

**Ohtlike ainete mõju ensümaatilistele biomarkeritele balti
lamekarbis (*Macoma balthica*)**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Diana Maslova

Juhendaja: Natalja Kolesova, TalTech Meresüsteemide Instituut, merebioloogia spetsialist

Kaasjuhendaja: Maarja Lipp, TalTech Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, doktorant-nooremteadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Diana Maslova

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Natalja Kolesova

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: [nimi]

[allkiri ja kuupäev]

**Effects of hazardous substances on enzymatic biomarkers in the
Baltic clam (*Macoma balthica*)**

Bachelor thesis

Student: Diana Maslova

Supervisor: Natalja Kolesova, Department of Marine Systems, Specialist of Marine Biology

Co-supervisor: Maarja Lipp, Department of Chemistry and Biotechnology, Early Stage Researcher

Study program: Applied chemistry, food- and gene technology

Sisukord

Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Läänemeri – Liivi laht ja Väinameri	6
1.2 Balti lamekarp <i>Macoma balthica</i>	6
1.3 Raskmetallid Läänemeres ja nende mõju	8
1.4 Biomarkerid.....	8
1.4.1 Atsetüülkoliinesteraas.....	9
1.4.2 Katalaas	11
2. Töö eesmärk.....	12
3. Meetodid.....	13
3.1 Proovide kogumine	13
3.2 Raskmetallide analüüs	13
3.3 Proovide ettevalmistus	14
3.4 Biomarkerite aktiivsuste määramine.....	14
3.4.1 Valgusisalduse määramine.....	14
3.4.2 Atsetüülkoliinesteraasi aktiivsuse määramine.....	15
3.4.3 Katalaasi aktiivsuse määramine	16
3.5 Statistiline analüüs.....	16
4. Tulemused.....	17
4.1 AChE ja CAT aktiivsused.....	17
4.2 Raskmetallid.....	18
4.3 Ensüümide aktiivsused ja raskmetallid	18
5. Arutelu.....	19
Kokkuvõte.....	21
Abstract	22
Tänuavaldused	23
Kasutatud kirjandus.....	24
Lisad.....	29
Lisa 1. Reaktsioonisegud	29
Lisa 2. Tulemuste statistiline analüüs R-s	30

Sissejuhatus

Kasvav inimtekkeline tegevus on peamine tegur, mis põhjustab saasteainete sisalduse suurenemist merekeskkonnas. Selle seisundi hindamiseks kasutatakse nii füüsikalisi, keemilisi kui ka bioloogilisi analüüse. Inimtegevuse tulemusena veeökosüsteemi sattunud keemilised saasteained võivad keskkonnale tõsist ohtu kujutada. Juba väikestes kontsentratsioonides võivad nad olla toksilised ning koguneda mereorganismide kudesse, põhjustades erinevaid tervisehäireid. Samuti saavad saasteained sattuda toiduahelasse ning jõuda ka inimeseni. Viimastel aastatel on võetud kasutusele erinevaid biomarkereid keskkonnareostusest tingitud bioloogilise mõju hindamiseks põhjaelustikus. Näiteks viitavad mitmed hiljutised uuringud mere- ja mageveekeskkonnast pärit organismidega sellele, et biomarkerite ensümaatilise aktiivsuse mõõtmise abil on võimalik tuvastada seos organismide ja keskkonnas leiduva keemilise reostusega (Gorokhova et al., 2010; Turja et al., 2014). Sel viisil on võimalik reostuse poolt organismidele põhjustatavat keemilist stressi tuvastada organismide bioloogia ja ökoloogiaga seotud skaaladel, mis muudab biomarkerid väärtuslikuks vahendiks keskkonnamõjude hindamisel.

Tänu oma laialdasele levikule Läänemeres on balti lamekarp (*Macoma balthica*) keemilise stressi ja selle mõju tuvastamiseks sobilik uurimisobjekt. Antud liik on tundlik paljude metalliliste ja orgaaniliste ühendite suhtes, mis võivad suurte kontsentratsioonidena setetes akumulieruda (Jędruch et al., 2015; Jokšas et al., 2019) ja mõjutada seal elavate liikide tervist (Berezina et al., 2019). Balti lamekarbi domineerimine paljudes pehmesetelistes kooslustes aitab võrrelda omavahel loomade seisundit erinevates piirkondades ning uurida seoseid tervise ja ohtlike ainete sisalduse vahel. Lamekarpide iseloomulik kaitsemehhanism kokkupuutes reostusega on kõrge katalaasi aktiivsus, mis on tagajärjeks oksüdatiivsele stressile. Kuna lamekarbid käituvad kui filtreerijad, siis võib erinevate saasteainetega kokkupuude väljenduda ka atsetüülkoliinesteraasi aktiivsuse langemisena.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on võrrelda balti lamekarbi näitel kahte ensümaatilist biomarkerit, atsetüülkoliinesteraasi ja katalaasi, erinevates Väinamere ja Liivi lahe jaamades ning uurida kolme raskmetalli (Ni, Pb, Hg) võimalikku mõju nende aktiivsustele. Saadud tulemused aitavad aru saada, kas valitud proovivõtupaikade ökoloogilise seisundi vahel on olulisi erinevusi arvestades nikli, plii ja elavhõbeda kontsentratsioone setetes.

Tööl on kaks peamist hüpoteesi: AChE ja CAT aktiivsused erinevad Liivi ja Väinamere jaamadest kogutud loomade kudedes ning raskmetallidel on märgatav mõju antud ensüümide aktiivsustele. Hüpoteesi testimiseks kasutati Läänemeres laialdaselt levinud balti lamekarpi. Atsetüülkoliinesteraasi ja katalaasi aktiivsuste määramiseks loomade kudedes kasutati spektrofotomeetrilisi meetodeid ning tulemuste hindamiseks statistilist analüüsi, et uurida võimalikke korrelatsioone saadud andmete vahel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Läänemeri – Liivi laht ja Väinameri

Läänemeri on üks maailma suurimaid riimveelisi veekogusid, mis tähendab, et Läänemeres elustik on segu ookeani-, magevee- ning üksikutest riimveelistest liikidest, mis moodustavad ökoloogiliselt ainulaadse koosluse (Ojaveer et al., 2010). Läänemere riimveelisuus on tingitud piiratud veevahetusest Põhjamerega madalate Taani väinade kaudu ning suurest magevee sissevoolust (Szymczycha et al., 2018). Selle tulemusena on Läänemere keskmine soolsus 7 psu ehk üks viiendik normaalsest ookeaniveest (Leppäranta ja Myrberg, 2009). Lisaks madalale soolsusele on Läänemeri ka suhteliselt madal meri, mille keskmine sügavus on 50 m (HELCOM, 2022).

Läänemerd ümbritseb 9 riiki ning Läänemere piirkond on koduks enam kui 85 miljonile inimesele. Kuna Läänemere vesi vahetub täielikult ligi 30 aastaga on mere keskkonnaseisund tugevalt mõjutatud inimtegevusest (HELCOM, 2011). Nii globaalsed kliimamuutused, liigne toitainete eraldumine, reostus kui ka rannikualade asustuse tugev kasv on põhjused, mille tõttu on vaja mereökosüsteemi toimimist ja seisundit pidevalt uurida (Omstedt et al., 2014).

Võrreldes teiste veeökosüsteemidega elab Läänemeres tänu madalale soolsusele suhteliselt vähe looma- ja taimeliike (HELCOM, 2022). Paljud liigid elavad pideva soolsusest ja temperatuurist põhjustatud stressi tingimustes, mistõttu nende tundlikkus keskkonnamuutuste, eelkõige inimtekkeliste muutuste suhtes on suur. Mereliste liikide arvukus ja kasvukiirus Läänemeres korreleerub enamasti soolsusega – rohkem liike leidub kõrgema soolsusega lõunapiirkonnas (Ojaveer et al., 2010). Liivi laht on Läänemere idaosa alamvesikond, mida mõjutavad Eestist ja Lätist sinna suubuvad jõed. Laht on Läänemerest eraldatud peamiselt maismaaga ning saartega ning selle veevahetus Läänemerega toimub läbi Irbe väina ning Väinamere (Astok et al., 1999). Lahe keskmine sügavus on 26 m (Liblik et al., 2017). Väinameri asub Läänemere kirdeosas, Saaremaa, Hiiumaa, Vormsi, Muhu ning Eesti maismaa vahel. Väinameri on Liivi lahe üks osa ning 90% selle sügavusest on madalam kui 10 m. Väinamere põhi on liivane ja mudane, mis on sobivaks elupaigaks merekarpidele (Suursaar et al., 2002). Antud piirkond kuulub Natura 2000 üle-euroopalise kaitstavate alade võrgustikku ning hõlmab endas nii linnu- kui ka loodusala (Keskkonnaportaali, 2022).

1.2 Balti lamekarp *Macoma balthica*

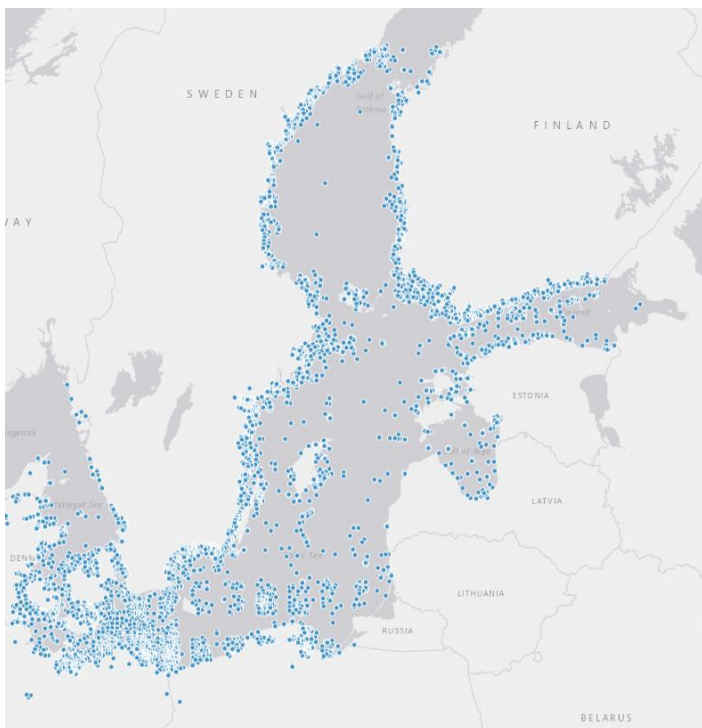
Macoma balthica (Joonis 1) on üks arvukamatest põhjaloomastiku liikidest Läänemeres. Põhiliselt levib *M. balthica* rannikualadel, kuid seda leidub ka avameres (Joonis 2; OBIS, 2024). Läänemere põhjaosas, kus pidevalt madal soolsus teiste mereorganismide levikut rangelt piirab, on antud liik laialt levinud (Leiniö ja Lehtonen, 2005). *Macoma balthica* on oluline indikaatorliik Läänemere

rannikupõhja ökosüsteemi seisundi hindamiseks. Teda on leitud nii 1 m kui ka 190 m sügavuselt ning ta eelistab mudast või liivast põhja (Bonsdorff ja Boström, 1995).



Joonis 1. (iNaturalist, 2024)

Macoma balthica keskmine kasvumäär aastas on 3,3 mm aastas ja täiskasvanud isendite keskmine pikkus on 18-20 mm. Ta võib olla nii roosakat, kollast kui ka oranži värvi. Nad elavad setetesse kaevunult, kuid säilitavad kontakti veega (WoRMS, 2024). *Macoma balthica* on võimeline taluma madalaid talviseid veetemperatuure, kuid nende arvukus suureneb kevadel ja suvel. Antud liik on detriivoor ehk toitub peamiselt lagunenenud orgaanilistest ainetest ning on ise saagiks paljudele linnu- ja kalaliikidele, mille tõttu võivad ka mürgised ained toiduahela kaudu edasi kanduda (BIOTIC, 2024). Sõltuvalt toidu kättesaadavusest, paljunemisvõimest ning muudest teguritest võivad saasteainete tasemed kudedes ja biomarkerite vastused kõikuda (Leiniö ja Lehtonen, 2005). Keskkonnaparameetrite ja biomarkerite hooajalise dünaamika analüüsi põhjal on väidetud, et *M. balthica* võib Läänemeres hilissuvel stressi kogeda (Strode et al., 2023). Selle põhjuseks võib pidada madalat hapnikusisaldust (Liblik et al., 2017).



Joonis 2. *Macoma balthica* levikualad Läänemeres (OBIS, 2024)

1.3 Raskmetallid Läänemeres ja nende mõju

Ohtlikud ained, antud töös raskmetallid, võivad merre sattuda looduslikest või inimtekkelistest allikatest. Peamiselt jõuavad ohtlikud ained merre jõgedest ja atmosfäärist, aga ka punktreostusallikatest (HELCOM, 2018a). Mulla omadused, piirkonna tööstuslik aktiivsus, väetiste kasutamine ning lähedal asuvatest heiteallikatest sadestumine on peamised tegurid, mis aitavad kaasa raskmetallide kontsentratsiooni suurenemisele. Läänemere peamisteks reostusallikateks on põllumajandus, tööstus, reovee puhastusjaamad, sadeveed, laevaliiklus jm. (HELCOM, 2021).

Paljudesse mereorganismidesse akumulereuvad erinevad metallijäägid, mis peegeldavad ümbritsevas keskkonnas leiduvaid metalle. Kõrged metallide kontsentratsioonid võivad kajastada piirkonna saastumist ning seetõttu on üheks keskkonnaseisundi hindamisviisiks biomarkerite määramine põhjaloomastikus (Hendozko et al., 2010).

Helsingi Komisjon (HELCOM) koordineerib merekeskkonna kaitset Läänemere piirkonnas ning viib erinevate indikaatorite abil iga kuue aasta tagant läbi Läänemere holistilise hinnangu. Raskmetallidest kuuluvad HELCOM poolt kasutatavate indikaatorite hulka plii, elavhõbe, kaadmium ja vask. Need raskmetallid on olulised, kuna avaldavad toksilist mõju ökosüsteemile juba suhteliselt väikestes kontsentratsioonides ning on raskesti lagundatavad (HELCOM, 2018b). Samuti kogunevad raskmetallid vee-elustiku kudedesse ning võivad põhjustada erinevaid tervisehäireid nagu paljunemis-, käitumis- või kasvuhäireid, vähki, geenide kahjustusi jm. (Sundelin et al., 1998; Kahlon et al., 2018).

Metallid nagu Cd, Ni, Cr, Pb ja Hg on veorganismidele mürgised peamiselt redoksreaktsioonides osalemise kaudu, kus tekivad reaktiivsed hapnikuühendid. Teistel metallidel nagu Fe, Zn, Cu, Se ja Mn on oluline koht organismis aset leidvate protsesside toimimises, kuid muutuvad mürgiseks, kui nende kontsentratsioon on ülemäära suur. Uuringud on näidanud raskmetallide bioakumulatsiooni ning nende poolt põhjustatud oksüdatiivseid kahjustusi karpide lihastes ja seedenäärmetes (Vlahogianni et al., 2007).

1.4 Biomarkerid

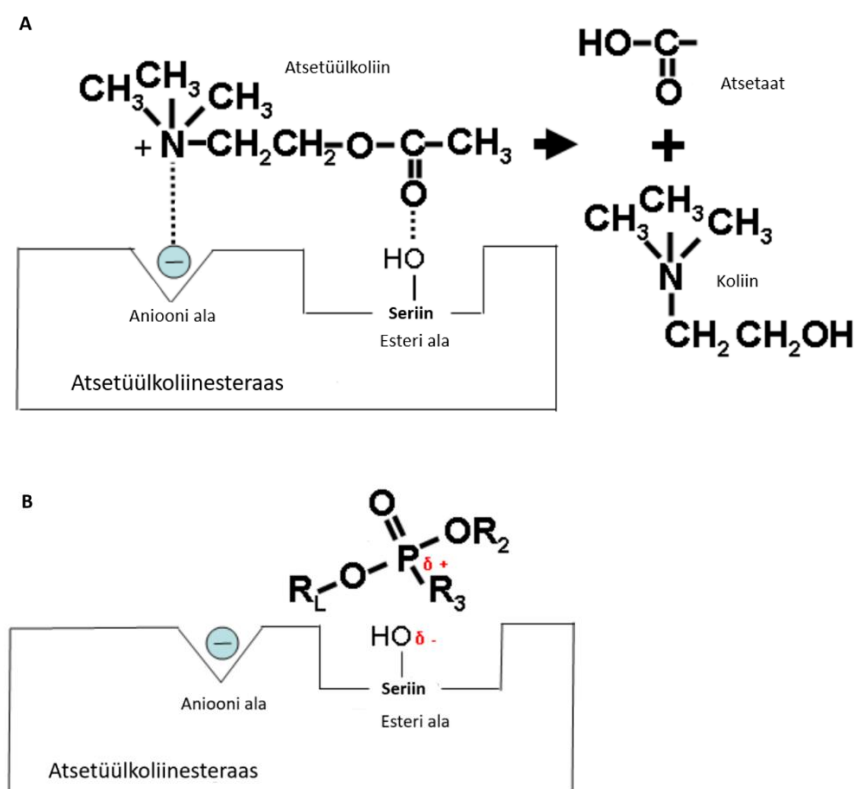
Biomarker on biokeemias määratletud kui mõõdetav ja jälgitav muutus molekulaarsel tasandil, mis hõlmab ka organismide käitumismuutusi. Biomarkerite vastused näitavad keskkonnastressorite kokkupuudet ning toksilist mõju organismile (Cossu-Leguille ja Vasseur, 2013). Biomarkereid ning nende analüüse kasutatakse erinevates valdkondades, sealhulgas meditsiinis, keskkonnatervises, toksikoloogias, arengubioloogias ja alusteadustes (Lionetto et al., 2013). Neid võib mõõta näiteks verest, uriinist, kudedest ning jaotada erinevate tüüpide järgi – DNA, RNA ning valgubiomarkeriteks (Shah et al., 2020).

Erinevaid biomarkereid peetakse ökotoksikoloogias sageli keskkonnareostuse varajaseks hoiatussignaalsiks. Lisaks saateainetele on hooajalised muutused samuti ühed olulistest teguritest, mis võivad mõjutada organismide füsioloogilist seisundit (Barda et al., 2014). Biokeemilised biomarkerid ning nende hindamisel kasutatavad laboratoorsed meetodid põhinevad molekulaarsetel mehhanismidel, tänu millele on võimalik mõõta keskkonnakemikaalide poolt põhjustatud toksilist toimet (Walker, 1995).

Merekeskkonda sattunud neurotoksiliste ainete, nagu näiteks fosfororgaaniliste- ning karbamaatühendite mõju mereorganismidele on võimalik hinnata atsetüülkoliinesteraasi (AChE) aktiivsuse määramise abil. Oksüdatiivse stressi indikaatorina on aga võimalik kasutada näiteks katalaasi (CAT) ning glutatiooni reduktaasi (GR) aktiivsuste hindamist ja ksenobiootikumide koosmõju hindamiseks glutatiooni S-transferaasi (GST) aktiivsust (Sarkar et al., 2006).

1.4.1 Atsetüülkoliinesteraas

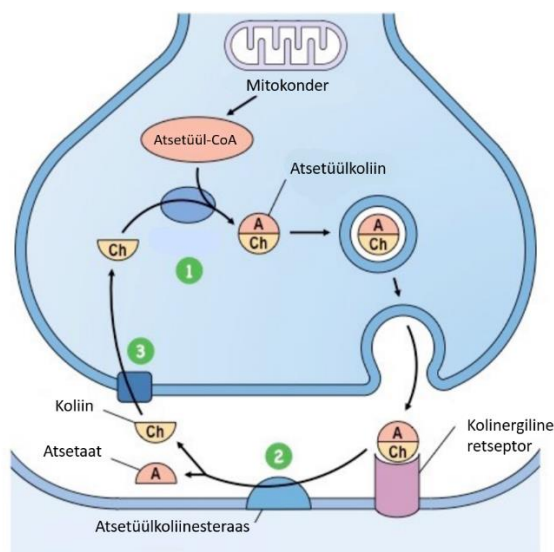
Atsetüülkoliinesteraas (EC 3.1.1.7) on hüdrolaaside hulka kuuluv närvisüsteemi võtmeensüüm. Atsetüülkoliinesteraasi esineb enamikes loomades ning on vastutav neurotransmitteri atsetüülkoliini (ACh) kiire hüdrolyütilise lagunemise eest (**Joonis 3A**; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007) inaktiivseteks saadusteks - koliiniks ja atsetaadiks (Bocquene ja Galgani, 1998). AChE aktiivsus lõpetab sünaptilise ülekande, vältides pidevat närvipõletust närvilõpmetes (Lionetto et al., 2013). Atsetüülkoliinesteraasi ekspresseeritakse mitmesuguste mereorganismide kudedes, sealhulgas karpide lihastes (Bocquene ja Galgani, 1998).



Joonis 3. A) Atsetüülkoliini lagunemine B) Inhibiitori seondumine atsetüülkoliinesteraasiga (muudetud Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007 põhjal)

ACh sünteesitakse üheetapilise reaktsiooniga, mida katalüüsib ensüüm koliin atsetültransferaas ja selle ensüümi olemasolu on "markeriks", et neuron on kolinergiline. Suurem osa närvilõpmetes sisalduvast atsetüülkoliinist sisaldub selgetes 100 nm vesiikulites ja väike kogus esineb ka tsütosoolis. ACh omastamine säilitusvesiikulisse toimub energiast sõltuva pumba kaudu, mis hapestab vesiikulit. Neurotransmissiooni käigus vabaneb ACh närvist sünaptilisse pilusse ja seostub postsünaptilise membraani ACh retseptoritega, edastades signaali närvist. AChE, mis asub samuti postsünaptilisel membraanil, lõpetab signaali edastamise hüdrolyüsides atsetüülkoliini. ACh

lagunemisel vabanenud koliin omastatakse uuesti presünaptilise närvi poolt ja neurotransmitterist sünteesitakse atsetüül-CoA-ga kombineerimisel atsetüültransferaasi toimel koliin (**Joonis 4**; Colovic et al., 2013).



Joonis 4. AChE mehhanism närviülekandel (muudetud BioNinja, 2024 põhjal)

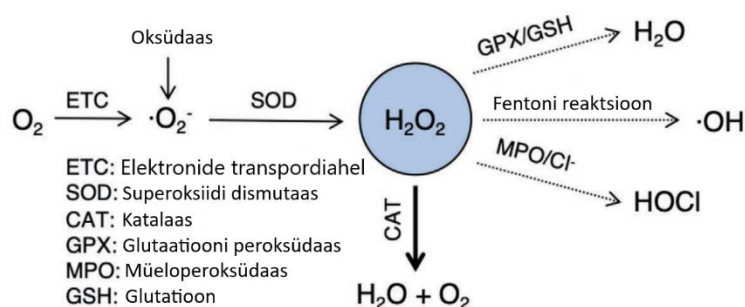
Fosfororgaanilised ja karbamaatühendid on teadaolevalt spetsiifilised atsetüülkoliinesteraasi katalüütilise aktiivsuse inhibiitorid. Fosfororgaanilisi ühendeid peetakse funktsionaalselt pöördumatuteks AChE inhibiitoriteks, kuna ensüümi inhibeerimisest vabastamiseks kuluv aeg võib ületada uue AChE sünteesiks kuluvat aega (Lionetto et al., 2013). Orgaanilisi fosfaate ja karbamaate kasutatakse laialdaselt põllukultuuride ja kariloomade kahjurite tõrjeks ning olmelistel eesmärkidel, sealhulgas putukatõrjeks kodus ja aias. Seetõttu võivad need ühendid kergelt ka merre sattuda. Ditioperoksüanhüdriid, ferbaam, butülaat, pebulaat on karbamaadid, mida kasutatakse näiteks herbitsiidide ja fungitsiididena. Fosfororgaanilistest ühenditest kasutatakse näiteks etüülparatiooni ja metüülparatiooni insektitsiidides (Colovic et al., 2013).

Fosfororgaanilised ühendid avaldavad oma peamist toksikoloogilist mõju esteraaside pöördumatu fosforüülimise kaudu närvisüsteemis. Ägedad toksilised mõjud on seotud AChE pöördumatu inaktiveerimisega. Fosfororgaanilised ühendid on ACh analoogid. Sarnaselt looduslikule substraadile siseneb inhibiitor ensüümi aktiivsaiti ning seondub kovalentselt seriini –OH rühmaga. Fosforiühend lõhutakse ja ensüüm fosforüülitakse (**Joonis 3B**). Fosforüülitud ensüüm ei ole enam võimeline neurotransmitteri hüdrolüüsides osalema. Ensüümi inhibeerimine põhjustab ACh akumulatsioonist sünaptilisse pilusse, mille tulemuseks on närviülekande takistumine (Colovic et al., 2013).

Viimastel aastatel on loomadel üha enam uuritud AChE inhibeerimist mitmete keemiliste ühendite, sealhulgas raskmetallide, polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike, detergentide ja saasteainete komplekssegude komponentide poolt (Lionetto et al., 2013). Läänemere organismides leiduvate raskemetallidega seoses on leitud, et AChE inhibeerimine on korrelatsioonis kaadmiumi ja tiamiini taseme tõusuga, millel on omakorda tihe seos AChE kolinergilise süsteemiga. Loomarakkudele oluline tiamiin imendub spetsiifiliste transporterite kaudu ning fosforüülitakse edasi kõrgemateks fosfaatide derivaatideks (Turja et al., 2014).

1.4.2 Katalaas

Katalaas (EC 1.11.1.6) on oksüdüreduktaaside hulka kuuluv antioksidatiivne ensüüm, mis vastutab vesinikperoksiidi lagunemise eest (Joonis 5; Qin et al., 2020). CAT aktiivsuse suurenemine organismide kudedes viitab oksüdatiivse stressile, mis on sageli seotud liigse oksüradikaalide moodustumisega erinevate orgaaniliste ühendite katabolismi ajal (Di Giulio et al., 1989). Oksüdatiivsete kahjustuste vastu toodavad veeorganismid kaitsemehhanismina ensüüme nagu katalaas ja superoksiidi dismutaas (Kadim ja Risjani, 2022).



Joonis 5. Reaktiivse hapniku rada (muudetud Qin et al., 2020 põhjal)

Superoksiidi anioon (O_2^-), hüdroksüülradikaal ($\cdot OH$) ja vesinikperoksiid (H_2O_2) on kolm peamist reaktiivse hapniku vormi. Kuigi H_2O_2 ei ole radikaal, võib ta kergesti tungida membraanidesse ja reageerida redoksaktiivsete metallidega, peamiselt Cu^+ ja Fe^{2+} , tekitades reaktiivsemaid liike, mida sageli peetakse hüdroksüülradikaalideks ($\cdot OH$). Vabad radikaalid on nii rakkude normaalse ainevahetuse kui ka organismile kahjulike reaktsioonide tulemusel, mida põhjustavad erinevad ksenobiootikumid nagu näiteks saasteained, pestitsiidid, herbitsiidid (Kehrer et al., 2010).

Antioksidatiivsed ensüümid kaitsevad rakke oksüradikaalide kahjuliku mõju eest, hoides reaktiivsete hapnikuühendite taset madalal. Lamekarpidel on olemas mitmesugused kaitsemehhanismid, sealhulgas katalaasi poolt katalüüsitud vesinikperoksiidi lagundamine. Katalaasid esinevad igas aeroobses organismis, paiknedes rakkude peroksüsoomides (Jourmi et al., 2015).

Turja ja teised (2020) teostasid eksperimendi, kus rannakarbid (*Mytilus trossulus*) puutusid kokku toornaftaga, et näha, milline on katalaasi aktiivsus erinevate võimalike naftareostuse kontsentratsioonide juures. Uuringust selgus, et rannakarpidel oli suurenenud katalaasi aktiivsus just kõrgema õlikontsentratsiooniga kokkupuutel.

2. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on võrrelda balti lamekarbis *M. balthica* kahte ensümaatilist biomarkerit, AChE ja CAT, erinevates Väinamere ja Liivi lahe jaamades ning uurida kolme raskmetalli (Ni, Pb, Hg) võimalikku mõju nende aktiivsustele.

Töös seati kaks hüpoteesi: 1. AChE ja CAT aktiivsused on Liivi lahe ja Väinamere jaamadest kogutud loomade kudedes statistiliselt oluliselt erinevad; 2. on olemas seos raskmetallide ja ensüümide aktiivsuste vahel. Kuna Liivi laht on rohkem inimtegevusest mõjutatud kui Väinameri, kuna seal on suuremad sadamad, sissevool veerohkematest jõgedest (Pärnu, Daugava) kui ka aktiivsem mereliiklus, siis eeldatavalt võiks sealt kogutud proovides näha suuremat mõju biomarkerite aktiivsustele kui Väinamere proovides.

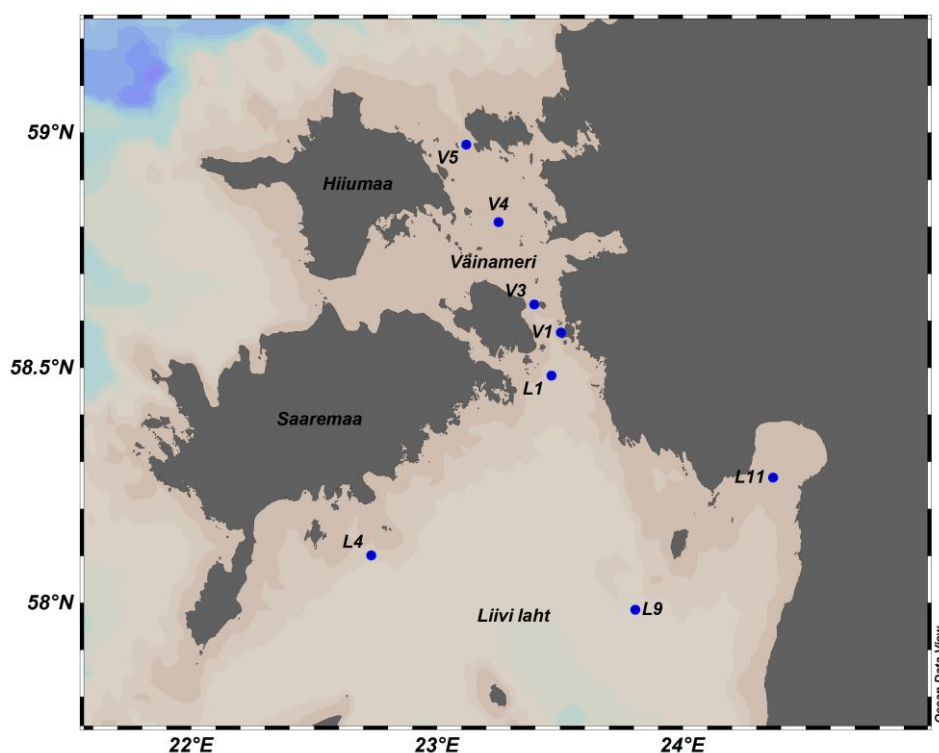
Püstitatud eesmärkideni jõudmiseks viidi läbi järgmised tegevused:

- eelnevalt erinevatest proovivõtupaikadest kogutud ja prepareeritud *M. balthica* kudede homogeniseerimine;
- atsetüülkoliinesteraasi ja katalaasi aktiivsuste määramine;
- saadud tulemuste põhjal jaamadevaheliste statistiliselt oluliste erinevuste ($p < 0,05$) väljaselgitamine;
- atsetüülkoliinesteraasi ja katalaasi korrelatsiooni analüüs setetes leidunud raskmetallide kontsentratsioonidega.

3. Meetodid

3.1 Proovide kogumine

Proovid on kogutud 2020. aasta mais ja augustis Läänemerest, kokku 8 jaamast. Proovide kogumine oli eelnevalt teostatud TalTech meresüsteemide instituudi uurimisrühmade liikmete poolt. Proovivõtujaamad V1, V3-V5, L1 asuvad Väinameres, ning L4, L9 ja L11 paiknevad Liivi (Joonis 6). V tähega märgitud jaamadest toimus proovivõtt maikuus, L jaamadest augustis. Proovivõtujaamade valikul arvestati, et need asuksid nii võimalikult puhastes kui ka potentsiaalselt saastunud piirkondades. Lühidalt toimus proovide kogumine järgmiselt. Setteproovid koguti uurimislaevalt „Salme“ kasutades Van Veen settekoppa haardepindalaga 0.1 m². Pealne settekiht paksusega kuni 5 cm koguti 200 ml purkidesse raskmetallide analüüsiks. Ülejäänud setted pesti mereveega laeva pardal läbi u 1 cm võrguavaga sõela, et karpe kätte saada. Elusaid balti lamekarpe hoiti proovivõtujaamast kogutud merevees, jahedas kohas. Kõikidest jaamadest saadud merekarbid koguti ja prepareeriti samu meetodeid kasutades.



Joonis 6. Proovivõtujaamad Liivi lahes (jaamade asukohad tähistatud siniste punktidega).

3.2 Raskmetallide analüüs

Ohtlike ainete ja orgaanilise süsiniku sisalduste määramiseks saadeti setted GBA GROUP laborisse Saksamaal. Elavhõbeda sisaldused olid jaamades V4, L1 ja L11 alla määramispiiri ehk LOQ < 0,01 mg/kg, mille tõttu tulemuste analüüsimisel kasutati nendes jaamades elavhõbeda väärtuseks pool labori poolt esitatud määramispiirist. Saadud raskmetallide tulemusi normaliseeriti 5% orgaanilise süsiniku järgi kasutades järgmist valemit:

$$C_{SS} = C_M \times \left(\frac{5\%}{N_M}\right), \quad (1)$$

kus

C_{SS} on normaliseeritud raskmetalli kontsentratsioon (mg/kg)

C_M on mõõdetud raskmetalli kontsentratsioon (mg/kg)

5% on kofaktori pöördeväärtus (%) (eng. pivot)

N_M on kofaktori mõõdetud kontsentratsioon (%) (OSPAR, 2008).

3.3 Proovide ettevalmistus

Laboris kudede prepareerimisel eraldati igast jaamast kogutud 10 karbil lihased ja seedenäärmed. Kui väiksemate isendite esinemise tõttu puudus analüüside jaoks vajaliku materjali kogus, ühendati 2-3 looma elundid ühe proovi valmistamiseks. Koed külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures kuni nende homogeniseerimiseni. *Macoma balthica* loomades ensüümide aktiivsuste määramiseks homogeniseeriti loomade seedetrakti koed 100 mM kaaliumfosfaatpuhvrts (K-PO₄), pH 7,40. Lihased aga 20 mM naatriumfosfaatpuhvrts (Na-PO₄), pH 7,00 koos lisatud 0.1% Triton X-100 lahusega. Sulatatud proovidele lisati homogeniseerimise puhvrit 3 ml/g seedetrakti kudede ning 2 ml/g lihaste kohta. Homogeniseeriti 30 Hz sagedusel 2 x 30 sekundit mikserveskil (MM400, Retsch). Proove tsentrifugeeriti (MPW-352R, MPW) 10 000 x g, 20 minutit, +4 °C juures. Supernatant jagati erinevate analüüside hilisemaks teostamiseks (katalaasi ja atsetüülkoliinesteraasi aktiivsuste ning valgusisalduste määramiseks) allikvootidena tuubidesse ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Proovid säilitati -80 °C juures.

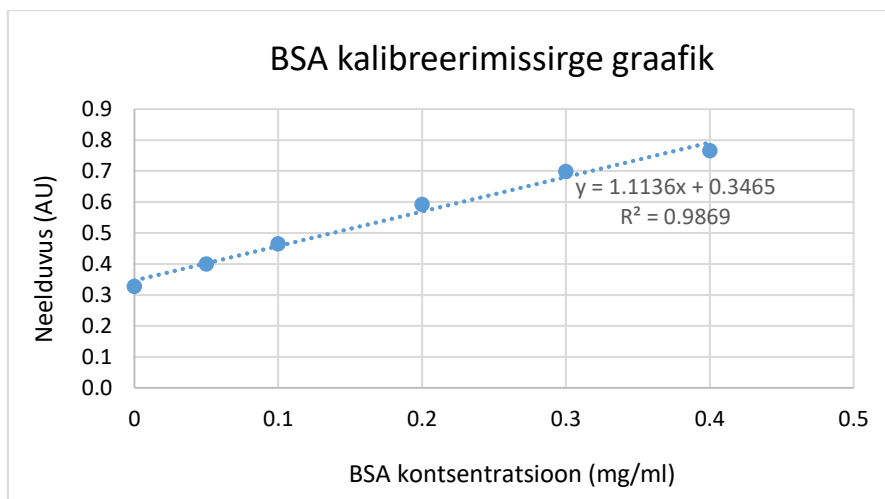
3.4 Biomarkerite aktiivsuste määramine

3.4.1 Valgusisalduse määramine

AChE ja CAT aktiivsuste esitamiseks ühikutes µmol/min/mg valgu kohta on vajalik analüüsitavales proovides määrata ka valgusisaldus. Selle jaoks kasutati Bradfordi meetodit (Bradford, 1976). Meetodi kohaselt seondub värvireagent Coomassie Brilliant Blue G250 valkude hüdrofoobse osaga, moodustades sinise kompleksi. Valgu seondumine värvainega põhjustab Coomassie lahuse värvuse muutust pruunist (neelduvuse maksimum 465 nm) siniseks (neelduvuse maksimum 610 nm). Standardina kasutatakse tavaliselt veise seerumi albumiini (BSA).

Mikroitiiterplaadi kaevudesse pipeteeriti nelja paralleelina 10 µl albumiini kalibreerimislahust (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 ja 0,4 mg/ml) või tundmatu valgusisaldusega eellahjendatud proovi ning lisati 200 µl Coomassie reaktiivi (Bio-Rad) viiekordselt lahjendatud lahust. Plaat koos reaktsioonidega segati mikroplaadi segajal 30 sekundit 2 mm amplituudiga ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel mõõdeti neelduvused spektrofotomeetris (Infinite M Plex, Tecan), Magellani tarkvara abil 595 nm juures.

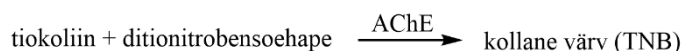
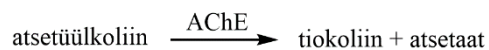
Kalibreerimislahuste mõõtmistel saadud neelduvuse näidud kanti kalibreerimisgraafikule (Joonis 7). Lineaarse kalibreerimissirge tõusu järgi arvutati uuritavate loomade kudedest valmistatud proovidele valgusisalduste väärtused (mg/ml).



Joonis 7. Valgusisalduse määramiseks kasutatud üks kalibreerimisgraafikutest. Iga uue Coomassie reaktiivi lahjenduse valmistamise järel teostati uus kalibreerimine. Albumiini lahuste teadaolev kontsentratsioon ning albumiini seondumisel Coomassie sinisega tekkiva kompleksi neelduvus lahuses on omavahel lineaarses seoses.

3.4.2 Atsetüülkoliinesteraasi aktiivsuse määramine

AChE aktiivsuse mõõtmisel kasutati *Macoma balthica* lihaskudesid. Meetodis kasutatakse atsetüülkoliinjodiidi (ACTC) spetsiifilise substraadina, millest AChE juuresolekul tekib tiokoliin. Analüüs põhineb kollase värvuse intensiivistumisel tiokoliinist, mis reageerib ditionitrobensoehappe (DTNB, nimetatakse ka Ellman'i reagentiks) iooniga. Kollase värvuse annab 5-tio-2-nitrobensoehape (TNB) anioon (**Joonis 8**).



Joonis 8. AChE juuresolekul toimuv TNB aniooni reaktsioon

Reaktsioon lõpp-mahuga 175 μl teostati poolemahulisel polüstüreenist mikrotiiterplaadil 20 mM Na-PO₄ pH 7,0 puhvril, 0,6 mM DTNB ja 2,9 mM ACTC juuresolekul. Lihaskudede homogeniseerimisel saadud supernatant ning reagentid pipeteeriti plaadile 4 paralleelina järjekorras, mis on toodud välja tabelis (**Lisa 1**). Neelduvuse muutused mõõdeti koheselt spektrofotomeetriga Magellani tarkvaras iga 25 sekundi tagant 412 nm juures.

Atsetüülkoliinesteraasi aktiivsused arvutati välja valemiga 2.

$$\text{AChE aktiivsus (nmol/min/mg (mU))} = \frac{\Delta A_{412} \times V_t \times 1000}{1,36 \times 10^4 \times l \times V_s \times [\text{prot}]}, \quad (2)$$

kus

ΔA_{412} on maksimaalne neelduvuse muutus 412 nm juures, absorptsioonikõvera lineaarses osas (AU/min)

V_t on reaktsioonimaht (ml)

$1,36 \times 10^4$ on TNB molaarne ekstinktsioonikoefitsient ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l on valguse teepikkus (cm)

V_s on proovi maht (ml)

$[prot]$ on valgusisaldus (mg/ml)

3.4.3 Katalaasi aktiivsuse määramine

Katalaasi aktiivsuse määramisel kasutati seedekulglä kudede homogeniseerimisel saadud proove. Vesinikperoksiid on organismidele kahjulik oksüdeerija, mis lagundatakse katalaasi poolt veeks ja hapnikuks. Katalaasi aktiivsuse määramisel mõõdetakse vesinikperoksiidi kontsentratsiooni vähenemist.

Reaktsioonisegusse lõpp-mahuga 300 μ l segati 100 mM K-PO₄ pH 7,0 puhvriss, sobiva eellahjendusega *M. balthica* proov ja 30 mM H₂O₂ (Lisa 1). Neelduvuste mõõtmiseks kasutati UV-läbipaistvat akrüülist mikrotiiterplaati. Proovi neelduvuse muutust (vesinikperoksiidi lagunemise kiirust) mõõdeti mikrotiiterplaadi spektrofotomeetriga iga 25 sekundi tagant 240 nm juures.

Katalaasi aktiivsused arvutati välja valemiga 3.

$$\text{CAT aktiivsus } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg (U)}) = \frac{\Delta A_{240} \times V_t \times 1000}{43,6 \times l \times V_s \times [prot]}, \quad (3)$$

kus

ΔA_{240} on maksimaalne neelduvuse muutus 240 nm juures, absorptsioonikõvera lineaarses osas (AU/min)

V_t on reaktsioonimaht (ml)

43,6 on H₂O₂ molaarne ekstinktsioonikoefitsient ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l on valguse teepikkus (cm)

V_s on proovi maht (ml)

$[prot]$ on valgusisaldus (mg/ml)

3.5 Statistiline analüüs

Esmalt kontrolliti AChE ja CAT analüüsitulemuste vastavust normaaljaotusele kasutades Shapiro-Wilk testi. Kuna andmed ei vastanud normaaljaotuse eeldustele, kasutati mitte-parametrilist Kruskal-Wallis testi. Jaamade vaheliste statistiliselt oluliste erinevuste ($p < 0,05$) väljaselgitamiseks teostati Dunn-i test. Biomarkerite ja raskmetallide seoste leidmiseks rakendati Spearman korrelatsiooni. AChE ja CAT tulemuste visualiseerimiseks kasutati karp-vurrud diagramme. Kõik statistilised testid viidi läbi kasutades Rstudio tarkvara (versioon 4.0.2, 2020-06-22).

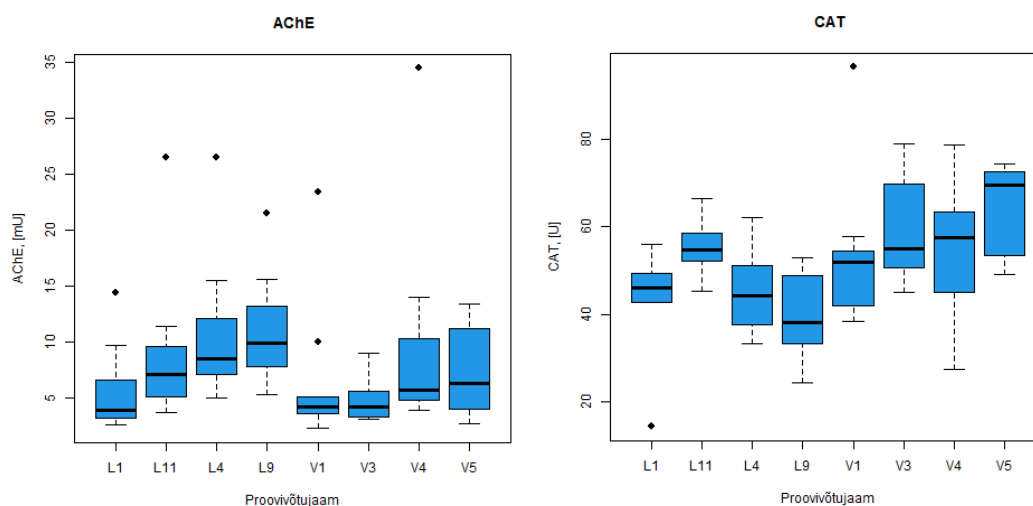
4. Tulemused

4.1 AChE ja CAT aktiivsused

Atsetüülkoliinesteraasi keskmised aktiivsused olid kõige madalamad Väinamere proovivõtujaamades L1, V1, V3 ning kõige kõrgemad Liivi lahe jaamades L4 ja L9. Katalaasi puhul aktiivsused olid üldiselt kõrgemad Väinamere jaamades ja madalamad Liivi lahe jaamades. Kõige kõrgem katalaasi aktiivsus oli mõõdetud proovivõtujaamas V5 (64,7 U). L9 proovivõtujaama proovide keskmine aktiivsus oli atsetüülkoliinesteraasi määramisel kõige kõrgem ning katalaasi aktiivsus kõige madalam (**Tabel 1, Joonis 9**).

Tabel 1. AChE ja CAT aktiivsuste keskmised jaama kohta

Jaam	V1	V3	V4	V5	L1	L4	L9	L11
AChE (mU)	6,4	4,6	9,5	7,4	5,4	10,9	11,0	8,8
CAT (U)	53,1	58,8	54,6	64,7	44,2	44,8	39,0	55,4



Joonis 9. AChE ja CAT aktiivsuste võrdlus (n = 10). X-teljel on proovivõtujaam ning Y- teljel aktiivsus.

Jaamade vahel esines statistiliselt oluline erinevus nii AChE kui ka CAT aktiivsuste puhul ($p < 0,05$; **Tabel 2**). Jaamades L4 ja L9 mõõdetud AChE väärtused olid statistiliselt oluliselt kõrgemad kui jaamades L1, V1 ja V3 mõõdetud AChE väärtused (**Lisa 2**). Samal ajal jaamas L9 mõõdetud CAT väärtused olid statistiliselt oluliselt madalamad kui jaamades L11, V3, V4, V5 (**Lisa 2**).

Tabel 2. Kõikide uurimisjaamade AChE ja CAT väärtuste võrdlus. Tumedas kirjas on välja toodud statistiliselt olulised ($p < 0,05$) erinevused.

Biomarker	Kruskal-Wallis (χ^2/p väärtus) df=7
AChE	23,17/ 0,0015
CAT	29,188/ 0,0001

4.2 Raskmetallid

Merekeskkonda sattunud erinevad saasteained, sealhulgas ka raskmetallid akumuleeruvad setetes, kus võivad püsida aastaid (HELCOM ACTION, 2021). **Tabelis 3** on välja toodud GBA GROUP labori tulemused raskmetallide sisalduse mõõtmistest kogutud setetes. Kõige kõrgem plii kontsentratsioon on jaamas L4 ning kõige madalam on jaamas V1. Võrreldes HELCOM plii kontsentratsiooni piirväärtusega (120 mg/kg kuivmassi kohta), ületab HELCOM poolt kehtestatud piirväärtust jaamas L4 plii mõõdetud tulemus (133,8 mg/kg). Nikli kontsentratsioonid olid kõige kõrgemad jaamades L4 ja V4 ning kõige madalam jaamas V1. Elavhõbeda kõrgemad jaamades L4 ja L9 ning madalam jaamas V1. Saadud tulemustest võib näha, et raskmetallide madalamad sisaldused tuvastati jaamas V1 ja kõrgemad L4. Jaamas L4 olid mõõdetud kõike raskmetallide kõrgemad kontsentratsioonid.

Tabel 3. Raskmetallide kontsentratsioonid proovivõtujaama kohta

Jaam	V1	V3	V4	V5	L1	L4	L9	L11
Ni (mg/kg)	28,9	53,0	257,1	53,8	72,4	352,9	150,9	156,9
Pb (mg/kg)	26,3	38,4	114,3	34,9	53,9	133,8	79,2	100,0
Hg (mg/kg)	0,06	0,09	0,07	0,06	0,07	0,16	0,14	0,09
TOC%	1,9	0,82	0,35	0,93	0,38	0,34	0,53	0,29

4.3 Ensüümide aktiivsused ja raskmetallid

Käesoleva töö käigus teostati korrelatsioonanalüüs kahe ensüümi (CAT ja AChE) ja kõikide uuritud raskmetallide vahel, kuid statistiliselt oluline positiivne korrelatsioon on leitud vaid AChE ja nikli vahel ($p < 0,05$; $\rho 0,74$; $S = 22$). See omakorda tähendab, et setteproovist saadud nikli sisalduse suurenemisega kasvas AChE aktiivsus. Teiste metallide kontsentratsioonide ning ensüümide aktiivsuste vahel statistiliselt olulist korrelatsiooni ei leitud.

5. Arutelu

Käesolevas lõputöös võrreldi mõõdetud ensümaatiliste biomarkerite (AChE ja CAT) väärtuseid Liivi lahes ja Väinameres asuvates jaamades ning uuriti seoseid keemiliste biomarkerite ja raskmetallide vahel. Peamise tulemusena võib välja tuua, et üldiselt erinevad Liivi lahes mõõdetud ensüümide aktiivsused Väinamere jaamades mõõdetud aktiivsustest, eriti AChE puhul. Nikli kontsentratsioonide suurenemisega setetes kasvas AChE aktiivsus. Seega leidis esimene hüpotees kinnitust, kuid teine hüpotees on kinnitatud vaid osaliselt, kuna seos on leitud vaid ühe biomarkeri ja ühe metalli vahel.

Erinevus piirkondade vahel võib olla tingitud mitmetest teguritest, näiteks keskkonnatingimustest või reostustasemest, mis võivad mõjutada ensüümide aktiivsust loomastikus. Tavaliselt esineb looduses samaaegselt erinevate parameetrite kombineeritud mõju. Ensümaatilised biomarkerid balti lamekarbis on väheuuritud, kuid Barda ja teised (2014) on leidnud, et CAT aktiivsus balti lamekarbis võib olla mõjutatud ka temperatuuri, soolsuse ja hapnikutaseme poolt. Lisaks on leitud seos CAT ja sesoonsete muutuste vahel. AChE puhul taoliseid seoseid ei leitud (Barda et al., 2014). Kuna käesolevas uuringus olid loomade proovid võetud kahel erineval hooajal, Väinamerest mais ja Liivi lahest augustis, võib see avaldada saadud tulemustes. Väinameri ja Liivi laht erinevad ka inimõju poolest. Näiteks asub Liivi lahe ääres suur rahvusvaheline Riia sadam, ning sinna suunduvad Pärnu ja Daugava jõgi; Väinamere piirkond on kogu oma ulatuses kaitse all, seal on väiksem laevaliiklus ja jõgede sissevoolud on ka madalamad. Seetõttu on saasteainete koormused uuritud piirkondadele erinevad, mis omakorda võib peegelduda ka biomarkerite tulemustes. Mitmed uuringud on juba ohtlike ainete mõju ensümaatilistele biomarkeritele põhjaloomades ka näidanud (Turja et al., 2014; Strode et al., 2022).

Käesoleva töö käigus leiti, et Liivi lahe proovivõtupaikadest L9 ja L4 kogutud loomade kudedes mõõdetud atsetüülkoliinesteraasi keskmised aktiivsused olid kõige suuremad. Huvipakkuva tähelepanekuna leiti, et katalaasi aktiivsus käitus nendes jaamades vastupidiselt näidates koos jaamaga L1 madalamaid tulemusi. Nendes jaamades olid kõrged raskmetallide sisaldused ning Hg sisaldus oli võrreldes teiste jaamadega kõrgem. Raskmetallide toksilisus võib avaldada mõju ensüümide aktiivsustele nendes jaamades (Frasco et al., 2005). Tavaliselt ohtlikud ained inhibeerivad AChE aktiivsust põhjaloomade kudedes ja selle väärtused vähenevad, kuid katalaasile esineb vastupidine mõju (Mnkandla et al., 2019; Lastumäki et al., 2020). Seetõttu vajab antud tulemus põhjalikumat uurimist.

Töö käigus teostati korrelatsioonanalüüs kahe ensüümi (CAT ja AChE) ja kõikide uuritud metallide vahel, kuid statistiliselt oluline positiivne korrelatsioon on leitud vaid AChE ja nikli vahel. Leidub mitmeid teineteisele vasturääkivaid uuringuid, millest osad näitavad nikli inhibeerivat mõju AChE-le ning teised hoopiski AChE aktiivsuse tõusu. Frasco ja teised (2005) on aga leidnud, et nikkel ei mõjutagi atsetüülkoliinesteraasi, kuid oma uuringus kasutas ta harilikku äädikakärbest (*Drosophila melanogaster*), mis erineb oma eluviisilt suuresti meres elavatest selgrootutest. Positiivse korrelatsiooni nikli ning AChE aktiivsuse vahel on aga näiteks avastanud nii Lof ja teised (2016) Läänemere kirpvähilisi uurides kui ka Liapi ja teised (2011) rottide lühiajalisel nikliga manustamisel. Seega võivad tulemused olla märkimisväärselt mõjutatud uurimisaluse liigi iseärasustest.

Arvestada tuleb ka asjaolu, et käesolev töö põhineb ühel korral mõõdetud ensümaatiliste biomarkerite tulemustel ning ohtlike ainete laiast spektrist on siin käsitletud vaid kolme raskmetalli. Samuti leidub merekeskkonnas väga suurel hulgal erinevaid ühendeid, mille mõju vee-elustikule võib olla sarnane või ohtlikum kui uuritud ainetel. Saadud tulemuste kinnitamiseks on vaja uuringut, mis hõlmaks rohkem ensümaatiliste aktiivsuste mõõtmisi ja käsitleks erinevate ohtlike ainete koosmõju. Leitud seos nikli ja AChE aktiivsuse vahel võib siiski indikeerida, et nikkel mõjutab AChE aktiivsust ning selle suurenenud kontsentratsioon võib olla balti lamekarpidele ohtlik.

Antud töös kajastatud andmed on tulemusteks ühtedele esimestest AChE ja CAT aktiivsuste määramistest, mis TalTech Meresüsteemide instituudi mereökoloogia laboris on teostatud. Antud analüüside järgselt on läbi viidud hulgaliselt uusi mõõtmisi nii teistest proovivõtupaikadest kogutud loomadest, erinevatest põhjaloomastiku liikidest, parendatud meetodikatega kui ka muude ensüümide aktiivsuste määramistena. Uute loomade kogumisel on edaspidi otsustatud ühest paigast prepeareerida suurem hulk loomi, et tõsta mõõtmistulemuste arvu ning võimaldada adekvaatsemat statistilise analüüsi läbiviimist. See samm on eriti oluline arvestades isendite vahelist suurt bioloogilist varieeruvust, mis võib tuleneda paljudest faktoritest nagu isendi vanus, sugu või toitumus.

Uurimisrühmas on oksüdatiivse stressi hindamiseks mõõdetud ka glutatiooni reduktaasi aktiivsust ning ksenobiootikumidega kokkupuute hindamiseks glutatiooni S-transferaasi aktiivsust. Mitmete biomarkerite tulemusi on võimalik kombineerida ning esitada integreeritud biomarkeri vastuse indeksina (IBR) (Beliaeff ja Burgeot, 2002). Kaalutud on ka superoksiidi dismutaasi (SOD) aktiivsuste määramist, et täiendada biomarkeri abil selgemini oksüdatiivse stressi esinemist põhjaloomastikus kindlaks teha.

Käesolevas töös saadud tulemused on väga huvipakkuvad ja näitavad, et teema vajab edasist uurimist. Kuna ohtlike ainete kontsentratsioonide mõõtmised keskkonnast ei peegelda alati elustiku tervises seisundit, on bioloogilise mõju indikaatorid kogunud populaarsust merekeskkonna hindamisel. Selleks, et kasutada ensümaatilisi biomarkereid bioloogilise mõju indikaatoritena, on vajalikud põhjalikumad uuringud nende seoste väljaselgitamiseks keskkonnaparameetrite ja ohtlike ainetega. Seetõttu on käesoleva uuringu jätkuks soovitatav uurida balti lamekarpide ensümaatilisi biomarkereid Väinamere ja Liivi lahe piirkonnas ka koos teiste keskkonnaparameetritega nagu hapnik, temperatuur ning soolsus. Biomarkerite mõõtmistulemusi tasub võrrelda ka teiste ohtlike ainete sisaldustega, millel võib raskmetallidega võrreldes olla teistsugune mõju ensüümide aktiivsustele lamekarbi kudedes.

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda balti lamekarpis *M. balthica* kahte ensümaatilist biomarkerit, atsetüülkoliinesteraasi ja katalaasi, erinevates Väinamere ja Liivi lahe jaamades ning uurida kolme raskmetalli (Ni, Pb, Hg) võimalikku mõju nende aktiivsustele. Töös kasutati üheksast proovivõtupaigast kogutud lamekarbi ning sette proove, millest viimased saadeti Saksamaale ohtlike ainete sisalduste määramiseks GBA GROUP laborisse. Balti lamekarpide lihaskoed ja seedenäärmed eraldati vastavalt atsetüülkoliinesteraasi ning katalaasi aktiivsuse määramiseks.

Peamise tulemusena võib välja tuua, et üldiselt erinevad Liivi lahes mõõdetud ensüümide aktiivsused Väinamere jaamades mõõdetud aktiivsustest, eriti AChE puhul. Samuti kasvab nikli kontsentratsiooni suurenemisega setetes ka AChE aktiivsus. Seega toetasid saadud tulemused esimest püstitatud hüpoteesi, kuid teine hüpotees leidis vaid osalist kinnitust, kuna seos esines vaid ühe biomarkeri ja ühe metalli vahel.

Käesolev töö põhineb üksikanalüüside käigus mõõdetud ensümaatiliste biomarkerite tulemustel ning käsitleb ohtlike ainete laiaast spektrist vaid kolme raskmetalli. Saadud tulemuste kinnitamiseks on vaja uuringut, mis hõlmaks rohkemate ensümaatiliste aktiivsuste mõõtmisi. Samuti tuleks käsitleda erinevate ohtlike ainete koostõju, millel võib võrreldes üksikute tulemustega olla oluliselt suurem mõju ensüümide aktiivsustele. Selleks, et kasutada ensümaatilisi biomarkereid bioloogilise mõju indikaatoritena, on vajalikud põhjalikumad uuringud nende seoste väljaselgitamiseks keskkonnaparameetrite ja ohtlike ainete suhtes. Seetõttu on käesoleva töö jätkuks soovitatav uurida balti lamekarpide ensümaatilisi biomarkereid Väinamere ja Liivi lahe piirkonnas koos erinevate keskkonnaparameetritega nagu hapnik, temperatuur ja soolsus.

Abstract

The aim of this Bachelor's thesis is to compare two enzymatic biomarkers, AChE and CAT, in the Baltic clam, *Macoma balthica*, from different stations in the Väinameri Sea and the Gulf of Riga and to investigate the possible effects of three heavy metals (Ni, Pb, Hg) on their activities. Two hypotheses were put forward: 1. there is a statistically significant difference between AChE and CAT activities in the Baltic clam tissues collected from the Gulf of Riga and the Väinameri Sea stations; 2. there is a correlation between heavy metal and enzyme activities.

Spectrophotometric methods were used to determine acetylcholinesterase and catalase activities in the tissues of *Macoma balthica* and statistical analysis of the results was performed to investigate any correlation between the obtained data.

The average activities of acetylcholinesterase were lowest at the Väinameri Sea sampling stations L1, V1, V3 and highest at the Gulf of Riga stations L4 and L9. For catalase, the activities were generally higher at the Väinamere Sea stations and lower at the Gulf of Riga stations. The highest catalase activity was measured at sampling station V5 (64,7 U). There was a statistically significant difference between stations for both AChE and CAT activities ($p < 0,05$). AChE values measured in stations L4 and L9 were statistically significantly higher than AChE values measured in stations L1, V1 and V3. CAT values measured at L9 were statistically significantly lower than those measured at stations L11, V3, V4, V5.

In the current thesis, a correlation analysis was conducted between the two biomarkers (CAT and AChE) and all three heavy metals analyzed in the sediments. A statistically significant positive correlation was only found between the AChE activities and nickel concentrations. No correlation was found between other metals and measured enzyme activities. This means that the first hypothesis was confirmed, but the second hypothesis is only partially confirmed, as a correlation has been found between one biomarker and one metal.

Tänuavaldused

Käesoleva töö autor soovib tänada TalTech Meresüsteemide Instituudi merebioloogia spetsialisti Natalja Kolesovat suure toe ja väga hea juhendamise eest töö valmimise käigus. Samuti tänab autor kaasjuhendajat keemia- ja biotehnoloogia instituudist Maarja Lippu laboris juhendamise, suurepärase tähelepanekute ja keelekorrektuuri eest.

Lisaks soovib autor tänada nooremprofessor Sirje Sildeveri käesoleva töö ülevaatamise, sisukate kommentaaride ja keelekorrektuuri eest. Samuti suured tänusõnad ka teistele meresüsteemide instituudi töötajatele ja uurimislava „Salme“ meeskonnale, kes innustasid ning olid toeks töö valmimisel.

Uuring oli rahastatud kahest Keskkonnainvesteeringute Keskuse (KIK) projektist nr 16300 ja 17253.

Aitäh teile!

Kasutatud kirjandus

Andmed ja kaart. Keskkonnaportaali. Veebiaadress: <https://register.keskkonnaportal.ee/register> [22.12.2023]

Astok, Villu, Otsmann, Mikk, Suursaar, Ülo 1999. Water exchange as the main physical process in semi-enclosed marine systems: The Gulf of Riga case. – *Hydrobiologia*, kd 393, nr 0, lk 11–18.

Baltic Macoma (Mollusks Of the Outer Lands). iNaturalist. Veebiaadress: https://www.inaturalist.org/guide_taxa/760177 [26.12.2023]

Barda, Ieva, Purina, Ingrida, Rimsa, Elina, Balode, Maija 2014. Seasonal dynamics of biomarkers in infaunal clam *Macoma balthica* from the Gulf of Riga (Baltic Sea). – *Journal of Marine Systems*, kd 129, lk 150–156.

Beliaeff, Benoit, Burgeot, Thierry 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, kd 21, nr 6, lk 1316–1322.

Berezina, Nadezhda A., Lehtonen, Kari K., Ahvo, Aino 2019. Coupled Application of Antioxidant Defense Response and Embryo Development in Amphipod Crustaceans in the Assessment of Sediment Toxicity. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, kd 38, nr 9, lk 2020–2031.

BIOTIC (2024). Veebiaadress: <https://www.marlin.ac.uk/biotic/browse.php?sp=4272> [09.01.2024]

Bocquene, G, Galgani, F 1998. ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds International Council for the Exploration of the Sea Conseil International pour l' Exploration de la Mer.

Bonsdorff, Erik, Boström, Christoffer 1995. Recruitment and population maintenance of the bivalve *Macoma balthica* (L.) : factors affecting settling success and early survival on shallow sandy bottoms Recruitment and population maintenance of the bivalve *Macoma balthica* (L.)-factors affecting settling success and early survival on shallow sandy bottoms. Veebiaadress: <https://www.researchgate.net/publication/29724709> [08.01.2024]

Bradford, Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – *Analytical Biochemistry*, kd 72, nr 1–2, lk 248–254.

Cholinesterase Inhibitors: Part 2: What are cholinesterase inhibitors?. *Environmental Medicine*. Veebiaadress: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase-inhibitors/inhibitors.html> [26.12.2023]

Colovic, Mirjana B., Krstic, Danijela Z., Lazarevic-Pasti, Tamara D., Bondzic, Aleksandra M., Vasic, Vesna M. 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. – *Current Neuropharmacology*, kd 11, nr 3, lk 315.

Cossu-Leguille, Carole, Vasseur, Paule 2013. Aquatic Biomarkers. – Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology, , lk 49–66.

Di Giulio, Richard T., Washburn, Peter C., Wenning, Richard J., Winston, Gary W., Jewell, Catherine S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. – Environmental Toxicology and Chemistry. lk 1103–1123.

Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. – Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals, kd 10, nr 5, lk 360–375.

Gorokhova, Elena, Löf, Marie, Halldórsson, Halldór Pálmar, Tjärnlund, Ulla, Lindström, Magnus, Elfving, Tina, Sundelin, Brita 2010. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. – Aquatic Toxicology, kd 99, nr 2, lk 263–274.

HELCOM 2018. Baltic Sea trends. Indicators. HELCOM core indicator report. Veebiaadress: www.helcom.fi [23.12.2023].

HELCOM (2011). Baltic Marine Environment Protection Commission Baltic Sea Environment Proceedings 155 Baltic Sea-Second HELCOM holistic. Veebiaadress: www.helcom.fi/baltic-sea-trends/holistic-assessments/state-of-the-baltic-sea-2018/reports-and-materials/ [23.12.2023]

HELCOM (2018). Baltic Marine Environment Protection Commission. Veebiaadress: <http://www.helcom.fi> [09.01.2024]

HELCOM (2022). The nature of the Baltic Sea. Veebiaadress: https://archive.iwlearn.net/helcom.fi/environment2/nature/en_GB/nature/index.html [09.01.2024]

HELCOM (2022). Inputs of hazardous substances to the Baltic Sea Baltic Marine Environment Protection Commission 2. Veebiaadress: www.helcom.fi [10.01.2024].

Hendozko, Edyta, Szefer, Piotr, Warzocha, Jan 2010. Heavy metals in *Macoma balthica* and extractable metals in sediments from the southern Baltic Sea. – Ecotoxicology and Environmental Safety, kd 73, nr 2, lk 152–163.

Jędruch, Agnieszka, Bełdowski, Jacek, Bełdowska, Magdalena 2015. Long-term changes and distribution of mercury concentrations in surface sediments of the Gdansk Basin (Southern Baltic Sea). – Journal of Soils and Sediments, kd 15, nr 12, lk 2487–2497.

Jokšas, Kęstutis, Stakėnienė, Rimutė, Raudonytė-Svirbutavičienė, Eva 2019. On the effectiveness of tributyltin ban: Distribution and changes in butyltin concentrations over a 9-year period in Klaipėda Port, Lithuania. – Ecotoxicology and Environmental Safety, kd 183,.

Jourmi, El, Jourmi, L El, Amine, A, Boutaleb, N, Abouakil, N, Lazar, S, Antri, S El 2015. The use of biomarkers (catalase and malondialdehyde) in marine pollution monitoring: Spatial variability. – *J. Mater. Environ. Sci*, kd 6, nr 6, lk 1592–1595.

Kadim, Miftahul Khair, Risjani, Yenny 2022. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. – *Emerging Contaminants*, kd 8, lk 195–205.

Kahlon, Sharanjeet Kaur, Sharma, Gaurav, Julka, J. M., Kumar, Amit, Sharma, Shweta, Stadler, Florian J. 2018. Impact of heavy metals and nanoparticles on aquatic biota. – *Environmental Chemistry Letters*. Springer Verlag. lk 919–946.

Kehrer, J. P., Robertson, J. D., Smith, C. V. 2010. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. – *Comprehensive Toxicology: Second Edition*, kd 1–14, lk 277–307.

Lastumäki, Anu, Turja, Raisa, Brenner, Matthias, Vanninen, Paula, Niemikoski, Hanna, Butrimavičienė, Laura, Stankevičiūtė, Milda, Lehtonen, Kari K. 2020. Biological effects of dumped chemical weapons in the Baltic Sea: A multi-biomarker study using caged mussels at the Bornholm main dumping site. – *Marine Environmental Research*, kd 161, lk 105036.

Leiniö, Sari, Lehtonen, Kari K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. – *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, kd 140, nr 3–4, lk 408–421.

Leppäranta, Matti, Myrberg, Kai 2009. Physical Oceanography of the Baltic Sea. – *Physical Oceanography of the Baltic Sea*, .

Liapi, Charis, Zarros, Apostolos, Theocharis, Stamatios, Voumvourakis, Konstantinos, Anifantaki, Foteini, Gkrouzman, Elena, Mellios, Zois, Skandali, Nikolina, Al-Humadi, Hussam, Tsakiris, Stylianos 2011. Short-term exposure to nickel alters the adult rat brain antioxidant status and the activities of crucial membrane-bound enzymes: Neuroprotection by L-cysteine. – *Biological Trace Element Research*, kd 143, nr 3, lk 1673–1681.

Liblik, Taavi, Skudra, Maris, Lips, Urmas 2017. On the buoyant sub-surface salinity maxima in the Gulf of Riga. – *Oceanologia*, kd 59, nr 2, lk 113–128.

Lionetto, Maria Giulia, Caricato, Roberto, Calisi, Antonio, Giordano, Maria Elena, Schettino, Trifone 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. – *BioMed Research International*.

Löf, Marie, Sundelin, Brita, Liewenborg, Birgitta, Bandh, Cecilia, Broeg, Katja, Schatz, Sandra, Gorokhova, Elena 2016. Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea. – *Ecological Indicators*, kd 63, lk 187–195.

Mnkandla, S. M., Basopo, N., Siwela, A. H. 2019. The Effect of Persistent Heavy Metal Exposure on Some Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation of the Freshwater snail, *Lymnaea natalensis*. – Bulletin of environmental contamination and toxicology, kd 103, nr 4, lk 551–558.

Neurotransmitters. BioNinja. Veebiaadress: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-6-human-physiology/65-neurons-and-synapses/neurotransmitters.html> [26.12.2023]

Ocean Biodiversity Information System. Veebiaadress: <https://obis.org/?query=macoma+balthica> [26.12.2023]

Ojaveer, Henn, Jaanus, Andres, Mackenzie, Brian R., Martin, Georg, Olenin, Sergej, Radziejewska, Teresa, Telesh, Irena, Zettler, Michael L., Zaiko, Anastasija 2010. Status of Biodiversity in the Baltic Sea. – PLOS ONE, kd 5, nr 9, lk e12467.

Omstedt, A., Elken, J., Lehmann, A., Leppäranta, M., Meier, H. E.M., Myrberg, K., Rutgersson, A. 2014. Progress in physical oceanography of the Baltic Sea during the 2003–2014 period. – Progress in Oceanography, kd 128, lk 139–171.

Qin, Meng, Cao, Zheng, Wen, Jing, Yu, Qingsong, Liu, Chaoyong, Wang, Fang, Zhang, Jianjun, Yang, Fengmei, Li, Yanyan, Fishbein, Gregory, Yan, Sen, Xu, Bin, Hou, Yi, Ning, Zhenbo, jt 2020. An Antioxidant Enzyme Therapeutic for COVID-19. – Advanced Materials, kd 32, nr 43, lk 2004901.

Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, Amulya N., Sarker, Subhodeep 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. – Ecotoxicology. lk 333–340.

Shah, Ankeet, Grimberg, Dominic C, Inman, Brant A. Classification of Molecular Biomarkers.

Szymczycha, Beata, Zaborska, Agata, Bełdowski, Jacek, Kuliński, Karol, Beszczyńska-Möller, Agnieszka, Kędra, Monika, Pempkowiak, Janusz 2018. The baltic sea. – World Seas: An Environmental Evaluation Volume I: Europe, the Americas and West Africa. Elsevier, lk 85–111.

Strode, Evita, Barda, Ieva, Suhareva, Natalija, Kolesova, Natalja, Turja, Raisa, Lehtonen, Kari K. 2023. Influence of Environmental Variables on Biochemical Biomarkers in the Amphipod *Monoporeia affinis* from the Gulf of Riga (Baltic Sea). – Water (Switzerland), kd 15, nr 2.

Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičiene, L., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S. V., Devier, M. H., Budzinski, H., Lehtonen, K. K. 2014. A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). – Science of The Total Environment, kd 473–474, lk 398–409.

Turja, Raisa, Sanni, Steinar, Stankevičiūtė, Milda, Butrimavičienė, Laura, Devier, Marie Hélène, Budzinski, Hélène, Lehtonen, Kari K. 2020. Biomarker responses and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Mytilus trossulus* and *Gammarus oceanicus* during exposure to crude oil. – Environmental Science and Pollution Research, kd 27, nr 13, lk 15498–15514.

Vlahogianni, Thomais, Dassenakis, Manos, Scoullou, Michael J., Valavanidis, Athanasios 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels

Mytilus galloprovincialis for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. – *Marine Pollution Bulletin*, kd 54, nr 9, lk 1361–1371.

Walker, C. H. 1995. Biochemical biomarkers in ecotoxicology — some recent developments. – *Science of The Total Environment*, kd 171, nr 1–3, lk 189–195.

WoRMS - World Register of Marine Species - *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758). Veebiaadress: <https://marinespecies.org/aphia.php/aphia.php?p=taxdetails&id=141579#notes> [12.12.2023]

Lisad

Lisa 1. Reaktsioonisegud

Mikroitiiterplaadile pipeteeritud reaktiivide kogused AChE aktiivsuste mõõtmiseks

	Nullproov (μ l)	Proov (μ l)
Supernatant	-	5
Reaktsioonipuhver (20 mM Na- PO ₄ , pH 7.0)	160	155
DTNB (10 mM)	10	10
ACTC (100 mM)	5	5

Mikroitiiterplaadile pipeteeritud reaktiivide kogused CAT aktiivsuste mõõtmiseks

	Nullproov (μ l)	Proov (μ l)
Reaktsioonipuhver (100 mM K- PO ₄ , pH 7.0)	280	260
10-kordselt lahjendatud supernatant	-	20
H ₂ O ₂ (450mM)	20	20

Lisa 2. Tulemuste statistiline analüüs R-s

#Shapiro-Wilk normality test results for AChE

data: V1
W = 0.60669, p-value = 6.647e-05

data: V3
W = 0.81944, p-value = 0.02495

data: V4
W = 0.63009, p-value = 0.0001266

data: V5
W = 0.92402, p-value = 0.3917

data: L1
W = 0.74914, p-value = 0.003483

data: L4
W = 0.80402, p-value = 0.01622

data: L9
W = 0.92489, p-value = 0.3996

data: L11
W = 0.71066, p-value = 0.001186

#Shapiro-Wilk normality test results for CAT

data: V1
W = 0.74959, p-value = 0.003528

data: V3
W = 0.92308, p-value = 0.3834

data: V4
W = 0.97664, p-value = 0.9447

data: V5
W = 0.8147, p-value = 0.02186

data: L1
W = 0.73645, p-value = 0.002441

data: L4
W = 0.94962, p-value = 0.664

data: L9
W = 0.9343, p-value = 0.4915

data: L11
W = 0.9697, p-value = 0.888

Kruskal-Wallis testi tulemused:

AChE: chi-squared = 23.165, df = 7, p-value = 0.001595

CAT: chi-squared = 29.188, df = 7, p-value = 0.0001337

AChE post-hoc

Dunn (1964) Kruskal-Wallis multiple comparison

p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	L1 - L11	-1.80903084	0.0704462118	0.21916599
2	L1 - L4	-2.89637385	0.0037750238	0.02114013
3	L11 - L4	-1.08734301	0.2768852486	0.36918033
4	L1 - L9	-3.11769145	0.0018227352	0.02551829
5	L11 - L9	-1.30866061	0.1906493401	0.28095692
6	L4 - L9	-0.22131760	0.8248451444	0.92382656
7	L1 - V1	-0.14433757	0.8852339145	0.91802036
8	L11 - V1	1.66469328	0.0959739651	0.22393925
9	L4 - V1	2.75203628	0.0059225959	0.02763878
10	L9 - V1	2.97335389	0.0029456462	0.02061952
11	L1 - V3	0.20207259	0.8398599725	0.90446459
12	L11 - V3	2.01110344	0.0443145322	0.17725813
13	L4 - V3	3.09844644	0.0019453813	0.01815689
14	L9 - V3	3.31976405	0.0009009356	0.02522620
15	V1 - V3	0.34641016	0.7290344895	0.92786208
16	L1 - V4	-1.74167331	0.0815656250	0.22838375
17	L11 - V4	0.06735753	0.9462970774	0.94629708
18	L4 - V4	1.15470054	0.2482130790	0.34749831
19	L9 - V4	1.37601814	0.1688160167	0.27804991
20	V1 - V4	-1.59733574	0.1101908871	0.22038177
21	V3 - V4	-1.94374591	0.0519260998	0.18174135
22	L1 - V5	-1.50111070	0.1333269318	0.24887694
23	L11 - V5	0.30792014	0.7581430977	0.92295681
24	L4 - V5	1.39526315	0.1629364998	0.28513887
25	L9 - V5	1.61658075	0.1059688091	0.22824051
26	V1 - V5	-1.35677313	0.1748533069	0.27199403
27	V3 - V5	-1.70318329	0.0885337720	0.22535869
28	V4 - V5	0.24056261	0.8098941304	0.94487649

CAT post-hoc
Dunn (1964) test Kruskal-Wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	L1 - L11	-2.0784610	3.766692e-02	0.0958794384
2	L1 - L4	0.1058475	9.157033e-01	0.9157033097
3	L11 - L4	2.1843085	2.893959e-02	0.0810308387
4	L1 - L9	1.0488530	2.942458e-01	0.4119440990
5	L11 - L9	3.1273140	1.764114e-03	0.0098790401
6	L4 - L9	0.9430054	3.456781e-01	0.4399539716
7	L1 - V1	-0.9911180	3.216280e-01	0.4288373108
8	L11 - V1	1.0873430	2.768852e-01	0.4080414191
9	L4 - V1	-1.0969655	2.726565e-01	0.4241322848
10	L9 - V1	-2.0399710	4.135322e-02	0.0964908445
11	L1 - V3	-2.3190236	2.039376e-02	0.0713781521
12	L11 - V3	-0.2405626	8.098941e-01	0.8398902093
13	L4 - V3	-2.4248711	1.531382e-02	0.0612552869
14	L9 - V3	-3.3678766	7.574950e-04	0.0106049301
15	V1 - V3	-1.3279056	1.842093e-01	0.3223662543
16	L1 - V4	-1.7031833	8.853377e-02	0.1770675440
17	L11 - V4	0.3752777	7.074540e-01	0.7618735037
18	L4 - V4	-1.8090308	7.044621e-02	0.1517303022
19	L9 - V4	-2.7520363	5.922596e-03	0.0276387807
20	V1 - V4	-0.7120653	4.764243e-01	0.5558283743
21	V3 - V4	0.6158403	5.379999e-01	0.6025599273
22	L1 - V5	-3.2235390	1.266171e-03	0.0088631938
23	L11 - V5	-1.1450780	2.521768e-01	0.4153500793
24	L4 - V5	-3.3293866	8.703751e-04	0.0081235013
25	L9 - V5	-4.2723920	1.933872e-05	0.0005414842
26	V1 - V5	-2.2324210	2.558715e-02	0.0796044619
27	V3 - V5	-0.9045154	3.657222e-01	0.4452269782
28	V4 - V5	-1.5203557	1.284216e-01	0.2397203195

>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Diana Maslova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Ohtlike ainete mõju ensümaatilistele biomarkeritele balti lamekarbis (*Macoma balthica*),

mille juhendaja on Natalja Kolesova,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

10.01.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktile 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.