu 20.8.2019.
- 2 Beldowski, Jacek; Potrykus, Joanna; Szubbska, Marta; Klusek, Zygmunt; Lastumäki, Anu; Lehtonen, Kari; Turja, Raisa; Fabisiak, Jacek; Michalak, Jaroslaw; Olejnik, Adam; Paczek, Bartlomiej; Lang, Thomas; Fricke, Nicolai; Bickmeyer, Ulf; Brenner, Matthias; Garnaga-Budre, Galina; Malejevas, Vitalijus; Popiel, Stanislaw; Östin, Anders; Fidler, Jan. 2014. CHEMSEA Findings – Results from the CHEMSEA project (chemical munitions search and assessment).
- 3 Danish Environmental Protection Agency. 1994. Report on Chemical Munitions Dumped in the Baltic Sea: Report to the 16th Meeting of Helsinki Commission 8 - 11 March 1994. Verkkoaineisto. HELCOM. <<http://www.helcom.fi/Lists/Publications/Report%20on%20chemical%20munition%20dumped%20in%20the%20Baltic%20Sea.pdf>>. Luettu 15.5.2019.
- 4 Strehse, Jennifer S.; Appel, Daniel; Geist, Catharina; Martin, Hans-Jörg; Maser, Edmund. 2017. Biomonitoring of 2,4,6-trinitrotoluene and degradation products in the marine environment with transplanted blue mussels (*M. edulis*). Toxicology. Vol. 390, s. 117–123.
- 5 Ek, Helene; Nilsson, Eva; Dave, Göran. 2008. Effects of TNT leakage from dumped ammunition on fish and invertebrates in static brackish water systems. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 69, s. 104–111.
- 6 Väinölä, Risto & Strelkov, Petr. 2011. *Mytilus trossulus* in Northern Europe. Marine Biology. Vol. 158, s. 817–833.
- 7 Sinisimpukka. Verkkoaineisto. Luontoportti. <<http://www.luontoportti.com/suomi/images/19728.jpg>> Luettu 19.6.2019.
- 8 Turja, Raisa. 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta. E-thesis-tietokanta.
- 9 Sokolova, Inna M.; Frederich, Markus; Bagwe, Rita; Lannig, Gisela; Sukhotin, Alexey. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research. Vol. 79, s. 1–15.

- 10 Pörtner, Hans-Otto. 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 213, s. 881–893.
- 11 Gupta, Ramesh C. (edit.) 2014. *Biomarkers in Toxicology*. E-kirja. Elsevier.
- 12 Vidal-Liñan, Leticia & Bellas, Juan. 2013. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* — Implications for marine pollution monitoring. *Science of the Total Environment*. Vol. 461–462, s. 56–64.
- 13 Smolders, R. 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*. Vol. 129, s. 99–112.
- 14 Pyruvaattikinaasin rakenne. Verkkoaineisto. SWISS-MODEL-tietokanta. <<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q0KHB6?csm=048511B9586F9172>>. Luettu 24.4.2019.
- 15 Sussarellu, Rossana; Fabioux, Caroline; Camacho Sanchez, Miguel; Le Goïc, Nelly; Soudant, Philippe; Moraga, Dario. 2011. Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 412, s. 87–95.
- 16 Le Moullac, Gilles; Bacca, Hélène; Huvet, Arnaud; Moal, Jeanne; Pouvreau, Stéphane; Van Wormhoudt, Alain. 2007. Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 307A, s. 371–382.
- 17 Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasin rakenne. Verkkoaineisto. SWISS-MODEL-tietokanta. <<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/G5D8W7?csm=BF30F88795DE2E2F>>. Luettu 24.4.2019.
- 18 Lacroix, Camille; Richard, Gaëlle; Segueineau, Catherine; Guyomarch, Julien; Moraga, Dario; Auffret, Michel. 2015. Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus* spp.) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbor (France). *Aquatic Toxicology*. Vol. 162, s. 126–137.
- 19 Lushchak, Volodymyr; Bagnyukova, Tetyana; Spichenkov, A.V. 1997. Modification of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase in foot muscle of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* under anaerobiosis and recovery. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 30, s. 381–385.

- 20 Marigomez, Ionan; Múgica, Maria; Izagirre, Urtzi; Sokolova, Inna M. 2017. Chronic environmental stress enhances tolerance to seasonal gradual warming in marine mussels. Verkkojulkaisu. PLoS ONE 12. <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174359>>. Luettu 2.9.2019.
- 21 Müller, Andre; Janßen, Frank; Grieshaber, Manfred K. 2007. Putative reaction mechanism of heterologously expressed octopine dehydrogenase from the great scallop, *Pecten maximus*. FEBS Journal. Vol. 274, s. 6329–6339.
- 22 Oktopiinidehydrogenaasin rakenne. Verkkoaineisto. SWISS-MODEL-tietokanta. <<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/M1FBU6?csm=7878AAF4005FCFC5>>. Luettu 24.4.2019.
- 23 Lima, Inês; Moreira, Susana M.; Rendón-Von Osten, Jaime; Soares, Amadeu M.V.M.; Guilhermino, Lúcia. 2006. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-west coast of Portugal. Chemosphere. Vol. 66, s. 1230–1242.
- 24 Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol. 72, s. 248-254.
- 25 Rosen, Günther; Lotufo, Guilherme R. 2007. Toxicity of explosive compounds to the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in aqueous exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 68:2, s. 228–236.