

**Rasvahappojen kerrostuminen itämerennorpan traanissa
ja sen merkitys kudoksen rasvahappokoostumukseen
perustuvassa ravintokohteiden arvioinnissa**

Pro gradu

Riikka Hannukainen

Helsingin yliopisto

Biotieteiden laitos

Fysiologian ja neurotieteen osasto

2012



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Riikka Hannukainen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Rasvahappojen kerrostuminen itämerennorpan traanissa ja sen merkitys kudoksen rasvahappokostumukseen perustuvassa ravintokohteiden arvioinnissa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Fysiologia ja neurotiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu		Aika – Datum – Month and year Joulukuu 2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 82
Tiivistelmä – Referat – Abstract Työssä tutkittiin rasvahappojen kerrostumista itämerennorpan (<i>Phoca hispida botnica</i>) traanissa ja tämän merkitystä rasvahappokostumukseen perustuvassa ravintokohteiden arvioinnissa. Vertaamalla sisätraanin rasvahappokostumusta plasman ja maksan rasvahappokostumukseen pyrittiin selvittämään siirtyvätkö jotkut tietyt ravinnon rasvahapot toisia tehokkaammin traanin sisäosiin, eli heijastelevatko jotkut sisätraanin rasvahapoista ravinnon rasvahappokostumusta toisia paremmin. Itämerennorpan traanin eri kerrosten rasvahappokostumusta verrattiin myös sen tärkeimmän ravintokalan, Itämeren silakan rasvahappokostumukseen, jotta nähtäisiin minkä kerroksen koostumus muistuttaa eniten ravinnon rasvahappokostumusta. Vertailun vuoksi työssä tutkittiin myös makeassa vedessä elävän saimaannorpan (<i>Phoca hispida saimensis</i>) traanin ja maksan rasvahappokostumuksia. Lisäksi määritettiin plasma- ja maksanäytteiden kuljettaman tai lyhytaikaisesti varastoiman varastorasvan määrät. Tutkimuksessa käytettiin Perämerellä ammutuista itämerennorpista kerättyjä traani-, maksa- ja plasmanäytteitä, sekä kuolleina löydetystä saimaannorpista kerättyjä traani- ja maksanäytteitä. Kudosnäytteiden rasvahappokostumusten määrittäminen tehtiin analysoimalla niistä valmistettuja rasvahappojen metyyliesteriseoksia kaasukromatografisesti (GC). Lipidiluokkakoostumukset puolestaan määritettiin korkean erotuskyvyn ohutlevy-kromatografialla (HPTLC). Analyysien tuloksia käsiteltiin tilastollisesti pääkomponenttianalyysin (PCA) ja sen tuloksia ohjatusti luokittelevan menetelmän (SIMCA) avulla, regressioanalyysillä, sekä laskemalla koostumusten euklidisia etäisyyksiä eri näytteiden välillä. Jokaisen avusilikon traanille luotiin vertikaalinen rasvahappoprofiili toisiaan nahasta lihakseen seuraavien osanäytteiden rasvahappokostumuksen perusteella. Itämerennorpan traanin kerrostuneisuutta tutkittiin nyt ensimmäistä kertaa ja sen havaittiin olevan rakenteeltaan kerrostunut, kuten on havaittu myös aiemmin tutkituilla kahdella norpan alalajilla. Aiemmistä tutkimustuloksista poiketen keskitraani ei kuitenkaan eronnut rasvahappokostumukseltaan merkitsevästi muista traanikerroksista. Sisä- ja ulkotraanin väliset rasvahappokostumuksen erot olivat sen sijaan merkitseviä. Traanikerroksista sisätraani muistutti eniten itämerennorpan tärkeän saalislajin, silakan, rasvahappokostumusta. Itämerennorpan kudosten rasvahappokostumus erosi selvästi saimaannorpan kudosten rasvahappokostumuksista. Näiden kahden alalajin ulkotraanit kuitenkin muistuttivat toisiaan rasvahappokostumukseltaan sisätraaneja enemmän, mikä viittaa siihen, että niiden ulkotraanin koostumusta säätelevät samankaltaiset lämmönsäätelyyn liittyvät geneettisesti määräytyvät tekijät. Rasvahappokostumusten alalajikohtaisista eroista huolimatta traanin rasvahappojen kerrostumistapa oli samanlainen molemmilla tutkituilla alalajeilla. Traanin vertikaaliset rasvahappoprofiilit olivat kuitenkin hyvin yksilöllisiä. Useiden rasvahappojen suhteelliset määrät plasmassa ja sisätraanissa korreloivat tilastollisesti merkitsevästi keskenään. Tämä tulos vahvistaa oletuksen, että viimeaikaisella ravinnolla on vaikutusta erityisesti sisätraanin rasvahappokostumukseen ja, että sen perusteella voidaan saada tietoa eläimen ravinnosta. On kuitenkin huomattava, että tietyt sisätraanin rasvahapot ilmentävät ravinnon rasvahappokostumusta toisia paremmin. Vaikka traanien vertikaaliset rasvahappoprofiilit antavat mitä ilmeisimmin yksilökohtaista tietoa eläinten ravinnosta ja aineenvaihdunnasta, niitä ei ole pystytty tulkitsemaan aiemmissä tutkimuksissa kovinkaan syvällisesti. Nämä tulokset voivatkin osaltaan auttaa tulkitsemaan traanin vertikaalisia rasvahappoprofiileja tulevaisuudessa. Saatuja tuloksia voidaan lisäksi hyödyntää myös hylkeiden ravintokohteiden arvioinnissa käytettävien näytteenotto-protokollien suunnitteluun ja kehittämiseen.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords itämerennorppa, saimaannorppa, traanin kerrostuneisuus, rasvahappokostumus, ravinto, plasma, maksa			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Reijo Käkelä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Fysiologian ja neurotieteen osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisältö

1 Lyhenteet	5
2 Alkusanat	6
3 Johdanto	7
3.1 Lipidit	7
3.1.1 Rasvahapot	7
3.1.2 Lipidien metabolia	9
3.1.3 Lipidien analysointi	11
3.2 Merinisäkkäiden ravinnon arviointi	11
3.2.1 Rasvahapposormenjälkien analyysi	12
3.2.2 Merinisäkkäiden traani ja sen käyttö ravinnon arvioinnissa	14
3.3 Itämeri	19
3.3.1 Itämerennorppa	20
3.4 Saimaa	21
3.4.1 Saimaannorppa	21
3.5 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet	22
4 Aineisto	23
4.1 Itämerennorpat	23
4.2 Saimaannorpat	23
4.3 Silakat	24
5 Menetelmät	25
5.1 Rasvahappojen metyyliestereiden eristys ja analysointi	25
5.1.1 Esivalmistelut	25
5.1.2 Rasvahappojen metyyliestereiden valmistus	26
5.1.3 Kaasukromatografiasta	26
5.1.4 Näytteiden rasvahappokoostumuksen analysointi kaasukromatografisesti	28
5.2 Lipidien eristys ja analysointi	29
5.2.1 Esivalmistelut	29
5.2.2 Lipidien eristys	29
5.2.3 Ohutlevykromatografiasta	30
5.2.4 Näytteiden lipidiluokkien analysointi ohutlevykromatografialla	30
5.3 Tilastolliset menetelmät	31

5.3.1 Näytteiden välisen euklidisen etäisyyden laskeminen	31
5.3.2 Lipidiluokkien osuuksien määrittäminen	32
5.3.3 Regressioanalyysi	33
5.3.4 Pääkomponenttianalyysi ja SIMCA	34
6 Tulokset	35
6.1 Kudosten rasvahappokoostumukset	35
6.2 Traanin vertikaaliset rasvahappoprofiilit ja kerrostuneisuus	35
6.3 Erot makean veden ja murtoveden alalajien välillä	36
6.4 Euklidiset etäisyydet	42
6.5 Lipidikoostumukset	43
6.6 Itämerennorpan eri kudosten rasvahappokoostumusten riippuvuus	44
6.7 Maksan ja plasman triasyyliglyserolin määrän vaikutus rasvahappojen esiintymiseen itämerennorpan kudoksissa	47
6.8 Pääkomponenttianalyysi	48
7 Tulosten tarkastelu	53
7.1 Kudosten rasvahappokoostumukset tässä ja aiemmissa tutkimuksissa	53
7.2 Traanin kerrostuneisuus	54
7.3 Murtoveden ja makean veden alalajien kudosten rasvahappokoostumuksen erot	55
7.4 Maksan ja plasman lipidikoostumus	58
7.5 Ravinnon vaikutus traanin rasvahappokoostumukseen	58
7.6 Virhelähteiden arviointi	60
7.7 Yhteenveto	61
8 Kiitokset	62
9 Lähteet	63
10 Liitteet	81
Liite 1. Rasvahappojen metyyliestereiden standardit	81
Liite 2. Lipidiluokkien standardit	82

1 Lyhenteet

AA	arakidonihappo (arachidonic acid)
EPA	eikosapentaeenihappo (eicosapentaenoic acid)
FFA	vapaa rasvahappo (free fatty acid)
MUFA	kertatydyttymätön rasvahappo (monounsaturated fatty acid)
PCA	pääkomponenttianalyysi (principal component analysis)
PL	fosfolipidit (phospholipids)
PUFA	monitydyttymätön rasvahappo (polyunsaturated fatty acid)
SFA	tydyttynyt rasvahappo (saturated fatty acid)
SIMCA	Soft independent modelling of class analogy
TAG	triasyyli glyseroli

2 Alkusanat

Itämeren hyljekannoissa tapahtui viime vuosisadalla huomattava romahdus, mutta suojelun ansiosta ne ovat viime vuosikymmeninä elpyneet (Valste 2007). Varsinkin harmaahyljekantojen kasvu on lisännyt hylkeiden kalataloudelle aiheuttamien vahinkojen määrää, mikä on aiheuttanut ristiriitoja hylkeiden ja kalastajien välille. Itämeren hyljekantojen hoito onkin tasapainottelua lajien suotuisan suojelutason toteutumisen sekä rannikkokalastuksen kannattavuuden välillä (Anon. 2012a).

Jotta hylkeiden kalastukselle aiheuttamien vahinkojen laajuutta, sekä niiden ekologista roolia voitaisiin arvioida, täytyy pystyä määrittämään niiden eri alueilla ja eri vuodenaikoina käyttämät ravintokohteet. Hylkeiden ravinnonkäyttöä on ryhdytty selvittämään EU:n rahoittamassa kansainvälisessä ECOSEAL-hankkeessa, johon tämä norppiin keskittyvä tutkimus myös osaltaan liittyy.

3 Johdanto

3.1 Lipidit

Lipidit on yleisnimitys eliöiden kudoksissa syntyneille rasvoille ja rasvamaisille aineille. Ne ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan monimuotoisia, ja siksi vaikeita määrittellä (Campbell & Reece 2008). Itse asiassa lipideille ei ole olemassa yleisesti hyväksyttyä määritelmää. Ryhmään kuuluville yhdisteille tärkeä yhteinen ominaisuus kuitenkin on, etteivät ne liukene veteen, mutta liukenevat hyvin orgaanisiin liuottimiin (Campbell & Reece 2008), kuten kloroformiin, eettereihin ja alkoholeihin (Christie & Han 2010). Lipidien hydrofobisuus johtuu niiden molekyyli­rakenteesta. Ne koostuvat pääosin hiilestä ja vedystä, ja ovat pääasi­allisesti polaarittomia molekyy­lejä (Hill ym. 2008). Eläin- ja kasvip­eräiset päälipidiluokat koostuvat kolmiarvoiseen alkoholiin, glyseroliin, tai muihin alkoholeihin esterisidoksin liittyneistä rasvahapoista, sekä pitkäketjuisiin emäksiin (ja joissain tapauksissa myös amiineihin) amidisidoksin liittyneistä rasvahapoista (Christie & Han 2010). Lipideihin kuuluvat muun muassa triasyyliglyserolit (TAG), vahat ja fosfolipidit (PL) (Hill ym. 2008), sekä steroidit, terpeenit ja karotenoidit (Christie & Han 2010).

Lipideillä on monia tehtäviä. Ensinnäkin PL:t ja kolesteroli ovat solukalvon ja solun sisäisten kalvojen keskeisiä rakenneosia. Toiseksi glyserolista ja siihen esterisidoksin liittyneistä kolmesta rasvahaposta koostuvat TAG:t toimivat merkittävänä energiavarastoaineena eläinten ja kasvien kudoksissa. Ne soveltuvat energian varastointiin erityisen hyvin, sillä niiden painoyksikköä kohden sisältämä energia on paljon suurempi kuin proteiineilla ja hiilihydraateilla (Hill ym. 2008). Näiden tehtävien lisäksi lipidit toimivat muun muassa viest­iaineina, liukasteina ja eristeinä, ovat prostaglandiinien ja monien hyönteisten feromonien esiasteita, vähentävät kehon pinnan veden läpäisevyyttä, sekä vaikuttavat kelluvuuteen esimerkiksi merinisäkkäillä (Christie & Han 2010).

3.1.1 Rasvahapot

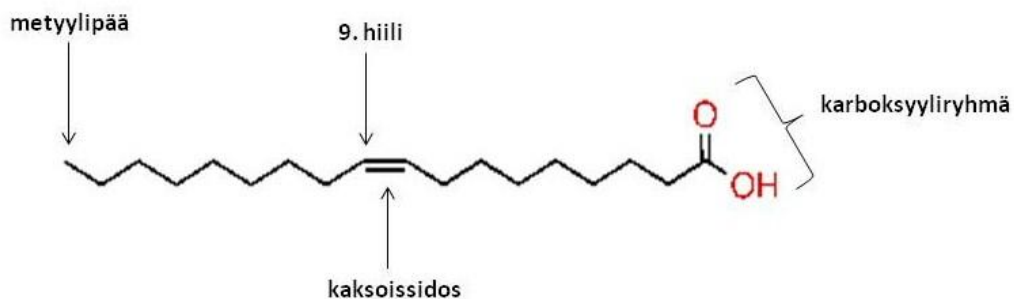
Useimpien lipidien tärkeitä rakenneosia ovat rasvahapot, jotka ovat pitk­ästä hiilivetyketjurungosta koostuvia molekyy­lejä, joiden toisessa päässä on karboksyyli­ryhmä ja toisessa metyyli­ryhmä. Rasvahapot ovat rakenteellisesti

monimuotoisia, mikä luo pohjan myös lipidien monimuotoisuudelle (Hill ym. 2008). Kasvi-, eläin ja mikrobiperäiset rasvahapot sisältävät yleensä parillisen määrän hiiliatomeja ja ovat rakenteeltaan suoraketjuisia (Christie & Han 2010). Eliöt pystyvät biokemiallisista rajoituksista ja eliöryhmästä riippuen syntetisoimaan rasvahappoja joissain määrin, sekä muokkaamaan niiden hiiliketjun pituutta ja lisäämään niihin kaksoissidoksia (Iverson 1993). Tämän seurauksena voi syntyä myös hiilimäärältään parittomia ja haarautuvia rasvahappoja. Eläinkudoksissa yleisimmät rasvahapot ovat hiiliketjultaan 14–22 hiiltä pitkiä, mutta myös lyhimmillään kahden hiilen pituisia karboksyylihappoja (vesilukoisuutensa vuoksi kaikkein lyhytketjuisimpia ei lueta rasvahapoiksi) ja pisimmillään yli 36 hiilen pituisia rasvahappoja esiintyy. Joissain mikrobiryhmissä voi esiintyä ketjultaan jopa yli 80 hiiltä pitkiä rasvahappoja (Christie & Han 2010).

Rasvahapot eroavat toisistaan rakenteellisesti hiilimäärän lisäksi myös niiden sisältämien kaksoissidosten määrän ja sijainnin perusteella. Jos hiiliatomien välillä ei ole kaksoissidoksia, kutsutaan rasvahappoa tyydyttyneeksi rasvahapoksi. Rasvahapon hiilivetyketjun sisältäessä vähintään yhden kaksoissidoksen, sitä kutsutaan tyydyttymättömäksi rasvahapoksi (Hill ym. 2008; Campbell & Reece 2008). *Cis*-kaksoissidos aiheuttaa hiilivetyketjuun taitteen, mikä estää vierekkäisiä rasvahappomolekyylejä pakkautumasta tiiviisti yhteen. Tästä johtuen tyydyttymättömistä rasvahapoista koostuvat rasvat ovat juoksevampia ja niiden sulamispiste on tyydyttyneitä rasvoja matalampi. Tyydyttyneitten rasvahappojen hiiliketjut ovat sen sijaan suoraa, joten ne voivat pakkautua tiiviisti vierekkäin. Niiden muodostamat rasvat ovat huoneenlämmössä kiinteitä ja niiden sulamispiste on korkeampi (Campbell & Reece 2008). Vesieläinten ja kasvien rasvat sisältävät yleensä enemmän tyydyttymättömiä rasvahappoja kuin maaeläinten rasvat (Hilditch & Williams 1964). Eläinten ja levien kudosten rasvahapoissa esiintyy kaksoissidoksia yhdestä kuuteen, kun taas kasveilla niitä on harvoin enemmän kuin kolme ja mikrobeilla vain harvoin enemmän kuin yksi (Christie & Han 2010).

Rasvahappojen nimeämisessä käytetään yleisesti tapaa: [hiilten lukumäärä]:[kaksoissidosten lukumäärä]n-[ensimmäisen kaksoissidoksen paikka

metyylipäästä laskien]. Tällöin esimerkiksi oleiinihapon lyhenne 18:1n-9 kertoo, että kyseisessä rasvahapossa on 18 hiilen pituinen ketju, joka sisältää yhden kaksoissidoksen, joka sijaitsee yhdeksännessä hiilessä ketjun metyyli- päästä laskien (Kuva 1). Monityydyttymättömien rasvahappojen kohdalla ilmaistaan vain lähimpänä metyyli- päästä olevan kaksoissidoksen paikka ja muut sijaitsevat, ellei toisin mainita, aina yhden metyleeniryhmän takana (esim. 20:5n-3 tapauksessa asemissa n-3, n-6, n-9, n-12 ja n-15). Rasvahapon hiiliketju voi myös olla haarautunut, jolloin nimeämisessä käytetään lisämerkintöjä *iso* ja *anteiso*. Sana ”*iso*” rasvahapon nimen lopussa (esim. 15:0 *iso*) tarkoittaa, että rasvahapolla on metyylihaara toisessa hiilessä metyyli- päästä laskien, ja ”*anteiso*” puolestaan, että metyylihaara on kolmannessa hiilessä metyyli- päästä laskien (Strandberg ym. 2008). Englanninkielisessä kirjallisuudessa rasvahapoista puhuttaessa käytetään myös lyhenteitä SFA, MUFA ja PUFA. Näistä SFA tarkoittaa tyydyttynyttä rasvahappoa (saturated fatty acid), MUFA kertatyydyttymätöntä rasvahappoa (monounsaturated fatty acid) ja PUFA monityydyttymätöntä rasvahappoa (polyunsaturated fatty acid).



Kuva 1. Esimerkki rasvahapon rakenteesta, oleiinihappo 18:1n-9. Rasvahapon päässä on metyyli- ja karboksyyli-ryhmät ja kaksoissidos sijaitsee yhdeksännessä hiilessä metyyli- päästä laskien.

3.1.2 Lipidien metabolia

Yksimahaisilla eläimillä ravinnon lipidit hydrolysoidaan mahalaukussa ja ohutsuolessa monoasyyli- glyseroliksi, glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi (FFA). Hajoamistuotteet kuljetetaan ohutsuolen seinämän läpi, jossa ne esteröidään uudelleen TAG:ksi ja pakataan veressä kiertäviin kylomikroneihin kudoksiin kuljetettaviksi (Borgström 1977; Patton 1981). Kudoksissa rasvahapot joko käytetään energiana tai varastoidaan rasvakudokseen (Iverson ym. 2004).

Ravinnon rasvahapot säilyvät siis pääosin muuttumattomina ruoansulatuksen aikana, ja monissa tutkimuksissa on todistettu, että ne myös varastoidaan kehon kudoksiin lähes sellaisenaan (esim. Iverson 1993; Gilmour ym. 1995; Pond ym. 1995; Kirsch ym. 1998; Logan ym. 2000). Ravinnon rasvahappokoostumuksen onkin huomattu vaikuttavan voimakkaasti rasvakudosten rasvahappokoostumukseen laboratorioeläimillä (Valero-Garrido ym. 1990), ihmisillä (Plakke ym. 1983; Field & Clandinin 1984; Tjonneland ym. 1993; Summers ym. 2000), jääkarhuilla (Colby ym. 1993) ja hylkeillä (esim. Iverson ym. 1997a, b). Petojen elimistössä tapahtuu kuitenkin aina jonkin verran rasvahappojen muokkausta ja biosynteesiä, mistä johtuen niiden rasvakudosten koostumus ei koskaan ole identtinen ravinnon rasvahappokoostumuksen kanssa (Iverson ym. 2004).

Kudoksiin sitoutunut lipoproteiinilipaasi-entsyymi on päävastuussa veressä kiertävän TAG:n vapauttamisesta elinten käyttöön. Lipoproteiinilipaasi hydrolysoi veren lipoproteiinien kantamaa TAG:a ja edistää tällä tavoin rasvahappojen talteenottoa useimmissa kudoksissa, mukaan lukien rasvakudoksessa (Hamosh & Hamosh 1985). Paastoamisen tai nääntymisen aikana lipoproteiinilipaasin aktiivisuus laskee rasvakudoksessa huomattavasti, mikä pysäyttää rasvahappojen varastoimisen. Tällöin rasvasolujen hormoneille herkkä lipaasi puolestaan aktivoituu ja katalysoi rasvahappojen vapauttamista rasvakudoksesta verenkiertoon (Allen 1976).

Eläimet pystyvät biosyntetisoimaan rasvahappoja vain rajoitetussa määrin (Cook 1985), joten ravinnosta saadut rasvahapot on mahdollista erottaa elimistön valmistamista rasvahapoista (Iverson ym. 2004). Esimerkiksi ravinnon sisältämät hiiliketjultaan alle 14 hiilen pituiset rasvahapot hapetetaan ruoansulatuksen jälkeen välittömästi, joten niitä voi kertyä petojen kudoksiin vain elimistön oman rasvahapposynteesin seurauksena (Jackson 1974). Muita eläinten elimistön oman biosynteesin tuottamia rasvahappoja ovat pääasiallisesti 16:0, 16:1, 18:0 ja 18:1 (Iverson 1993). Vastaavasti hiiliketjun n-6- tai n-3-asemissa kaksoissidoksia sisältävät rasvahapot ja tietyt muut rasvahapot, kuten 22:1n-11, voivat olla peräisin vain ravinnosta (Bremer & Norum 1982). On myös olemassa rasvahappoja, jotka voivat olla lähtöisin sekä ravinnosta että biosynteesistä. (Ackman ym. 1988; Iverson 1993; Iverson ym. 1995).

3.1.3 Lipidien analysointi

Lipidien analysointia varten on kehitetty useita eri tekniikoita. Näitä ovat muun muassa kaasukromatografia (GC) tai kaasu-nestekromatografia (GLC), ohutlevykromatografia (TLC), korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) ja massaspektrometria (MS). Lipidiluokkien erottamiseen käytetään yleensä adsorptiokromatografiaa (HPLC tai TLC), ja kudoksen koko lipidiseoksen rasvahappokoostumus voidaan edelleen määrittää kaasukromatografisesti (Christie & Han 2010).

Lipidien tai niiden rakenneosien, rasvahappojen, kromatografisessa erottelutavassa on olemassa kuusi päävaihtoehtoa. Näitä ovat adsorptiokromatografia, normaalifaasi-neste-erottelukromatografia, neste-neste- tai kaasu-neste-erottelukromatografia, ioninvaihtokromatografia, geelisuodatuskromatografia ja kiraalifaasikromatografia. Kaikissa tapauksissa erottuminen perustuu molekulaarisiin vuorovaikutuksiin liuoksen, liikkuvan faasin, sekä paikallaan pysyvän faasin välillä. Rasvahappojen erottumisessa erityisen tärkeitä ovat hydrofobiset vuorovaikutukset, mutta niiden lisäksi esimerkiksi molekyylien polaarisuus voi vaikuttaa erottumiseen (Christie & Han 2010).

3.2 Merinisäkkäiden ravinnon arviointi

Ravinnon ja sen ajallisen ja paikallisen vaihtelun tunteminen on tärkeää merinisäkkäiden ekologian tutkimisessa, sekä erityisesti arvioitaessa niiden roolia meriekosysteemien kuluttajina ja kalakantojen säätelijöinä (Laws 1993; Knox 1994; Santos ym. 2001). Näistä tiedoista on myös hallintopoliittista hyötyä esimerkiksi hylkeiden ja kalateollisuuden välisten konfliktien selvittelyssä (Harwood 1987; Harwood & Croxall 1988).

Merinisäkkäiden ravinnon tutkimiseen liittyy kuitenkin ongelmia. Harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta niiden ruokailu tapahtuu pinnan alla, joten suoraan tarkkailuun perustuva ravinnon havainnointi ei yleensä ole mahdollista (Iverson ym. 1997b). Perinteiset mahan sisällön ja ulosteiden perusteella tehtävät analyysit sisältävät vääristymiä, sillä eri ravintokohteiden sulatusnopeudet vaihtelevat ja pehmeärakenteisesta saaliista ei jää havaittavia kovia osia. Lisäksi näiden analyysien tulokset kertovat vain aivan viimeaikaisimmista aterioista eivätkä

kuvaa pitkäaikaisempaa ravintoa (Jobling & Breiby 1986; Jobling 1987; Pierce & Boyle 1991). Tämän vuoksi perinteisten menetelmien rinnalle onkin kehitetty uusia, joita ovat muun muassa ulosteista tehtävä saaliin DNA:n eristys, pedon kudosten rasvahapposormenjälkien analyysi tai niiden sisältämien vakaiden isotooppien suhteiden määrittäminen, sekä suora videotarkkailu (Tollit & Heaslip 2006).

Uusillakin menetelmillä on hyvät ja huonot puolensa. Ulosteiden sisältämän DNA:n tutkiminen on kallista ja se heijastaa perinteisten menetelmien tavoin vain viimeaikaisinta ravintoa. Tämän menetelmän avulla voidaan kuitenkin tunnistaa myös ne saalislajit, joista ei ole jäänyt sulamattomia kovia osia (Tollit & Heaslip 2006). Petojen kudoksista mitattavat vakaiden isotooppien (esimerkiksi $\delta^{13}\text{C}$ ja $\delta^{15}\text{N}$) suhteiden analyysit voivat puolestaan tarjota tietoa eläimen trofiatasosta, mutta ne eivät kerro ravinnon sisällöstä tarkemmin. Niiden avulla voidaan kuitenkin havaita ravinnossa tapahtuvia ajallisia muutoksia (Kurle 2002). Eläimiin kiinnitettävien kameroiden avulla voidaan puolestaan saada tietoa saalistusmenetelmistä ja saaliin laadusta, mutta laitteet ovat kalliita, niillä on rajoitettu tallennuskapasiteetti ja ne on pystyttävä keräämään takaisin (Bowen ym. 2002; Tollit & Heaslip 2006). Rasvakudoksen rasvahapposormenjälkien analyysi on sen sijaan osoittautunut lupaavaksi menetelmäksi ja sitä on hyödynnetty paljon viimeaikaisissa merinisäkkäiden ravinnon arviointiin liittyvissä tutkimuksissa (esim. Iverson ym. 1997b; Best ym. 2003; Walton & Pomeroy 2003; Tucker ym. 2009).

3.2.1 Rasvahapposormenjälkien analyysi

Rasvakudosten rasvahapposormenjälkien analyysi on tarjonnut laadullista tietoa monien merinisäkkäiden, merilintujen ja maapetojen ravinnon ajallisista ja paikallisista eroista (esim. Smith ym. 1996; Iverson ym. 1997b, Beck ym. 2005), sekä myös määrällisiä arvioita ravinnon koostumuksesta (Iverson ym. 2004; Beck ym. 2007; Iverson ym. 2007). Menetelmä perustuu siihen, että tietyt ravinnon sisältämät rasvahapot voidaan varastoida pedon rasvakudoksiin pääosin muuttumattomina (ks. 3.1.2 Lipidien metabolia). Kudosten rasvahappokoostumukset tarjoavat täten biokemiallisia sormenjälkiä, joiden avulla voidaan havaita ravinnossa esiintyviä eroja ja muutoksia (esim. Iverson ym. 1997b; Beck

ym. 2005; Budge ym. 2006), sekä tunnistaa jopa yksittäisiä saalislajeja (Iverson 1993; Raclot ym. 1998).

Eri taksonomisissa ryhmissä esiintyvistä rasvahappojen biosynteesiin ja muokkaukseen liittyvistä rajoituksista (esim. Paradis & Ackman 1976; Ackman 1980; Cook 1985; Fraser ym. 1989) johtuen tiettyjen rasvahappojen isomeerien tai rasvahappoperheiden alkuperä ravintoketjussa voidaan tunnistaa (Cook 1985). Meriekosysteemeissä esiintyvät lipidit sisältävät tunnetusti paljon pitkäketjuisia ja monitydyttymättömiä rasvahappoja, jotka ovat peräisin yksisoluisesta kasviplanktonista ja merileivistä (Ackman 1980). Lisäksi jotkin epätavalliset, esimerkiksi hiiliketjultaan parittomat tai haarautuneet rasvahapot voivat olla ominaisia vain tietyille ekosysteemin fylogeneettiselle ryhmälle tai jopa tietyille lajille (Iverson 1993). Esimerkiksi merien ekosysteemeissä kertatydyttymättömät rasvahapot 22:1n-11 ja 20:1n-9 ovat peräisin äyriäisten vahaestereistä (Pascal & Ackman 1976; Ackman ym. 1980), ja niiden tasot ovat makeiden vesien eliöissä tyypillisesti hyvin alhaisia (Ackman 1967; Käkälä ym. 1993, 1995; Grahl-Nielsen ym. 2005).

Rasvakudosten n-3 ja n-6 monitydyttymättömien rasvahappojen (PUFA) suhde kertoo myös ravintokohteiden alkuperästä. Ravintoketjujen n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde nimittäin vaihtelee ekosysteemistä riippuen (Napolitano 1999). Yleisesti vesiekosysteemien ravintoverkoissa on paljon n-3- ja maekosysteemien ravintoverkoissa paljon n-6-monitydyttymättömiä rasvahappoja (Ackman 1994). Makeiden vesien eliöissä on kuitenkin tyypillisesti enemmän n-6-monitydyttymättömiä rasvahappoja kuin merien eliöissä, eli niiden n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde on korkeampi (Käkälä ym. 1993, 1995; Grahl-Nielsen ym. 2005). Lisäksi runsaasti pohjaeläimiä ravintonaan käyttävissä kaloissa on suuremmat n-6 PUFA/n-3 PUFA-määräsuhteet kuin pelagisissa kaloissa (Käkälä ym. 2005, 2007).

Merinisäkkäillä rasvahappoja analysoidaan yleensä niiden nahanalaisesta rasvakerroksesta, eli traanista, tai niiden maidosta (Best ym. 2003). Maidon rasvahappojen analysointi rajoittuu kuitenkin vain maitoa tuottavien naaraiden tutkimiseen, kun taas traanin rasvahappokoostumuksen analysointi soveltuu

kaikille ikäluokille ja sukupuolille (Iverson ym. 1997b; Kirsch ym. 2000; Bradshaw ym. 2003; Grahl-Nielsen ym. 2003; Falk-Petersen ym. 2004; Iverson ym. 2004).

3.2.2 Merinisäkkäiden traani ja sen käyttö ravinnon arvioinnissa

Merinisäkkäiden nahanalainen traanikerros koostuu pääosin neutraalista varastolipidistä, TAG:sta (Summers ym. 2000). Traanin kehittyminen on ollut evoluution aikana monin tavoin keskeinen sopeuma nisäkkäiden siirtymisessä maalta vesielämään (Strandberg ym. 2008). Ensinnäkin se on alhaisen lämmönjohtavuutensa ansiosta erinomainen eriste, jonka kautta tapahtuvaa lämmönhukkaa voidaan säädellä tehokkaasti verenkierron avulla (Irving & Hart 1957; Hart & Irving 1959). Tämän lisäksi traani toimii energiavarastona, vaikuttaa kelluvuuteen ja tekee eläimestä virtaviivaisemman (Koopman ym. 2002; Strandberg ym. 2008). Traanin energiavarastot ovat hylkeille ja monille muille merinisäkkäille erityisen tärkeitä niiden kausittaisten paastojaksojen aikana, esimerkiksi lisääntymis- tai karvanvaihtoaikaan. Tällöin suurin osa energiasta on lähtöisin traanin rasvasta ja proteiinien käyttö on rajoitettua (Castellini & Rea 1992).

Traani on paljon käytetty kudos merinisäkkäiden biomonitoroinnissa, sillä sen perusteella voidaan saada tietoa monista lajien fysiologisista ja ekologisista ominaisuuksista, kuten lämmönsäätelystä, energiatasapainosta ja ravinnon vuodenaikaisvaihteluista. Se voi myös kertoa mahdollisesta altistumisesta varsinkin rasvaliukoisille ympäristömyrkyille (Strandberg ym. 2008). Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että ravinnolla on merkittävä vaikutus merinisäkkäiden traanin rasvahappokoostumukseen (esim. Ackman & Eaton 1966; Iverson 1993; Käkälä ym. 1993; Iverson ym. 1995, 2004; Käkälä & Hyvärinen 1998; Kirsch ym. 2000). Traani soveltuu ravintotutkimuksiin hyvin, sillä sen rasvahapot edustavat yksilön ravintoa viikkojen tai kuukausien ajalta (Iverson ym. 2004; Budge ym. 2006), eli ekologisesti merkityksellisemmältä aikaskaalalta kuin perinteiset menetelmät (Tucker ym. 2009).

Hylkeillä tehdyissä tutkimuksissa traanin rasvahappokoostumuksen on huomattu kertovan esimerkiksi ravinnon vuosittaisesta vaihtelusta, sekä yksilöiden

ruokavalioissa esiintyvistä eroista (Best ym. 2003; Bradshaw ym. 2003; Iverson ym. 1997b; Tucker ym. 2009; Walton & Pomeroy 2003). Lisäksi vertailtaessa meren ja makean veden hyljepopulaatioita on voitu havainnoida kuinka merkittävästi erilaisista ravintoketjuista peräisin olevat rasvahappolähteet vaikuttavat traanin rasvahappokoostumukseen (Käkelä ym. 1993; Käkelä & Hyvärinen 1996; Grahl-Nielsen ym. 2005).

3.2.2.1 Traanin kerrostuneisuus

Traani ei ole rakenteeltaan homogeeninen, vaan sen rasvahappokoostumuksen on havaittu olevan kerrostunut tähän mennessä tutkituilla hetulavalas-, hammasvalas-, mursu- ja hyljelajeilla (esim. Käkelä & Hyvärinen 1996; Koopman ym. 1996; Hooker ym. 2001; Best ym. 2003; Olsen & Grahl-Nielsen 2003; Grahl-Nielsen 2005 ym.; Strandberg ym. 2008; Skoglund ym. 2010). Näiden tutkimusten perusteella ulkotraanissa on suhteellisesti enemmän lyhytketjuisia MUFA:ja ja vähemmän SFA:ja sekä pitkäketjuisia MUFA:ja kuin sisätraanissa. Useat tutkimukset myös viittaavat siihen, että sisäkerros on aineenvaihdunnaltaan ulkokerrosta aktiivisempi ja, että ravinnon rasvahapot varastoidaan ensisijaisesti juuri sisätraaniin (esim. Koopman ym. 1996; Strandberg ym. 2008). Rasvahappojen lisäksi myös orgaanisten ympäristömyrkkyjen ja rasvaliukoisten vitamiinien on havaittu kerrostuvan traanissa (Fredheim ym. 1995; Käkelä & Hyvärinen 1996; Rosa ym. 2007; Severinsen ym. 2000).

Traanin kerrostumisen syyt ovat vielä epäselviä (Averina ym. 2012), mutta ne liittyvät todennäköisesti traanin kerrosten välisiin lämpötilaeroihin ja tarpeeseen pitää lipidit tarpeeksi juoksevina (Strandberg ym. 2011). Ulkotraanin lämpötila on huomattavasti sisätraanin ja kehon sisäosien lämpötilaa alhaisempi (Irving & Hart 1957; Hart & Irving 1959), mikä saattaa rajoittaa korkean sulamislämpötilan omaavien rasvahappojen varastoimista ulkotraaniin. Ulkotraanin runsaat MUFA-tasot ovat luultavasti seurausta sekä sisäsyntyisestä SFA:jen desaturaatiosta että valikoivasta ravintoperäisten MUFA:jen varastoinnista (Strandberg ym. 2011). Traanin kerrostuneisuutta on havaittu esiintyvän jo sikiöillä, joten todennäköisesti siihen vaikuttavat lämpötilan lisäksi myös geneettiset tekijät (Averina ym. 2012).

Viimeisimmät norpalla (*Phoca hispida*) ja sen alalajilla, saimaannorpalla (*Phoca hispida saimensis*), tehdyt tutkimukset (Strandberg ym. 2008, 2011) ovat osoittaneet, että traanin rasvahappokoostumus ei muutu poikkileikkauksen matkalla tasaisesti vaan siitä voidaan erottaa kolme toisistaan koostumukseltaan ja toiminnallisuudeltaan erilaista kerrosta.

Näistä uloin nahan alla sijaitseva traanikerros vaikuttaa olevan toiminnaltaan pääasiassa lämmönsäätelyllinen. Sen rasvahappokoostumuksen vaihtelun on havaittu olevan pientä sekä yksilöiden että tutkittujen norpan alalajien välillä. Tämä viittaa siihen, että sisäsyntyisillä lämmöneristykseen ja -sääteelyyn liittyvillä tekijöillä on todennäköisesti ravintoa voimakkaampi vaikutus ulkotraanin rasvahappokoostumuksen muodostumisessa (Strandberg ym. 2008, 2011). Norppaan verrattuna samankokoisella grönlanninhylkeellä ympäristön lämpötilan vaihteluiden on havaittu heijastuvan traanissa 1,5 cm syvyyteen asti, ja lähempänä lihasta sijaitsevan traanin olevan termoneutraalia (Irving & Hart 1957; Hart & Irving 1959). Tämä mitattu lämpögradientti ylittää syvyyteen, joka vastaa norpalla suhteellisen vakioiseksi havaittua ulkotraanin paksuutta (1,5 cm), joka voi taas edustaa riittävään lämmöneristykseen tarvittavan traanin minimipaksuutta (Strandberg ym. 2008, 2011).

Kun traani on riittävän paksu (norpalla yli 3 cm), siitä voidaan erottaa koostumukseltaan yhtenäinen keskikerros. Tämän kerroksen tärkein tehtävä on ilmeisesti energian varastointi, ja sen paksuus vaihtelee ravitsemustilan mukaan. Ympäristön lämpötila ei näytä vaikuttavan huomattavasti sen rasvahappokoostumukseen, toisin kuin ulkotraanissa. Toisaalta myöskään viimeaikaisella aineenvaihdunnalla ei ilmeisesti ole keskitraanissa suurta vaikutusta, joten sen koostumus voi heijastaa pidempiaikaisia ravinnon mukana saatujen rasvahappojen keskiarvoja, sekä pitkällä aikavälillä ravitsemuksessa tapahtuneita muutoksia. (Strandberg ym. 2008, 2011)

Traanin sisimmässä kerroksessa lipidimetabolia on todennäköisesti kaikkein vilkkainta. Tämän kerroksen rasvahappokoostumukseen luultavasti vaikuttavat voimakkaasti sekä viimeaikainen että meneillään oleva rasvahappojen varastointi ja vapauttaminen (Koopman ym. 1996; Strandberg ym. 2008). Lämpötilalla ei sen

sijaan luultavasti ole vaikutusta tämän kerroksen rasvahappokoostumuksen muodostumisessa, sillä lämpötilan vaihtelut ovat sisätraanissa minimaalisia (Strandberg ym. 2008).

Yksittäisten rasvahappojen varastoinnin ja vapauttamisen on havaittu tapahtuvan valikoivasti (Raclot & Groscolas 1995; Raclot 2003). Tästä johtuen viimeaikainen ravitsemustilasta riippuva lipidimetabolia voi muuttaa sisätraanin koostumusta, jolloin se voi erota huomattavasti keskikerroksen pitkäaikaisemmasta keskiarvoisesta rasvahappokoostumuksesta. Sisätraanin rasvahappokoostumus voisi siten antaa tietoa eläimen viimeaikaisesta ravinnosta ja ravitsemustilanteesta (Strandberg ym. 2008). Sisätraanin paksuuden on havaittu olevan ulkotraanin paksuuden tavoin hyvin vakioinen (norpalla noin 1 cm) (Strandberg ym. 2008, 2011).

3.2.2.2 Traanin käytön haasteet ravinnon arvioinnissa

Vaikka traanin rasvahapposormenjäljet ovat osoittautuneet hyödylliseksi työkaluksi, niiden perusteella tehtävä ravinnon koostumuksen arvioiminen ei ole yksiselitteistä. Myöskään eri traanikerrosten rasvahappokoostumuksen soveltuvuutta ravinnonkäytön ja ravitsemustilanteen arvioimiseen eri aikaväleillä ei ole vielä täysin todistettu.

Rasvahapposormenjälkiä tutkittaessa on otettava huomioon, että nisäkkäiden aineenvaihdunta muokkaa joitain ravinnon rasvahappoja ennen niiden varastoimista traaniin (Budge ym. 2004; Cooper ym. 2005) ja niiden elimistön oma rasvahapposynteesi saattaa peittää ravinnon rasvahappojen vaikutuksia (Ntambi ym. 2004). Lisäksi rasvahappojen valikoiva varastointi ja vapauttaminen voi vaikuttaa niiden määriin rasvakudoksessa. Tämä valikoivuus toimii yksittäisen rasvahapon kohdalla siten, että mobilisaatio kasvaa kaksoissidosten määrän lisääntyessä ja vähenee hiiliketjun pituuden kasvaessa. (Raclot 2003).

Ravinnon lisäksi kaikilla eläimen aineenvaihduntaan vaikuttavilla fysiologisilla ja ympäristöllisillä tekijöillä, kuten ravitsemustilalla, liikkumisaktiivisuudella ja veden lämpötilalla on luultavasti merkitystä traanin rasvahappokoostumuksen muodostumisessa (Ryg ym. 1988; Aguilar & Borell 1990; Worthy & Edwards 1990). Lisäksi myös iän (Koopman ym. 1996; Iverson ym. 1997b; Kirsch ym.

2000; Smith & Worthy 2006, Koopman 2007; Strandberg ym. 2008), lisääntymisstatuksen (Aguilar & Borell 1990; Samuel & Worthy 2004) ja sukupuolen (West ym. 1979; Cockcroft & Ross 1990) on havaittu vaikuttavan traanin rasvahappokoostumukseen. Näistä tekijöistä iän vaikutus ilmenee siten, että nuorilla eläimillä traanin kerrostuneisuus on heikompaa ja niiden ulkotraani ei eroa koostumukseltaan muista traanikerroksista yhtä voimakkaasti kuin vanhemmilla eläimillä.

Traanin soveltuvuutta ravinnon arvioimiseen on myös kritisoitu. Grahl-Nielsen ym. (2011) ovat esittäneet, että ravinnon rasvahapoilla olisi vain vähäistä vaikutusta traanin rasvahappokoostumukseen ja, että se olisi tämän sijaan pääasiassa lajispesifinen ja eläimen aineenvaihdunnan määrittelemä. Onhan yleisesti tiedossa, että traanin koostumus ei ole koskaan identtinen ravinnon rasvahappokoostumuksen kanssa (Iverson ym. 2004). Tämä tuleekin ottaa huomioon ravintoa koskevia arvioita tehtäessä. Useat muut tutkimukset kuitenkin tukevat teoriaa, että ravinnolla on merkittävä vaikutus merinisäkkäiden traanin rasvahappokoostumukseen (esim. Ackman & Eaton 1966; Iverson 1993; Käkälä ym. 1993; Iverson ym. 1995, 2004; Käkälä & Hyvärinen 1998; Kirsch ym. 2000).

Best ym. (2003) toteavat artikkelissaan, että vanhemmissa traanin rasvahappokoostumusta ravinnon arvioinnissa hyödyntävissä tutkimuksissa ei ole juurikaan huomioitu traanin kerrostuneisuutta. Traanin kerrostumisen ymmärtäminen ja tunteminen on kuitenkin tärkeää oikeanlaisen näytteenoton ja tutkimusten tulosten tulkinnan kannalta. Kerrostuneisuudesta johtuen traanin perusteella tehtävät ravinnon koostumusta koskevat arvioinnit voivat vaihdella suuresti riippuen analysoidusta traanikerroksesta (Hooker ym. 2001; Thiemann ym. 2004). Toisaalta myöskään koko traanin paksuuden kattava yksittäinen näyte ei anna luotettavaa tulosta, sillä eri kerrosten suhteelliset osuudet riippuvat traanin kokonaispaksuudesta, jolloin tietyn kerroksen vaikutus rasvahappokoostumukseen voi vaihdella huomattavasti. Optimaalisinta olisi tutkia traani koko sen paksuudelta yksityiskohtaisesti, vaikka se onkin työlästä (Averina ym. 2012). Traanikerrosten paksuudet myös todennäköisesti vaihtelevat lajien välillä, joten lajikohtaiset tutkimukset ovat tarpeellisia (Strandberg ym. 2011).

3.3 Itämeri

Pinta-alaltaan noin 377 000 km² ja vesitilavuudeltaan noin 21 000 km³ suuruinen Itämeri on yksi maailman suurimmista murtovesialueista (Elmgren 2001). Sen keskisyvyys on vain 60 metriä (Jansson 1997) ja valuma-alue pinta-alaan nähden nelinkertainen (Elmgren 2001). Itämeri on yhteydessä valtameriin ainoastaan kapeiden ja matalien Tanskan salmien kautta, joten sen veden vaihtuvuus on hyvin rajoitettua. Valuma-alueelta laskevat lukuisat joet laimentavat suolapitoisuutta varsinkin itäisellä ja pohjoisella Itämerellä, mistä johtuen suolapitoisuus vaihtelee Kattegatin syvänteen noin 30 grammasta litrassa Suomenlahden ja Pohjanlahden vain 2 grammaan litrassa (Rheinheimer 1998). Alhaisen suolapitoisuuden takia lajisto on köyhää ja vain tietyt meren ja makean veden eliöt sekä jotkin murtoveteen erikoistuneet eliöt voivat elää Itämeressä (Elmgren & Hill 1997).

Itämerellä ei esiinny vuorovesi-ilmiötä ja veden sekoittuminen on siksi vähäistä. Tämä edistää suolaisuudeltaan erilaisten kerrosten muodostumista veteen siten, että vähäsuolaisempi vesi kerrostuu raskaamman suolaisemman veden päälle (Rheinheimer 1998). Itämeressä onkin ympäri vuoden pysyvä suolaisuuden harppauskerros 40–70 metrin syvyydessä (Jansson 1997), mikä rajoittaa edelleen veden pystysuuntaista sekoittumista (Rheinheimer 1998). Pohjalla oleva vesi voi vaihtua vain satunnaisesti Tanskan salmien kautta tulevien suolaisen ja hapekkaan veden sisäänvirtausten, eli suolapulssien aikana, joiden väli on normaalisti 2-4 vuotta, mutta enimmillään jopa 16 vuotta (Elmgren 2001).

Itämerta ympäröivän valuma-alueen runsaasta asutuksesta, maataloudesta, sekä teollisuudesta peräisin olevat päästöt ovat saastuttaneet Itämerta huomattavasti (Rheinheimer 1998). Typpi- ja fosforitasojen moninkertaistuminen on aiheuttanut rehevöitymistä ja muutoksia ekosysteemissä (Larsson ym. 1985). Pohjaan vajoavan kuolleen orgaanisen aineksen lisääntyminen on kasvattanut merenpohjan bakteerimäärää ja siten myös hapenkulutusta. Tästä johtuen suolapulssien välisinä aikoina Itämeren pohjalle kehittyy hapettomia alueita, joissa syntyy eliöille myrkyllistä rikkivetyä (Andersin ym. 1978; Rheinheimer 1998).

Itämerta ovat saastuttaneet myös myrkylliset yhdisteet, kuten polyklooratut bifenyylit (PCB:t), teollisuudesta peräisin olevat raskasmetallit ja hyönteismyrkkinä käytetty diklooridifenyylitrikloorietaani (DDT) (Elmgren 2001). 1960-luvulla Itämeren huippupedoista mitattiin korkeita DDT- ja PCB-pitoisuuksia (Jensen ym. 1969) ja rikastuessaan eliöihin ne aiheuttivat lisääntymisongelmia muun muassa merikotkille (*Haliaeetus albicilla*) ja hylkeille romahduttaen niiden populaatioita (Helander ym. 1988; Jensen ym. 1969; Olsson ym. 1992). Näiden yhdisteiden kieltämisen jälkeen eliöistä mitatut myrkkypitoisuudet ovat laskeneet (Bignert ym. 1998) ja populaatiot ovat hiljalleen toipuneet (Helander 2000). Esimerkiksi hylkeistä mitatut ympäristömyrkkypitoisuudet ovat kuitenkin edelleenkin monta kertaa suurempia kuin vastaavissa lajeissa vähemmän saastuneilla alueilla (Nyman ym. 2002).

3.3.1 Itämerennorppa

Itämerennorppa (*Phoca hispida botnica*) on norpan (*Phoca hispida*) alalaji (Valste 2007). Alalajin populaatiosta suurin osa elää Perämerellä (Helle 1980), mutta sen lisäksi norppia esiintyy myös Suomenlahdella ja Riianlahdella (Härkönen & Lunneryd 1992). Eteläisellä Itämerellä alalajia ei tavata, sillä norppa tekee pesänsä jäälle kinokseen kaivettuun lumiluolaan, ja vaatii siksi pysyvän jääpeitteen lisääntymisaikana (Valste 2007). Kuutit syntyvät helmi-maaliskuussa ja niiden imetys kestää 4-6 viikkoa (Helle 1983). Itämerennorpan tyypillistä ravintoa ovat silakka (*Clupea harengus membras*), kolmipiikki (*Gasterosteus aculeatus*), sekä muut pienet kalat, kuten kuore (*Osmerus eperlanus*) ja muikku (*Coregonus albula*), ja jopa äyriäiset (Stenman & Pöyhönen 2005; Sinisalo ym. 2008; Suuronen & Lehtonen 2012). Huhti-toukokuussa norpat paastoavat maalla vuosittaisen karvanvaihdon ajan (Helle 1980).

1900-luvulla itämerennorppien populaatio pieneni huomattavasti ensin metsästyksen ja sittemmin ympäristömyrkyjen aiheuttamien lisääntymisongelmien takia (Helle 1980, 1981; Durant & Harwood 1986; Bergman & Olsson 1986). Alalaji rauhoitettiin 1980-luvulla, kannan ollessa tuolloin vain muutamia tuhansia yksilöitä. Tämän jälkeen kanta on taas hitaasti kasvanut (Valste 2007) ja vuonna 2010 tehtyjen laskentojen mukaan itämerennorppia oli noin 6500 yksilöä

(Kunnasranta 2010). Itämerennorppa luokitellaan vaarantuneeksi (Sinisalo ym. 2008).

3.4 Saimaa

Suomen suurin järvi, Saimaa, syntyi jääkauden jälkeen noin 8000 vuotta sitten. Sen keskisyvyys on 17 metriä (maksimisyvyys 85 m), pituus 194 km, leveys 138 km ja kokonaispinta-ala noin 4 460 km². Saimaa muodostuu useista salmien yhdistämistä järvenselistä, ja sen alueella on noin 14 000 saarta. Tästä johtuen rantaviivaa on melkein 15 000 km. Järvessä on pysyvä jääpeite yleensä marraskuusta toukokuun alkuun asti (Kunnasranta ym. 1999). Saimaata kuormittavat asutus, teollisuuslaitokset, maanviljelys ja metsänhoito, mutta suurin osa siitä on kuitenkin vedenlaadultaan erinomaista tai hyvää (Anon. 2011).

3.4.1 Saimaannorppa

Saimaannorppa (*Phoca hispida saimensis*) on itämerennorpan tavoin norpan alalaji, joka jäi viimeisimmän jääkauden jälkeen eristyksiin Saimaaseen ja on elänyt siellä jo yli 8000 vuoden ajan (Hyvärinen & Nieminen 1990). Vaikka tämä on evoluution näkökulmasta lyhyt aika ja suuria fysiologisia eroja on tuskin ehtinyt kehittyä (Käkelä & Hyvärinen 1998), saimaannorppa on sopeutumassa elämään makeassa vedessä ja eroaa muista alalajeista käyttäytymiseltään ja morfologialtaan (Hyvärinen & Nieminen 1990). Muikku kuuluu saimaannorpan tärkeimpiin ravintokohteisiin, mutta myös muut pienet kalalajit, kuten ahven (*Perca fluviatilis*), särki (*Rutilus rutilus*), kuore ja kiiski (*Gymnocephalus cernuus*) sisältyvät sen ravintoon (Hyvärinen ym. 1995; Kunnasranta ym. 1999). Saimaannorpan kuutit syntyvät helmi-maaliskuun vaihteessa ja niiden imetys kestää noin 6-8 viikkoa (Sipilä 1990).

Saimaannorpan populaatio koostuu tällä hetkellä noin 310 yksilöstä (Anon. 2012b) ja alalaji on määritelty äärimmäisen uhanalaiseksi (Rassi ym. 2010). Saimaannorpan pahimpia uhkia ovat olleet metsästys, verkkokalastus, saasteet, sekä talvella tapahtuvat luonnolliset ja säännöstelystä johtuvat veden korkeuden vaihtelut (Müller-Wille 1969; Forsten & Alhonen 1975). Suojelun myötä uhkia on saatu huomattavasti vähennettyä (Hyvärinen ym. 1998; Sipilä & Hyvärinen 1998;

Kostamo ym. 2000), mutta siitä huolimatta vuosittain pääasiassa verkkoihin hukkuu noin 15 kuuttia ja 1-3 aikuista (Auvinen ym. 2005).

3.5 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet

Työni tarkoituksena oli tutkia Itämerennorpan (*Phoca hispida botnica*) traanin, maksan ja plasman rasvahapposormenjälkiä, sekä vertailuaineistoksi Saimaannorpan (*Phoca hispida saimensis*) traanin ja maksan rasvahapposormenjälkiä. Tavoitteena oli selvittää, muistuttaako traanin sisimmän kerroksen rasvahappokoostumus eläimen viimeaikaisen ravinnon rasvahappokoostumusta, jota taas kuvastavat plasman ja hieman pidemmällä aikavälillä maksan rasvahappokoostumukset. Lisäksi tarkasteltiin siirtyvätkö jotkut tietyt rasvahapot maksan ja erityisesti plasman kuljettamista metabolisista rasvoista toisia tehokkaammin traanin sisäosiin. Toisin sanoen haluttiin siis havainnoida heijastelevatko sisätraanin tietyt rasvahapot ravinnon rasvahappokoostumusta paremmin kuin toiset.

Vertasin myös itämerennorppien tärkeän ravintokohteen, silakan (*Clupea harengus membras*), rasvahapposormenjälkiä traanin eri kerrosten rasvahapposormenjälkiin selvittääkseni, minkä traanikerroksen koostumusta ravinnon rasvahappokoostumus eniten muistuttaa. Itämerennorpalla ei ole aiemmin tutkittu traanin kerrostuneisuutta, joten yritin selvittää onko tämän alalajin traanissa samanlaiset kemiallisesti erottuvat kerrokset kuin muilla tutkituilla norpan alalajeilla. Tarkoituksena oli tarkastella myös eroja murtoveden ja makean veden alalajien kudosten rasvahappokoostumusten välillä.

Rasvahappokoostumuksen lisäksi tutkin eläinten plasman ja maksan lipidiluokkakoostumusta, sillä näiden kudosten rasvapitoisuus kertoo varastorasvan määrästä ja siten eläimen ravitsemustilanteesta. Tutkin myös iän vaikutusta maksan varastoituneen rasvan määrään ja sen rasvahappokoostumukseen saimaannorpilla.

4 Aineisto

4.1 Itämerennorpat

Tutkimuksessa käytettiin kymmenestä 5-13- vuotiaasta itämerennorpasta kerättyjä traani-, maksa- ja plasmanäytteitä (Taulukko 1). Näytekudokset saatiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitokselta (RKTL). Eläimet oli ammuttu ajalla 28.4.–1.5.2009 Perämerellä, Hailuodon edustalla. Traaninäytteet oli otettu eläinten selkäpuolelta ja iänmääritys oli tehty hampaiden perusteella. Kudoksia säilytettiin ennen näytteidenottoa -20 °C:ssa.

Taulukko 1. Itämerennorppien (*Phoca hispida botnica*) näytenumero, ampumispäivämäärä, sukupuoli, ikä vuosina, pituus (kuonosta häntään) maksimiympärysmitta, traanin paksuus ja traanin paino.

Hylkeen nro	Ampumis- päivämäärä	Sukupuoli	Ikä vuosina	Pituus (cm)	Ympärys- mitta (cm)	Ilmoitettu traanin paksuus ^a (cm)	Mittattu traanin paksuus ^b (cm)	Traanin paino* (kg)
N1-09	28.4.2009	uros	8	138	122	4,0	3,9	43,2
N2-09	29.4.2009	uros	11	125	110	3,5	3,6	31,4
N3-09	29.4.2009	uros	9	136	109	4,2	3,9	31,3
N4-09	29.4.2009	uros	6	135	99	3,0	2,9	23,9
N5-09	30.4.2009	uros	12	134	106	4,2	3,6	28,9
N6-09	30.4.2009	uros	13	143	110	3,8	3,2	32,6
N7-09	1.5.2009	uros	5	136	106	3,4	3,5	29,0
N8-09	1.5.2009	uros	9	140	112	4,0	3,6	34,1
N9-09	1.5.2009	naaras	8	133	144	5,7	5,1	68,1
N10-09	1.5.2009	uros	6	139	111	3,6	3,1	33,2

* Tietoa eläinten kokonaispainosta ei saatavilla.

^a RTKL:n ilmoittama traanin paksuus.

^b Näytteiden valmistuksen yhteydessä mitattu traanin paksuus.

4.2 Saimaannorpat

Tutkimuksessa käytetyt Saimaannorppien traani- ja maksanäytteet olivat peräisin vuosina 2006–2011 Saimaalta kuolleina löytyneistä yksilöistä, joiden kudokset ja tiedot saatiin Metsähallitukselta (Taulukko 2). Eläinten löytöpaikat ovat suojelun vuoksi salassa pidettäviä. Traaninäytteet oli otettu eläinten vatsapuolelta ja iänmääritys oli tehty hampaiden perusteella. Viidestä yksilöstä (ikä 3 kk-16 v.) tutkittiin sekä traani- että maksanäytteitä, ja näiden lisäksi kymmenestä yksilöstä (ikä 1 kk-17 v.) vain maksanäytteitä. Traaneja haluttiin tutkia pääasiassa aikuisista eläimistä, mutta tällaisia näytteitä oli saatavissa vain neljä kappaletta. Tästä

johtuen traaninäytteiden määrä jäi saimaannorppien osalta pieneksi. Vertailun vuoksi traania tutkittiin myös yhdeltä kolmen kuukauden ikäiseltä kuutilta. Vuoden 2011 näytteitä säilytettiin ennen näytteidenottoa -80 °C:ssa ja sitä vanhempia näytteitä -20 °C:ssa.

Suurimpaan osaan tuloksista on sisällytetty vain ne neljä aikuista (ikä>1 vuotta) saimaannorppayksilöä, joista oli saatavilla sekä traani- että maksanäytteet (n=4). Muiden yksilöiden kudoksia käytettiin tutkittaessa maksan varastorasvan määrää, sekä iän vaikutusta tämän varastoituneen rasvan määrään ja rasvahappokoostumukseen.

Taulukko 2. Saimaannorppien (*Phoca hispida saimensis*) näyttenumero, kuolinvuosi, sukupuoli, ikä, pituus (kuonosta häntään), maksimiympärysmitta, traanin paksuus ja paino.

Hylkeen nro	Kuolinvuosi	Sukupuoli	Ikä	Pituus (cm)	Ympärysmitta (cm)	Ilmoitettu traanin paksuus ^a (cm)	Mitattu traanin paksuus ^b (cm)	Paino (kg)
2396	2006	uros	5 v	110	116	4		63
2421	2006	ei tietoa	16 v	112	93	ei tietoa	3,0	44,5
2434	2007	ei tietoa	17 v	126	106	6,2		63
2449	2007	ei tietoa	6 v	147	133	6,5		103,5
2451	2008	ei tietoa	12 v	140	125	5,8		89
2459	2008	uros	2,5 kk	117	91	2,8		30
2466	2008	uros	5 kk	93	68	2		16,5
2471	2008	uros	5,5 kk	95	71	1,9		20
2496	2009	ei tietoa	1-4 v	100	87	5	4,2	31,5
2497	2010	uros	1-4 v	122	95	ei tietoa	4,8	49,5
2513	2010	uros	6,5 kk	100	77	3,8		27
2523	2011	ei tietoa	1 kk	81	67	2,7		15,5
2527	2011	uros	3 kk	91	77	3	2,7	21
2529	2011	ei tietoa	4 kk	84	66	2		17,5
2536	2011	uros	aikuinen*	122	ei tietoa	5,5	4,2	53

* Ei tarkempaa tietoa saatavilla.

^a Metsähallituksen ilmoittama traanin paksuus.

^b Näytteiden valmistuksen yhteydessä mitattu traanin paksuus. Arvon puuttuessa eläimestä on tutkittu vain maksa.

4.3 Silakat

Silakan ja itämerennorpan traanin välisten rasvahapposormenjälkien vertailussa käytettiin toisesta meneillään olevasta tutkimusprojektista saatuja silakoiden rasvahappokoostumusten arvoja. Kyseiset viisi silakkayksilöä oli pyydystetty vuonna 2009 Harufjärdenistä.

5 Menetelmät

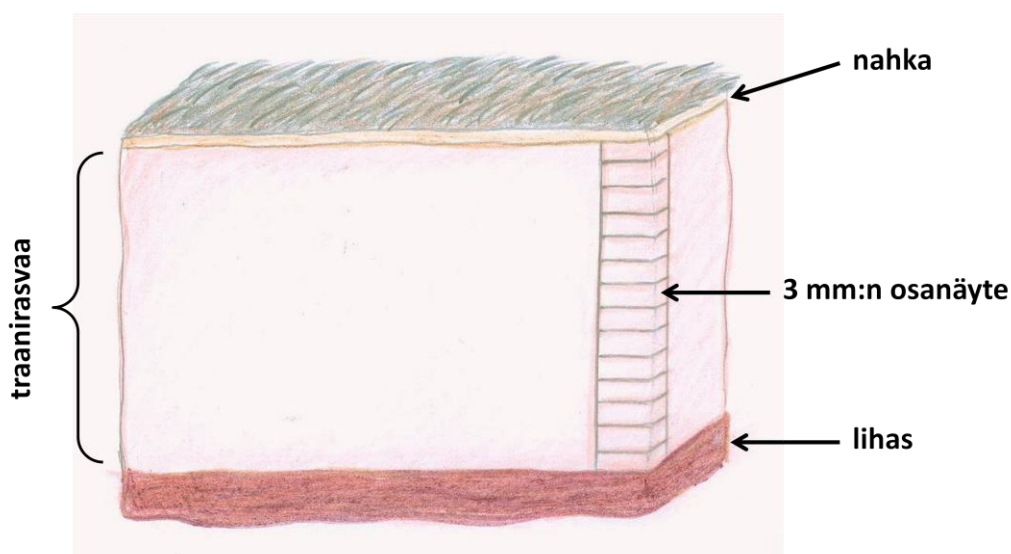
5.1 Rasvahappojen metyyliestereiden eristys ja analysointi

Jotta lipidien rasvahappokomponentteja voitaisiin analysoida kaasukromatografisesti, niistä täytyy ensin valmistaa helposti höyrystyviä johdannaisia, eli yleensä metyyliestereitä (Christie & Han 2010). Tässä tutkimuksessa itämerennorpan traani-, maksa- ja plasmanäytteille, sekä saimaannorpan traani- ja maksanäytteille tehtiin *trans*-esteröinti metanolisessa rikkihappoliuoksessa Christien (1993) kuvaaman menetelmän mukaisesti. Valmistetut rasvahappojen metyyliesteriseokset analysoitiin kaasukromatografisesti.

5.1.1 Esivalmistelut

Työssä käytetyt liuokset tarkistettiin aina ennen aloittamista pH-muutosten ja peroksidien esiintymisen varalta, ja käytettävät koeputket pestiin ensin kloroformilla (CHCl_3) ja metanolilla (MeOH) epäpuhtauksien välttämiseksi.

Pakastimessa säilytetty jäinen traanipala halkaistiin rautasahalla, jotta saatiin esiin puhdas hapettumiselta säilynyt näytteenottopinta. Saatu traanin puolikas upotettiin nestetyypeen ja odotettiin sen kovettumista. Tämän jälkeen halkaisupuolelta leikattiin esiin uusi puhdas pinta, jolta leikattiin näytepaloja (koko 3x3x5 mm) kolmen millimetrin välein nahasta lihakseen asti (Kuva 2.). Samalla mitattiin traanin kokonaispaksuus.



Kuva 2. Traaninäyte. Traanista leikattiin 3x3x5 millimetrin kokoisia näytepaloja kolmen millimetrin välein nahasta lihakseen asti.

Tutkimuksessa käytetyt maksat oli paloitetu lohkoiksi säilytystä varten. Yksi tällainen jäinen lohko jokaisen yksilön maksasta halkaistiin keskeltä näytteenottoa varten, taas hapettumattoman pinnan esiin saamiseksi. Halkaistun maksapalan keskeltä otettiin puhtaalta leikkauspinnalta noin 3x3x3 mm kokoinen näytepala.

Pakastetut itämerennorpan plasmanäytteet sulatettiin ja sekoitettiin koeputkiravistelijalla (Vortex) hyvin ennen näytteenottoa. Tämän jälkeen niistä otettiin 250 µl suuruinen näyte, ja pääosa näytteen sisältämästä nesteestä haihdutettiin typpivirran avulla.

5.1.2 Rasvahappojen metyyliestereiden valmistus

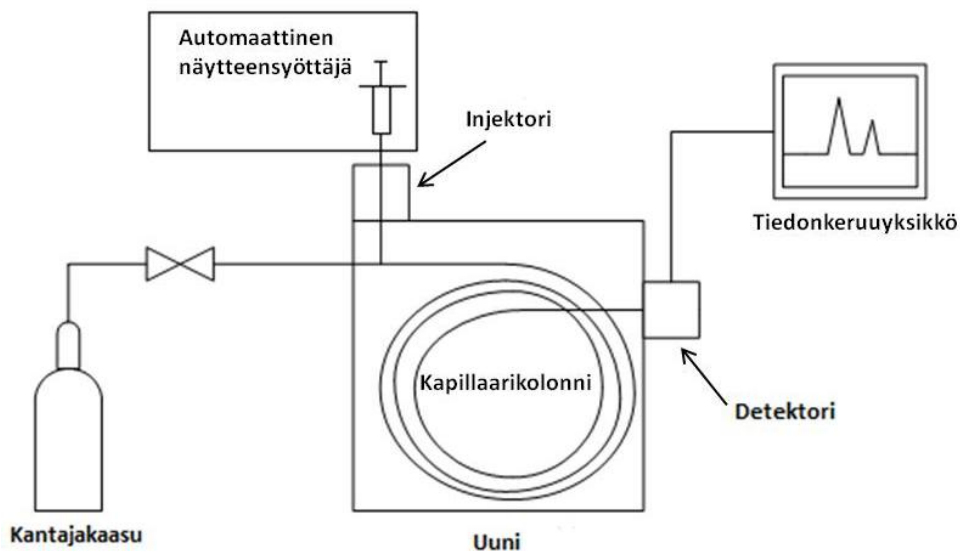
Koeputkeen siirrettyihin kudoksenäytteisiin lisättiin välittömästi 1 ml n-heksaania (C₆H₁₄) ja 2 ml 1 % rikkihappoa (H₂SO₄) metanolissa (MeOH). Tämän jälkeen koeputkiin luotiin typpivirran avulla typpi-atmosfääri rasvahappojen hapettumisen estämiseksi ja Teflon-tiivisteiset korkit suljettiin tiiviisti typpipilven sisällä. Koeputkia kuumennettiin 95 °C:ssa kahden tunnin ajan. Näytteiden jäähtyttyä niihin lisättiin 1,5 ml tislattua vettä ja 4 ml heksaania, minkä jälkeen niitä ravisteltiin käsin 1-2 minuutin ajan. Seuraavaksi näytteet sentrifugoitiin (3000 rpm, 5 min) faasien erottamiseksi ja saatu yläfaasi kerättiin talteen. Muodostuneet metyyliesterit pyrkivät poolittomana heksaaniin, joten yläfaasi sisälsi heksaanin ja rasvahapot, ja alafaasi puolestaan vettä, metanolia ja rikkihappoa. Jäljelle jääneelle alafaasille toistettiin sama käsittely ja uusi yläfaasi kerättiin ja yhdistettiin aiemmin saatuun yläfaasiin. Näyteputkeen lisättiin tämän jälkeen kuivausaineeksi natriumsulfaattia (Na₂SO₄), jonka tarkoitus oli poistaa näytteessä olevat vesijäämät. Näytteen oltua kuivausaineessa vähintään 30 minuutin ajan, se siirrettiin puhtaaseen koeputkeen, ja maksa- sekä plasmanäytteet haihdutettiin typpellä 1,5 ml tilavuuteen näytteen konsentroimiseksi. Traaninäytteet olivat konsentraatioiltaan niin vahvoja, että niitä ei haihdutettu, vaan itse asiassa niitä laimennettiin heksaaniin lukusuhteessa 1:9. Valmiita näytteitä säilytettiin ennen niiden analysointia -20 °C:ssa 1-2 viikkoa.

5.1.3 Kaasukromatografiasta

Kaasukromatografian avulla voidaan erotella, tunnistaa, sekä tehdä kvantitatiivisia määrittelyksiä haihtuvista aineista, ja se on ensisijaisesti käytetty tekniikka

rasvahappoja analysoitaessa. Liikkuvana faasina tässä menetelmässä toimii kaasu ja paikallaan pysyvänä faasina neste, eli käytännössä jokin sidottu geelimäinen polymeeri (Christie & Han 2010).

Kaasukromatografilaitteiston pääosat ovat automaattinen näytteensyöttäjä, kapillaarikolonne, uuni, detektori ja tiedonkeruuyksikkö (Kuva 3.). Laitteessa analysoitava näyte syötetään usein automaattisella näytteensyöttäjällä injektoriin, jossa aineoset höyrystyy korkeassa lämpötilassa ja kulkee kantajakaasun (useimmiten heliumin) mukana uunin sisällä olevan kolonniin jakautuen kaasu- ja nestefaasiin. Näytteen komponentit liikkuvat kolonnissa erilaisilla nopeuksilla riippuen niiden vuorovaikutuksista kolonnin sisäpinnalla olevan nestefaasikerroksen kanssa. Ensimmäisinä kolonnin läpäisevät ja detektorille saapuvat ne komponentit, joilla on pienin affiniteetti kapillaarikolonniin sisäpintaan sidottuun geelimäiseen kalvoon, eli niin sanottuun nestefaasiin. Kolonnista tulleet komponentit havaitaan detektorilla ja muunnetaan sähköisiksi signaaleiksi. Nämä signaalit näkyvät piikkeinä kromatogrammissa. Yksittäiset rasvahapot voidaan tunnistaa suurella varmuudella niiden suhteellisten retentioaikojen perusteella, sekä jo olemassa olevan tiedon avulla (Christie 1989; Christie & Han 2010).



Kuva 3. Kaasukromatografilaitteisto. Näyte syötetään automaattisella näytteensyöttäjällä injektoriin, jossa aineoset höyrystyy ja kulkee kantajakaasun mukana kapillaarikolonnein. Kolonnissa erottuneet komponentit havaitaan detektorilla ja muunnetaan sähköisiksi signaaleiksi. Nämä signaalit näkyvät piikkeinä kromatogrammissa.

Nykyään yleisin kaasukromatografiassa käytetty kolonni on WCOT- kolonni (wall-coated open-tubular column). Se koostuu ohuesta ja taipuisasta kvartsilasiputkesta, jonka sisäpinta on päällystetty jollakin polymeerillä. WCOT-kolonniin ongelma kuitenkin on, että niillä on rajattu näytekapasiteetti ja ne ylikuormittuvat helposti. Tämän takia niiden yhteydessä käytetään jakoinjektiota (split injection), joka on käytetyin injektiotapa rasvahappoja analysoitaessa. Siinä näyte höyrystetään kantajakaasuun, joka jaetaan kahteen virtaan. Näistä toinen ohjataan kolonniin ja toinen atmosfääriin. Virtaa säädetään ennen injektiota halutun jakosuhteen saamiseksi, joka on normaalisti 1:20–1:200 (Christie 1989; Christie & Han 2010).

Yleisin detektorityyppi on puolestaan liekki-ionisaatiotektori (flame ionization detector, FID). Sen toiminta perustuu siihen, että orgaaniset aineet, kuten rasvahappojen metyyliesterit, palavat kolonnista tullessaan vety-ilmaliekissä synnyttäen ioneja. Tämä ionivirta mitataan ja signaalia vahvistetaan, minkä jälkeen tiedot tallentuvat kromatogrammiin (Christie 1989; Christie & Han 2010).

5.1.4 Näytteiden rasvahappokoostumuksen analysointi kaasukromatografisesti

Näytteiden rasvahappokoostumus määritettiin analysoimalla niistä tuotetut rasvahappojen metyyliesteriseokset kaasukromatografisesti. Tutkimuksessa käytettiin Shimadzu GC-2010 Plus kaasukromatografia, joka oli varustettu automaattisella näytteensyöttölaitteistolla (Shimadzu AOC-20i autoinjector & AOC-20s autosampler) ja liekki-ionisaatiotektorilla. Kyseisessä laitteessa oli ohut lasikapillaarikolonni (sisähalkaisija 0,25 mm ja pituus 30 m), jonka sisäpinta oli päällystetty polyetyleeniglykolilla (kerroksen paksuus 0,25 μm) (Zebron ZB-wax Capillary GC column, Phenomenex, Torrence CA, USA). Kantajakaasuna käytettiin heliumia (kokonaisvirtausnopeus 23,7 ml/min, kolonnin virtaus 0,99 ml/min) ja injektorin jakosuhte oli 1:20. Injektorin lämpötila oli 250 °C ja liekki-ionisaatiotektorin lämpötila 280 °C. Näytettä analysoitaessa kolonnin lämpötilaa pidettiin aluksi 180 °C:ssa 8 minuutin ajan, jonka jälkeen sitä nostettiin nopeudella 3 °C/min 210 °C:een ja pidettiin tässä lämpötilassa 40 minuutin ajan. Yhden näytteen analysointiin kulunut aika oli kokonaisuudessaan 58 minuuttia.

Saadut kaasukromatogrammit integroitiin manuaalisesti Shimadzun GC-solution-ohjelmalla, ja rasvahappojen piikit tunnistettiin niiden retentioajan, aikaisemmin julkaistujen tietojen, sekä käytetyn standardiseoksen (Liite 1.) perusteella. Piikkien pinta-alojen avulla jokaisesta näytteestä laskettiin 65 tunnistetulle rasvahapolle sekä mooli- että painoprosentit, ja niiden detektorilla havaittuja vasteita korjattiin Ackmanin (1992) kuvaamien teoreettisten vastekertoimien avulla. Seuraavissa vaiheissa ja laskuissa käytettiin vain mooliprosenttiosuuksia, ja niiden perusteella traaneille luotiin vertikaaliset rasvahappoprofiilit.

5.2 Lipidien eristys ja analysointi

Lipidiluokkien selvittämiseksi itämerennorpan maksa- ja plasmanäytteistä, sekä saimaannorpan maksanäytteistä eristettiin lipidit Folchin ym. (1957) kuvaaman menetelmän mukaisesti. Eristetyt lipidit analysoitiin ohutlevykromatografialla.

5.2.1 Esivalmistelut

Lipidien eristyksessä käytetyt liuokset tarkistettiin aina ennen töiden aloittamista pH-muutosten ja peroksidien esiintymisen varalta, ja käytettävät koeputket pestiin kloroformilla (CHCl_3) ja metanolilla (MeOH).

Näytteet otettiin kudoksista samanaikaisesti rasvahappojen metyyliestereiden määrittystä varten otettujen näytteiden kanssa, joten kudosten käsittely tapahtui samalla tavalla kuin jo edellä kuvattiin. Halkaistun maksapalan keskeltä leikattiin lipidieristystä varten noin 6x6x3 mm kokoinen näyte, ja sulatetusta plasmasta otettiin näytettä 500 μl .

5.2.2 Lipidien eristys

Kudoksista otetut näytteet siirrettiin koeputkiin ja niihin lisättiin 3 ml metanolia ja 6 ml kloroformia. Maksanäytteisiin lisättiin vielä tämän lisäksi 150 μl vettä. Näytteitä seisotettiin pimeässä vähintään 30 minuutin ajan, jonka jälkeen ne homogenisoitiin ja sentrifugoitiin (10 min, 3000 rpm). Puhdas supernatantti kerättiin talteen ja siihen lisättiin 1,8 ml vettä. Näyte sekoitettiin (Vortex) ja sentrifugoitiin (10 min, 3000 rpm), minkä seurauksena se erottui pääasiassa puhtaita kudoksen lipidejä sisältävään alafaasiin, sekä lipideihin kuulumattomia yhdisteitä ja hyvin pieniä lipidimääriä sisältävään ylafaasiin. Saatu alafaasi kerättiin talteen ja jäljelle jääneeseen ylafaasiin lisättiin 4,5 millilitran teoreettinen

alafaasi (CHCl₃/MeOH/H₂O tilavuussuhteessa 86/14/1). Tämän jälkeen näyte sekoitettiin (Vortex) ja sentrifugoitiin (10 min, 3000 rpm) uudelleen. Muodostunut uusi alafaasi kerättiin talteen ja lisättiin aiemmin saatuun alafaasiin. Lopuksi yhdistetyt alafaasit sisältävä näyte haihdutettiin typpellä melkein kuivaksi ja siihen lisättiin 0,74 ml kloroformia ja 0,74 ml metanolia. Valmiita näytteitä säilytettiin ennen analysointia pakastimessa -20 °C:ssa 3-12 viikkoa.

5.2.3 Ohutlevykromatografiasta

Näytteiden sisältämien lipidiluokkien erottelu voidaan tehdä ohutlevykromatografian avulla. Tässä menetelmässä liikkuvana faasina toimii neste ja paikallaan pysyvänä faasina ohut päällysteaine lasilevyn pinnalla. Yleisimmin käytetty adsorboiva aine on hienojakoinen silikageeli, jonka adsorptiset ominaisuudet johtuvat sen pinnalla olevista silanoliryhmistä (SiOH). Komponentit erottuvat tässä menetelmässä toisistaan polaaristen ryhmien määrän ja laadun perusteella (Christie & Han 2010).

Menetelmässä näytteet lisätään levyille pisteinä tai ohuina nauhoina ja liuottimen annetaan nousta levyllä kapillaari-ilmiön johdosta. Liuotin ottaa kulkiessaan mukaansa näytteen komponentteja erilaisilla nopeuksilla, riippuen siitä kuinka tiukasti ne ovat kiinnittyneet paikallaan pysyvään faasiin. Tämän jälkeen levy kuivataan ja käsitellään niin, että näytteet saadaan näkyville. Yksi tapa on käsitellä levy hapettavilla aineilla ja kuumentaa korkeassa lämpötilassa. Tällöin lipidit tulevat näkyville tummina hiilijuovina. Lipidien määrä voidaan tämän jälkeen määrittää skannaamalla levy fotodensitometrillä. Skannauksen seurauksena saadut piikkien pinta-alat ovat verrannollisia lipidien alkuperäisiin levyille lisättyihin määriin, jotka on mahdollista selvittää standardiaineiden avulla. Näytteiden lipidiluokat voidaan tunnistaa levyiltä ja kvantitoida, jos niiden rinnalla erotellaan tiettyjä määriä tunnettuja standardeja (Christie & Han 2010).

5.2.4 Näytteiden lipidiluokkien analysointi ohutlevykromatografialla

Maksojen ja plasmojen lipidiluokat määritettiin analysoimalla näytteet ohutlevykromatografialla. Näytteet lisättiin sumuttamalla vierekkäisiksi nauhoiksi CAMAG automatic TLC sampler 4-laitteella piimaageelipäällysteisille lasilevyille (20x10 cm, HTPLC Silica gel 60 F₂₅₄, E. MERCK KGaA, © Millipore

Corporation), minkä jälkeen levyt kuivattiin hiustenkuivaajalla. Maksanäytettä lisättiin levyille 6 µl ja plasmanäytettä 10 µl.

Seuraavaksi näytelevyt asetettiin ajokammioon (CAMAG horizontal developing chamber), jonka kahteen liuoskaivoon lisättiin molempiin 6 ml ajoliuosta. Kaikista näytteistä tehtiin ajot sekä neutraalilipideille tarkoitettulla heksaani/dietyylieetteri/etikkahappo/vesi (tilavuussuhteessa 130/30/2/0,5)-ajoliuoksella että fosfolipideille tarkoitettulla kloroformi/metanoli/etikkahappo/vesi (tilavuussuhteessa 25/17,5/3,8/1,75)-ajoliuoksella. Neutraalilipidien liuoksella tehtiin toistot kaikista näytteistä. Liuoksen annettiin nousta levyllä 80 mm asti, jonka jälkeen levy kuivattiin huolellisesti hiustenkuivaajalla ja kastettiin 3 % CuSO₄-8 % H₃PO₄-liuoksessa CAMAG chromatogram immersion devise III-laitteella (aika 6 s, nopeus 5). Kastamisen jälkeen levy kuivattiin taas hiustenkuivaajalla. Lopuksi levyä kuumennettiin 170 °C:ssa uunissa niin kauan, että näyteraidat tummuivat (noin 7 minuuttia).

Valmiiksi kehitetyt levyt skannattiin CAMAG TLC Scanner 3-laitteella ja saadut kromatogrammit integroitiin manuaalisesti winCATS-ohjelmalla. Lipidiluokkien tunnistuksessa käytettiin apuna näytteiden vierellä ajettuja tunnettuja standardeja (Liite 2.).

5.3 Tilastolliset menetelmät

5.3.1 Näytteiden välisen euklidisen etäisyyden laskeminen

Itämerennorpan eri traanikerrosten ja sen tärkeän saalislajin, silakan rasvahappokoostumusten samankaltaisuutta arvioitiin euklidisten etäisyyksien avulla (Kaava 1). Euklidinen etäisyys on yksinkertainen mitta kahden objektin väliselle etäisyydelle (Quinn & Keough 2002), ja eri muuttujien (tässä tapauksessa rasvahappojen mooliprosenttiosuuksien) vaikutus siihen riippuu muuttujien varianssista. Suuremman varianssin omaavat muuttujat vaikuttavat enemmän, kun taas määrältään vähäisemmillä ja varianssiltaan alhaisemmilla muuttujilla on pienempi vaikutus. Tässä tutkimuksessa suuremmat euklidisen etäisyyden arvot merkitsevät suurempia eroja rasvahappokoostumusten välillä.

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2} \quad (1)$$

Euklidiset etäisyydet laskettiin yksilökohtaisesti jokaisen traanin osanäytteen (x) ja silakan (y) rasvahappojen mooliprosenttiosuuksien välillä. Laskuissa käytettiin viidestä vuonna 2009 Harufjärdenistä pyydystetystä silakkayksilöstä laskettuja rasvahappokohtaisia keskiarvoja. Analyysiin sisällytettiin sellaiset rasvahapot, jotka oli tunnistettu sekä norppien että silakan kudoksista, jolloin tarkasteluun tuli yhteensä 55 rasvahappoa.

Itämerennorpan ja silakan lisäksi euklidiset etäisyydet laskettiin myös itämerennorpan (x) ja saimaannorpan (y) traanin osanäytteiden välillä, jotta voitiin vertailla alalajien traanin koostumuksen samanlaisuutta eri syvyyksillä. Saimaannorpista vertailuun valittiin kolme yksilöä (2496, 2497 ja 2536), joiden traanien paksuudet olivat samansuuruisia keskenään (4,2, 4,8 ja 4,2 cm) ja lähellä itämerennorppien traanien keskimääräistä paksuutta. Näiden kolmen yksilön traaneista laskettiin kullekin traanin osanäytteelle rasvahappokohtaiset keskiarvot, joita käytettiin laskuissa. Alalajien välisessä tarkastelussa mukaan sisällytettiin kaikki 65 tutkimuksessa tunnistettua rasvahappoa.

5.3.2 Lipidiluokkien osuuksien määrittäminen

Maksa- ja plasmanäytteiden sisältämät lipidimäärät laskettiin vertailemalla integroitujen kromatografisten piikkien pinta-aloja tunnettujen standardien pinta-aloihin. Näytteistä selvitettiin neutraaleihin lipideihin kuuluvien FFA:jen, kolesteroliesterin (CE), TAG:n ja kolesterolin ainemäärät, sekä PL:eihin kuuluvien sfingomyeliiniin (SM), fosfatidyylinoinositolin (PI), fosfatidyyliseriiniin (PS), fosfatidyylietanoliiniin (PE) ja fosfatidyylkoliiniin (PC) ainemäärät.

Kun kaikista tutkituista maksa- ja plasmanäytteistä oli saatu lipidiluokkien ainemäärät, TAG:n määrä jaettiin PL:ien kokonaismäärällä. Näin saatu luku kuvaa TAG:n eli varastorasvojen suhteellista määrää PL:eihin eli rakennerasvoihin verrattuna. Tällaiseen esitystapaan päädyttiin kaikkien lipidiluokkien suhteellisten prosenttiosuuksien esittämisen sijaan siksi, että FFA:jen määrä oli näytteissä epäilyttävän korkea ja prosenttiosuudet eivät siksi

olleet luultavasti kovin todenmukaisia. Suuri FFA:jen määrä voi johtua siitä, että kudoksissa on tapahtunut jonkin verran lipidien hydrolyysiä tai muuta hajoamista säilytyksen aikana. Saimaannorpalla kudosten FFA:jen määrä oli vielä suurempi kuin itämerennorpilla. Tämä johtuu luultavasti siitä, että tutkitut saimaannorppayksilöt olivat ehtineet olla jonkin aikaa kuolleena ennen ruhojen löytämistä ja näytteiden keräämistä, jolloin hajoamista on ehtinyt tapahtua melko korkeissa lämpötiloissa enemmän.

5.3.3 Regressioanalyysi

Eläinten kudosten rasvahappokoostumusten välistä riippuvuutta ja ravinnon rasvahappokoostumuksen vaikutusta sisätraaniin tutkittiin regressioanalyysin avulla. Tässä käytettiin Microsoft Office Excel 2007-ohjelman Regressioanalyysityökalua. Ohjelmalla voitiin laskea kahden kudoksen välille rasvahappokohtaisesti korrelaatiokertoimen neliö R^2 , eli lineaarisen regression selitysaste. Se ilmoittaa kuinka suuri osa toisen muuttujan varianssista voidaan selittää toisen muuttujan avulla (Karjalainen & Ruuskanen 1998). Ohjelma laski automaattisesti myös tilastollisen merkitsevyytason, eli p-arvon.

Ennen regressioanalyysia alkuperäiselle aineistolle tehtiin muunnos, jossa jokainen rasvahapon saama suhteellinen arvo jaettiin kaikkien yksilöiden näytteistä lasketulla rasvahappokohtaisella keskiarvolla. Tämä tasoitti rasvahappojen väliset määrälliset erot, muuntaen kaikkien rasvahappojen arvot lähelle lukua yksi. Regressioanalyysi tehtiin kudospareille maksa-plasma, maksa-sisätraani, maksa-ulkotraani, plasma-sisätraani, plasma-ulkotraani ja sisätraani-ulkotraani.

Lisäksi regressioanalyysin avulla tutkittiin maksan ja plasman TAG:n rakennelipideihin suhteutettua määrää (TAG/PL) verrattuna sisätraanin rasvahappojen suhteellisiin määriin. Tällä tavalla haluttiin tutkia ovatko tiettyjen rasvahappojen määrät sisätraanissa suuria silloin, jos maksassa tai plasmassa on paljon TAG:a. Maksan ja plasman TAG/PL-arvot jaettiin ennen analyysia kaikilta yksilöiltä lasketulla keskiarvolla, mikä tasoitti määrällisiä eroja muuntaen arvot lähellä yhtä.

5.3.4 Pääkomponenttianalyysi ja SIMCA

Jotta kaikista rasvahapoista saataisiin yhdistettyä tietoa samanaikaisesti, tuloksia käsiteltiin pääkomponenttianalyysillä (principal component analysis, PCA). PCA on monimuuttuja-analyysimenetelmä, jonka avulla voidaan tarkastella useita muuttujia sisältävää aineistoa. Siinä ohjelmisto etsii moniulotteisesta näytteiden sisältämien muuttujien muodostamasta avaruudesta suuntia (pääkomponentteja), joissa suurin osa näytteiden vaihtelusta esiintyy. Pääkomponentti 1 selittää suurimman osan vaihtelusta, pääkomponentti 2 toiseksi suurimman osan, ja niin edelleen (Kvalheim & Karstang 1987). Tällä tavalla näytteiden välisiä suhteita selittäviä tekijöitä (ulottuvuuksia) voidaan vähentää menettämättä näytteiden keskeistä systemaattista vaihtelua, ja aineiston sisältämä informaatio voidaan selittää muutaman pääkomponentin avulla (Grahl-Nielsen ym. 2011). Kun käytetään vain kahta ensimmäistä pääkomponenttia, aineisto voidaan esittää kaksiulotteisena biplot-kuvaajana.

Tutkimuksessa pääkomponenttianalyysi tehtiin SIRIUS 8.1 ohjelmistolla (Pattern Recognition systems, Bergen, Norway). Rasvahappojen mooliprosenttiosuuksille tehtiin ennen analyysiä Arcsin-muunnos (Kaava 2), joka normalisoi aineiston jakauman. Tämä muunnos sopii suhteellisille osuuksille ja prosentteille, ja aineiston arvojen pitää olla ennen muunnosta välillä 0-1 (prosentit jaetaan sadalla). PCA-käsittelyyn otettiin mukaan vain ne rasvahapot, joiden suhteellinen mooliprosenttiosuus oli yli 0,3 vähintään yhdessä näytteessä. Tällä tavalla tarkasteluun tuli yhteensä 46 rasvahappoa.

$$x' = \arcsin\sqrt{x} \quad (2)$$

PCA on laadullinen kuvaileva menetelmä, joten se ei kerro näyteryhmien välillä esiintyvien erojen tilastollisesta merkitsevyydestä. Tämän vuoksi aineistoa tutkittiin vielä SIRIUS-ohjelmistopakettin sisältämällä SIMCA-ohjelmalla (soft independent modeling of class analogies). SIMCA:a varten vertailtavat näytteet jaettiin kahteen ryhmään ja niille luotiin tilastolliset normaali-jakaumaan perustuvat mallit. Ohjelma testaa kuinka hyvin valitut näytejoukot sopivat omiin malleihinsa valitun merkitsevyytason mukaisesti. Tulokset esitetään Cooman plot-kuvaajassa ja tulos on merkitsevä, jos ryhmät ovat erillään ja

merkitsevyytensä esittävän viivan turvallisella puolella (Wold ym. 1984). Tutkimuksessa käytetty merkitsevyytensä oli $p < 0,05$.

6 Tulokset

6.1 Kudosten rasvahappokoostumukset

Itämerennorpalta ja saimaannorpalta tutkituissa kudoksissa havaittiin yhteensä 65 erilaista rasvahappoa. Näistä 46 rasvahapon osuus oli yli 0,3 mooliprosenttia vähintään yhdessä näytteessä, ja ne esitetään taulukoissa ja sisällytettiin tilastolliseen käsittelyyn (Taulukko 3.).

Sekä itämerennorpalla että saimaannorpalla traanin runsaimmat rasvahapot olivat 16:1n-7, 18:1n-9+11 (pääosin isomeeriä n-9, mutta sisältää myös vähäisessä määrin n-11 isomeeriä), 22:6n-3, 20:5n-3, 16:0, 22:5n-3, 18:2n-6, 14:0 ja 18:1n-7. Maksoissa molemmilla alalajeilla puolestaan oli eniten rasvahappoja 18:0, 20:4n-6, 16:0, 18:1n-9+11, 18:1n-7, 18:2n-6, 16:1n-7, 20:5n-3, 22:6n-3 ja 22:5n-3. Näiden rasvahappojen määräsuhteet kuitenkin vaihtelivat alalajien välillä. Itämerennorpan plasmassa runsaimmat rasvahapot olivat 20:4n-6, 18:0, 16:0, 18:1n-9+11, 18:1n-7, 18:2n-6, 16:1n-7, 20:5n-3 ja 22:6n-3.

Maksat ja plasmat sisälsivät traaneja runsaammin rasvahappoja 16:0, 18:0, 18:1n-7, 20:3n-6 ja 20:4n-6. Niissä oli kuitenkin traaneihin verrattuna vähemmän muun muassa rasvahappoja 16:1n-7, 18:1n-9+11, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 ja 22:6n-3.

6.2 Traanin vertikaaliset rasvahappoprofiilit ja kerrostuneisuus

Kahdeksan määrältään runsasta ja hiiliketjun pituudeltaan sekä tyydyttymättömyysasteeltaan erilaista rasvahappoa valittiin kuvaamaan traanin kerrostuneisuutta, ja niiden mooliprosenttiosuuksien perusteella laadittiin kaikille yksilöille vertikaaliset rasvahappoprofiilit (Kuva 4. ja Kuva 5.). Molemmilla alalajeilla lyhytketjuiset MUFA:t, kuten 16:1n-7 ja 14:1n-5 olivat rikastuneet ulkotraaniin ja SFA:t, kuten 14:0 ja 16:0 sisätraaniin. Lisäksi ulkotraani sisälsi

runsaammin rasvahappoa 20:5n-3, jonka määrässä oli sisä- ja ulkotraanin välillä vielä huomattavampia eroja itämerennorpalla kuin saimaannorpalla.

Rasvahappoprofiilien perusteella varsinkin itämerennorpan traanissa näytti erottuvan kolme koostumukseltaan erilaista kerrosta, kunhan traanin paksuus oli yli 3 cm (Kuva 4.). Saimaannorpalla kerrostuneisuus oli heikommin nähtävissä, mutta voitiin silti erottaa (Kuva 5.). Molemmilla alalajeilla ulkotraanin paksuus oli noin 1,5 cm ja sisätraanin paksuus noin 1cm. Keskitraanin paksuus vaihteli traanin kokonaispaksuudesta riippuen.

Ulko- ja keskitraanin rajapinta voidaan nähdä rasvahappoprofiileista (Kuva 4. ja Kuva 5.) kohtana, jossa rasvahapon 16:1n-7 määrä alkaa laskea ja sen prekursorin, 16:0, määrä alkaa kasvaa. Paksusta traanista (esim. paneeli I, Kuva 4.) voidaan erottaa rasvahappoprofiililtaan suhteellisen tasainen keskiosa, jossa rasvahappojen tasoissa ei tapahdu suuria muutoksia. Sen sijaan alle 3 cm paksuisesta traanista keskitraania ei voida erottaa lainkaan (esim. paneeli J, Kuva 4. ja paneeli K, Kuva 5.). Keski- ja sisätraanin rajalla rasvahappojen tasot alkavat taas muuttua, joskin tämän rajapinnan erottaminen rasvahappoprofiileista on vaikeampaa (voi näkyä esim. 16:1n-7 määrän laskuna ja 18:1n-9+11 määrän kasvuna).

6.3 Erot makean veden ja murtoveden alalajien välillä

Itämerennorpan traani sisälsi saimaannorpan traania runsaammin rasvahappoja 18:1n-9+11, 20:2n-6, 20:3n-3, 22:4n-3 ja 22:6n-3. Lisäksi itämerennorpan sisätraanissa oli enemmän rasvahappoja 22:3n-3 ja 22:5n-3, mutta ulkotraanissa näiden rasvahappojen tasoissa ei juuri ollut eroja alalajien välillä. Saimaannorpan traanissa oli puolestaan itämerennorpan traaniin verrattuna enemmän rasvahappoja 16:0, 17:1n-8, 18:3n-3, 20:4n-6, 22:4n-6 ja 22:5n-6. Alalajien välillä oli eroja myös maksojen rasvahappokoostumuksissa. Itämerennorpan maksoissa oli saimaannorpan maksoja runsaammin rasvahappoja 18:0, 18:1n-9+11, 18:2n-6 ja 20:5n-3. Saimaannorpan maksat sisälsivät puolestaan enemmän rasvahappoja 15:0 *iso*, 16:0, 17:0 *iso*, 20:4n-6, 22:4n-6, 22:5n-6 ja 22:5n-3. Alalajien traanien SFA:jen, MUFA:jen ja PUFA:jen kokonaismäärissä oli myös jonkin verran eroja. Itämerennorpan ulkotraanissa oli saimaannorpan ulkotraaniin verrattuna vähemmän SFA:ja ja enemmän MUFA:ja. Sisätraanissa puolestaan

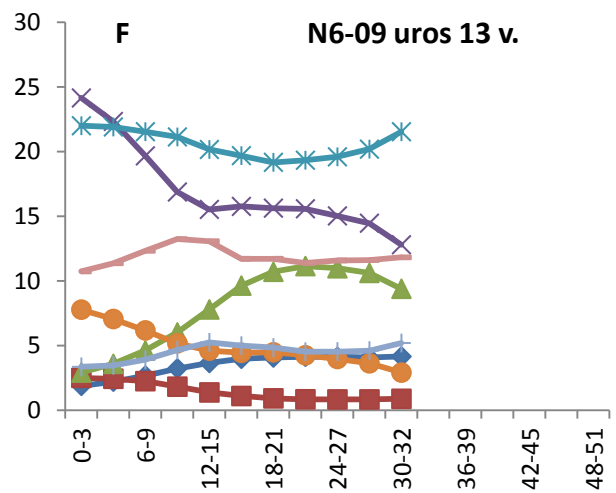
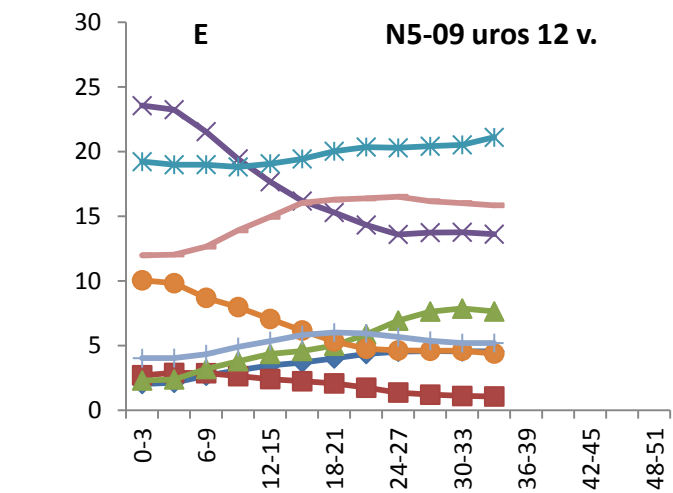
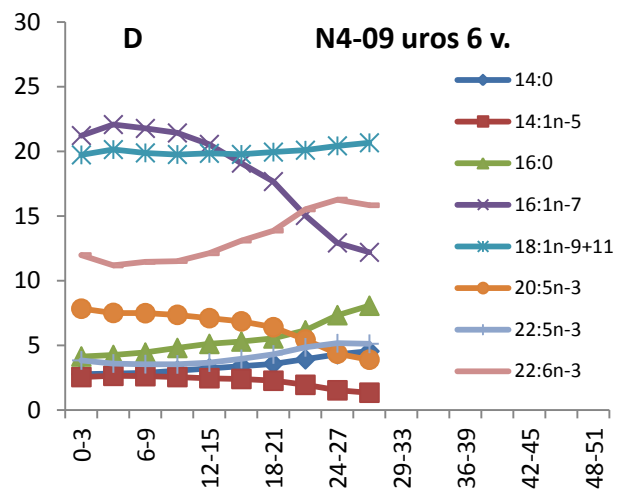
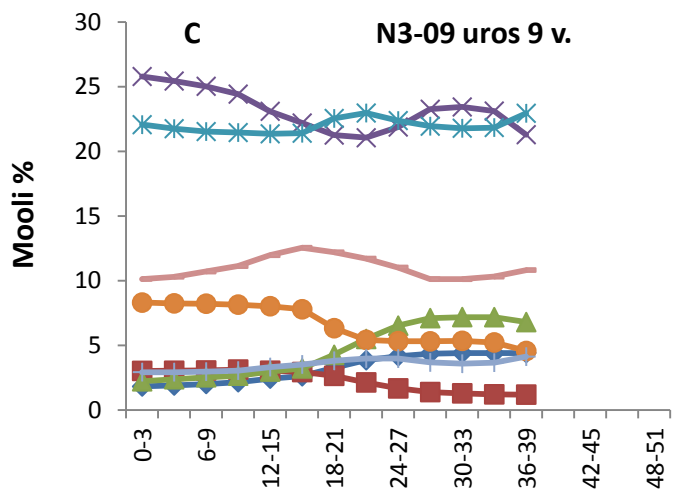
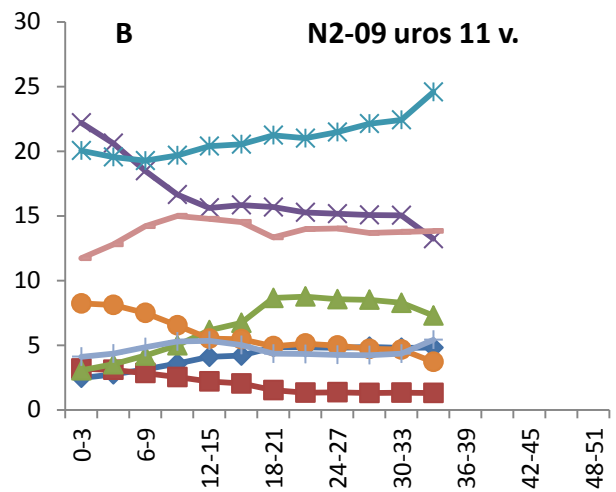
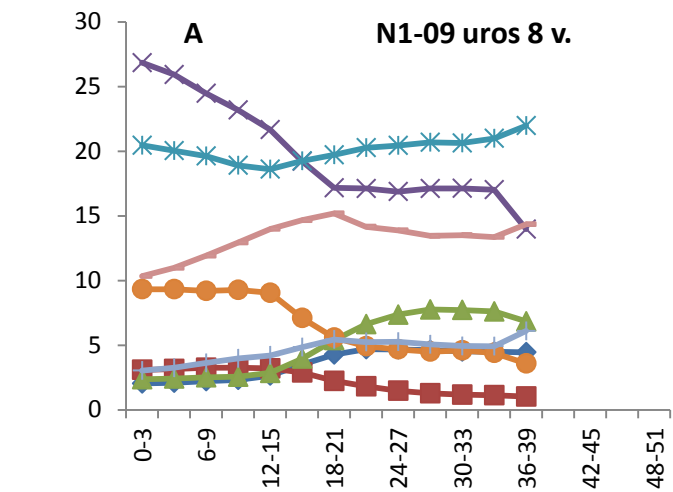
itämerennorpalla oli vähemmän SFA:ja ja enemmän PUFA:ja kuin saimaannorpalla.

Ulko- ja sisätraanin keskiarvona ilmoitettuna itämerennorppien traanin n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde oli 0,26 (n=10) ja saimaannorpalla vastaavasti 0,39 (n=4) (Taulukko 3.). Maksoissa tämä suhde oli puolestaan itämerennorpalla 3,51 (n=10) ja saimaannorpalla 3,62 (n=4). Itämerennorpan plasman n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde oli 4,54.

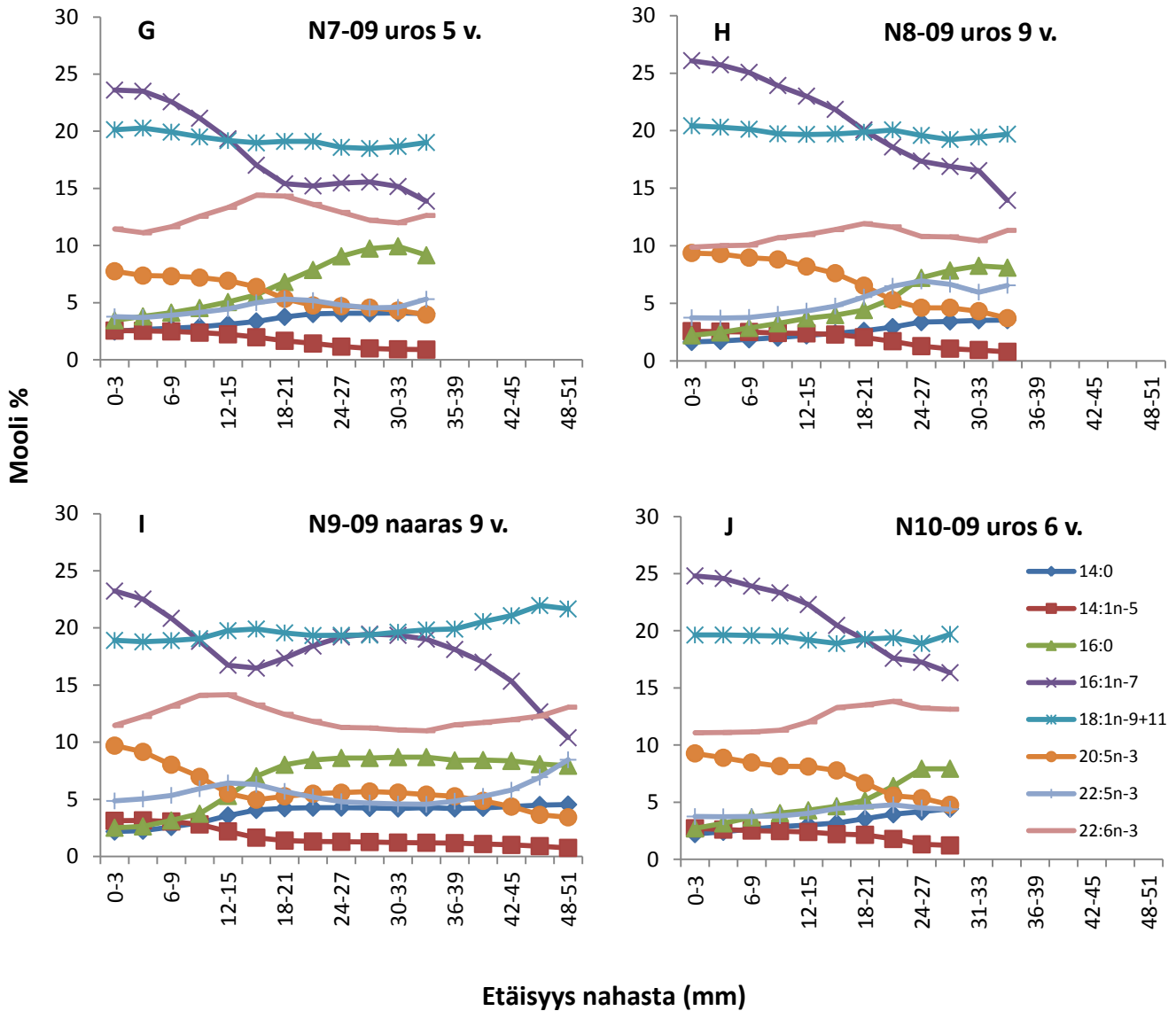
Kudoshormonien, eikosanoidien, esiasteina toimivien arakidonihapon (arachidonic acid, AA) 20:4n-6 ja eikosapentaeenihapon (eicosapentaenoic acid, EPA) 20:5n-3 suhde, AA/EPA, oli suurempi saimaannorpan kudoksissa kuin itämerennorpan kudoksissa. Itämerennorpalla tämä suhde oli traanissa (ulko- ja sisätraanin keskiarvo) 0,18 ja maksassa 6,92, kun taas saimaannorpalla se oli traanissa 0,56 ja maksassa 13,41. Molempien alalajien maksoissa AA:n määrät olivat huomattavan korkeita traanin määriin verrattuna. Itämerennorpan plasmassa AA:n määrät olivat myös korkeita ja AA/EPA-suhde oli 6,21.

Taulukko 3. Itämerennorpan traanin, maksan ja plasman, sekä saimaannorpan traanin ja maksan rasvahappokoostumukset (mooli %, keskiarvo ± keskihajonta). Ulkotraanin koostumus on ilmoitettu uloimman 3 mm perusteella ja sisätraanin koostumus sisimmän 3mm perusteella. Mukana rasvahapot, joiden määrä ylitti 0,3 % vähintään yhdessä näytteessä. Myös tyydyttyneiden (SFA), kertatyydyttymättömien (MUFA) ja monityydyttymättömien (PUFA) rasvahappojen, sekä n-3 ja n-6 monityydyttymättömien rasvahappojen kokonaismäärät ja n-6 PUFA/n-3 PUFA suhde on ilmoitettu. Saimaannorpista mukana vain ne neljä aikuista (ikä>1 vuotta) yksilöä, joista oli saatavilla sekä traani- että maksanäytteet.

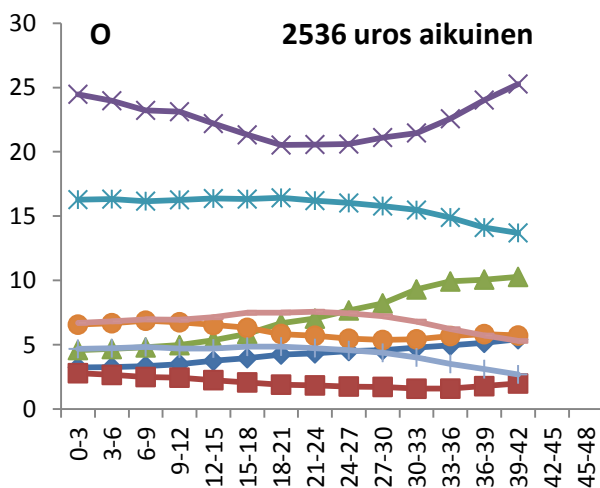
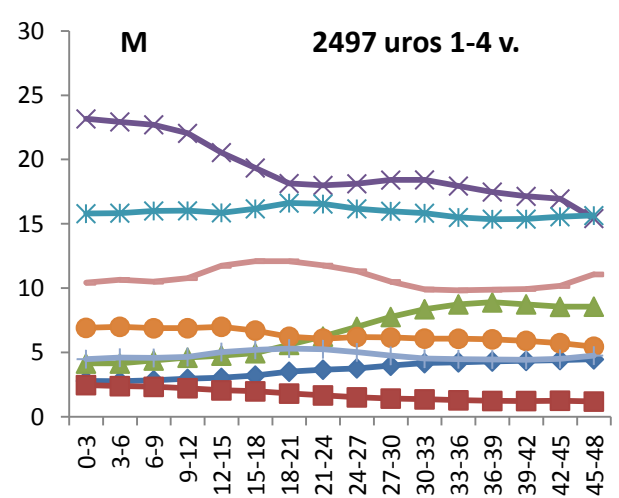
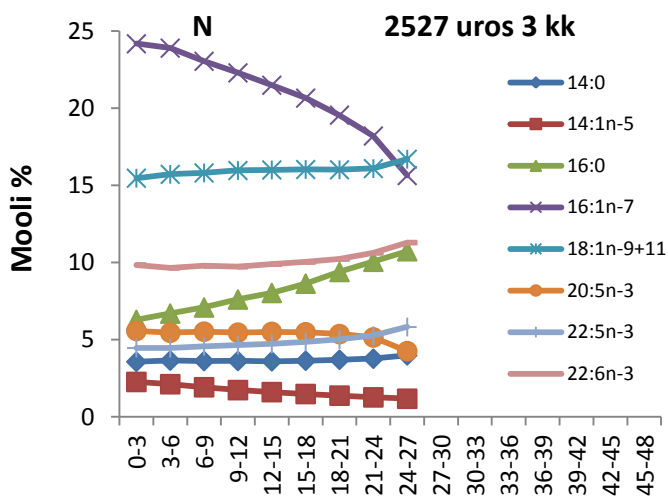
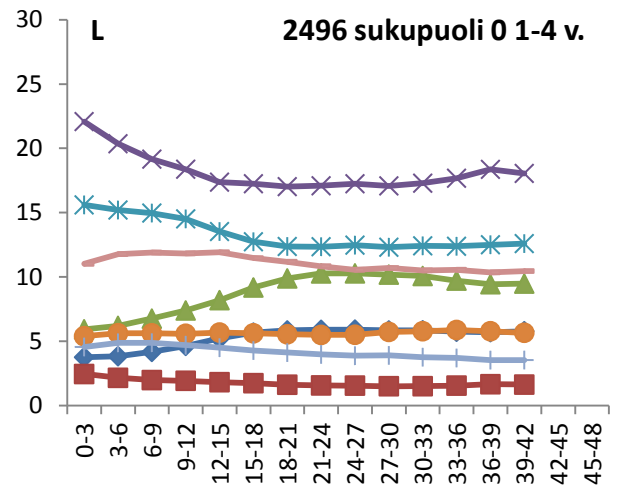
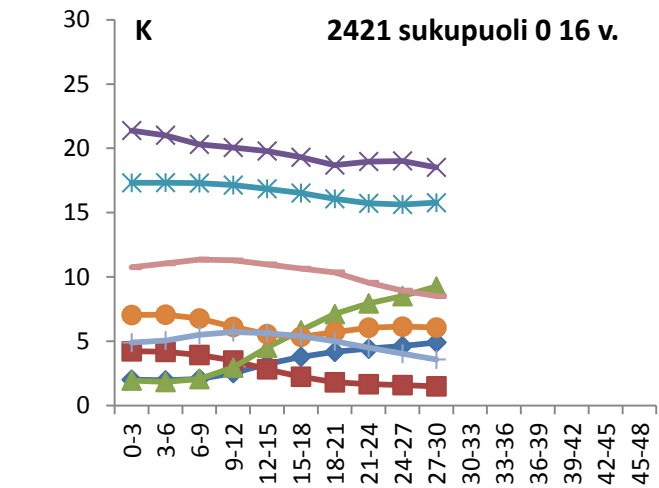
	Itämerennorppa (n=10)				Saimaannorppa (n=4)		
	ulkotraani	sisätraani	maksa	plasma	ulkotraani	sisätraani	maksa
14:0	2.15 ± 0.35	4.35 ± 0.35	0.67 ± 0.12	0.93 ± 0.11	2.96 ± 0.74	5.16 ± 0.58	1.21 ± 0.43
14:1n-5	2.80 ± 0.27	1.05 ± 0.21	0.10 ± 0.04	0.13 ± 0.03	2.99 ± 0.84	1.59 ± 0.33	0.16 ± 0.17
15:0 iso	0.22 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.50 ± 0.11	0.61 ± 0.11	0.21 ± 0.04
15:0 anteiso	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.07 ± 0.05
15:0	0.20 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.10	0.48 ± 0.03	0.35 ± 0.04
15:1n-6	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.29 ± 0.06	0.14 ± 0.02	0.02 ± 0.01
16:0	2.79 ± 0.62	7.91 ± 0.86	13.83 ± 0.84	15.45 ± 0.80	4.16 ± 1.65	9.40 ± 0.70	15.72 ± 1.34
16:1n-9	0.94 ± 0.14	0.77 ± 0.12	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.04	1.01 ± 0.14	0.90 ± 0.10	0.45 ± 0.08
16:1n-7	24.14 ± 1.76	14.16 ± 2.92	4.42 ± 0.69	4.75 ± 0.91	22.78 ± 1.35	19.32 ± 4.20	4.06 ± 2.02
16:1n-5	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.07	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.40 ± 0.07	0.33 ± 0.06
17:0 iso	0.10 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.25 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.41 ± 0.08	0.46 ± 0.13	0.77 ± 0.35
17:0 anteiso	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.36 ± 0.03
16:2n-4	0.70 ± 0.14	0.50 ± 0.16	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.42 ± 0.09	0.40 ± 0.10	0.11 ± 0.03
17:1n-branched	0.12 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.36 ± 0.19
17:0	0.06 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.71 ± 0.07	0.60 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.96 ± 0.15
17:1n-8	0.49 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.97 ± 0.15	0.78 ± 0.11	0.35 ± 0.06
18:0 iso	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.31 ± 0.03
18:0	0.28 ± 0.06	1.02 ± 0.14	19.68 ± 1.25	15.65 ± 1.63	0.39 ± 0.12	1.05 ± 0.09	16.67 ± 4.60
18:1n-9+11	20.26 ± 1.05	21.29 ± 1.66	9.46 ± 0.93	9.57 ± 0.70	16.25 ± 0.77	14.43 ± 1.55	7.31 ± 0.90
18:1n-7	3.64 ± 0.35	3.92 ± 0.35	8.29 ± 1.62	7.05 ± 1.39	4.15 ± 0.65	4.09 ± 0.20	7.58 ± 1.26
18:1n-5	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.40 ± 0.07	0.34 ± 0.07	0.22 ± 0.06	0.19 ± 0.02	0.30 ± 0.06
18:2n-9	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.22 ± 0.16
18:2n-7	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.35 ± 0.20	0.36 ± 0.22	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.54 ± 0.40
18:2n-6	4.88 ± 0.55	5.36 ± 1.05	7.18 ± 2.15	6.59 ± 2.55	4.45 ± 0.71	4.13 ± 1.20	3.91 ± 0.92
18:3n-6	0.25 ± 0.04	0.20 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.07	0.40 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.31 ± 0.02
18:3n-3	2.90 ± 0.42	2.80 ± 0.69	0.43 ± 0.17	0.41 ± 0.12	4.04 ± 1.02	4.06 ± 0.45	0.79 ± 0.63
18:4n-3	2.32 ± 0.20	2.47 ± 0.27	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.04	2.07 ± 0.12	2.60 ± 0.66	0.13 ± 0.08
20:0	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.47 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.42 ± 0.12
20:1n-9	0.25 ± 0.05	0.87 ± 0.16	0.43 ± 0.08	0.22 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.35 ± 0.14	0.22 ± 0.05
20:1n-7	0.07 ± 0.01	0.25 ± 0.11	0.19 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01
20:2n-6	0.32 ± 0.09	0.98 ± 0.44	0.56 ± 0.25	0.41 ± 0.17	0.19 ± 0.04	0.30 ± 0.08	0.25 ± 0.08
20:3n-9	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.38 ± 0.20	0.39 ± 0.23	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.05
20:3n-6	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.79 ± 0.15	0.79 ± 0.18	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.75 ± 0.07
20:4n-6	1.09 ± 0.15	0.86 ± 0.20	19.21 ± 2.14	23.32 ± 3.42	3.45 ± 0.45	3.34 ± 0.17	22.09 ± 3.83
20:3n-3	0.41 ± 0.11	0.64 ± 0.32	0.19 ± 0.09	0.11 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.13 ± 0.06
20:4n-3	1.28 ± 0.20	1.19 ± 0.30	0.32 ± 0.13	0.20 ± 0.08	0.85 ± 0.12	0.97 ± 0.18	0.28 ± 0.23
20:5n-3	8.76 ± 0.87	3.89 ± 0.56	3.10 ± 0.98	4.12 ± 1.15	6.49 ± 0.75	5.73 ± 0.25	1.75 ± 0.41
21:5n-3	0.03 ± 0.01	0.17 ± 0.14	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
22:3n-6	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.11 ± 0.05
22:4n-6	0.12 ± 0.03	0.33 ± 0.11	0.19 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.60 ± 0.12	0.82 ± 0.20	1.40 ± 0.38
22:3n-3	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.16	0.03 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
22:5n-6	0.24 ± 0.07	0.50 ± 0.23	0.16 ± 0.06	0.11 ± 0.04	1.06 ± 0.24	1.27 ± 0.43	0.74 ± 0.33
22:4n-3	0.31 ± 0.10	0.79 ± 0.44	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.11 ± 0.06	0.04 ± 0.02
22:5n-3	3.74 ± 0.56	5.59 ± 1.24	1.22 ± 0.27	0.56 ± 0.15	4.66 ± 0.18	3.66 ± 0.85	2.75 ± 0.84
22:6n-3	11.08 ± 0.77	13.27 ± 1.73	2.85 ± 0.68	1.64 ± 0.35	9.73 ± 2.03	8.84 ± 2.60	3.36 ± 1.44
24:1n-9	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.50 ± 0.07	1.01 ± 0.16	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.43 ± 0.15
SFA	6.08 ± 1.07	14.62 ± 0.97	36.13 ± 0.93	34.16 ± 2.11	9.48 ± 2.75	18.18 ± 1.35	36.97 ± 4.57
MUFA	53.59 ± 2.58	43.71 ± 3.51	24.64 ± 2.70	24.17 ± 2.89	49.45 ± 1.71	42.53 ± 4.34	21.69 ± 3.98
PUFA	39.13 ± 1.99	40.38 ± 3.08	37.79 ± 2.21	40.32 ± 1.55	39.54 ± 3.13	37.57 ± 5.35	39.81 ± 1.08
n-3 PUFA	30.87 ± 2.04	31.01 ± 2.68	8.32 ± 1.99	7.44 ± 1.89	28.22 ± 2.89	26.34 ± 3.82	9.26 ± 3.31
n-6 PUFA	7.31 ± 0.57	8.66 ± 1.01	28.50 ± 1.28	31.92 ± 1.45	10.64 ± 0.30	10.64 ± 1.69	29.55 ± 2.27
n-6 PUFA/n-3 PUFA	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.03	3.51 ± 1.21	4.54 ± 1.16	0.38 ± 0.03	0.40 ± 0.03	3.62 ± 0.91



Etäisyys nahasta (mm)



Kuva 4. Rasvahappojen 14:0, 14:1n-5, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9+11, 20:5n-3, 22:5n-3 ja 22:6n-3 vertikaaliset rasvahappoprofiilit itämerennorppien (A-J) traaneissa. NX-09=itämerennorppien yksilökohtainen koodi.

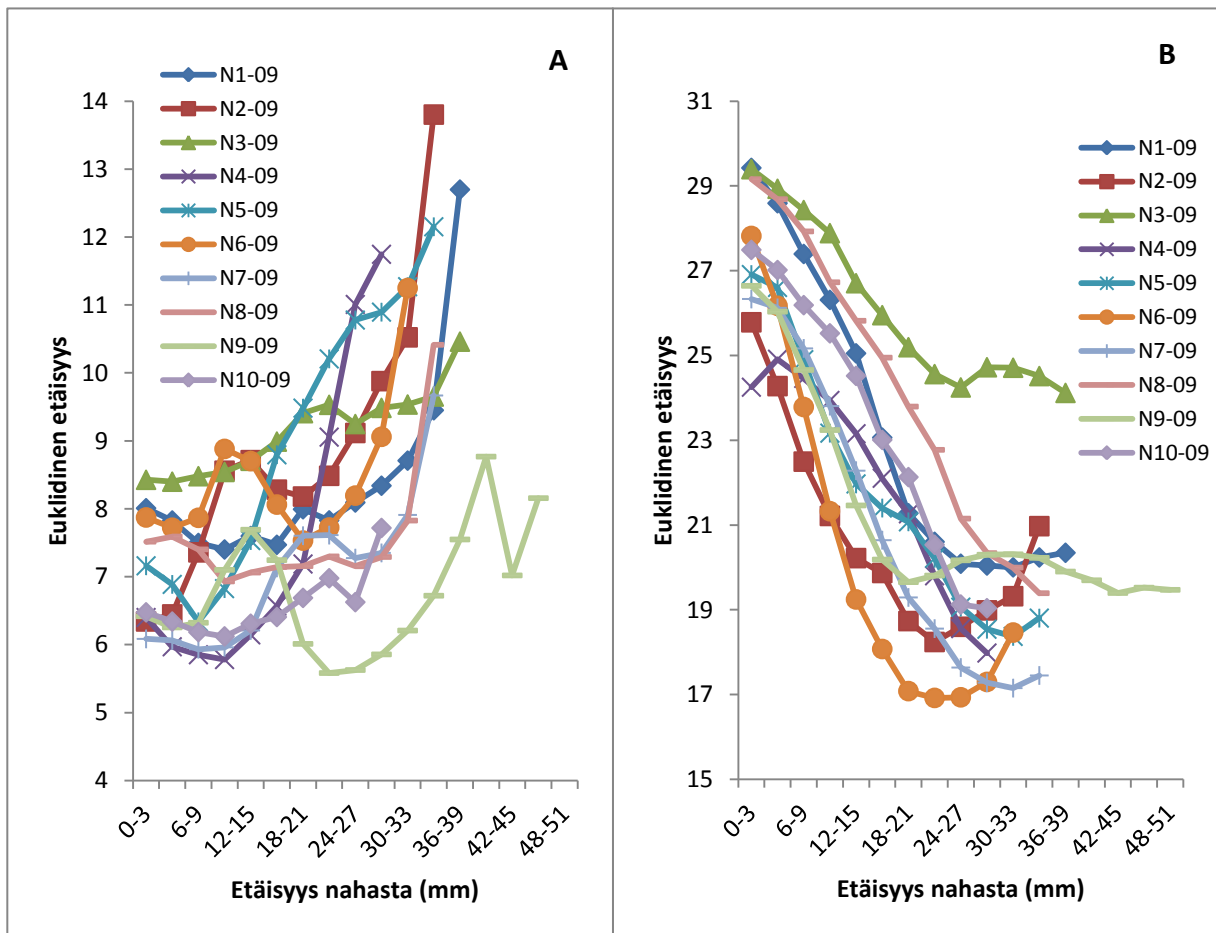


Kuva 5. Rasvahappojen 14:0, 14:1n-5, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9+11, 20:5n-3, 22:5n-3 ja 22:6n-3 vertikaaliset rasvahappoprofiilit saimaannorpan (K-O) traaneissa. 2XXX=saimaannorppien yksilökohtainen koodi.

Etäisyys nahasta (mm)

6.4 Euklidiset etäisyydet

Euklidisina etäisyyksinä mitatut itämerennorpan traanin ja saimaannorpan traanin, sekä itämerennorpan traanin ja silakan rasvahappokoostumuksen erot eivät olleet samanlaiset traanin eri syvyyksillä. Tutkittujen norpan alalajien traanien välinen euklidinen etäisyys oli pienin ulkotraanissa ja kasvoi edettäessä sisätraaniin päin, jossa se oli suurin (Kuva 6A). Alalajien ulkotraanit muistuttivat siis rasvahappokoostumukseltaan enemmän toisiaan kuin keski- ja sisätraanit. Suurimmat koostumukselliset erot näiden norpan alalajien välillä olivat sisätraanissa. Yksilön N9-09, itämeriaineiston ainoan naaraan, profiili poikkesi muista yksilöistä.



Kuva 6. **A** Itämerennorpan (n=10) ja saimaannorpan (n=3) traanin, sekä **B** itämerennorpan traanin ja silakan (n=5) rasvahappokoostumusten välinen euklidinen etäisyys. Laskuissa käytettiin kolmen saimaannorpan traaneista (ks. s. 32) kullekin osanäytteelle laskettuja rasvahappokohtaisia keskiarvoja (mooli %), sekä viidestä silakkayksilöstä laskettuja rasvahappokohtaisia keskiarvoja. Euklidiset etäisyydet laskettiin kunkin itämerennorppayksilön jokaiselle traanin osanäytteelle erikseen.

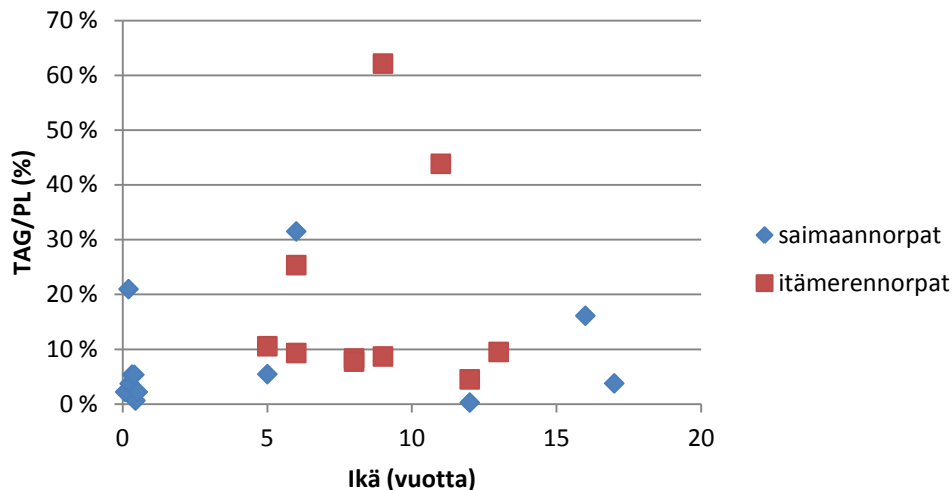
Itämerennorpan traanin ja sen tärkeän ravintokohteen, silakan, välinen euklidinen etäisyys puolestaan oli suurin ulkotraanissa ja laske sisätraaniin päin, jossa se oli pienin (Kuva 6B). Itämerennorpan sisätraani siis muistutti rasvahappokoostumukseltaan ulko- ja keskitraania enemmän silakan rasvahappokoostumusta. Norpat N2-09 ja N6-09 poikkesivat muista yksilöistä, sillä niillä keskitraanin koostumus muistutti eniten silakan koostumusta sisätraanin sijaan. Itämerennorpan traanin ja silakan rasvahappokoostumusten väliset euklidiset etäisyydet olivat kuitenkin kaikilla traanin syvyyksillä suurempia kuin alalajien traanien välillä.

6.5 Lipidikoostumukset

Itämerennorpan maksan TAG/PL suhteen keskiarvo oli 0,19 ja plasman vastaavasti 0,14 (n=10). Saimaannorpan maksan TAG/PL keskiarvo oli puolestaan aikuisilla (ikä>1 vuotta) yksilöillä 0,12 (n=8) (Taulukko 4.). Iällä ei näyttänyt olevan vaikutusta maksaan varastoituneen rasvan, eli TAG:n määrään kummallakaan alalajilla (Kuva 7.). Maksan ja plasman TAG/PL suhteiden välillä ei esiintynyt tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta.

Taulukko 4. Itämerennorppien (n=10) maksaan ja plasmaan, sekä aikuisten (ikä>1 vuotta) saimaannorppien (n=8) maksaan varastoituneen triasyyliglyserolin määrä suhteessa fosfolipidien määrään. TAG=triasyyliglyseroli, PL=fosfolipidit.

itämerennorpat	maksa TAG/PL	plasma TAG/PL	saimaannorpat	maksa TAG/PL
N1-09	0.08	0.06	2536	0.03
N2-09	0.44	0.04	2496	0.13
N3-09	0.62	0.08	2497	0.20
N4-09	0.25	0.12	2396	0.05
N5-09	0.04	0.15	2434	0.04
N6-09	0.09	0.14	2421	0.16
N7-09	0.11	0.13	2451	≤0.01
N8-09	0.09	0.29	2449	0.31
N9-09	0.08	0.17	keskiarvo	0.12
N10-09	0.09	0.25		
keskiarvo	0.19	0.14		



Kuva 7. Iän vaikutus saimaannorpan (n=12) ja itämerennorpan (n=10) maksan triasyyliglyserolin (TAG) määrään. Triasyyliglyserolin määrä ilmoitettu prosenttiosuutena fosfolipidien (PL) kokonaismäärästä. Saimaannorppista mukana eivät ole ne kolme yksilöä (2496, 2497 ja 2535), joiden iästä ei ollut saatavilla tarkkaa tietoa.

6.6 Itämerennorpan eri kudosten rasvahappokoostumusten riippuvuus

Regressioanalyysien perusteella havaittiin, että itämerennorpalla joidenkin rasvahappojen tasot korreloivat positiivisesti kudosten välillä, ja toisten kohdalla taas ei ollut havaittavissa tilastollisesti merkitsevää ($p < 0,05$) riippuvuutta (Taulukko 5). Maksan ja plasman välillä korrelaatio oli merkitsevä 30/46 rasvahapon kohdalla ja selitysasteet olivat suhteellisen korkeita. Muiden kudosparien välillä merkitsevästi korreloivia rasvahappoja on vähemmän, mutta niitä kuitenkin esiintyy. Plasman ja sisätraanin välillä näiden rasvahappojen määrä oli 12, ja koostuen pääasiassa hiiliketjultaan parittomista ja haarautuneista tai n-3 ja n-6 PUFA:sta (Kuva 8.). Näistä seitsemän rasvahapon tasot korreloivat merkitsevästi myös maksan ja sisätraanin välillä. Rasvahappojen 22:5n-6 ja 22:4n-3 tasoissa puolestaan esiintyi merkitsevää korrelaatiota maksan ja sisätraanin välillä, mutta ei plasman ja sisätraanin välillä.

Rasvahappojen 17:0 *iso*, 17:0 *anteiso*, 17:1n-8, 20:2n-6, 20:4n-6, 21:5n-3, 22:3n-3 ja 22:4n-3 tasot korreloivat merkitsevästi vain maksan ja sisätraanin, tai plasman ja sisätraanin välillä. Rasvahappojen 15:0 *iso* ja 15:0 *anteiso* tasojen korrelaatio oli taas merkitsevää kaikkien muiden kudosparien, paitsi plasman ja ulkotraanin välillä. Rasvahappojen 14:0, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso* ja 21:5n-3 tasot heijastuivat merkitsevästi aina maksasta plasman ja sisätraanin kautta ulkotraaniin asti (Kuva 8.).

Taulukko 5. Itämerennorpan kudosten välisten rasvahappotasojen selityksasteet (R^2), sekä maksan ja plasman TAG/PL osuuden ja sisätraanin rasvahappotasojen väliset selityksasteet. Regressioanalyysiä varten kunkin yksilön kudosten rasvahappojen arvot jaettiin kaikilta yksilöiltä ($n=10$) lasketulla rasvahappokohtaisella keskiarvolla. Merkitsevyytasoa 0,05 pienemmät p-arvot on merkitty punaisella. Lipidimetabolian suhteen toisiinsa kaikkein suurimmin yhteydessä olevat kudosparit on lihavoitu. Kuvaajan alalaidassa olevat lukusuhteet kuvaavat kudosten välillä tilastollisesti merkitsevästi korreloivien rasvahappojen osuutta kaikista havaituista rasvahapoista. M=maksa, P=plasma, ST=sisätraani, UT=ulkotraani, TAG=triasyyliglyceroli ja PL=fosfolipidit.

	M/P		M/ST		M/UT		P/ST		P/UT		ST/UT		M _{TAG/PL} /ST		P _{TAG/PL} /ST	
	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo	R^2	p-arvo
14:0	0.642	0.005	0.381	0.057	0.162	0.248	0.509	0.021	0.076	0.440	0.466	0.030	0.118	0.331	0.660	0.004
14:1n-5	0.669	0.004	0.017	0.717	0.000	0.986	0.029	0.635	0.029	0.638	0.040	0.579	0.209	0.184	0.042	0.570
15:0 <i>iso</i>	0.632	0.006	0.915	0.000	0.489	0.025	0.764	0.001	0.222	0.169	0.404	0.048	0.028	0.644	0.049	0.540
15:0 <i>anteiso</i>	0.527	0.017	0.821	0.000	0.427	0.041	0.430	0.039	0.114	0.340	0.642	0.005	0.000	0.991	0.153	0.263
15:0	0.513	0.020	0.043	0.563	0.000	0.959	0.081	0.427	0.017	0.722	0.078	0.436	0.281	0.115	0.028	0.647
15:1n-6	0.318	0.090	0.034	0.612	0.044	0.560	0.001	0.920	0.075	0.444	0.408	0.047	0.001	0.943	0.458	0.032
16:0	0.023	0.675	0.064	0.479	0.040	0.581	0.003	0.890	0.068	0.468	0.149	0.271	0.123	0.321	0.007	0.824
16:1n-9	0.577	0.011	0.081	0.424	0.090	0.400	0.085	0.414	0.254	0.137	0.000	0.956	0.020	0.695	0.194	0.202
16:1n-7	0.736	0.002	0.020	0.696	0.127	0.312	0.121	0.324	0.303	0.099	0.261	0.132	0.505	0.021	0.017	0.716
16:1n-5	0.239	0.152	0.185	0.214	0.005	0.852	0.390	0.054	0.007	0.819	0.048	0.541	0.076	0.441	0.252	0.139
17:0 <i>iso</i>	0.745	0.001	0.369	0.062	0.000	0.954	0.459	0.031	0.011	0.774	0.089	0.401	0.000	0.963	0.061	0.491
17:0 <i>anteiso</i>	0.789	0.001	0.750	0.001	0.290	0.108	0.590	0.009	0.298	0.103	0.250	0.141	0.109	0.353	0.305	0.098
16:2n-4	0.312	0.094	0.094	0.390	0.140	0.287	0.284	0.113	0.118	0.330	0.004	0.855	0.471	0.028	0.026	0.659
17:1n- <i>branched</i>	0.067	0.471	0.030	0.631	0.181	0.220	0.023	0.678	0.349	0.072	0.700	0.003	0.126	0.314	0.001	0.949
17:0	0.813	0.000	0.128	0.311	0.019	0.703	0.357	0.068	0.191	0.207	0.085	0.415	0.209	0.184	0.031	0.629
17:1n-8	0.447	0.035	0.759	0.001	0.000	0.971	0.654	0.005	0.020	0.697	0.013	0.757	0.385	0.056	0.232	0.159
18:0 <i>iso</i>	0.695	0.003	0.384	0.056	0.111	0.347	0.223	0.168	0.004	0.862	0.584	0.010	0.389	0.054	0.319	0.089
18:0	0.650	0.005	0.143	0.281	0.207	0.187	0.042	0.569	0.233	0.158	0.046	0.552	0.093	0.392	0.023	0.674
18:1n-9+11	0.139	0.288	0.013	0.749	0.064	0.479	0.001	0.939	0.466	0.030	0.000	0.986	0.476	0.027	0.722	0.002
18:1n-7	0.969	0.000	0.060	0.495	0.204	0.190	0.043	0.564	0.279	0.116	0.030	0.633	0.012	0.764	0.001	0.950
18:1n-5	0.897	0.000	0.004	0.859	0.025	0.660	0.007	0.816	0.049	0.540	0.153	0.264	0.029	0.638	0.048	0.543
18:2n-9	0.930	0.000	0.151	0.267	0.000	0.970	0.048	0.543	0.008	0.803	0.316	0.091	0.315	0.091	0.273	0.121

18:2n-7	0.973	0.000	0.344	0.075	0.661	0.004	0.299	0.102	0.613	0.007	0.050	0.535	0.425	0.041	0.237	0.154
18:2n-6	0.945	0.000	0.546	0.015	0.410	0.046	0.709	0.002	0.333	0.081	0.028	0.643	0.366	0.064	0.547	0.015
18:3n-6	0.785	0.001	0.159	0.254	0.420	0.043	0.393	0.052	0.698	0.003	0.598	0.009	0.463	0.030	0.425	0.041
18:3n-3	0.285	0.112	0.241	0.150	0.171	0.236	0.379	0.058	0.043	0.566	0.019	0.703	0.462	0.030	0.250	0.141
18:4n-3	0.184	0.216	0.008	0.803	0.019	0.708	0.000	0.997	0.147	0.275	0.271	0.123	0.142	0.283	0.121	0.324
20:0	0.391	0.053	0.002	0.893	0.293	0.106	0.031	0.627	0.526	0.018	0.161	0.251	0.157	0.256	0.022	0.682
20:1n-9	0.827	0.000	0.022	0.683	0.001	0.927	0.010	0.781	0.000	0.961	0.161	0.250	8E-06	0.994	0.070	0.459
20:1n-7	0.572	0.011	0.000	0.956	0.025	0.660	0.016	0.726	0.143	0.282	0.375	0.060	0.232	0.159	0.282	0.114
20:2n-6	0.971	0.000	0.590	0.009	0.221	0.170	0.537	0.016	0.245	0.146	0.147	0.275	0.290	0.109	0.359	0.067
20:3n-9	0.961	0.000	0.194	0.203	0.746	0.001	0.271	0.123	0.761	0.001	0.060	0.495	0.382	0.057	0.415	0.045
20:3n-6	0.791	0.001	0.025	0.662	0.181	0.220	0.018	0.711	0.432	0.039	0.281	0.115	0.079	0.432	0.341	0.077
20:4n-6	0.668	0.004	0.489	0.025	0.019	0.706	0.778	0.001	0.051	0.530	0.144	0.280	0.390	0.054	0.385	0.056
20:3n-3	0.832	0.000	0.282	0.114	0.240	0.151	0.179	0.223	0.303	0.099	0.017	0.718	0.442	0.036	0.411	0.046
20:4n-3	0.862	0.000	0.108	0.355	0.143	0.282	0.168	0.240	0.252	0.139	0.000	0.999	0.735	0.002	0.460	0.031
20:5n-3	0.866	0.000	0.393	0.053	0.051	0.531	0.250	0.141	0.089	0.403	0.089	0.402	0.181	0.221	0.010	0.783
21:5n-3	0.670	0.004	0.304	0.098	0.328	0.083	0.462	0.031	0.398	0.051	0.577	0.011	0.206	0.188	0.192	0.206
22:3n-6	0.027	0.649	0.000	0.992	0.001	0.924	0.000	0.974	0.004	0.856	0.029	0.636	0.032	0.620	0.137	0.293
22:4n-6	0.011	0.778	0.261	0.131	0.519	0.019	0.463	0.030	0.051	0.531	0.279	0.116	0.001	0.940	0.195	0.202
22:3n-3	0.281	0.115	0.009	0.794	0.143	0.282	0.592	0.009	0.140	0.287	0.231	0.159	0.285	0.112	0.246	0.144
22:5n-6	0.391	0.053	0.456	0.032	0.878	0.000	0.022	0.681	0.247	0.144	0.677	0.003	0.022	0.682	0.247	0.144
22:4n-3	0.154	0.262	0.419	0.043	0.076	0.442	0.022	0.683	0.607	0.008	0.041	0.573	0.428	0.040	0.424	0.041
22:5n-3	0.393	0.052	0.171	0.235	0.380	0.058	0.222	0.169	0.019	0.701	0.438	0.037	0.375	0.060	0.206	0.188
22:6n-3	0.041	0.575	0.248	0.143	0.570	0.012	0.000	0.999	0.057	0.507	0.425	0.041	0.162	0.249	0.048	0.545
24:1n-9	0.010	0.779	0.035	0.606	0.022	0.682	0.046	0.552	0.139	0.289	0.269	0.124	0.150	0.270	0.033	0.617

30/46

9/46

9/46

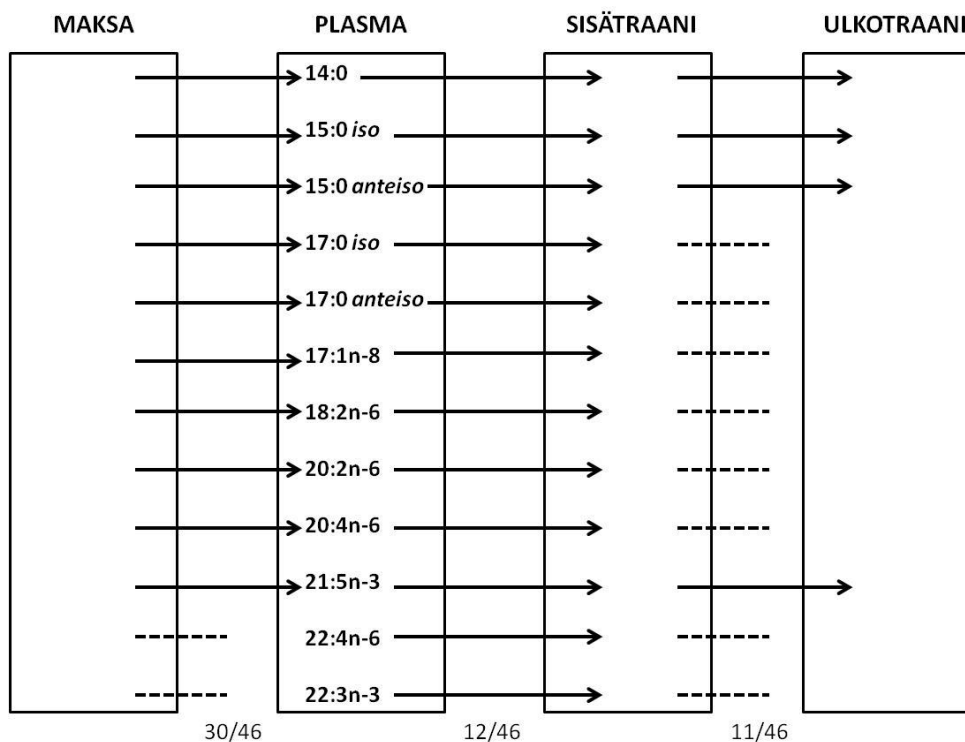
12/46

7/46

11/46

11/46

9/46



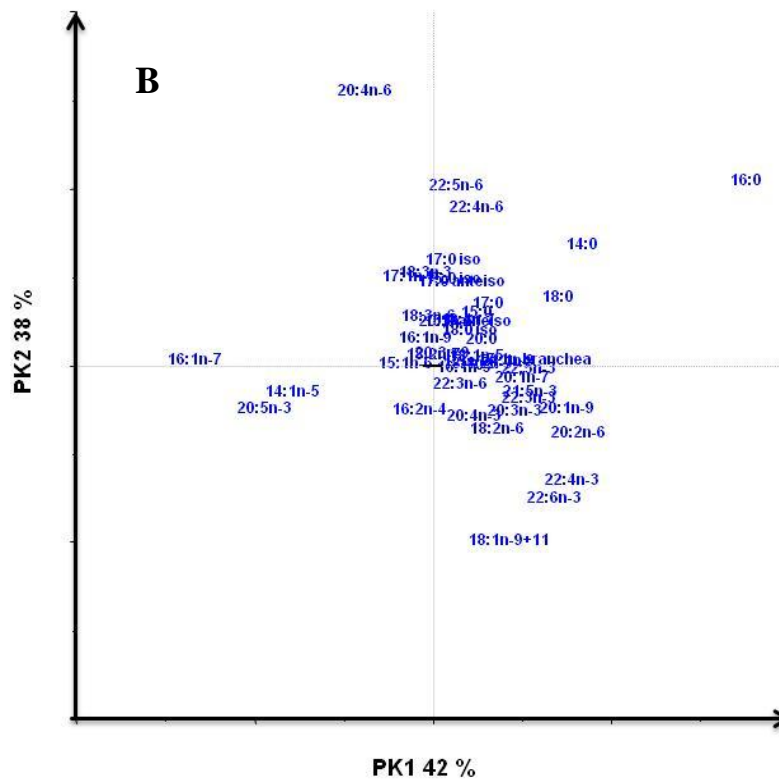
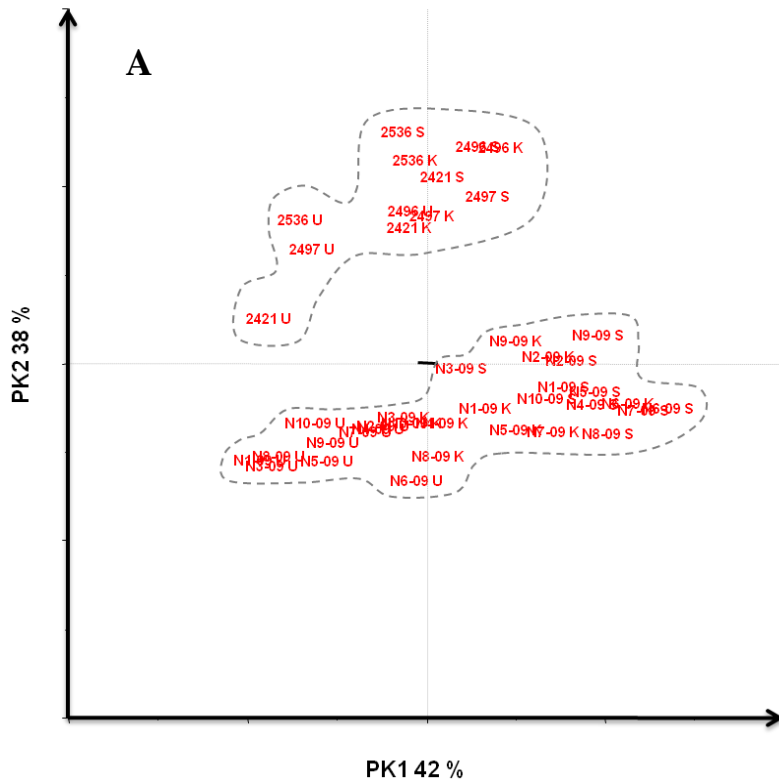
Kuva 8. Suhteellisten rasvahappotasojen korrelaatiot itämerennorpan (n=10) eri kudosten välillä. Kuvaan on sisällytetty ne 12 rasvahappoa, joiden osalta havaittiin tilastollisesti merkitsevä korrelaatio ($p < 0,05$) plasman ja sisätraanin välillä. Tätä tilastollisesti merkitsevää kudosten välistä rasvahapon suhteellisen määrän korrelaatiota on kuvattu nuolella ja tilastollisesti merkityksetöntä korrelaatiota katkoviivalla. Kuvaajan alalaidassa olevat lukusuhteet kuvaavat kudosten välillä tilastollisesti merkitsevästi korreloivien rasvahappojen osuutta kaikista havaituista rasvahapoista.

6.7 Maksan ja plasman triasyyliglyserolin määrän vaikutus rasvahappojen esiintymiseen itämerennorpan kudoksissa

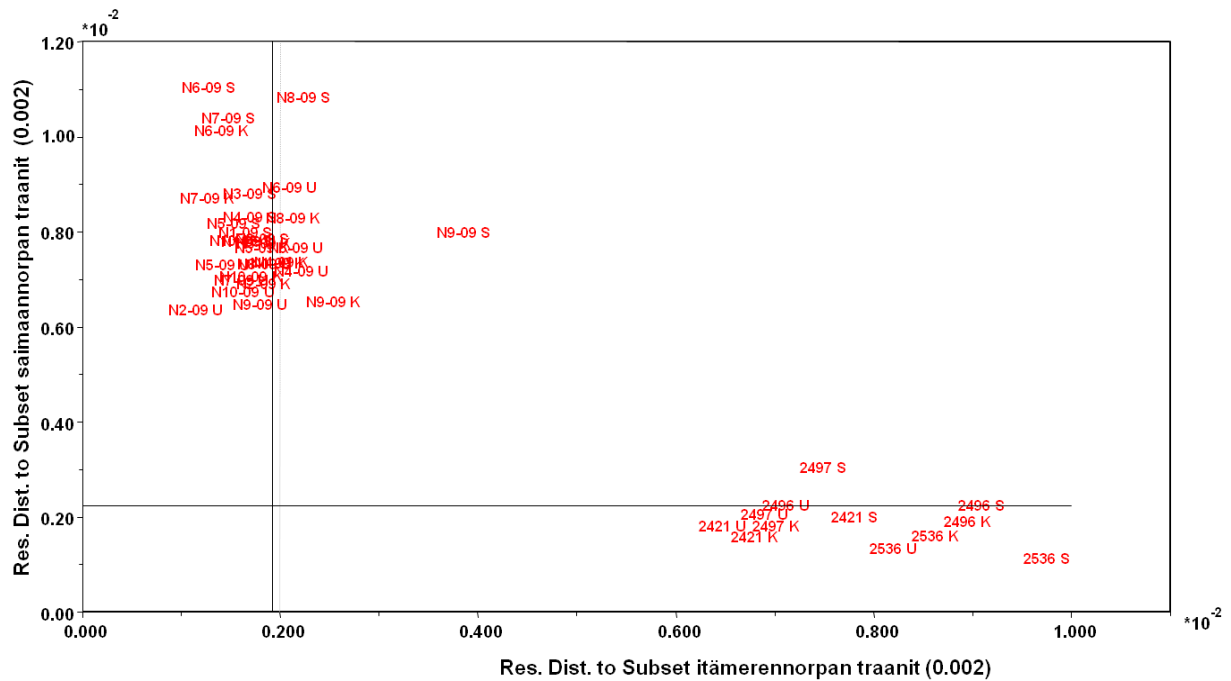
Kun maksaan ja plasmaan varastoituneen TAG:n suhteellinen määrä (TAG/PL) on korkea, niissä molemmissa esiintyy runsaammin rasvahappoja 18:1n-9+11, 18:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-3 ja 22:4n-3. Lisäksi maksassa on tällöin runsaammin rasvahappoja 16:1n-7, 16:2n-4, 18:2n-7 ja 18:3n-3, ja plasmassa rasvahappoja 14:0, 15:1n-6, 18:2n-6 ja 20:3n-9 (Taulukko 5.).

6.8 Pääkomponenttianalyysi

Itämerennorpan ja saimaannorpan traanit erottuivat pääkomponenttianalyysissä toisistaan. Myös traanien eri osat erottuivat lajin sisällä omiksi ryhmikseen (Kuva 9A). Pääkomponentti 1, eli vaakasuunnassa esiintyviä eroja selittävä tekijä oli mitä ilmeisimmin traanin syvyys, ja se selitti vaihtelusta 42 %. Pääkomponentti 2 eli pystysuunnassa esiintyviä eroja selittävä tekijä oli puolestaan alalaji, ja se selitti vaihtelusta 38 %. Norpan alalaji ja traaninäytteen ottosyvyys selittivät siis aineiston vaihtelusta melkein yhtä suuren osan. Pääkomponenttiin 1 eniten vaikuttaneita rasvahappoja ovat 16:0, 14:0, 20:2n-6, 18:0, 20:1n-9, 22:4n-3 ja 22:6n-3 (rikastuneet sisätraaniin), sekä 16:1n-7, 20:5n-3 ja 14:1n-5 (rikastuneet ulkotraaniin) (Kuva 9B). Pääkomponenttiin 2 puolestaan vaikuttivat eniten rasvahapot 18:1n-9+11, 22:6n-3 ja 22:4n-3 (runsaammin itämerennorpalla), sekä 20:4n-6, 22:5n-6 ja 22:4n-6 (runsaammin saimaannorpalla) (Kuva 9B). Alalajien traanit erottuivat myös Cooman plotissa (Kuva 10.) merkitsevästi ($p < 0,05$) omiksi ryhmikseen.

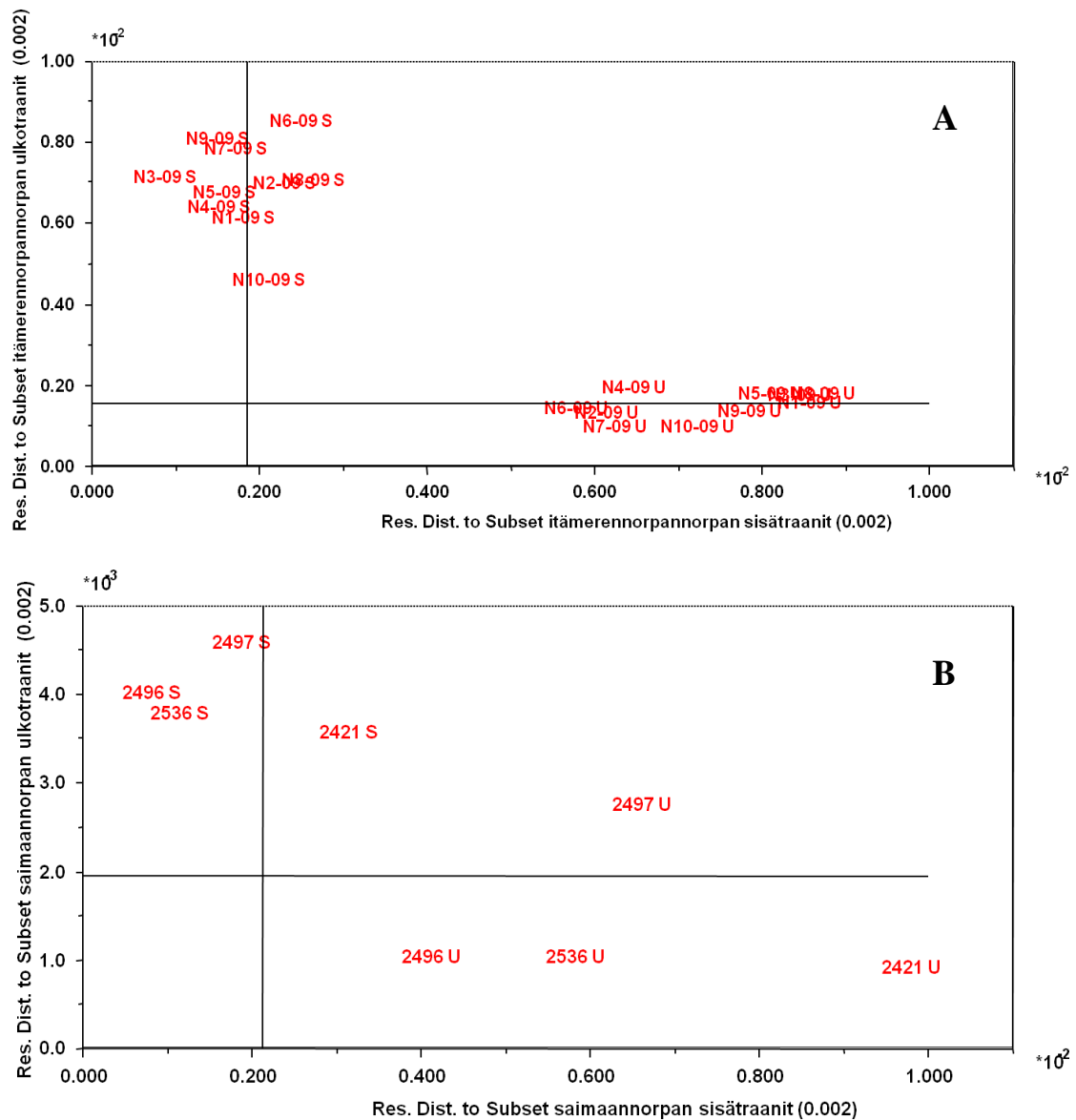


Kuva 9. **A** Pääkomponenttikuvaaja itämerennorppan (n=10) ja saimaannorppan (n=4) traanin kerroksista. Ulkotraanien (U) arvot laskettiin jokaiselle eläimelle neljän uloimman traanin osanäytteen keskiarvon perusteella, sisätraanin (S) arvot kolmen sisimmän osanäytteen keskiarvon perusteella ja keskitraanin (K) arvot siten, että viisi ulointa ja neljä sisintä osanäytettä jätettiin pois ja lopuille laskettiin keskiarvo. **B** Saman aineiston rasvahappomuuttujat. Aineistolle tehtiin ensin Arcsin-muunnos. NX-09=itämerennorppien yksilökohtainen koodi, 2XXX=saimaannorppien yksilökohtainen koodi, PK=pääkomponentti.



Kuva 10. Cooman plot itämerennorpan (n=10) ja saimaannorpan (n=4) traanin kerroksista (p<0,05). Aineistolle tehtiin ensin Arcsin-muunnos. U=ulkotraani, K=keskitraani ja S=sisätraani. Ks. tulkinta s. 34–35.

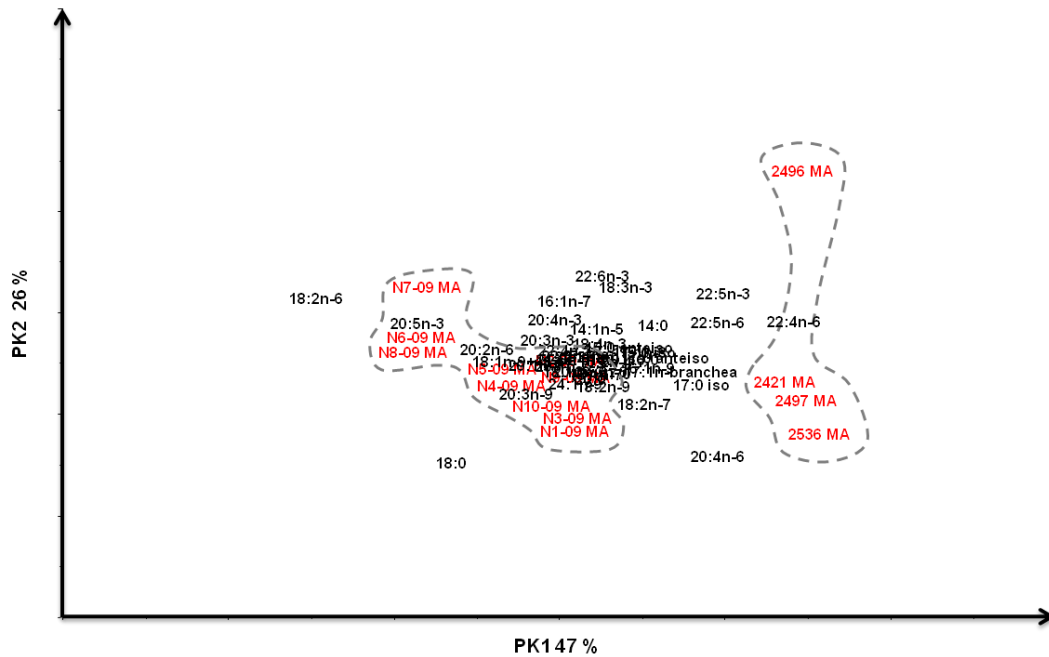
Cooman plotin (Kuva 11A) perusteella itämerennorpan sisä- ja ulkotraani erosivat rasvahappokoostumukseltaan toisistaan merkitsevästi (n=10, p<0,05). Sisä- ja keskitraani, sekä ulko- ja keskitraani eivät sen sijaan eronneet koostumukseltaan merkitsevästi. Sama ilmiö oli nähtävissä saimaannorpan kohdalla (Kuva 11B): sisä- ja ulkotraani erosivat koostumukseltaan merkitsevästi (n=4, p<0,05), mutta sisä- ja keskitraani, sekä ulko- ja keskitraani eivät.



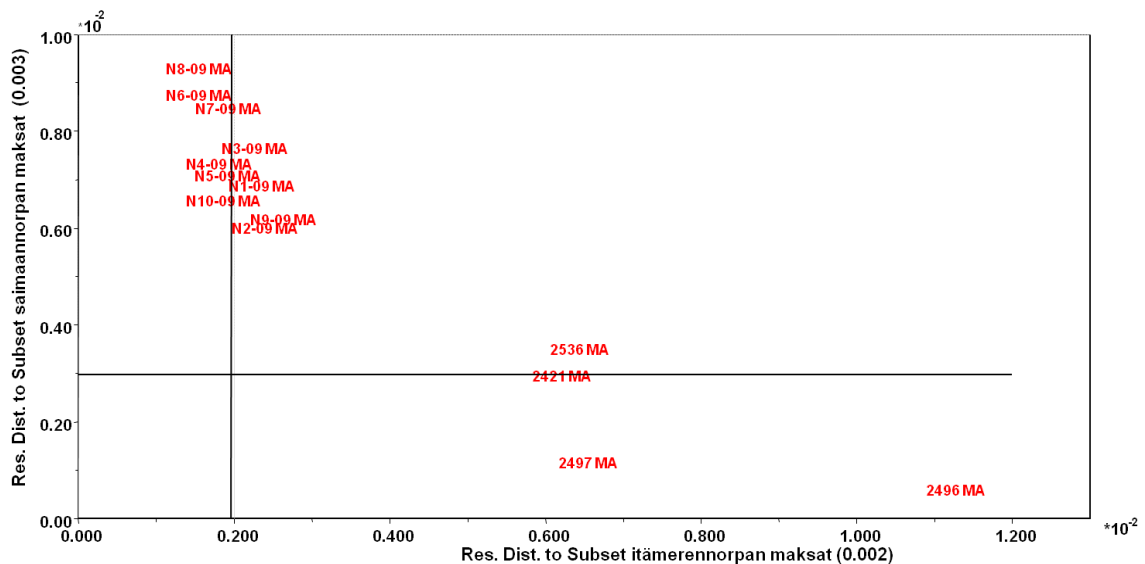
Kuva 11. Cooman plot **A** itämerennorpan (n=10) ja **B** saimaannorpan (n=4) traanin ulko- ja sisäkerroksista ($p < 0,05$). Aineistolle tehtiin ensin Arcsin muunnos. U=ulkotraani ja S= sisätraani.

Itämerennorpan ja saimaannorpan maksat erottuivat rasvahappokoostumukseltaan pääkomponenttianalyysissä toisistaan. Kuvassa 12. pääkomponentti 1, eli vaakasuuntaista vaihtelua selittävä tekijä oli mitä ilmeisimmin alalaji, ja se selitti vaihtelusta 47 %. Alalajien sisäistä vaihtelua selittävä pääkomponentti 2 oli jokin tuntematon tekijä, jonka selitysosuus oli 26 %. Pääkomponenttiin 1 vaikuttivat eniten rasvahapot 18:2n-6, 20:5n-3 ja 18:0 (runsaammin itämerennorpalla), sekä 22:4n-6, 22:5n-3, 20:4n-6 ja 22:5n-6 (runsaammin saimaannorpalla).

Saimaannorppien kohdalla yksilön 2496 maksa erottui koostumukseltaan muiden yksilöiden maksoista. Alalajien maksat erottuivat merkitsevästi ($p < 0,05$) Cooman plotissa (Kuva 13.) omiksi ryhmiin.



Kuva 12. Monimuuttuja-analyysin tuloksena saatu biplot-kuvaaja itämerennorpan ($n=10$) ja saimaannorpan ($n=4$) maksoista. Aineistolle tehtiin ensin Arcsin-muunnos. MA=maksa, NX-09=itämerennorppien yksilökohtainen koodi, 2XXX=saimaannorppien yksilökohtainen koodi.



Kuva 13. Cooman plot itämerennorpan ($n=10$) ja saimaannorpan ($n=4$) maksoista ($p < 0,05$). Aineistolle tehtiin ensin Arcsin-muunnos. MA=maksa. NX-09=itämerennorppien yksilökohtainen koodi, 2XXX=saimaannorppien yksilökohtainen koodi.

7 Tulosten tarkastelu

7.1 Kudosten rasvahappokoostumukset tässä ja aiemmissa tutkimuksissa

Tässä tutkimuksessa havaitut saimaannorpan ja itämerennorpan traanien rasvahappokoostumukset vastasivat yleisellä tasolla aiemmissä tutkimuksissa näillä alalajeilla havaittuja koostumuksia (Käkelä ym. 1993; Käkelä 1996; Käkelä & Hyvärinen 1996; Strandberg ym. 2011). Pienet erot traanien rasvahappokoostumuksissa Käkelän ym. (1993) tutkimuksen tulosten ja tämän tutkimuksen tulosten välillä voivat johtua osittain siitä, että aiemmassa tutkimuksessa traanin kerrostuneisuutta ei ole otettu huomioon, vaan traani on jaettu analyysia varten kahteen osaan (ylä- ja alatraaniin). Tällöin ilmoitetuissa ulko- ja sisätraanin koostumuksissa on mukana myös keskikerroksen rasvahappoja. Itämerennorppien tapauksessa eroja voi aiheuttaa myös se, että Käkelän ym. (1993) tutkimuksessa käyttämät itämerennorpat olivat yhtä yksilöä lukuun ottamatta peräisin Ahvenanmaan lähietäältä, eli suolaisemmilta merialueilta kuin tässä tutkimuksessa käytetyt yksilöt. Luultavasti tästä johtuen Käkelän ym. (1993) saamista tuloksissa itämerennorpan traanissa on runsaammin merien lajeille tyypillistä rasvahappoa 20:1n-9. Traanin rasvahappokoostumus voi siis kertoa ravinnon lisäksi myös eläimen saalistusalueesta.

Saimaannorppien maksan rasvahappokoostumus vastasi aiemmissä tutkimuksissa havaittuja koostumuksia (Käkelä & Hyvärinen 1998). Itämerennorpan maksan rasvahappokoostumus sen sijaan muistutti Käkelän ym. (1993) julkaisemia arvoja, mutta erosi hieman Käkelän ja Hyvärisen (1998) saamista arvoista. Hylkeiden maksassa on tyypillisesti runsaasti rasvahappoa 20:4n-6 (AA) ja muita n-6 PUFA:ja (Käkelä & Hyvärinen 1998), mikä oli havaittavissa myös tämän tutkimuksen tuloksista.

Tässä tutkimuksessa itämerennorpan ja saimaannorpan traanin runsaimpiin rasvahappoihin lukeutuvat 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 20:5n-3 ja 22:6n-3 olivat samat kuin on aiemmin raportoitu näillä alalajeilla (Käkelä ym. 1993; Strandberg ym. 2011), sekä monilla muilla varsinaisilla hyljelajeilla, kuten harmaahylkeellä (*Halichoerus grypus*) (Käkelä ym. 1993; Grahl-Nielsen ym. 2003; Walton &

Pomeroy 2003), grönlanninhylkeellä (*Pagophilus groenlandicus*) (Grahl-Nielsen ym. 2011; Tucker ym. 2009), kirjohylkeellä (*Phoca vitulina*) (Iverson ym. 1997b), etelänmerinorsulla (*Mirounga leonina*) (Best ym. 2003), jäämerennorpalla (*Phoca hispida hispida*) (Grahl-Nielsen ym. 2003, 2005; Strandberg ym. 2008) ja kuplahylkeellä (*Cystophora cristata*) (Tucker ym. 2009). Merissä elävien lajien traaneissa tyypillisesti runsaana esiintyvää rasvahappoa 20:1n-9 (Iverson ym. 1997b; Walton & Pomeroy 2003; Best ym. 2003; Tucker ym. 2009; Grahl-Nielsen ym. 2003, 2005, 2011; Strandberg ym. 2011) oli puolestaan odotetusti tämän tutkimuksen traaneissa vähäisesti.

7.2 Traanin kerrostuneisuus

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin ensimmäistä kertaa itämerennorpan traanin kerrostuneisuutta. Traanin eri osat erottuivat pääkomponenttianalyysissä molemmilla tutkituista alalajeista omiksi ryhmikseen, ja vertikaalisten rasvahappoprofiilien perusteella näytti siltä, että itämerennorpan traanista voitaisiin havaita samanlaiset toisistaan rasvahappokoostumukseltaan erottuvat ulko-, keski- ja sisäkerrokset kuin on aiemmin havaittu olevan saimaannorpan ja jäämerennorpan traaneissa (Strandberg ym. 2008, 2011). Cooman plotissa kuitenkin vain sisä- ja ulkotraanin rasvahappokoostumukset erosivat toisistaan merkitsevästi sekä itämerennorpalla että saimaannorpalla. Ulko- ja keskitraanin, sekä sisä- ja keskitraanin rasvahappokoostumuksissa ei ollut havaittavissa tilastollisesti merkitseviä eroja kummallakaan alalajilla, toisin kuin aiemmissa tutkimuksissa (Strandberg ym. 2008, 2011). Keskitraanin rasvahappokoostumus on siis jotain ulko- ja sisätraanin rasvahappokoostumuksen väliltä, mutta ei tarpeeksi erilainen erotukseen kummastakaan merkitsevästi. Ulko- ja sisätraanin on havaittu eroavan merkitsevästi rasvahappokoostumukseltaan myös baikalinhylkeellä ja jäämerennorpalla tehdyissä tutkimuksissa (Grahl-Nielsen ym. 2005).

Rasvahappokoostumusten eroista huolimatta traanin rasvahappojen kerrostumistapa oli samanlainen itämerennorpalla ja saimaannorpalla. Havaitut traanikerrosten paksuudet vastasivat aiemmin jäämerennorpalle ja saimaannorpalle raportoituja paksuuksia, eli ulkotraani oli noin 1,5 cm ja sisätraani enintään 1 cm paksu molemmilla alalajeilla (Strandberg ym. 2008, 2011).

Keskitraanin paksuus vaihteli myös näiden aiempien tutkimusten mukaisesti traanin kokonaispaksuudesta riippuen. Itämerennorpan traanin ja silakan, sekä itämerennorpan ja saimaannorpan traanin rasvahappokoostumusten välisten euklidisten etäisyyksien vertikaaliset profiilit tukevat traanin kerrostuneisuutta koskevia tuloksia, sillä myös niistä ilmenee, että eri kerrosten välillä on koostumuksellisia eroja.

Traanien vertikaaliset rasvahappoprofiilit olivat hyvin yksilöllisiä ja ne sisältävät tietoa yksilöiden ravitsemuksesta ja aineenvaihdunnasta. Tätä tietoa ei ole vielä kuitenkaan pystytty tulkitsemaan aiemmissä tutkimuksissa kovin syvällisesti. Tämä työ voi osaltaan auttaa ymmärtämään näitä hylkeen traanin rasvahappojen erilaisten kerrostumisten takana olevia ravitsemusfysiologisia ja ekofysiologisia syitä.

Erilaisten kerrosten olemassaolon ja niiden paksuuden huomioiminen on tärkeää kerättäessä traaninäytteitä esimerkiksi biomonitorointi- tai ravintotutkimuksia varten. On myös olennaista tiedostaa, että vaikka aiemmissä tutkimuksissa traanikerrosten paksuuksien on havaittu olevan samansuuruiset kuin tässä tutkimuksessa havaittiin, se ei tarkoita, että näin olisi kaikkien lajien kohdalla. Luultavasti traanikerrosten paksuudet vaihtelevat lajien ja eri maantieteellisillä alueilla elävien populaatioiden välillä, joten olisi tärkeää tutkia traanin kerrostuneisuutta erilaisilla merinisäksälajeilla ja eri populaatioilla.

7.3 Murtoveden ja makean veden alalajien kudosten rasvahappokoostumuksen erot

Itämerennorpan ja saimaannorpan traanit ja maksat erottuivat pääkomponenttianalyysissä toisistaan, ja Cooman plotin perusteella niiden rasvahappokoostumusten väliset erot olivat merkitseviä ($p < 0,05$). Myös aiemmissä hylkeillä tehdyissä tutkimuksissa eläinten lajin on havaittu vaikuttavan traaninäytteiden erottumiseen pääkomponenttianalyysissä (Grahl-Nielsen ym. 2005; Tucker ym. 2009). Alalajien välisten erojen taustalla on todennäköisesti sekä erilaisesta ravinnosta johtuvia että geneettisiä tekijöitä.

Euklidisia etäisyyksiä laskettaessa havaittiin, että itämerennorpan ja saimaannorpan väliset erot traanien koostumuksessa eivät ole yhtä suuria kaikilla

traanin syvyyksillä, vaan traanien uloimpien osien rasvahappokoostumukset muistuttivat toisiaan enemmän kuin traanien sisempien osien koostumukset. Samanlaisia tuloksia on saatu myös aiemmissa saimaannorpan ja jäämerennorpan välillä tehdyissä tutkimuksissa (Strandberg ym. 2011). Se, että erilaisista elinympäristöistä lähtöisin olevien alalajien ulkotraanit ovat koostumukseltaan samankaltaisia viittaa siihen, että ulkotraanin rasvahappokoostumusta säätelevät ennemminkin lämmöneristykseen ja -sääteelyyn liittyvät geneettiset tekijät kuin ravintoon liittyvät tekijät (Strandberg ym. 2011).

Itämerennorppayksilö N9-09 poikkesi vertikaaliselta rasvahappoprofiililtaan muista yksilöistä lajien traanien välisessä euklidisten etäisyyksien vertailussa. Kyseisen yksilön traanin ja saimaannorpan traanin välinen euklidinen etäisyys ei kasvanut ulkotraanista sisätraaniin päin, vaan etäisyys nousi ja laski vaihtelevasti traanin eri syvyyksillä. Tämä yksilö oli tutkimuksen itämerennorppien ainoa naaras, joten on mahdollista, että esimerkiksi imetyksestä johtuva erilainen rasvahappometabolia tai rasvahappojen mobilisaatio on aiheuttanut eroja sukupuolten välille. Yhden yksilön perusteella ei kuitenkaan voida tehdä minkäänlaisia johtopäätöksiä.

Saimaannorpan traanissa oli makean veden lajille tyypillisesti enemmän n-6 PUFA:ja, sekä n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhdeluku oli korkeampi kuin itämerennorpan traanissa (0,39 vs. 0,26). Aiemmissä tutkimuksissa (Käkelä & Hyvärinen 1998; Strandberg ym. 2011) saimaannorpan traanin n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteen on havaittu olevan 0,35 eli samaa suuruusluokkaa kuin tässä tutkimuksessa. Myös toisella makean veden norpan alalajilla, baikalinhylkeellä, n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteen on havaittu olevan samansuuruinen, eli 0,4 (Averina ym. 2012). Merissä elävillä hylkeillä traanin n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde on tyypillisesti huomattavasti makean veden lajeja alhaisempi (Käkelä ym. 1993, 1995), ja jäämerennorpalla sen on havaittu olevan 0,09 (Strandberg ym. 2008). Itämerennorpan arvo on kuitenkin huomattavasti tätä korkeampi, mitä voi selittää se, että murtovesielinympäristöstä johtuen sen ravinto sisältää huomattavia määriä n-6 PUFA:ja (Linko ym. 1985; Käkelä ym. 1993, 1995).

Maksojen n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteessa ei sen sijaan ollut suurta eroa alalajien välillä (itämerennorppa 3,5 vs. saimaannorppa 3,6), mikä on yllättävä tulos. Aiemmissä tutkimuksissa on nimittäin havaittu huomattavia eroja tässä suhteessa. Saimaannorpan maksan n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteeksi on aiemmin raportoitu 3,2 (Käkelä & Hyvärinen 1998), mikä on lähellä tässä tutkimuksessa saatua arvoa. Itämerennorpalla maksan n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteen on puolestaan aiemmin havaittu olevan 2,2 (Käkelä & Hyvärinen 1998), mutta tässä tutkimuksessa se oli huomattavasti korkeampi, eli 3,5. Mahdollisesti Käkelän & Hyvärisen (1998) tutkimuksen pienemmällä otoskoollla (n=6 vs. n=10) ja suuremmalla yksilöiden välisellä ikähajonnalla (2-23 vuotta vs. 5-13 vuotta) on vaikutusta tähän eroavaisuuteen, joskin nämä ovat tuskin ainoat syyt. On mahdollista, että esimerkiksi veden suolapitoisuuden vaihtelun seurauksena Perämeren ravintoketjuissa tapahtuneet muutokset ovat vaikuttaneet ensin ravintokohteiden ja sen seurauksena norpan kudosten rasvahappokoostumukseen.

Alalajien välillä oli eroja myös kudosten AA/EPA -suhdeluvussa, joka oli korkeampi saimaannorpalla kuin itämerennorpalla (traanissa 0,6 vs. 0,2 ja maksassa 13,4 vs. 6,2). Nämä tulokset ovat yhteneviä aiempien havaintojen (Käkelä & Hyvärinen 1996, 1998) kanssa molempien alalajien traanin ja saimaannorpan maksan osalta. Itämerennorpan maksan saama arvo on kuitenkin korkeampi kuin on aiemmin raportoitu (6,2 vs. 3,8), mikä johtuu siitä, että tässä tutkimuksessa itämerennorpan maksoissa havaittu keskimääräinen AA:n taso on huomattavasti korkeampi kuin aiemmissä tutkimuksissa (23,3 vs. 14,3). Tämä puolestaan viittaa siihen, että tämän tutkimuksen itämerennorppien ravinto on sisältänyt enemmän AA:a tai sen esiastetta, rasvahappoa 18:2n-6.

Maksan lipidien n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhde ja erityisesti AA/EPA-suhde (20:4n-6/20:5n-3) on biologisesti tärkeää. Näiden rasvahappojen suhteiden tiedetään vaikuttavan eri eikosanoidiryhmien tuotannon tasapainoon (esim. Hwang 1992). Eikosanoidit ovat rasvahapoista tuotettuja paikallisia kudoshormoneja, joilla on laajoja fysiologisia vaikutuksia esimerkiksi verenkiertoelimistössä ja immuunipuolustuksessa (Bruckner 1992; Boissonneault & Hayek 1992). Saimaannorpan ja itämerennorpan kudoksien AA- ja EPA-tasoissa esiintyvien

erojen vuoksi on mahdollista, että näiden alalajien immuunipuolustuksessa ja alttiudessa rasvaliukoisille ympäristömyrkyille on eroja (Käkelä 1996).

20- ja 22-hiilisten MUFA:jen tasot olivat molemmilla alalajeilla alhaisia, mikä on tyypillistä makean veden ja murtoveden hylkeille (Käkelä ym. 1993, 1995; Käkelä & Hyvärinen 1996; Grahl-Nielsen ym. 2005; Strandberg ym. 2011). Itämerennorpalla tasot olivat kuitenkin hieman korkeammat kuin saimaannorpalla, mikä johtuu luultavasti erilaisista elinympäristöistä. Merien ravintoketjuissa 20- ja 22-hiiliset MUFA:t ovat peräisin äyriäisten vahaestereistä (Saito & Kotani 2000).

7.4 Maksan ja plasman lipidikoostumus

Hylkeiden maksan tai plasman lipidikoostumuksesta ei juuri ole olemassa julkaistuja tuloksia. Eräässä munkkihylkeellä (*Monachus monachus*) tehdyssä tutkimuksessa (Henderson ym. 1994) maksan TAG:n ja PL:en suhteen havaittiin olevan 0,19, eli samaa suuruusluokkaa kuin tässä tutkimuksessa (itämerennorpan maksa 0,19 ja saimaannorpan maksa 0,12). Kyseisen tutkimuksen tulokset ovat kuitenkin saatu tutkimalla vain yhden yksilön kudoksia, joten niiden perusteella ei voida tehdä paljoakaan johtopäätöksiä.

Odotusten vastaisesti iällä ei havaittu olevan tässä tutkimuksessa vaikutusta maksaan varastoituneen TAG:n määrään kummallakaan tarkastelun kohteena olleista alalajeista. Ilmeisesti maksan varastorasvan määrässä tapahtuu nopeita muutoksia viimeaikaisen ravitsemustilanteen mukaan.

Itämerennorpan kudoksilla tehdyissä regressioanalyseissa havaittiin, että tiettyjen rasvahappojen tasot ovat merkitsevästi korkeampia maksan tai plasman TAG:n suhteellisen määrän ollessa suuri. Näitä tuloksia on kuitenkin vaikea tulkita yksiselitteisesti. Lukuunottamatta rasvahappoja 16:1n-7 ja 18:1n-9+11, muut kyseisistä rasvahapoista ovat rakenteensa perusteella ravintoperäisiä, eivätkä eläinten oman rasvahapposynteesin tuottamia.

7.5 Ravinnon vaikutus traanin rasvahappokoostumukseen

Tässä tutkimuksessa havaitut traanien n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteet (saimaannorpalla 0,39 ja itämerennorpalla 0,26), sekä AA/EPA-suhteet (saimaannorpalla 0,56 ja itämerennorpalla 0,18) vastasivat hyvin itämerennorpan

ja saimaannorpan potentiaalisille saalislajeille raportoituja arvoja. n-6 PUFA/n-3 PUFA-suhteen on nimittäin havaittu olevan sekä Saimaan muikuissa että Itämeren silakoissa noin 0,3 (Linko ym. 1985; Muje ym. 1989). AA/EPA-suhde on puolestaan näiden tutkimusten mukaan muikkujen lihaksissa 0,5-0,7 (Muje ym. 1989) ja silakoissa 0,1 (Linko ym. 1985).

Silakan ja itämerennorpan traanin rasvahappokoostumusten välisten euklidisten etäisyyksien perusteella havaittiin, että silakan ja traanin väliset koostumukselliset erot olivat suurimpia ulkotraanissa ja pienimpiä sisätraanissa. Samanlaisia tuloksia on saatu myös aiemmissa tutkimuksissa, joissa on tarkasteltu saimaannorpan traanin ja sen potentiaalisten saaliskalojen rasvahappokoostumusten euklidisia etäisyyksiä (Strandberg ym. 2011). Tämä tukee oletusta, että ravinnon rasvahapot varastoituvat ensisijaisesti sisätraaniin ja, että traanin sisäosat voivat kertoa eläinten ravinnosta ulko-osia enemmän. Yksilöt N2-09 ja N6-09 poikkesivat euklidisten etäisyyksien profiileiltaan muista yksilöistä, sillä niillä silakan rasvahappokoostumusta muistuttikin sisätraanin sijaan eniten keskitraania. Tämä voisi viitata siihen, että näiden yksilöiden viimeaikaisin ravinto oli sisältänyt silakan lisäksi tai sijasta joitain muita ravintokohteita.

Regressioanalyysin tulosten perusteella havaittiin, että itämerennorpan plasman ja maksan rasvahappojen tasot selittivät sisätraanin rasvahappojen tasoja tiettyjen rasvahappojen kohdalla. Nämä rasvahapot olivat pääasiassa ravintoperäisiä, hiiliketjultaan parittomia ja haarautuneita, tai n-3 ja n-6 PUFA:ja. Kyseisistä rasvahapoista 14:0 ja 18:2n-6 esiintyvät suurina pitoisuuksina pelagisessa kasviplanktonissa ja niiden on todettu siirtyvän ravintoketjussa edelleen pelagisiin kaloihin (Ackman ym. 1968; Ackman 1999; Napolitano 1999; Budge ym. 2002; Käkelä ym. 2005). Rasvahappoja 17:0 *iso*, 17:0 *anteiso*, 17:1n-8, 20:4n-6 ja 22:4n-6 on puolestaan havaittu olevan runsaammin vesistöjen pohjalla elävissä kaloissa kuin pelagisissa kaloissa (Käkelä ym. 2005). Haarautuneet ja parittomat rasvahapot, kuten 17:0 *iso* ja 17:0 *anteiso*, ovat yleisiä vesistöjen pohjasedimentin mikrobeissa (Stoeck ym. 2002). Rasvahappoa 20:4n-6 on yleensä runsaasti detritusta syövässä pohjakaloissa ja ravintoketjun huipulla olevissa petokaloissa (esim. Kuusipalo & Käkelä 2000; Budge ym. 2002).

Tässä tutkimuksessa plasman ja sisätraanin välillä merkitsevästi korreloivista rasvahapoista osa viittasi pohjakaloista koostuvaan ravintoon ja osa pelagiseen kalaravintoon. Enemmistö näistä rasvahapoista oli kuitenkin pohjaeliöperäiseen ravintoon viittaavia rasvahappoja.

Tämän itämerennorpan kudoksilla tehdyn tutkimuksen tulokset siis osoittivat ensimmäistä kertaa, että tiettyjen ravinnon mukana saatujen rasvahappojen tasot heijastuvat plasmasta ja maksasta sisätraaniin merkitsevästi. Nämä tulokset vahvistavat oletuksia, että viimeaikaisella ravinnolla on vaikutusta etenkin sisätraanin rasvahappokoostumukseen ja, että sen perusteella voidaan saada tietoa eläimen ravinnosta.

7.6 Virhelähteiden arviointi

Jokainen kaksoissidos lisää rasvahapon hapettumisherkkyyttä kaksin- tai kolmikertaisesti, joten varsinkin monityydyttymättömät rasvahapot hapettuvat ilmassa nopeasti (Christie & Han 2010). On siis mahdollista, että tässä tutkimuksessa käytettyjen kudosten rasvahapoissa on tapahtunut jonkin asteista hapettumista näytteiden säilytyksen tai valmistuksen aikana. Näytteiden käsittely ja valmistus pyrittiin tekemään kuitenkin mahdollisimman huolellisesti tällaisten ongelmien minimoimiseksi. Muun muassa välineet puhdistettiin huolellisesti ja käytettyjen liuottimien pH ja peroksidien esiintyminen tarkistettiin aina ennen töiden aloittamista. Hapettumisen estämiseksi näytteiden *trans*-esteröinti ja mahdollisuuksien mukaan myös muut työvaiheet tehtiin typpi-atmosfäärissä.

Jotkut tutkimuksessa käytetyistä saimaannorpista olivat ehtineet olla hukkuneina jo jonkin aikaa ennen niiden löytämistä ja kudoksenäytteiden keräämistä. Voisi siis olla mahdollista, että pilaantumisprosessi on vaikuttanut kudosten rasvahappokoostumukseen ja rasvahapot ovat alkaneet hapettua. Lipidiluokka-analyyseissä saimaannorpan maksoissa havaitut poikkeuksellisen korkeat FFA:jen tasot viittaavatkin siihen, että jonkin asteista hajoamista, mahdollisesti entsyymaattista hydrolyysiä, on ehtinyt tapahtua. Hylkeiden traaninäytteissä säilytyksen aikana tapahtuvia rasvahappokoostumuksen muutoksia tutkittaessa on kuitenkin havaittu, että traanin rasvahappokoostumus pysyy muuttumattomana jopa näytteen osittain pilaantuessa (Lind ym. 2012). Kyseisessä tutkimuksessa traaninäytteiden

rasvahappokoostumuksessa ei havaittu merkittäviä muutoksia, vaikka niitä säilytettiin 6 kuukauden ajan +2 °C:ssa tai 33 kuukauden ajan -20 °C:ssa. Voimme siis olettaa, että pilaantuminen tai pitkä säilytysaika eivät ole aiheuttaneet merkittäviä muutoksia tässä tutkimuksessa käytettyjen kudosten rasvahappokoostumuksessa.

Itämerennorpan ja saimaannorpan traaninäytteet oli otettu eri puolilta kehoa (itämerennorpalla selkäpuolelta ja saimaannorpalla vatsapuolelta), joten näytteiden vertailukelpoisuutta voitaisiin epäillä. Jäämerennorpalla tehty tutkimus kuitenkin osoittaa, että saman yksilön vatsa- ja selkäpuolelta otettujen traaninäytteiden vertikaaliset rasvahappoprofiilit ja rasvahappokoostumukset ovat äärimmäisen yhteneviä (Strandberg ym. 2008). Myös useilla muilla varsinaisilla hyljelajeilla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet traanin lipidien mobilisaation ja traanin rasvahappokoostumuksen olevan samanlainen eri puolilla kehoa (Nordy & Blix 1985; Slip ym. 1992; Beck & Smith 1995; Cooper 2004). Tämän vuoksi voidaan olettaa, että traaninäytteen ottopaikalla ei ollut vaikutusta sen rasvahappokoostumukseen.

Tutkimuksen luotettavuutta vähentää saimaannorpan tapauksessa se, että aikuisten yksilöiden traaneja oli saatavilla vain neljä kappaletta, mistä johtuen otoskoko jäi pieneksi.

7.7 Yhteenvedo

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin itämerennorpan traanin kerrostuneisuutta ensimmäistä kertaa. Traanin havaittiin olevan rakenteeltaan kerrostunut, kuten on havaittu myös aiemmin tutkituilla kahdella norpan alalajilla. Aiemmistä tutkimustuloksista poiketen keskitraani ei kuitenkaan eronnut rasvahappokoostumukseltaan merkitsevästi muista traanikerroksista. Sisä- ja ulkotraanin väliset rasvahappokoostumuksen erot olivat sen sijaan merkitseviä. Itämerennorpan kudosten rasvahappokoostumus erosi sen sukulaisalalajin, saimaannorpan, kudosten rasvahappokoostumuksista. Näiden alalajien ulkotraanin kuitenkin muistuttivat toisiaan rasvahappokoostumukseltaan sisätraaneja enemmän, mikä viittaa siihen, että ulkotraanin koostumusta säätelevät samanlaiset lämmönsäätelyyn liittyvät geneettiset tekijät. Rasvahappokoostumusten eroista

huolimatta traanin rasvahappojen kerrostumistapa oli kuitenkin samanlainen molemmilla tutkituista alalajeista.

Traanien vertikaaliset rasvahappoprofiilit olivat hyvin yksilöllisiä, ja ne antavat tietoa kunkin eläimen ravinnosta ja aineenvaihdunnasta. Näitä profiileja ei ole vielä kuitenkaan pystytty tulkitsemaan aiemmissä tutkimuksissa kovin syvästi. Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin ensimmäistä kertaa kudosten välisten rasvahappotasojen riippuvuutta, ja havaittiin, että tietyt maksan ja plasman ravintoperäisten rasvahappojen tasot selittävät vastaavia sisätraanin rasvahappotasoja. Viimeaikaisella ravinnolla on siis näiden tulosten mukaan vaikutusta sisätraanin rasvahappokoostumukseen, mutta tietyt sen sisältämistä rasvahapoista heijastelevat ravinnon rasvahappokoostumusta toisia paremmin. Nämä tulokset voivat osaltaan auttaa selventämään traanin rasvahappoprofiilin tulkintaa tulevaisuudessa. Saatuja tuloksia voidaan hyödyntää myös hylkeiden ravintokohteiden arvioinnissa käytettävien näytteenottoprotokollien suunnitteluun ja kehittämiseen.

8 Kiitokset

Haluaisin kiittää ensinnäkin työni ohjaajaa, Reijo Käkelää asiantuntevasta, kärsivällisestä ja kannustavasta ohjauksesta. Kiitän myös Rasmus Karlssonia hyvästä käytännön perehdytyksestä laboratoriotöihin. Tämän lisäksi osoitan kiitokseni saimaannorpan kudokset tarjonneelle Metsähallitukselle, itämerennorpan kudokset tarjonneelle Riista- ja kalataloudentutkimuslaitokselle, sekä työtä rahoittaneelle EU:n Central Baltic 2007–2013 Interreg IV A-ohjelmalle ja Varsinais-Suomen ELY-keskukselle. Lopuksi vielä kiitokset työni tukena olleelle perheelleni, ja tietysti inspiraation lähteenä olleille norpille.

9 Lähteet

Ackman RG (1967). Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comp Biochem Physiol* **22**, 907-922.

Ackman RG (1980). Fish lipids, Part 1. Teoksessa *Advances in fish science and technology*, toim. Connell JJ, s. 86-103. Fishing News Books Ltd, Surrey.

Ackman RG (1992). Application of gas-liquid chromatography to lipid separation and analysis: qualitative and quantitative analysis. Teoksessa *Fatty acids in foods and their health implications*, toim. Chow CK, s. 47-63. Marcel Dekker, New York.

Ackman RG (1994). Animal and marine lipids. Teoksessa *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, toim. Kamel BS & Kakuda Y, s. 292-328. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Ackman RG (1999). Comparison of lipids in marine and freshwater organisms. Teoksessa *Lipids in freshwater ecosystems*, toim. Arts MT & Wainman BC, s. 263-298. Springer-Verlag, New York.

Ackman RG & Eaton CA (1966). Lipids of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) from North Atlantic waters. III. Occurrence of eicosanoid and docosenoic fatty acids in the zooplankton *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars) and their effect on whale oil composition. *Can J Biochem* **44**, 1561-1566.

Ackman RG, Ratnayake WM & Olsson BM (1988). The basic fatty-acid composition of Atlantic fish oils – potential similarities useful for enrichment of poly-unsaturated fatty-acids by urea complexation. *Journal of the American Oil Chemists Society* **65**, 136-138.

Ackman RG, Tocher CS & McLachlan J (1968). Marine phytoplankter fatty acids. *J Fish Res Board Can* **25**, 1603-1620.

Aguilar A & Borrell A (1990). Patterns of lipid-content and stratification in the blubber of fin whales (*Balaenoptera physalus*). *J Mammal* **71**, 544-554.

Allen WV (1976). Biochemical aspects of lipid storage and utilization in animals. *American Zoologist* **16**, 631-647.

Andersin AB, Lassig J, Parkonen L & Sandler H (1978). The decline of macrofauna in the deeper parts of the Baltic proper and the Gulf of Finland. *Kieler Meeresforsch Sonderh* **4**, 23-52.

Anon. (2011). Osoitteessa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=117975> (23.8.2012).

Anon. (2012a). Osoitteessa: <http://www.rktl.fi/riista/hylkeet/ecoseal/> (7.11.2012).

Anon. (2012b). Osoitteessa: <http://www.metsa.fi/sivustot/metsa/fi/luonnonsuojelu/lajitjaluontotyypit/uhanalaisetelaimet/Saimaannorppa/Sivut/Saimaannorppa.aspx> (7.11.2012).

Auvinen H, Jurvelius J, Koskela J & Sipilä T (2005). Comparative use of vendace by humans and Saimaa ringed seal in Lake Pihlajavesi, Finland. *Biological Conservation* **125**, 381-389.

Averina E, Strandberg U, Radnaeva L, Pintaeva E, Grahl-Nielsen O & Käkälä R (2012). Vertical stratification of fatty acids and triacylglycerols in the blubber of the Baikal seal: adults, pups and foetuses. Unpublished article.

Beck CA, Iverson SJ & Bowen WD (2005). Blubber fatty acids of gray seals reveal sex differences in the diet of a size-dimorphic marine carnivore. *Can J Zool* **83**, 377-388.

Beck CA, Iverson SJ, Bowen WD & Blanchard W (2007). Sex differences in grey seal diet reflect seasonal variation in foraging behavior and reproductive expenditure: evidence from quantitative fatty acid signature analysis. *Journal of Animal Ecology* **76**, 490-502.

Beck GG & Smith TG (1995). Distribution of blubber in the northwest Atlantic harp seal, *Phoca groenlandica*. *Can J Zool* **73**, 1991-1998.

Bergman A & Olsson M (1986). Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finnish Game Res* **44**, 47-62.

Best NJ, Bradshaw CJA, Hindell MA & Nichols PD (2003). Vertical stratification of fatty acids in the blubber of southern elephant seals (*Mirounga leonina*): implications for diet analysis. *Comp Biochem Physiol B* **134**, 253-263.

Bignert A, Olsson M, Persson W, Jensen S, Zakrisson S, Litzén K, Eriksson U, Häggberg L & Alsberg T (1998). Temporal trends of organochlorines in Northern Europe, 1967-1995. Relation to global fractionation, leakage from sediments and international measures. *Environ Pollut* **99**, 177-198.

Boissonneault GA & Hayek MG (1992). Dietary fat, immunity, and inflammatory disease. Teoksessa *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, toim. Chow CK, s. 707-734. Marcel Dekker, New York.

Borgström B (1977). Digestion and absorption of lipids. *Int Rev Physiol* **12**, 305-323.

Bowen WD, Read AJ & Estes JA (2002). Feeding ecology. Teoksessa *Marine mammal biology: an evolutionary approach*, toim. Hoelzel AR. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Bradshaw CJA, Hindell MA, Best NJ, Phillips KL, Wilson G & Nichols PD (2003). You are what you eat: describing the foraging ecology of southern elephant seals (*Mirounga leonina*) using blubber fatty acids. *P Roy Soc Lond B* **270**, 1283-1292.

Bremer J & Norum KR (1982). Metabolism of very long-chain monounsaturated fatty-acids (22:1) and the adaptation to their presence in the diet. *Journal of lipid research* **23**, 243-256.

Bruckner G (1992). Biological effects of polyunsaturated fatty acids. Teoksessa *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, toim. Chow CK, s. 631-646. Marcel Dekker, New York.

Budge SM, Cooper MH & Iverson SJ (2004). Demonstration of the deposition and modification of dietary fatty acids in pinniped blubber using radiolabelled precursors. *Physiol Biochem Zool* **77**, 682-687.

Budge SM, Iverson SJ, Bowen WD & Ackman RG (2002). Among- and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can J Fish Aquat Sci* **59**, 886-898.

Budge SM, Iverson SJ & Koopman HN (2006). Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: A primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science* **22**, 759-801.

Campbell NA, Reece JB, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV & Jackson RB (2008). Lipids are a diverse group of hydrophobic molecules. Teoksessa *Biology*, 8th edn, toim. Wilbur B, s. 74-77. Benjamin Cummings, San Francisco, CA.

Castellini MA & Rea LD (1992). The biochemistry of natural fasting at its limits. *Experientia* **48**, 575-582.

Christie WW (1989). *Gas Chromatography and Lipids*. Oily Press, Dundee.

Christie WW (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. Teoksessa *Advances in lipid methodology—Two*, toim. Christie WW, s. 69–111. Oily Press, Dundee.

Christie WW & Han X (2010). *LIPID ANALYSIS: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, 4th edn. The Oily Press, Bridgwater, Somerset, UK.

Cockcroft VG & Ross GJB (1990). Comments on Australian bottlenose dolphins and the taxonomic status of *Tursiops aduncus* (Ehrenberg, 1832). Teoksessa *The bottlenose dolphin*, toim. Leatherwood S & Reeves RR, s. 101-128. Academic Press, San Diego.

Colby RH, Mattacks CA & Pond CM (1993). The gross-anatomy, cellular structure, and fatty-acid composition of adipose-tissue in captive polar bears (*Ursus maritimus*). *Zoo Biology* **12**, 267-275.

Cook HW (1985). Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. Teoksessa *Biochemistry of lipids and membranes*, toim. Vance DE & Vance JE, s. 181-211. The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc, Menlo Park, CA.

Cooper MH (2004). Fatty acid metabolism in marine carnivores: implications for quantitative estimation of predator diets. *Ph.D. thesis*. Dalhousie University, Halifax, N.S.

Cooper MH, Iverson SJ & Heras H (2005). Dynamics of blood chylomicron fattyacids in a marine carnivore: implications for lipid metabolism and quantitative estimation of predator diets. *J Comp Physiol B* **175**, 133-145.

Durant S & Harwood J (1986). The effects of hunting on ringed seals (*Phoca hispida*) in the Baltic. *ICES C M* **10**.

Elmgren R (2001). Understanding human impact on the Baltic ecosystem: Changing views in recent decades. *Ambio* **30**, 222-231.

Elmgren R & Hill C (1997). Ecosystem function at low biodiversity - the Baltic example. Teoksessa *Marine Biodiversity: Patterns and Processes*, toim. Ormond RFG, Gage J and Angel M, s. 319-336. Cambridge University Press.

Falk-Petersen S, Haug T, Nilssen KT, Wold A & Dahl TM (2004). Lipids and trophic linkages in harp seal (*Phoca groenlandica*) from the eastern Barents Sea. *Polar Research*, **23**, 43-50.

Field CJ & Clandinin MT (1984). Modulation of adipose-tissue fat composition by diet: a review. *Nutrition Research* **4**, 743-755.

Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497-509.

Forsten A & Ahonen P (1975). The subfossil seals of Finland and their relation to the history of the Baltic Sea. *Boreas* **4**, 143-155.

Fraser AJ, Sargent JR, Gamble JC & Seaton DD (1989). Formation and transfer of fatty-acids in an enclosed marine food chain comprising phytoplankton, zooplankton and herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Marine Chemistry* **27**, 1-18.

Fredheim B, Holen S, Ugland KI & Grahl-Nielsen O (1995). Fatty acid composition in blubber, heart and brain from phocid seals. Teoksessa *Whales, Seals, Fish and Man*, toim. Blix AS, Walløe L & Ultang Ø, s. 153-168. Elsevier, Amsterdam.

Gilmour I, Johnston MA, Pillinger CT, Pond CM, Mattacks CA & Prestrud P (1995). The carbon isotopic composition of individual fatty acids as indicators of dietary history in arctic foxes on Svalbard. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **349**, 135-142.

Grahl-Nielsen O, Andersen M, Derocher AE, Lydersen C, Wiig O & Kovacs KM (2003). Fatty acid composition of the adipose tissue of polar bears and of their prey: ringed seals, bearded seals and harp seals. *Marine Ecology Progress Series* **265**, 275-282.

Grahl-Nielsen O, Halvorsen AK, Bodoev N, Averina L, Radnaeva L, Pronin N, Käkälä R, Petrov E (2005). Fatty acid composition of blubber of the Baikal seal *Phoca sibirica* and its marine relative, the ringed seal *P. hispida*. *Mar Ecol Prog Ser* **305**, 261-274.

Grahl-Nielsen O, Haug T, Lindstrøm U & Nilsse, KT (2011). Fatty acids in harp seal blubber do not necessarily reflect their diet. *Mar Ecol Prog Ser* **426**, 263-276.

Hamosh M & Hamosh P (1985). Lipoproteins and lipoprotein lipase. Teoksessa *Handbook of physiology-the respiratory system 1*, toim. Fishman AP & Fisher AB, s. 387-418. The American Physiological Society, Washington D.C.

Hart JS & Irving L (1959). The energetics of harbor seals in air and in water with special consideration of seasonal changes. *Can J Zool* **37**, 447-457.

Harwood J (1987). Competition between seals and fisheries. *Science progress* **71**, 429-437.

Harwood J & Croxall JP (1988). The assessment of competition between seals and commercial fisheries in the North Sea and the Antarctic. *Marine Mammal Science* **4**, 13-33.

Helander B (2000). Havsörn och gråsäl – fortsatt ökande bestånd. Teoksessa *Östersjö 99 – Swedish Marine Monitoring in the Baltic Proper August 2000*, s. 37-40. Stockholm.

Helander B, Olsson M & Reutergårdh L (1988). Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs in the relationships to breeding success in white tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Holarctic Ecol* **5**, 349-366.

Helle E (1980). Aerial census of ringed seals *Pusa hispida* basking on the ice of the Bothnian Bay, Baltic. *Holarctic Ecology* **3**, 183-189.

Helle E (1981). Reproductive trends and occurrence of organochlorines and heavy metals in the Baltic seal population. *ICES C M*, **37**.

Helle E (1983). *Hylkeiden elämää*. Kirjayhtymä, Vaasa.

Henderson RJ, Kalogeropoulos N & Alexis MN (1994). The Lipid Composition of Selected Tissues from a Mediterranean Monk Seal, *Monachus monachus*. *Lipids* **29**, 577-582.

Hilditch TP & Williams PN (1964). *The chemical constitution of natural fats*, 4th edn. Chapman & Hall, London.

Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2008). Lipids are required for all membranes and are the principal storage compounds of animals. Teoksessa *Animal Physiology*, 2nd edn, s.114-115. Sinauer Associates, MA USA.

Hooker SK, Iverson SJ, Ostrom P & Smith SC (2001). Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Can J Zool* **79**, 1442-1454.

Hwang D (1992). Dietary fatty acids and eicosanoids. Teoksessa *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, toim. Chow CK, s. 545–557. Marcel Dekker, New York.

Hyvärinen H, Hämäläinen E & Kunnasranta M (1995). Diving behavior of the Saimaa ringed seal (*Phoca hispida saimensis*). *Marine Mammal Science* **11**, 324-334.

Hyvärinen H & Nieminen M (1990). Differentiation of the ringed seal in the Baltic Sea, Lake Ladoga and Lake Saimaa. *Finnish Game Research* **47**, 21-27.

Hyvärinen H, Sipilä T, Kunnasranta M & Koskela J (1998). Mercury pollution and the Saimaa ringed seal (*Phoca hispida saimensis*). *Marine Pollution Bulletin* **36**, 76-81.

Härkönen T & Lunneryd SG (1992). Estimating Abundance of Ringed Seals in the Bothnian Bay. *Ambio* **21**, 497-503.

Irving L & Hart JS (1957). The metabolism and insulation of seals as bare-skinned mammals in cold water. *Can J Zool* **35**, 293-495.

Iverson SJ (1993). Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: can milk fatty acids predict diet?. *Symp Zool Soc Lond* **66**, 263-291.

Iverson SJ, Arnould JPY & Boyd IL (1997a). Milk fatty acid signatures indicate both major and minor shifts in the diet of lactating Antarctic fur seals. *Can J Zool* **75**, 188-197.

Iverson SJ, Field C, Don Bowen W & Blanchard W (2004). Quantitative Fatty Acid Signature Analysis: A New Method of Estimating Predator Diets. *Ecol Monogr* **74**, 211-235.

Iverson SJ, Frost KJ & Lowry LF (1997b). Fatty acid signatures reveal fine scale structure of foraging distribution of harbor seals and their prey in PrinceWilliam Sound, Alaska. *Mar Ecol Prog Ser* **151**, 255-271.

Iverson SJ, Oftedal OT, Bowen WD, Boness DJ & Sampugna J (1995). Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J Comp Physiol B* **165**, 1-12.

Iverson SJ, Springer AM & Kitaysky AS (2007). Seabirds as indicators of food web structure and ecosystem variability: qualitative and quantitative diet analyses using fatty acids. *Mar Ecol Prog Ser* **352**, 235-244.

Jackson MJM (1974). Transport of short chain fatty acids. *Biomembranes* **4B**, 673-709.

Jansson BO (1997). The Baltic Sea: Current and Future Status and Impact of Agriculture. *Ambio* **26**, 424-431.

Jensen S, Johnels AG, Olsson M & Otterlind G (1969). DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature* **224**, 247-250.

Jobling M (1987). Marine mammal faecal samples as indicators of prey importance – a source of error in bioenergetics studies. *Sarsia* **72**, s. 255-260.

Jobling M & Breiby A (1986). The use and abuse of fish otoliths in studies of feeding habits of marine piscivores. *Sarsia* **71**, 265-274.

Karjalainen L & Ruuskanen A (1998). Korrelaatio. Teoksessa *Tilastomatemiikka*, 6. painos, toim Karjalainen L & Ruuskanen A, s. 79–82. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä.

Kirsch PE, Iverson SJ, Bowen WD, Kerr SR & Ackman RG (1998). Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 1378-1386.

Kirsch PE, Iverson SJ & Bowen WD (2000). Effect of a Low-Fat Diet on Body Composition and Blubber Fatty Acids of Captive Juvenile Harp Seals (*Phoca groenlandica*). *Physiol Biochem Zool* **73**, 45-59.

Knox GA (1994). *The Biology of the Southern Ocean*. Cambridge University Press, New York.

Koopman HN (2007). Phylogenetic, ecological, and ontogenetic factors influencing the biochemical structure of the blubber of odontocetes. *Marine Biology* **151**, 277-291.

Koopman HN, Iverson SJ & Gaskin DE (1996). Stratification and age-related differences in blubber fatty acids of the male harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Comp Physiol B* **165**, 628-639.

Koopman HN, Pabst DA, McLellan WA, Dillaman RM & Read AJ (2002). Changes in Blubber Distribution and Morphology Associated with Starvation in the Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*): Evidence for Regional Differences in Blubber Structure and Function. *Physiol Biochem Zool* **75**, 498-512.

Kostamo A, Medvedev N, Pellinen J, Hyvärinen H & Kukkonen JV (2000). Analysis of organochlorine compounds and extractable organic halogen in three subspecies of ringed seal from Northeast Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 848-854.

Kunnasranta M (2010). Merihylkeet vuonna 2010. *Riista- ja kalatalous – Selvityksiä* **21**, 21-23.

Kunnasranta M, Hyvärinen H, Sipilä T & Koskela JT (1999). The diet of the Saimaa ringed seal *Phoca hispida saimensis*. *Acta Theriologica* **44**, 443-450.

Kurle CM (2002). Stable-isotope ratios of blood components from captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their diet: applications for studying the foraging ecology of wild otariids. *Can J Zool* **80**, 902-909.

Kuusipalo L & Käkälä R (2000). Muscle fatty acids as indicators of niche and habitat in Malawian cichlids. *Limnol Oceanogr* **45**, 996-1000.

Kvalheim OM & Karstang TV (1987). A general-purpose program for multivariate data-analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 235-237.

Käkälä A, Furness RW, Kelly A, Strandberg U, Waldron S & Käkälä R (2007). Fatty acid signatures and stable isotopes as dietary indicators in North Sea seabirds. *Mar Ecol Prog Ser* **342**, 291-301.

Käkälä R (1996). Fatty acid compositions in subspecies of ringed seal (*Phoca hispida*) and several semiaquatic mammals: site specific and dietary differences. *Ph.D. thesis*. University of Joensuu, Joensuu.

Käkälä R, Ackman RG, Hyvärinen H (1995). Very long chain polyunsaturated fatty acids in the blubber of ringed seals (*Phoca hispida* sp.) from Lake Saimaa, Lake Ladoga, the Baltic Sea and Spitsbergen. *Lipids* **30**, 725-731.

Käkälä R & Hyvärinen H (1996). Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comp Biochem Physiol B* **115**, 501-514.

Käkälä R & Hyvärinen H (1998). Composition of polyunsaturated fatty acids in the liver of freshwater and marine ringed seals (*Phoca hispida* ssp.) differs largely due to the diet of the seals. *Comp Biochem Physiol B* **120**, 231-237.

Käkelä R, Hyvärinen H & Vainiotalo P (1993). Fatty acid composition in liver and blubber of the Saimaa ringed seal (*Phoca hispida saimensis*) compared with that of the ringed seal (*Phoca hispida botnica*) and grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic. *Comp Biochem Physiol B* **105**, 553-565.

Käkelä R, Käkelä A, Kahle S, Becker PH, Kelly A & Furness RW (2005). Fatty acid signatures in plasma of captive herring gulls as indicators of demersal or pelagic fish diet. *Mar Ecol Prog Ser* **293**, 191-200.

Larsson U, Elmgren R & Wulf F (1985). Eutrophication and the Baltic Sea: causes and consequences. *Ambio* **14**, 9-14.

Laws RM (1993). *Antarctic seals: research methods and techniques*. Cambridge University Press, New York.

Lind Y, Bäcklin BM, Lundström K, Budge SM, Walton M & Karlsson O (2012). Stability of fatty acid composition in seal blubber during long-term storage. *Mar Ecol Prog Ser* **461**, 283-291.

Linko RR, Kaitaranta JK, Vuorela R (1985). Comparison of the fatty acids in Baltic herring and available plankton feed. *Comp Biochem Physiol* **82B**, 699-705.

Logan MS, Iverson SJ, Ruzzante DE, Walde SJ, Macchi PJ, Alonso MF & Cussac VE (2000). Long term diet differences between morphs in trophically polymorphic *Percichthys trucha* (*Pisces* : *Percichthyidae*) populations from the southern Andes. *Biological Journal of the Linnean Society* **69**, 599-616.

Müller-Wille LL (1969). Biometrical comparison of four populations of *Phoca hispida* Schreb. in the Baltic and White Seas and lakes Ladoga and Saimaa. *Commentationes biologicae. Societas Scientiarum Fennica* **31**, 1-12.

Muje P, Ågren JJ, Lindqvist OV, Hänninen O (1989). Fatty acid composition of vendace (*Coregonus albula* L.) muscle and its plankton feed. *Comp Biochem Physiol* **92B**, 75-79.

- Napolitano GE (1999). Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. Teoksessa *Lipids in freshwater ecosystems*, toim. Arts MT & Wainman B, s. 21-44. Springer-Verlag, New York.
- Nordy ES, Blix AS (1985). Energy sources in fasting grey seal pups evaluated with computed tomography. *Am J Physiol* **249**, R471-R476.
- Ntambi JM, Miyazaki MM & Dobrzyn AM (2004). Regulation of Stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids* **39**, 1061-1065.
- Nyman M, Koistinen J, Fant ML, Vartiainen T & Helle E (2002). Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environmental Pollution* **119**, 399-412.
- Olsen E & Grahl-Nielsen O. (2003). Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Marine Biology* **142**, 13-24.
- Olsson M, Karlsson B & Ahnland E (1992). Seals and seal protection: A presentation of a Swedish research project. *Ambio* **21**, 494-496.
- Paradis M & Ackman RG (1976). Localization of marine source of odd chain-length fatty acids. I. The amphipod *Pontoporeia femorata* (Kröeyer). *Lipids* **11**, 863-870.
- Pascal JC & Ackman RG (1976). Long-chain monoethylenic alcohol and acid isomers in lipids of copepods and capelin. *Chemistry and physics of lipids* **16**, 219-223.
- Patton JS (1981). Gastrointestinal lipid digestion. Teoksessa *Physiology of the gastrointestinal tract*, toim. Johnson LR, s. 1123-1146. Raven Press, New York.
- Pierce GJ & Boyle PR (1991). A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. *Oceanography and marine biology* **29**, 409-486.

Plakke T, Berkel J, Beynen AC, Hermus RJ & Katan MB (1983). Relationship between the fatty-acid composition of the diet and that of the subcutaneous adipose-tissue in individual human-subjects. *Human Nutrition-applied Nutrition* **37**, 365-372.

Pond CM, Mattacks CA, Gilmour I, Johnston MA, Pillinger CT & Prestrud P (1995). Chemical and carbon isotopic composition of fatty acids in adipose tissue as indicators of dietary history in wild Arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard. *Journal of zoology* **236**, 611-623.

Quinn GP & Keough MJ (2002). *Experimental Design and Data Analysis*. Cambridge University Press, United Kingdom.

Raclot T (2003). Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Progress in lipid research* **42**, 257-288.

Raclot T & Groscolas R (1995). Selective mobilization of adipose-tissue fatty-acids during energy depletion in the rat. *Journal of lipid research* **36**, 2164-2173.

Raclot T, Groscolas R & Cherel Y (1998). Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Marine Biology* **132**, 523-533.

Rassi P, Hyvärinen E, Juslén A & Mannerkoski I (2010). *The 2010 Red List of Finnish species*. Ympäristöministeriö & Suomen ympäristökeskus, Helsinki.

Rheinheimer G (1998). Pollution in the Baltic sea. *NATURWISSENSCHAFTEN* **85**, 318-329.

Rosa C, Blake JE, Mazzaro L, Hoekstra P, Ylitalo GM & O'Hara TM (2007). Vitamin A and E tissue distribution with comparison to organochlorine concentrations in the serum, blubber and liver of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). *Comp Biochem Physiol* **B 148**, s. 454-462.

Ryg M, Smith TG & Oritsland NA (1988). Thermal significance of the topographical distribution of blubber in ringed seals (*Phoca hispida*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**, 985-992.

Saito H & Kotani Y (2000). Lipids of four boreal calanoid copepods: origin of monoene fats of marine animals at higher trophic levels in the grazing food chain in the subarctic ocean ecosystem. *Mar Chem* **71**, s. 69-82.

Samuel AM & Worthy GAJ (2004). Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber as a function of body site, season, and reproductive state. *Can J Zool* **82**, 1933-1942.

Santos MB, Clarke MR & Pierce GJ (2001). Assessing the importance of cephalopods in the diets of marine mammals and other top predators: problems and solutions. *Fisheries Research* **52**, 121-139.

Severinsen T, Skaare JU & Lydersen C (2000). Spatial distribution of persistent organochlorines in ringed seal (*Phoca hispida*) blubber. *Marine environmental research* **49**, 291-302.

Sinisalo T, Jones RI, Helle E & Valtonen ET (2008). Changes in diets of individual Baltic ringed seals (*Phoca hispida botnica*) during their breeding season inferred from stable isotope analysis of multiple tissues. *Marine Mammal Science* **24**, 159-170.

Sipilä T (1990). Lair structure and breeding habitat of the Saimaa ringed seal (*Phoca hispida saimensis* Nordq.) in Finland. *Finnish Game Research* **47**, 11-20.

Sipilä T & Hyvärinen H (1998). Status and biology of Saimaa (*Phoca hispida saimensis*) and Ladoga (*Phoca hispida ladogensis*) ringed seals. *NAMMCO Scientific Publications* **1**, 83-99.

Skoglund EG, Lydersen C, Grahl-Nielsen O, Haug T & Kovacs KM (2010). Fatty acid composition of the blubber and dermis of adult male Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in Svalbard, and their potential prey. *Marine Biology Research* **6**, 239-250.

Slip DJ, Gales NJ & Burton HR (1992). Body-mass loss, utilization of blubber and fat, and energetic requirements of male southern elephant seals, *Mirounga leonina*, during the molting fast. *Australian Journal of Zoology* **40**, 235-243.

Smith RJ, Hobson KA, Koopman HN & Lavigne DM (1996). Distinguishing between populations of fresh- and salt-water harbour seals (*Phoca vitulina*) using stable-isotope ratios and fatty acid profiles. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 272-279.

Smith HR & Worthy GAJ (2006). Stratification and intra- and inter-specific differences in fatty acid composition of common dolphin (*Delphinus sp.*) blubber: Implications for dietary analysis. *Comp Biochem Physiol B* **143**, 486-499.

Stenman O & Pöyhönen O (2005). Food remains in the alimentary tracts of the Baltic grey and ringed seals. *Finnish Game and Fisheries Research Institute Research Report* **346**, 51-53.

Stoeck T, Kröncke I, Duineveld GCA & Palojarvi A (2002). Phospholipid fatty acid profiles at depositional and non-depositional sites in the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **241**, 57-70.

Strandberg U, Käkelä A, Lydersen C, Kovacs KM, Grahl-Nielsen O, Hyvärinen H & Käkelä R (2008). Stratification, composition, and function of marine mammal blubber: the ecology of fatty acids in marine mammals. *Physiol Biochem Zool* **81**, 473-485.

Strandberg U, Sipilä T, Koskela J, Kunnasranta M & Käkelä R (2011). Vertical fatty acid profiles in blubber of a freshwater ringed seal - Comparison to a marine relative. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology* **407**, 256-265.

Summers LKM, Barnes SC, Fielding BA, Beysen C, Ilic V, Humphreys SM & Frayn KN (2000). Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. *Am J Clin Nutr* **71**, 1470-1477.

Suuronen P & Lehtonen E (2012). The role of salmonids in the diet of grey and ringed seals in the Bothnian Bay, northern Baltic Sea. *Fisheries Research* **125**, 283-288.

Thiemann GW, Budge SM & Iversin SJ (2004). Determining blubber fatty acid composition: A comparison of in situ direct and traditional methods. *Marine Mammal Science* **20**, 284-295.

Tjonneland A, Overvad K, Thorling E & Ewertz M (1993). Adipose-tissue fatty-acids as biomarkers of dietary exposure in Danish men and women. *Am J Clin Nutr* **57**, 629-633.

Tollit D & Heaslip S (2006). Estimating diet composition in sea lions: which technique to choose?. Teoksessa *Sea lions of the world*, toim. Trites AW, Atkinson SK, DeMaster DP, Fritz LW, Gelatt TS, Rea LD & Wynne KM, s. 293-307. Alaska Sea Grant College Program, Fairbanks.

Tucker S, Bowen WD, Iverson SJ & Stenson GB (2009). Intrinsic and extrinsic sources of variation in the diets of harp and hooded seals revealed by fatty acid profiles. *Can J Zool* **87**, 139-151.

Valero-Garrido D, Lopez-Frias M, Llopis J & Lopez-Jurado M (1990). Influence of Dietary Fat on the Lipid Composition of Perirenal Adipose Tissue in Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* **34**, 327-332.

Valste J (2007). Norppa. Teoksessa *Nisäkkäät Suomen luonnossa*, 2. painos, toim. Valste J, s. 130-131. Otava, Keuruu.

Walton M & Pomeroy P (2003). Use of blubber fatty acid profiles to detect inter-annual variations in the diet of grey seals *Halichoerus grypus*. *Mar Ecol Prog Ser* **248**, 257-266.

West GC, Burns JJ & Modafferi M (1979). Fatty-acid composition of blubber from the 4 species of Bering Sea phocid seals. *Can J Zool* **57**, 189-195.

Wold S, Albano C, Dunn III WJ, Edlund U & 6 muuta (1984). Multivariate data analysis in chemistry. *NATO ASI Ser C Math Phys Sci* **138**, 17-97.

Worthy G & Edwards EF (1990) Morphometric and biochemical factors affecting heat-loss in a small temperate cetacean (*Phocoena phocoena*) and a small tropical cetacean (*Stenella attenuata*). *Physiological Zoology* **63**, 432-442.

10 Liitteet

Liite 1. Rasvahappojen metyyliestereiden standardit

Toimittaja: Larodan AB, Limhamnsgårdens alle 9, S-216 MALMÖ, Sweden

Standardiseoksessa seuraavia standardeja samassa tilavuussuhteessa:

Metyylilinoleaatti (9c)

Metyylipalmitoleaatti (9c)

Metyylioleaatti (9c)

Metyylimyristoleaatti (9c)

Metyyliheksadekanoaatti (palmitaatti)

Metyylilinoleaatti

Metyyli 11c- eikosenoaatti

Metyyliarakidonaatti (5c, 8c, 11c, 14c)

Metylierukaatti (13c)

Metyylinervonaatti (15c)

100 mg jokaista standardia sekoitettiin yksittäin 8 ml heksaaniin, ja näistä varastoista otettiin standardiseosta varten jokaista standardia 150 µl ja ne sekoitettiin keskenään. Tätä seosta laimennettiin vielä kymmenkertaisesti heksaanilla varsinaisia ajoja varten.

Liite 2. Lipidiluokkien standardit

Seos neutraalilipidejä varten, standardeja ainemääräsuhteessa 1:1:1:1

Triasyyliglyseroli (TAG)

Kolesteryylilinoleaatti

Fosfatidyylikoliini

Oleiinihappo

+ kolesterolista valmistettiin vielä erillinen standardisarja

Seos fosfolipidejä varten

Sfingomyeliini

Fosfatidyylikoliini

Fosfatidyyliiseriini

Fosfatidyyli-inositoli

Fosfatidyylietanoliamiini