

Effekter av miljøgifter på torsk fra Indre Oslofjord

Elin Camilla Rosenberg Imrik



Masteroppgave i Toksikologi, Biologisk institutt

UNIVERSITETET I OSLO

August, 2010

Forord

Mens politikerne diskuterer om det er fornuftig å gi lærere studiepermisjon i ny og ne, har jeg testet ideen i praksis. Kanskje har det ikke vært økonomisk fornuftig, men det har vært meget lærerikt og nyttig. Jeg har fått mye faglig påfyll og oppdatering, trimmet engelsken og fått oppgradert datakunnskapene mine. Men det har vært en krevende prosess. Det hadde ikke vært mulig å gjennomføre denne masteroppgaven uten hjelp fra mange.

Tusen takk til hovedveileder professor Ketil Hylland for meget inspirerende og god veiledning! Kontordøra har alltid stått åpen, og de mange mailene har blitt raskt besvart. Med omtanke, store forventninger og høye ambisjoner på studentenes vegne, inspireres man til å yte sitt beste.

Takk til medveileder Merete Grung som har vært til god hjelp under arbeidet ved NIVA! Takk til Karina, Oscar og Kenneth som også har hjulpet meg under labarbeidet på NIVA! Gunnar Brunborg ved Folkehelseinstituttet har kommet med nyttig tips og ikke minst bidratt til å gjenfinne bortkomne Cometfilmer. Tusen takk for det! En veldig stor takk til Tor Fredrik Holth som ikke formelt, men høyst reelt har vært en nyttig veileder! Takk for gode tips på labben, en og annen redningsaksjon og oppklarende svar både på telefon og mail på de merkeligste tidspunkt av døgnet!

Takk til mannskapet på FF Trygve Braarud for hjelp ved innsamlingen av materiale til oppgaven! Takk til Berit Kaasa og Rita Amundsen for hjelp til å finne frem utstyr til labarbeidet på UiO! Takk til professor Tom Andersen for nyttige statistikk tips! Takk til medstudenter som jeg har jobbet sammen med på labben! Kathrin, Henriette, Polina, Bjørn, Nicolai og Inger Lise har gjort labarbeidet og studietiden både triveligere og mer lærerik.

Ikke minst en stor takk til hele storfamilien min! Uten dem hadde dette ikke vært gjennomførbart. Besteforeldre har stilt opp som barnevakter og de har bidratt med både ryddehjelp og middagsservering i de mest hektiske periodene. Takk kjære Vemund for all støtte og oppmuntring gjennom hele prosessen og for alt ekstraarbeid hjemme! Takk til Eirik, Vetle og Eivind som har gitt meg nødvendig avkobling fra studiene og viktig tilkobling til livet utenfor!

E. Camilla R. Imrik, Fredrikstad august, 2010.

Sammendrag

Formålet med denne oppgaven var å avdekke effekter av miljøgifter på torsk i Indre Oslofjord. Aktuelle miljøgifter var metaller som bly, kvikksølv, kadmium, kobber og sink, plane organiske miljøgifter som klororganiske forbindelser (PCB, dioksiner og dibenzofuraner) og PAH-er samt organofosfater og karbamater. Effektene ble undersøkt ved å bruke en rekke forskjellige biomarkører som knyttes spesifikt til ulike grupper av miljøgifter. Biomarkørene som ble benyttet var: ALA-D-hemming i blodceller, MT i lever, CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet i lever, PAH-metabolitter i galle, DNA-trådbrudd i røde blodceller og AChE-aktivitet i muskel. Torsk fra et antatt rent område i Ytre Oslofjord ble benyttet som referanse. Utvalget besto av 38 fisk fra Indre Oslofjord og 40 fisk fra Ytre Oslofjord. De ble fanget med bunntål i slutten av november. Vevsprøver ble fortløpende tatt av fisken. Prøvene ble umiddelbart fryst ned til -80°C , for senere analyser på laboratoriet. De røde blodcellene til Cometanalyse av DNA-skade, ble behandlet og oppbevart på to ulike måter. Den ene var å bearbeide og støpe dem inn i agarose ombord på båten og deretter oppbevare dem ved 4°C på Lyseringsbuffer. Den andre metoden var å fryse blodcellene langsomt ned i Mr. Frosty og deretter oppbevare dem ved -80°C .

Resultatet viste at ALA-D i blod var hemmet i torsk fra Indre Oslofjord. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom områdene av MT-konsentrasjonen i lever. MT-nivåene var lave i begge områdene. CYP1A-konsentrasjonen og EROD-aktiviteten var signifikant høyere i leveren fra Indre Oslofjord enn i leveren fra Ytre Oslofjord. Det var også signifikant mer av PAH-metabolitten 1-OH-pyren i gallen fra Indre Oslofjord enn i gallen fra Ytre Oslofjord. Det var signifikant mer DNA-skade i røde blodceller fra fisk fra Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. AChE-aktiviteten i muskel var mest hemmet i torsk fra Ytre Oslofjord.

Mer hemming av ALA-D-aktiviteten i røde blodceller i Indre Oslofjord kan bety at det var mer effekter av bly i dette området sammenlignet med referanseområdet. Ulik effekt av andre metaller på MT-konsentrasjonen ble ikke sett mellom de to områdene. Signifikant høyere CYP1A-aktivitet i leveren fra torsk i Indre Oslofjord enn i torsk fra Ytre Oslofjord, kan indikere at fisk fra indre områder hadde mer effekter av plane organiske miljøgifter. Torsk fra Indre Oslofjord hadde de høyeste konsentrasjonene av PAH-metabolitten 1-OH-pyren i gallen. Det kan tilsi at den generelle PAH-belastningen var størst i dette området. Mer DNA-skade i røde blodceller fra torsk i Indre Oslofjord kan bety større eksponering for gentoksiske stoffer som metallene bly, kadmium og kvikksølv, PAH-er som benzo(a)pyren og

klororganiske forbindelser som dioksiner i dette området. Lavere AChE-aktivitet i muskel hos torsk fra Ytre Oslofjord enn i Indre Oslofjord, kan bety at det var forskjell i effekter av organofosfater og karbamater i de to områdene og at effekten var størst i Ytre Oslofjord.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Fysiologiske parametre og biomarkører	2
1.3	Problemstilling og hypoteser	6
2	Material og metode.....	7
2.1	Innsamling av fisk	7
2.2	Prøvetaking og innsamling av data.....	9
2.3	Aldersbestemmelse	10
2.4	Kondisjonsfaktor, leversomatisk indeks og gonadesomatisk indeks.....	10
2.5	Proteinmåling.....	10
2.6	Analyse av δ -aminolevulinsyre dehydrogenase aktiviteten i blodceller	11
2.7	Opparbeiding av levervev.....	12
2.8	Metallotionein.....	12
2.9	Måling av CYP1A-konsentrasjon.....	14
2.10	Måling av EROD aktivitet	16
2.11	Analyse av PAH-metabolitter	17
2.12	Cometanalyse (enkeltcelle gelelektroforese)	18
2.13	Acetylcholinesterase hemming i muskel	21
2.14	Statistiske metoder	23
3	Resultat.....	25
3.1	Fysiologiske parametere	25
3.2	Aminolevulinsyredehydrogenase (ALA-D) aktivitet i røde blodceller.....	27
3.3	Metallotionein (MT) i lever	28
3.4	CYP1A- konsentrasjon i lever	29
3.5	EROD- aktivitet i lever.....	30
3.6	PAH-metabolitter i galle.....	30
3.7	DNA-skade i røde blodceller	33
3.8	Acetylcholinesterase-aktivitet i muskel.....	35
3.9	Alderskorrelasjon.....	35
3.10	Korrelasjonsanalyse	37

4	Diskusjon.....	39
4.1	Effekter på fysiologiske parametere	39
4.2	Effekter av metaller	41
4.3	Effekter av plane organiske miljøgifter	45
4.4	PAH-metabolitter i galle.....	48
4.5	DNA-skader.....	49
4.6	Effekter av organofosfater og karbamater	52
4.7	Avsluttende betraktninger.....	55
5	Konklusjon	57
	Referanser.....	59
	Vedlegg 1: Forkortelser.....	69
	Vedlegg 2: Rådata	70
	Vedlegg 3: Bearbeidede data.....	72
	Vedlegg 4: Kjemikalieliste.....	76
	Vedlegg 5: Buffere og løsninger	78
	Vedlegg 6: Utstyrliste	81
	Vedlegg 7: Instrumentinnstillinger.....	82
	Vedlegg 8: Spearman korrelasjonsanalyse.....	83

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekter av miljøgifter på torsk fra Indre Oslofjord. For å avdekke effekter av miljøgifter, ble det benyttet en rekke biologiske effektmetoder, også kalt biomarkører. English Nature (2004) definerer en biomarkør som ”en biokjemisk, cellulær, fysiologisk eller atferdsmessig endring i vev eller kroppsvæsker eller på hele organismen som gir bevis på eksponering for kjemiske forurensing og som også indikerer en toksisk effekt”. Slike biomarkøreffekter kan være induksjon eller hemming av spesifikke enzymer, påvirkning på metabolismen, genetiske skader eller svekket immunsystem, reproduksjonsevne eller vekst (Mayer et al., 1992). Fordelen med å bruke biomarkører i overvåking av miljøgiftsituasjonen i naturen, er at de viser at det har skjedd en interaksjon mellom miljøgiften og organismen. En kjemisk analyse av miljøgifter i kroppsvæv eller miljø vil ikke på samme måte kunne si noe om skadelige effekter i organismen (Sarkar et al., 2006). Biomarkører og undersøkelser på molekyl/celle/individelt nivå er relevant fordi det gir et tidlig varselsignal om at økosystemet er påvirket av giftige stoffer. Miljøgiftene vil først påvirke cellulære og molekylære prosesser. Hvis tilpasnings- og reparasjonsmekanismene blir overbelastet, vil effektene bli overført til et høyere nivå (vev, organ, individ, populasjon, samfunn eller økosystem) (Bayne et al., 1985).

Indre Oslofjord er belastet med en rekke miljøgifter. Konsentrasjonene er spesielt høye i sedimentene i de indre områdene og i havnene. Her kan miljøgifter som kvikksølv, PCB og PAH forekomme i konsentrasjoner klassifisert av Klif (Klima- og forurensingsdirektoratet) som ”meget sterkt forurenset”. Antropogene bidrag er hovedårsaken til dette. I dag er ca. 750 000 mennesker tilknyttet renseanlegg som munner ut i fjorden. Flere elver har sitt utløp her og fører med seg miljøgifter fra industri, forurenset grunn, deponier, urbane flater og atmosfærisk nedfall (Helland et al., 2003). Omfattende skips- og båtaktivitet i havneområdene og betydelig veitrafikk fra landets sentrale ferdselsårer bidrar også.

Mange miljøgifter som tilføres havet er tungt nedbrytbare og/eller fettløselige og vil bindes til partikler og tilslutt ende i sedimentet eller akkumuleres i fettrike vev i organismene. Ved å måle miljøgiftkonsentrasjonene i bunnsedimentene og ulike vev hos aktuelle organismer, kan

forurensingssituasjonen kartlegges. Sedimentprøver fra Indre Oslofjord inneholder uorganiske miljøgifter som metallene kvikksølv, kadmium, bly, kobber og sink og organiske miljøgifter som polyaromatiske hydrokarboner (PAH), polyklorertebifenyl (PCB), diklordifenyltrikloretan (DDT) og organiske tinnforbindelser (TBT) (Berge et al., 2009). Sedimentprøver tatt fra Steilene inneholdt overkonsentrasjon (klasse II: god (Klifs klassifiseringssystem)) av kvikksølv, sink, kobber, PCB og PAH. Overkonsentrasjon (klasse III: moderat) ble funnet for bly og TBT (Green et al., 2010). Det er muligens en tendens at miljøgiftbelastningen i fjorden synker, men tendensen for metaller er ikke entydig (Magnusson et al., 2008). Prøver tatt i 2008 fra lever og muskel fra torsk i Indre Oslofjord fant at muskelen var moderat forurenset av kvikksølv og PCB og at leveren var markant forurenset av PCB. Undersøkelsene viste en oppadgående trend for kvikksølv i muskel og for kadmium i lever (Green et al., 2010). Dette har ført til at Mattilsynet opprettholder restriksjonene mot å spise blant annet fiskelever fra dette området.

Torsk ble benyttet som undersøkelsesorganisme i denne oppgaven. Torsk (*Gadus morhua*) er en relevant art å undersøke fordi den har vid utbredelse, stor kommersiell betydning og har blitt mye studert. Torsk tilfredsstiller kravene til en god indikatorart (Goksøyr et al., 1996). En indikatororganisme for biomarkøranalyser skal ha vid utbredelse, stor forekomst og være relativt stasjonær. Den skal også ta opp miljøgifter og kunne leve i forurensete miljøer (Clark R.B, 2001). Kysttorsken er strukturert i lokale populasjoner og oppholder seg i samme fjordområde hele året, også i gyteperioden i februar – april. Torsken i Indre Oslofjord tilhører en genetisk, separat stamme (Knutsen et al., 2003). Torskens diett er variert og avhenger av sesong og livstadium. Bentiske organismer som bunntilknyttede reker, eremittkreps, krabber, flerbørstemark, snegler og andre fisker er vanlige i dietten (Hop et al., 1992). Torsken kan få i seg miljøgifter gjennom føden, via vannet direkte og ved oppvirvling fra sedimentet (Ruus et al., 2005, Aarre, 2008). Torsk har en fettrik lever og akkumulerer derfor fettløselige miljøgifter i stor grad (Ruus et al., 2001).

1.2 Fysiologiske parametre og biomarkører

Biomarkørene som ble benyttet i denne oppgaven var hemming av ALA-D-aktivitet i blod, induksjon av metallotionein i lever, induksjon av CYP1A og EROD-aktivitet i lever, PAH-metabolitter i galle, Cometanalyse av DNA-skade i røde blodceller og AChE-hemming i

muskel. Fysiologiske parametre som kondisjonsfaktor og organosomatiske indekser ble også benyttet som grove indikasjoner på fiskens helsetilstand.

Kondisjonsfaktoren relaterer kroppslengde til vekten og kan si noe om fiskens helsetilstand og miljøstress. Miljøgifter med virkningsmekanismer som gir økt metabolsk rate, en nedgang i energiopptak eller økt fettmetabolisme, vil mest sannsynlig redusere kondisjonsfaktoren (Smolders et al., 2003). Organsomatiske indekser relaterer vekten på et spesielt organ til kroppsvekten og kan dermed knytte en eksponering direkte til et målorgan. Leversomatisk indeks (LSI) kan brukes som parameter for miljøgifter som er toksiske for leveren og er relevant fordi leveren spiller en sentral rolle i avgiftning av miljøgifter (Haux and Larsson, 1984). Gonadesomatisk indeks (GSI) gir informasjon om kjønnsmodning og reproduksjonsstatusen til fisken (Crim et al., 1975), men kan også avdekke innvirkning fra hormonhermende stoffer (Jobling et al., 1996).

Enzymet δ -aminolevulinsyredehydratase (ALA-D) er involvert i et tidlig trinn i hemsyntesen. ALA-D katalyserer dannelsen av porfobilinogen fra to aminolevulinsyremolekyler. Bly hemmer dette enzymet ved å binde seg til sulfhydrylgrupper (Marks, 1985). Flere studier med fisk viser at måling av ALA-D-aktiviteten i røde blodceller hos fisk kan brukes som en sensitiv biomarkør for blyeksponering (Johansson-Sjöbeck et al., 1979; Hylland et al., 2009). Eksponeringsforsøk og målinger i fisk fra felt viser en doseavhengig hemming av ALA-D-aktivitet og at reduksjonen i aktivitet skjer raskt og kan bli oppdaget ved lave blykonsentrasjoner. I tillegg tar det lang tid før hemmet ALA-D-aktivitet er tilbake på normalt nivå. I blyeksponert regnbueørret ble det registrert 60- 90 % hemming. Etter 16 uker i rent vann var fortsatt hemmingen 45- 85 %. Hemming av ALA-D kan gi anemi hos pattedyr og fugler, men ikke hos fisk (Larsson et al., 1985).

Metallotionein (MT) induseres av og binder seg til toksiske metaller som kadmium, kvikksølv, sølv, kobber og sink (Viarengo et al., 1999). MT er et cysteinrikt, cytosolisk protein som finnes i de fleste eukaryote celler og vev. I fisk finner vi de største MT-konsentrasjoner i leveren. Med sine mange thiolgrupper, kan ett MT-molekyl binde seg til mange atomer av flere ulike innskuddsmetaller (Schlenk et al., 2008). MT beskytter cellestrukturene fra skader knyttet til ikke-essensielle metaller og metalloverskudd i cellene, men har også en rolle i intracellulær regulering av de essensielle metallene sink og kobber. MT-induksjon er også observert som en del av den generelle akutte stressproteinresponsen

knyttet til celledskade. MT spiller trolig en rolle i detoksifiseringen av frie radikaler som dannes ved beskyttelse av cellen (Hamer, 1986).

EROD og CYP1A er biomarkører for plane organiske miljøgifter som PAH-er og klororganiske forbindelser som PCB, dioksiner og dibenzofuraner (Stegeman og Hahn, 1994). Grunnlaget for målingene er at CYP1A- produksjonen i cellene øker etter eksponering for slik forbindelser, mens aktiviteten oftest ikke kan registreres i ueksponert fisk (Stegemann og Lech, 1991). CYP 1A-enzymet er en underfamilie i cytokrom P450-systemet. Cytokrom P450-systemet er en stor superfamilie av membranbundne enzymer funnet i de fleste organismer. De katalyserer mange oksidasjons- og reduksjonsreaksjoner. Cytokrom P450-systemet har en bred substratspesifisitet og er hovedansvarlig for den oksidative fase I-metaboliseringen av mange endogene og eksogene stoffer. CYP1A-enzymene i leveren er spesielt viktige i metaboliseringen av mange miljøgifter og er en av de mest studerte CYP-familie i fisk. Transkripsjonen av CYP1A-genene kontrolleres av arylhydrokarbonreseptoren (AhR) i cytosol (Schlenk et al., 2008). Plane klororganiske forbindelser og PAH-er inducerer CYP1A-geneekspressjon ved å binde seg til AhR (Safe, 1990).

CYP1A- induksjon kan måles enten ved å måle mengden CYP1A- proteiner i et semikvantitativt immunassay (ELISA) (Goksøyr og Husøy, 1992) eller ved å måle CYP1A aktiviteten gjennom EROD- aktivitet. Ethoxyresorufin oksideres av CYP1A til resorufin som er et fluorescend produkt som er lett å måle (Schlenk et al., 2008). Siden EROD-aktiviteten gjerne måles i leverhomogenat som også akkumulerer stoffer som kan hemme aktiviteten, kan måling av CYP1- mengde gi informasjon om dette (Schlenk et al., 2008).

Sammenhengen mellom EROD-aktivitet og skadelige effekter er ikke klart definert (Whyte et al., 2000). Whyte et al. (2000) viser til studier med fisk som indikerer at klororganiske forbindelser gir effekter som kan relateres til oksidativ stress. Videre at EROD-induksjon kan gi reproduksjonseffekter, økt LSI og dødelighet. CYP1A-metabolisering av PAH-er bidrar både til detoksifisering og bioaktivering av PAH-er. PAH-metabolitter kan danne DNA-addukter som kan lede til karsinogenese (Varanasi et al., 1989).

En biomarkør for eksponering for PAH-er er analyse av PAH-metabolitter i fiskegalle. Hovedparten av PAH-ene som absorberes i fisken blir raskt metabolisert til hydroksylerte metabolitter (fase I reaksjoner) og konjugert videre i fase II reaksjoner til polare metabolitter som lagres i gallen før de skilles ut av organismen (Ariese et al., 2005). Flere studier har vist

en sammenheng mellom PAH-metabolitter i galle og eksponering for PAH-er (Grung et al., 2009; Aas et al., 2001; Krahn et al., 1992). Et studie der torsk ble eksponert for en blanding av PAH-er viste at de fleste PAH-er gjenfinnes som monohydroksylerte metabolitter i gallen. Samme studie viste at det er en doseavhengig sammenheng mellom metabolitter i gallen og eksponering via vann og diett (Grung et al., 2009). Dette indikerer at kvantifisering av PAH-metabolitter i gallen egner seg godt til å si noe om eksponering for PAH-er. 1-OH-pyren blir brukt som markør for den totale eksponeringen for PAH-er. Sammenhengen mellom denne metabolitten i galle og PAH-konsentrasjonen i sedimenter har vist seg å være positivt korrelert (Hosnedl et al., 2003). Studier har avdekket en sammenheng mellom PAH-konsentrasjoner og utvikling av leverneoplasma og leversvulster i fisk (Varanasi et al., 1989). Effekter på vekst (Heintz et al., 2000), immunsystem (Holladay et al., 1998), endokrin regulering (Navas og Segner, 2000) er også registrert hos fisk eksponert for PAH-er.

Mange strukturelle forandringer i organismens DNA kan inntreffe på grunn av eksponering for gentoksiske stoffer. Slike endringer i DNA kan være DNA-base modifisering, basetap, enkelt- og dobbeltrådbrudd, DNA-addukter og kryssbindinger (Eastman og Barry, 1992). DNA-trådbrudd kan brukes som en biomarkør på gentoksisitet. Cometassay (enkelcelle gelelektroforese) er en metode som måler DNA trådbrudd i eukaryote enkeltceller. Under alkaliske forhold vil også alkalilabile seter omdannes til trådbrudd. Ved å innføre skadespesifikke enzymer, kan andre DNA-skader som modifiserte baser, gjenkjennes og omdannes til trådbrudd (Collins, 2004). I denne oppgaven ble enzymet formamidopyrimidine DNA-glykosylase (fpg) innført for å oppdage baseskader som purineoksidering, ringåpnede puriner eller formamidopyrimidiner (Collins et al., 2008). Slike genetiske endringer kan føre til mutasjoner, kromosomavvik, fødselsdefekt og kreft (Kurelec, 1993). Dette representerer en alvorlig påvirkning som potensielt kan gi effekter på alle nivåer av biologisk organisering. Et intakt DNA er viktig for både individets overlevelse og reproduksjon.

Acetylkolinesterase (AChE)-hemming er en biomarkør for organofosfater og karbamater som er AChE-hemmere og brukes som insekticider. AChE er et enzym som bryter ned neurotransmitteren acetylcholin (ACh). Effekten av AChE-hemming blir at ACh hopper opp i synapsen og overstimulerer ACh-reseptorene i sentralnervesystemet, det perifere nervesystem og i nerve-muskelsynapsen med ulike tegn på forgiftning (Bradbury et al., 2008). Både organofosfat- og karbamatforbindelsene forblir bundet lenge til AChE og hindrer reaktivering av enzymet. For organofosfater regnes deaktiveringen nesten som irreversibel og

gjenopprettingstiden har vist seg å være langsommere i fisk enn pattedyr (Carr et al., 1995). Kortvarig eksponering for spesielt organofosfater gir langvarig hemming av AChE. I fisk er det mest AChE i hjerne og muskel (Habig og Di Giulio, 1991). I denne oppgaven måles AChE-hemming i muskel. I tillegg til å være neurotoksiske, kan pesticider være karsinogene, reproduksjonstoksiske og ha effekter på immunforsvaret hos fisk (Carlson og Zelikoff, 2008).

1.3 Problemstilling og hypoteser

Problemstillingen i denne oppgaven har vært å avklare om det er effekter av miljøgifter på torsk i Indre Oslofjord. Torsk fra et antatt rent område i Ytre Oslofjord ble benyttet som referanse.

Følgende hypoteser er testet:

- H₀: Det er ingen forskjell i effekter av metaller på torsk fra Indre Oslofjord og på torsk fra Ytre Oslofjord.
- H₀: Det er ingen forskjell i effekter av plane organiske miljøgifter på torsk fra Indre og på torsk fra Ytre Oslofjord.
- H₀: Det er ikke høyere konsentrasjoner av PAH-metabolitter i gallen til torsk fra Indre Oslofjord enn gallen til torsk fra Ytre Oslofjord.
- H₀: Det er ikke mer DNA-skade i røde blodceller fra torsk fra Indre Oslofjord enn i røde blodceller fra torsk fra Ytre Oslofjord.
- H₀: Det er ingen forskjell i effekter av organofosfater og karbamater på torsk fra Indre Oslofjord og torsk fra Ytre Oslofjord.

For å avklare reelle effekter av miljøgifter ble det tilstrebet at utvalget av torsk var mest mulig homogent med tanke på størrelse og alder. Hunner og hanner ble prøvetatt i begge områdene for å kunne avdekke eventuelle forskjeller knyttet til kjønn. Tidspunktet for prøvetakingen fulgte standardiserte anbefalinger for å minimalisere effektene av årstidsvariasjoner og for å kunne sammenligne resultatene med andre undersøkelser.

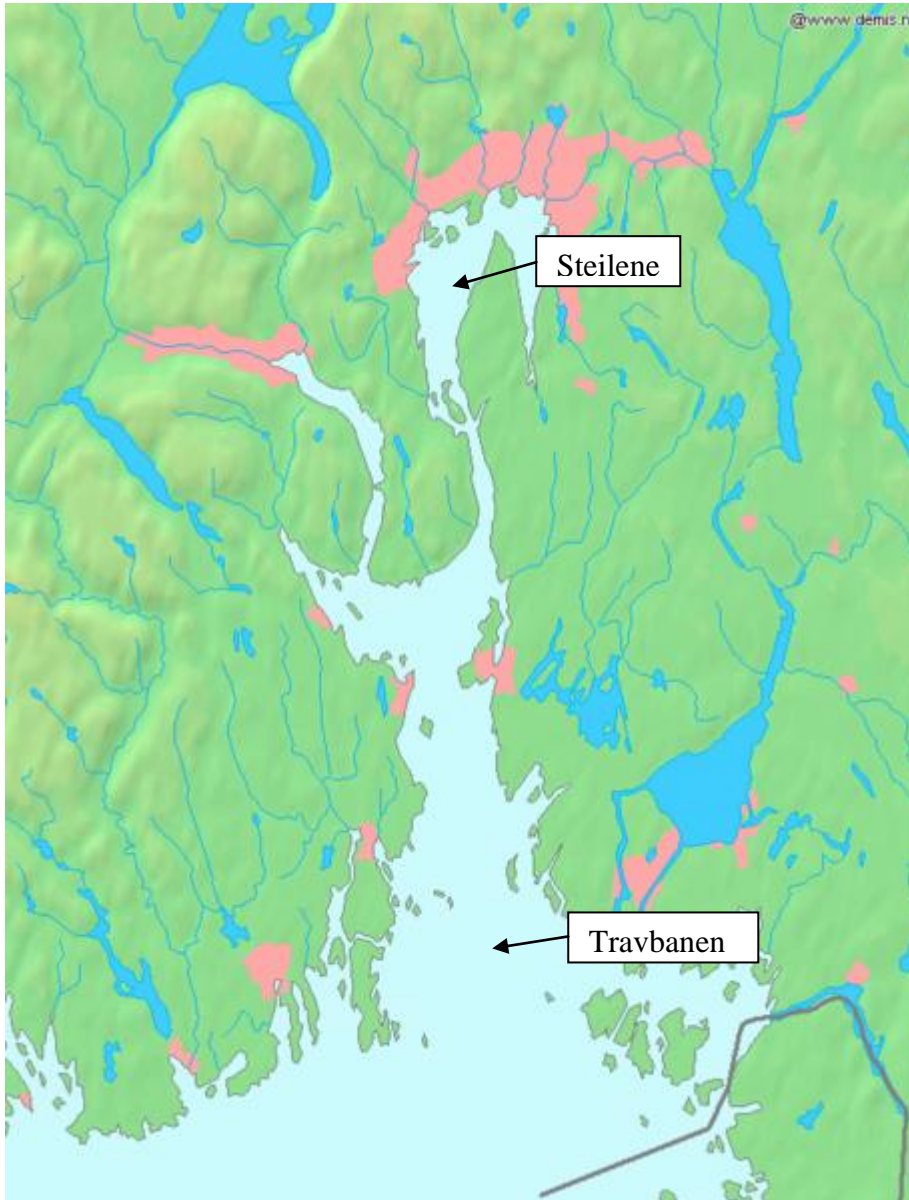
2 Material og metode

2.1 Innsamling av fisk

Materialet til oppgaven ble samlet under et 4 dagers tokt 24. til 27. november 2008 med UiOs forskningsfartøy FF Trygve Braarud. Torsk ble fanget ved bunntråling med trålehastighet på 1,3-1,6 knop (Tabell 2.1). 40 torsk ble fanget i Ytre Oslofjord som referanse; 39 ved Travbanen og 1 ved Blåkollrenna. I Indre Oslo ble 38 torsk fanget; 2 ved Grårøyrenna og 36 ved Steilene (Figur 2.1).

Tabell 2.1: Oversikt over tråledata fra Ytre og Indre Oslofjord.

Fjord Område	Dato	Lokalitet	Kart-koordinater	Antall trekk	Dyp m	Bunn-temperatur °C	Tids-punkt (tråle-start)	Antall torsk
Ytre Oslofjord	24/11-08	Travbanen	59 15.83N- 10 39.28Ø til 59 17.31N - 10 37.33Ø	1	119-120	7,8- 8,0	16 ⁴⁵	12
	25/11-08	Blåkollrenna	59 58.69N – 10 53.50Ø til 58 56.94N – 10 54.53Ø	1	95-100	9,2	10 ⁰⁰	1
	25/11-08	Travbanen	59 15.83N- 10 39.28Ø til 59 17.31N - 10 37.33Ø	2	115-120	8,0-8,1	14 ⁴⁵	27
Indre Oslofjord	26/11-08	Grårøyrenna	59 42.12N - 10 32.61Ø til 59 42.84 N - 10 32.16Ø	1	110	9,2	10 ³⁰	2
	26/11-08	Steilene	59 48.22N - 10 32.12Ø til 59 48.92N - 10 33.44Ø	2	100	8,4	11 ⁵⁵	18
	27/11-08	Steilene	59 48.22N - 10 32.12Ø til 59 48.92N - 10 33.44Ø	3	95-100	8,4-8,6	9 ⁴⁵	18



Figur 2.1: Kartutsnitt fra Oslofjorden. Steilene i Indre Oslofjord og Travbanen i Ytre Oslofjord er markert.

Fiskens størrelse ble vurdert før innsamling slik at gruppen skulle bli mest mulig homogen med hensyn på alder, vekt og lengde (Tabell 2.2). I Indre Oslofjord var tilgangen på fisk begrenset og de fleste fiskene ble brukt tross for variasjonen. Fiskene ble oppbevart i store kar med havvanngjennomstrømming. De ble umiddelbart og fortløpende dissekert for at oppholdstiden under unormale forhold skulle bli minst mulig.

Tabell 2.2: Alder, lengde og vekt (median; 25 – 75 persentil) og kjønnsfordelingen i Ytre og Indre Oslofjord.

Lokalitet	Kjønn	Antall	Alder (år)	Lengde (cm)	Vekt (g)
Ytre Oslofjord	Hunn	27	3,0; 2,0 – 4,0	49,5; 46,5 – 54,0	1168; 846 - 1509
Ytre Oslofjord	Hann	13	2,5; 2,0 – 4,0	48,0; 45,5 – 53,3	1068; 895 - 1355
Indre Oslofjord	Hunn	17	3,0; 2,0 – 4,0	42,0; 38,0 – 49,0	672; 496 - 1142
Indre Oslofjord	Hann	21	2,0; 2,0 – 4,0	42,0; 37,3 – 45,5	680; 455 - 834

2.2 Prøvetaking og innsamling av data

Fisken ble avlivet med et slag mot hodet. Fiskens lengde og vekt ble målt. Parasitter, pigmentendringer eller blodutredninger ble notert. Blodprøver ble tatt med en 2 ml heparinisert sprøyte fra kaudalvenen under ryggraden nær gattfinnen.

Blod ble overført til et eppendorfrør tilsatt iskald PBS (NaCl; 7,2 g/l, Na₂HPO₄ x 2H₂O; 1,25 g/l, KH₂PO₄; 0,43 g/l) tilsatt 10 mM EDTA (3,72 g/l PBS), pH 7,4 i forholdet 1: 10. Prøvene ble blandet godt og oppbevart på is. Resten av blodprøven ble overført til et eppendorfrør på is og sentrifugert ved 1000 x g i 5 minutter for å skille plasmaet og blodcellene. Plasmaet ble overført til et kryorør med en pasteurpipette. Plasma og blodceller ble frosset på flytende nitrogen.

Fiskene ble åpnet på undersiden fra brystfinnen til gattåpningen. Leveren ble dissekert ut og veid. To leverprøver fra området mellom de to portalvenene ble frosset på flytende nitrogen i kryorør. Gallen ble sugd ut fra galleblæren med en 1 ml sprøyte og holdt mørkt i aluminiumsfolie på is før de ble oppbevart i fryser. Disseksjonen ble gjennomført slik at galle ikke kontaminerte leveren. Gonadene ble veid og benyttet til kjønnsbestemmelse.

Filet ble dissekert ut mellom sidelinjeorganet og første ryggfinne. Muskelfiletten ble frosset på flytende nitrogen i kryorør. Otolittene (sagitta) ble tatt ut ved å åpne fiskens kranie og oppbevart på et eppendorfrør med destillert vann.

2.3 Aldersbestemmelse

Fiskens alder ble bestemt ved å telle antall opake og hyaline soner på otolittene. Kjernen er en opak sone som dannes i fiskenes første levemåneder, mens den første hyaline sonen dannes fra høsten til tidlig vår. En opake og en hyalin sone representerer et leveår (Williams et al., 1974).

Metoden som ble fulgt for preparering av otolittene er beskrevet av Williams et al. (1974). Otolittene ble delt i to på tvers gjennom kjernen. Bruddflaten ble forsiktig slipt med en metallfil, brent lett over en spritlampe og penslet med glyserol. Otolittene ble satt med bruddflaten opp og de hyaline sonene ble talt under en lupe med fleksibelt sidelys. Siste hyaline sone i ytterkant ble ikke regnet som et år, men angitt med en +.

2.4 Kondisjonsfaktor, leversomatisk indeks og gonadesomatisk indeks

Kondisjonsfaktoren ble regnet ut for alle individer etter formelen $K_F = 100 \times \text{vekt}/\text{lengde}^3$ (Schlenk et al., 2008).

Leversomatisk indeks (LSI) ble regnet ut for alle individer etter formelen $LSI = 100 \% \times \text{levervekt}/\text{kroppsvekt}$. Gonadesomatisk indeks (GSI) ble beregnet tilsvarende ut fra formelen $GSI = 100 \% \times \text{gonadevekt}/\text{kroppsvekt}$ (Schlenk et al., 2008). Tarmene var inkludert i vekten ved begge utregningene.

2.5 Proteinmåling

Protein ble kvantifisert som beskrevet av Lowry et al. (1951). Protein ble brukt til standardisering for andre analyser (ALA-D, MT, CYP1A, EROD, AChE).

Prøvene ble tint på is og fortynnet i iskald 0,1 M trisbuffer (TrisHCl; 13,2 g, Trisbase; 1,94 g), pH 8,0 (ved 4 °C). For å finne rett fortynning, ble noen tilfeldige prøver testet ut med ulike konsentrasjoner. En 96-brønns flatbunnet mikrotiterplate på is ble tilsatt 10 µl fortynnet prøve i 3 replikater. En referanseprøve gikk igjen på hvert brett for å fange opp variasjonen mellom brettene (se referanseplot). 4 replikater blank og en standardrekke av 0,125- 0,25- 0,5- 1,0 mg/ml bovint serum albumin (BSA) i trisbuffer i 3 replikater ble avstatt i de to første kolonnene. Mikrotiterplaten ble tatt av isen før hver brønn umiddelbart ble tilsatt 25 µl reagens A (alkalisk kobbertartrateløsning) og 200 µl reagens B (fortynnet Folinreagens).

Reagensene var romtempererte og reagent B ble holdt mørkt til bruk. Reagens A og B var fra BioRad (Kit.nr 5000-0111).

Platene ble ristet lett for hånd og inkubert mørkt ved romtemperatur i 15 minutter før absorbansen ble avlest ved 750 nm på en plateleser av typen SynergyMx, BioTek (UiO) eller Thermomax microplate reader, Molecular Devices (NIVA). Software til plateleserne var henholdsvis Gen5 og Softmax Pro.

Hvis ikke absorbansen lå mellom 2 og 3 punkt på standardkurven, ble prøvene i de fleste tilfeller fortynnet igjen. Proteinverdiene ble beregnet ut fra standardkurven.

2.6 Analyse av δ -aminolevulinsyre dehydrogenase aktiviteten i blodceller

Blodprøvene ble opparbeidet og analysert etter en metode utviklet av Hodson (1976), modifisert som beskrevet av Hylland (2004). Fortynningsbufferen og fellingsreagensen ble laget på forhånd og oppbevart i kjøleskap. Standardløsningen ble fryst i porsjoner. ALA-reagensen og Ehrlich`s reagens ble laget samme dag. ρ - dimetylaminobenzaldehyd ble tilsatt rett før bruk av Ehrlich`s reagens.

Blodprøvene ble tatt ut randomisert og tint på is. Blodet ble fortynnet 1: 2 i iskald fortynningsbuffer (100 ml 0,1 M fosfatbuffer, pH 7,0, 1 ml triton X-100, dH₂O til 200 ml) og homogenisert med en glasspistel i eppendorfrøret. Homogenatet ble sentrifugert ved 10 000 x g i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fortynnet 1: 3 med fortynningsbufferen og 50 μ l overført til 7 eppendorfrør. Ett av rørene ble fryst ned for senere proteinanalyse. Det ble arbeidet på is frem til dette trinnet. Tre av rørene ble tilsatt 200 μ L ALA-reagens (33,5 mg δ -aminolovelinsyre i 50 ml fortynningsbuffer) og 3 andre ble tilsatt samme volum fortynningsbuffer. Tilsetningen av ALA-reagens og fortynningsbuffer ble gjort ved tidtaking og alle prøvene inkuberte nøyaktig 2 timer i romtemperatur før 300 μ l fellingsreagens (trikloreddiksyre; 4,0 g, HgCl₂; 2,7 g i dH₂O til 100 ml) ble tilsatt. Rørene ble grundig ristet etter hver tilsetning. Prøvene sto minst 5 minutter før de ble sentrifugert ved 10000 x g i 5 minutter ved romtemperatur. Protokollen anbefaler 2500 x g, men det ga ikke tilstrekkelig bunnfall.

Til standard ble det laget en fortynningsserie (0- 20- 40- 80- 160- 320 µl) av standardløsningen (41,44 µg PBG/ml fortynningsbuffer) fortynnet til 400 µl med fortynningsbuffer. En 96-brønns flatbunnet mikrotiterplate ble tilsatt 150 µl av hver standardfortynning i duplikater.

For hver prøve ble seks brønner tilsatt 150 µl supernatant; 3 replikater med ALA og 3 uten. Alle brønner ble tilsatt 150 µl modifisert Ehrlich's reagent (HgCl₂; 0,35 g i 6 ml dH₂O, 20 ml 70 % perkloreddiksyre, eddiksyre til 200 ml, Ehrlich's reagens; 2,0 g). Platen ble ristet for hånd, satt til inkubasjon i 15 minutter ved romtemperatur og absorbansen avlest ved 550 nm på en plateleser.

Til proteinanalyse etter Lowry (1951) ble de nedfrosne prøvene fortynnet 1: 40 i trisbuffer.

2.7 Opparbeiding av levervev

Leverprøvene som skulle brukes til analyser av metallotionein (MT), EROD og CYP1A ble opparbeidet fra samme leverbit etter metode av Dignam (1990). Cytosolfraksjonen ble brukt til MT-analyser, mens mikrosomalfraksjonen ble benyttet til EROD- og CYP1A-analyser. Gjennom hele prosedyren ble prøvene og rør holdt nedkjølt på is. Rørene ble vasket grundig og skylt minst tre ganger i destillert vann før gjenbruk. Prøvene ble tatt ut randomisert.

Leverprøvene ble veid frosne. Store leverbiter ble delt slik at vekten ble ca 1 g. Prøven ble overført til et homogeniseringsrør og tilsatt 4500 µl iskald homogeniseringsbuffer (0,1 M kaliumfosfatbuffer, tilsatt 0,15 M KCl, 1 mM DTT, 5 % glyserol), pH 7,8. Prøvene ble homogenisert med Potter-Elverheim homogenistator med rotasjonshastighet 6000 rpm, mens pistillen ble ført opp og ned 10 ganger. Homogenatet ble sentrifugert ved 10 000 x g ved 4 °C i 30 minutter. Supernatanten ble sentrifugert ved 50 000 x g ved 4 °C i 120 minutter og fryst ned ved -80 °C. Pelleten (mikrosomene) ble resuspendert og homogenisert i 1,5 ml mikrosomalbuffer (homogeniseringsbuffer tilsatt 20 % glyserol og 1 mM EDTA). Løsningen ble fordelt i eppendorfrør og fryst ned ved -80 °C.

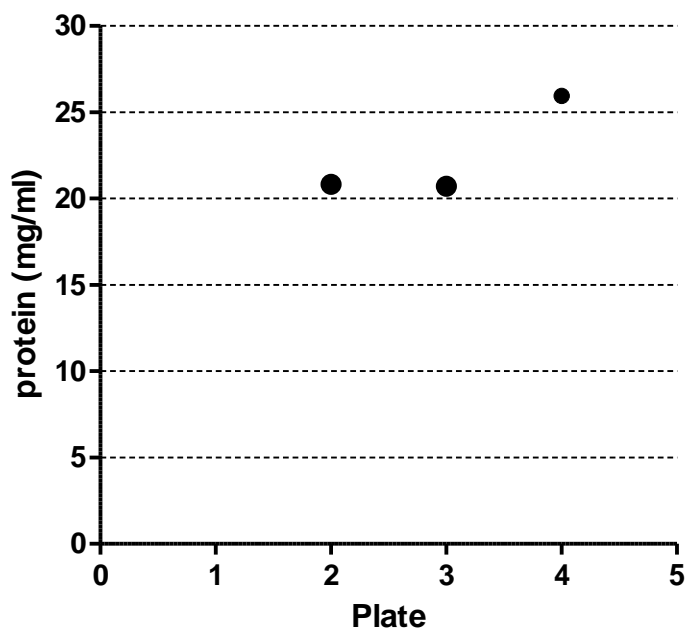
2.8 Metallotionein

Metallotioneinanalysen var basert på metode av Olafson et al. (1991). Cytosol fra lever ble tint på is og fortynnet 1: 10 i iskald fortynningsbuffer (0,9 % NaCl). Prøvene ble denaturet på en digital varmeblokk (WWR) ved 95 °C i 4 minutter og direkte avkjølt på is. Deretter ble de

sentrifugert 10 000 x g i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og ristet før måling.

Til målingene ble det brukt en 633 VA elektrode fra Metrohm, en Autolab type II potentiostat og IME663 rører fra Eco Chemie B.V. En nedfrost standardprøve fra metallothionin fra kanin (Sigma-Aldrich) med konsentrasjonen 50 µg/ml 0,9 % NaCl ble benyttet. Standardkurven ble laget ved å måle etter hver tilsetning (10- 20- 20-30- 40- 40 µl). Standard og prøve ble avsatt i en PARC glasscelle med 300 µl Triton X-100 og 10 ml elektrolytt (Co(NH₃)₆Cl₃; 0,322 g/l, ammoniumklorid; 53,4 g/l og 25 % NH₄OH; 154 ml/l). Elektrolytten ble lagret på lystett flaske ved 4 °C og varmet til romtemperatur før bruk. Mellom 150- 400 µl prøve ble tilsatt slik at målingen havnet midt på standardkurven. Hver løsning ble boblet med nitrogengass i ett minutt før måling. Dataprogrammet 757 VA Computrace v1.0 ble brukt. Polarografens innstillinger følger i vedlegg 7.

Restene av prøven ble fryst ned ved -80 °C til senere proteinmåling etter Lowrys metode (1951). Fortynningene ved proteinanalysen var hovedsakelig 1: 40, men de varierte mellom 1: 10-1: 80. En referanseprøve (YF19) ble brukt på 3 av 5 mikrotiterplater ved proteinbestemmelse i MT-prøvene. De ulike proteinkonsentrasjonene for referanseprøvene ble sammenlignet for kontrollere på stabiliteten til analysene (Figur 2.2).



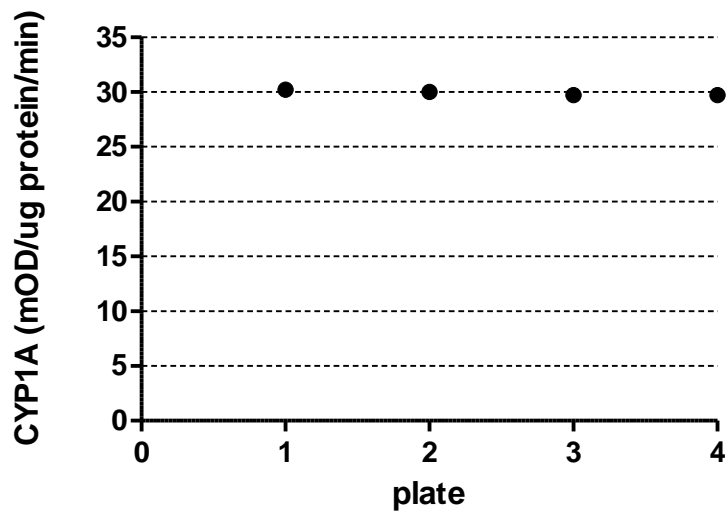
Figur 2.2: Referanseplot for proteinkonsentrasjonen (mg/ml) til referanseprøven som ble brukt på 3 mikrotiterplater ved proteinbestemmelse i MT-prøvene. Plate 2 og 3 ble avlest på samme dag.

2.9 Måling av CYP1A-konsentrasjon

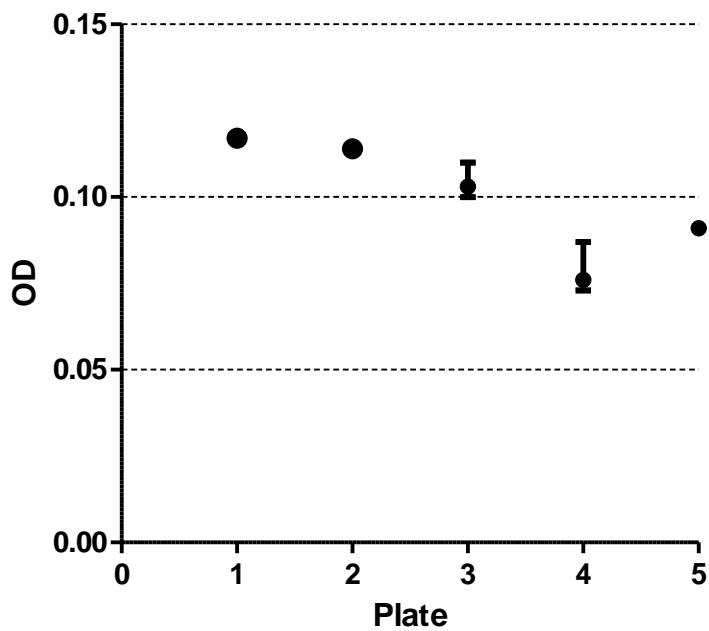
Metodene som ble benyttet for måling av CYP1A-konsentrasjon er beskrevet av Goksøyr (1991). Proteinverdiene ble brukt til å finne forholdet mellom coatingbuffer og prøve for å få en konsentrasjon på 10 µg protein/ml.

Mikrosomalfraksjonen av leverprøvene ble tint på is. Iskald coatingbuffer (karbonat-bikarbonatbuffer; 10 kapsler/l) og prøve ble blandet i rett forhold. På en Nunc Maxisorb 96-brønns mikrotiterplate ble 100 µl fortynnet prøve avsatt i 4 replikater. 4 replikater blank og 2 referanseprøver (en fra ytre og en fra indre fjord) ble avsatt på hvert brett. Prøvene inkuberte over natten (>16 t) ved 4 °C med tape over. Brettene ble vasket 3 ganger med TTBS (20 mM Trisbuffer, pH 8,5 ved 25 °C med 0,5 M NaCl og 0,5 ml/l Tween-20), pH 8,7 i en platevasker (Skan Washer 300, Skatron Instruments). Alle brønnene, unntatt 1A og 1B (blank) ble tilsatt 300 µl TTBS med 1 % BSA. Brettene ble inkubert i 60 minutter og vasket 3 ganger med TTBS. De samme brønnene ble tilsatt 100 µl primært antistoff av antifisk (CP226) fortynnet 1: 1000 i antistoffbuffer (TTBS med 0,1 % BSA). Brettene inkuberte over natten (>16 t) ved 4 °C med tape over. Brettene ble vasket 3 ganger med TTBS. De samme brønnene ble tilsatt 100 µl sekundært antistoff (Sigma geit anti-kanin IgG konjugert med HRP). Brettene ble inkubert i 6 timer ved 4 °C med tape over og vasket 5 ganger med TTBS. Alle brønner ble tilsatt 100 µl TMB Plus (Kem-en-Tec Diagnostics) og satt mørkt til inkubering i 15 minutter (tiden ble notert) ved romtemperatur. 1 M H₂ SO₄ ble tilsatt og absorbansen umiddelbart målt ved 450 nm på en plateleser. Programvaren var SOFTmax v2.32 1992.

Referanseverdiene (Figur 2.3) ble kontrollert og resultatene korrigert ut fra gjennomsnittsverdien til en av de to referanseprøvene (IF15). Absorbansen til referanseprøven (IF35) under proteinbestemmelsen ble registrert (Figur 2.4) for å kontrollere analysens stabilitet.



Figur 2.3: Referanseplot for CYP1A-konsentrasjonen (mOD/ μ g protein/min) til referanseprøven som gikk igjen på 4 mikrotiterplater. Alle plater ble avlest samme dag.



Figur 2.4: Referanseplot med proteinabsorbansen (OD) til 3 replikater av referanseprøven (median med avvikene verdier) som ble brukt på 5 mikrotiterplater ved proteinbestemmelse i CYP1A-prøvene. Alle prøver ble målt samme dag.

2.10 Måling av EROD aktivitet

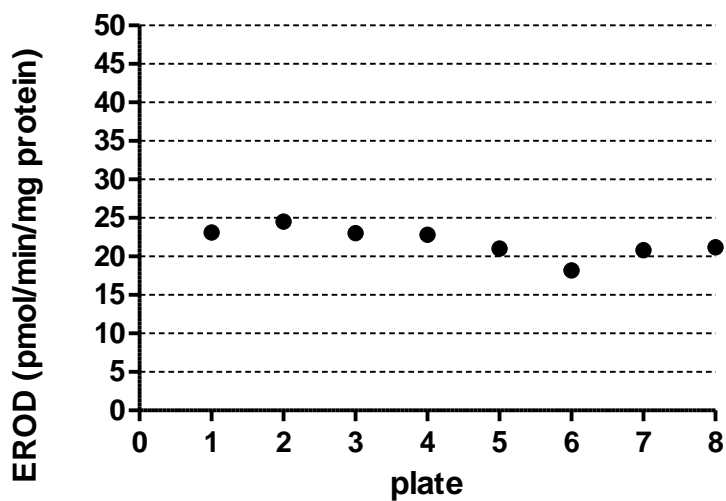
Ved måling av EROD-aktivitet i mikrosomalfraksjonen av lever, ble det benyttet en metode basert på Burke og Mayer (1974) som har blitt videreutviklet for plateleser av Eggens et al. (1992).

Standardløsning 1 mM resorufin (235,2 g/l DMSO) ble fryst ned i porsjoner ved -80°C . Tilsvarende med 0,2 mM resorufin etyleter (48,4 g/l DMSO). Begge løsningene ble laget i mørke. En 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 8,0 ble laget og oppbevart i kjøleskap. 4,8 mM NADPH (4 mg/ml kaliumfosfatbuffer) ble fryst ned i porsjoner på forhånd.

For å finne eksakt konsentrasjon, ble resorufinstandarden (både 0,32 μM og 10 μM) kalibrert ved å måle absorbansen ved 572 nm i en plateleser. Reaksjonsblandingen (0,015 ml resorufin etyleter/ml kaliumfosfatbuffer) ble kalibrert tilsvarende ved 450 nm.

Prøvene ble tint på is og fortynnet til ca 2 mg/ml i iskald buffer ut fra proteinverdiene. En standardrekke (0,32- 0,16- 0,08- 0,04- 0,02- 0,01 μM i buffer) med 10 μl standard i duplikater ble pipettert ut på en svart 96-brønns mikroplate med klar bunn (Greiner Bio One). Seks brønner ble tilsatt 50 μl prøve. Tre av disse ble tilsatt 10 μl 0,32 μM standard som spike for å hindre quench. En referanseprøve gikk igjen på hvert brett. Ti brønner ble tilsatt buffer som blank. Mikrotiterplaten ble tatt av isen. Nyttint NADPH ble fortynnet til 2,4 mM i buffer. Prøvene og blanken ble tilsatt 200 μl romtemperert reaksjonsblanding før 25 μl NADPH ble tilsatt de samme brønnene. Fluorescensen ble umiddelbart avlest i 8 steg i ca 4,5 minutter med eksitasjon 538 nm og emisjon 584 nm i en plateleser. Under hele prosedyren ble det arbeidet uten direkte lys.

Et referanseplott ble laget for referanseprøven som gikk igjen på alle brettene under analysen av EROD-aktivitet (Figur 2.5). Referanseplottet for proteinbestemmelsen i CYP1A-prøvene gjelder også for EROD (Figur 2.4).



Figur 2.5: Referanseplot med EROD- aktiviteten (pmol/min/mg protein) til referanseprøven som gikk igjen på 8 ulike mikrotiterplater. Plate 1-4 og 5-8 ble avlest på to ulike dager.

2.11 Analyse av PAH-metabolitter

HPLC (high-performance liquid chromatography) med fluorescens-detektor ble benyttet til analyse av PAH-metabolitter i galle. HPLC-analysene og opparbeidelsen av prøvene er basert på Krahn et al. (1992), og detaljene er beskrevet i Grung et al. (2009).

Galleprøvene ble tint og holdt på is. Et eppendorfrør ble tilsatt 50 µl destillert vann, 20 µl galle og 10 µl internstandard av trifenylamin. Tilsatt galle og internstandard ble veid før 20 µl av enzymet β-glukorinidase/arylsulfatase ble tilsatt. Prøvene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i 1 time. Prøvene ble tilsatt 200 µl metanol og sentrifugert med 13 000 x g i 10 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble overført til HPLC-rør og satt i fryseren ved -21 °C. Det ble laget en blankprøve med vann i stedet for galle og to fortynninger (1:100 og 1:1000) av en sertifisert referanseprøve (BCR 720; 52 000 ng/g, fra IRMM). Opparbeidelsen frem til enzymbehandlingen foregikk i mørke.

HPLC-systemet som ble benyttet besto av en Waters 2695 separasjonsmodul (injektor og pumpe) med en 2475 fluorescens detektor tilkoblet. Kolonnen som ble benyttet var en Waters PAH C₁₈ (4,6 x 250 mm) med 5 µm partikler. Mobilfasen var en gradient som startet på 40: 60 acetonitril: vann og endte på 100 % acetonitril i løpet av 30 minutter.

Gjennomstrømningshastigheten var på 1 ml/min, og kolonnen ble varmet opp til 35 °C.

Injektortemperaturen var 4⁰ C. For hver analyse ble 25 µl ekstrakt injisert. Fluorescensen (eksitasjon/emisjon) ble målt på optimum for hver enkelt komponent:

2-hydroksynaftalen (eks/em; 290/335 nm)

1- hydroksyfenantren (eks/em; 256/380 nm)

1- hydroksypyren (eks/em; 346/384 nm)

Internstandard (trifenylamin) (eks/em; 300/360 nm)

3- hydroksybenzo(a)pyren (eks/em; 350/430 nm)

En standardrekke (0,2- 1- 5- 10- 50- 100- 200 ng/g) av BCR 720 ble benyttet til å kvantifisere PAH- metabolittene. Deteksjonsgrensen ble satt til:

2-hydroksynaftalen: 1000 ng/g

1- hydroksyfenantren: 1ng/g

1- hydroksypyren: 1 ng/g

3- hydroksybenzo[a]pyren: 1,8 ng/g

Sertifisert verdi for 1-OH-pyren i referanseprøven var 520 ng/g ± 90 ved fortyning 1: 100. En kalibreringsstandard ble avlest for hver 10. prøve for å registrere eventuell apparatdrift.

2.12 Cometanalyse (enkelcelle gelelektroforese)

Prosedyren som ble fulgt for Cometanalysen var en alkalisk versjon av enkeltcelle gelelektroforese basert på metode av Sing et al. (1988) og i henhold til presiseringer fra Tice et al. (2000).

Blodprøvene som ble brukt var fortynt 1:10 med PBS med 10 mM EDTA pH 7,4 og holdt på is. Blodprøvene fikk to ulike behandlinger; innstøping i agarose med lagring i lyseringsbuffer eller en langsom nedfrysing. I sistnevnte behandling ble 50 µl prøve overført til 450 µl frysemedium i et kryorør, satt i en boks kalt Mr. Frosty og plassert i fryser ved -20⁰C. I Mr. Frosty stakk prøvene ned i isopropanol, og det gjorde at prøvenes temperatur sank med 1⁰C i minuttet. Etter ca 40 minutter, ble prøvene lagt i flytende nitrogen. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -80⁰ C i 14 måneder.

For innstøping i agarose ble 5 µl blod tilsatt 195 µl iskald PBS med 10 mM EDTA og oppbevart på is. Agarosegelen ble laget ved å ha 75,8 mg LMP-agarose i 10,1 ml PBS. Blandingen ble forsiktig varmet i en mikrobølgeovn. Agarosens temperaturen ble holdt stabil på ca 37 °C på en varmet aluminiumsblokk. Den fortynnede blodprøven ble tilsatt agarose i forholdet 1:10, og 10 µl ble støpt ut på en 11 x 7,5 cm membran (GelBond®film). Hver prøve ble avsatt på to filmer. Filmene lå på et iskaldt metallbrett ved utstøping. Det var ca 1 cm mellom hver prøve.

Når prøvene var innstøpt, ble membranene nedsunket i et plastbeger med lokk tilsatt kald (4 °C) lyseringsbuffer (150 ml lyseringstock (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisbase, NaOH; 8,3 g/l, N-Lauroylsarcosin natriumsalt; 11,24 g/l) 16,7 ml DMSO og 1,67 ml Triton X-100), pH 10,2. En stor binders holdt membranene fra hverandre (2 stk/boks). Plastbegrene ble oppbevart i kjøleskap om bord og på kjølerom 8 dager før videre prosessering.

De nedfryste prøvene ble tatt ut randomisert og overført frosne til 10 ml iskald PBS med 10 mM EDTA uten Ca og Mg, pH 7,4. De ble deretter sentrifugert i 10 minutter på 400 x g ved 4 °C i 15 ml koniske rør fra NUNC. Supernatanten ble helt av. Pelleten ble tilsatt 10 ml iskald PBS med 10 mM EDTA, blandet godt og satt på is. Prøven ble tilsatt 0,75 % softagar i PBS med 10 mM EDTA med temperatur 37 °C i forholdet 1: 10. 7,5 µl ble støpt ut på en film i 2 replikater pr prøve. Tilsvarende på en film som skulle enzymbehandles. Filmene lå på kjøleblokk ved utstøping i dunkel belysning. De ble festet til en ramme og satt ned i 300 ml kald lyseringsbuffer pH 10,0 over natten ved 4 °C.

Filmene med lyserte blodceller ble vasket med Collinsbuffer (40 mM Hepes, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA), pH 7,6 ved 4 °C. En film ble senket i et kar med 40 ml Collinsbuffer i 10 minutter før den ble overført til et nytt kar med samme innhold i 50 minutter. Filmene ble overført til små kar med 50 ml Collins buffer (37 °C). Filmene som skulle enzymbehandles ble tilsatt 0,7 µg/ml foramidopyrimidin DNA glycosylase råekstrakt (fpg). Alle ble satt i varmeskap 37 °C i 1 time.

Etter enzymbehandling ble filmene lagt i kar med 50 ml kald elektroforesebuffer (1,08 l dH₂O, 0,12 l elektroforesestock (NaOH; 120 g/l, EDTA; 3,72 g/l)), pH 13,2 i 5 minutter. Deretter overført til et nytt kar med samme innhold i 35 minutter. Alt foregikk på kjølerom. 1500 ml elektroforesebuffer (8-9 °C) ble tilsatt elektroforesekaret. 4 filmer ble plassert midt i hvert kar. Gelelektroforesen ble utført i 20 min med spenning på 25 V og strømstyrke 0,8A.

Filmene ble skyllet to ganger i nøytraliseringsbuffer i 5 minutter (Tris-base; 48,5 g/l), pH 7,5 før de ble skylt i destillert vann 1 minutt. De ble fiksert ved å skylles i et etanolbad i 5 minutter og i et nytt etanolbad i 1,5 timer. Filmene ble tørket noen timer i en skuff og lagret mørkt med skillpapir mellom. Etter elektroforesen holdt alle væsker romtemperatur. Fra og med elektroforesen ble det arbeidet med prøvene i mørke.

Før scoring av kometer ble filmene farget med fluoriserende SYBR[®] Gold nukleinsyre gelfarge. 20 µl SYBR Gold (fortynnet 10000 x i DMSO) var på forhånd fryst ned (-20 °C) i porsjoner i eppendorfrør tilsatt 1 ml TE-buffer (5 ml 0,2M EDTA-natriumsaltløsning, 20 ml 0,5 M Tris-syre, dH₂O til 1 liter), pH 8,0. SYBR Gold ble tint rett før bruk og tilsatt et lite plastkar med 24 ml TE-buffer ved romtemperatur. Filmen ble farget i 20 minutter på en ristemaskin og deretter skylt i et kar med 50 ml dH₂O i 1 minutt. Filmen ble klipt i to og lagt på et pleksiglass. Et dekkglass ble forsiktig plassert over med noen dråper vann i mellom for å unngå luftbobler. Filmer som ikke skulle scores umiddelbart, ble lagt i kjøleskapet i en mørk boks tilsatt fuktet papir. Før farging ble et rutenett risset inn med en skalpell på filmen for å markere skillet mellom gelene. Alt arbeid med SYBR Gold og filmene samt cometscoringen, ble utført i et mørkt rom.

Ved scoring ble det brukt et fluorescens mikroskop (LEICA DMR) tilknyttet en kvikksølvlampe (edg 100 ISOLATED) og et kamera (Stingray). Eksitasjonsfilteret var 520 nm og barrierefilteret på 610 nm. Objektivforstørrelsen var 40 x og mikroskopet var innstilt på photo ved scoring for å få rett intensitet. Halelengde og haleintensitet (relativ % DNA i halen) ble registrert. Programvaren var Comet assay IV. Mikroskopets øvrige innstillinger følger i vedlegg 7.

Femti tilfeldig valgte celler ble scoret for hver gel ved å markere midt i hodet av kometen. Replikatgelen ble bare benyttet hvis det ikke var nok egnede celler i første replikat. Kun de nedfryste prøvene hadde teknisk replikat. I henhold til Tice et al. (2000), ble ikke celler nær kanten av gelen scoret. Celler som lå for nærme hverandre slik at de kunne ha overlappende kometer, ble unngått. Før scoring av celler i kanten av bildet ble det sjekket at det ikke lå noen celler i nærheten før scoring. Mange av prøvene hadde en del fragmenter av skadde celler mellom cellene. Disse ble unngått, men der det var mest fragmenter måtte noen aksepteres for å få scoret nok celler. Mange av de nedfryste cellene hadde svært liten kjerne, veldig stort areal og lav intensitet som karakteriserer apoptotiske celler (Tice et al., 2000). Men det ble ikke gjort vurdering eller bortvelging av eventuelle apoptotiske celler da mange hadde dette

utseende. Programmet hadde problemer med å fange hele arealet i noen slike celler. Det ble ikke gjort noe manuelt for å påvirke dette, men cellene der kun hodet ble registrert ble utelukket. Scoringen ble i stor grad utført randomisert og blindt.

2.13 Acetylcholinesterase hemming i muskel

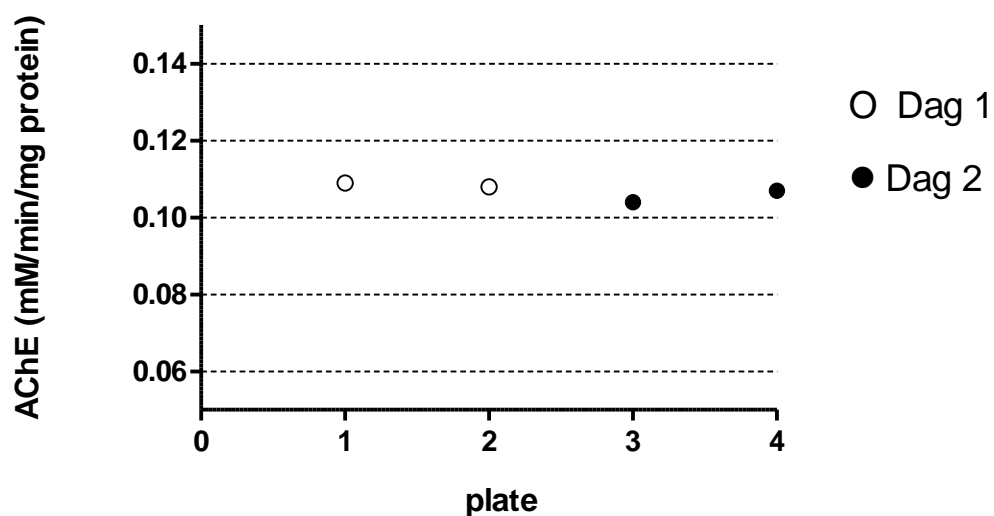
Til å måle acetylcholinesterase (AChE)-hemming i muskel ble det brukt en mikroplatemetode basert på Ellman (1961) som ble modifisert av Herbert et al. (1995).

Randomiserte muskelfiletrøver ble veid frosne og delt til vekten var ca 1,0 g. Fileten ble umiddelbart lagt i 7 ml rør på is og tilsatt iskald 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2 til totalt volum 5 ml. Prøvene ble homogenisert på is med en ultraturax homogenisator (PRO 200) ved 25 000-35 000 rpm i 1,5 min. Generatoren var 7 mm x 75 mm. Homogenatet ble sentrifugert ved 5 000 x g i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fryst ved -80 °C.

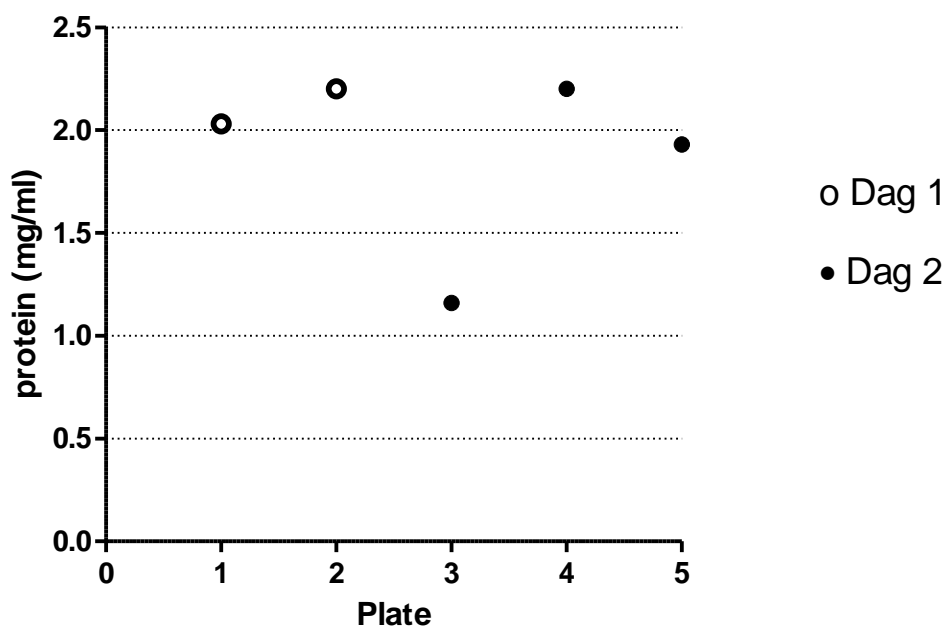
Ved analysen ble prøvene tint på is og fortynnet 1: 10 med iskald 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2. Prøven ble avsatt i 4 replikater av 50 µl på en flatbunnet 96-brønns mikrotiterplate (Falon) og tilsatt 250 µl AChE reagens (30 ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer, 0,2 ml 0,075 M ATC og 1,0 ml 0,01 M DTNB (DTNB; 3,96 mg/ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2 tilsatt 1,5 mg/ml natriumhydrogenfosfat)). 4 replikater av kaliumfosfatbufferen ble brukt som blank. En referanseprøve gikk igjen på hvert brett. Platene ble inkubert 5 minutter ved 25 °C i en plateleser før absorbansen ble avlest ved 414 nm hvert 2. minutt i 10 minutter med resting mellom hver avlesing. ATC, DTNB og AChE-reagensen ble laget fersk hver dag og alle ble holdt mørkt.

Resten av den fortynnede prøven ble fryst ned og senere analysert for protein som beskrevet tidligere. Fortynningen i trisbuffer var 1: 4.

En referanseprøve (IF12) gikk igjen på de fire mikrotiterbrettene som ble brukt under analysen av AChE-aktiviteten. Verdiene ble satt opp i et referanseplot for å kontrollere stabiliteten til analysen (Figur 2.6). En referanseprøve (YF13) gikk igjen på alle mikrotiterplatene under proteinbestemmeslen i AChE-prøvene. Proteinkonsentrasjonene som ble målt, ble også satt opp i et referanseplot (Figur 2.7).



Figur 2.6: Referanseplot som viser AChE-aktiviteten (mM/min/mg protein) til referanseprøven som ble brukt på 4 ulike mikrotiterplater. Ulike dager er markert.



Figur 2.7: Referanseplot for proteinkonsentrasjonen (mg/ml) til referanseprøven brukt på 5 mikrotiterplater ved proteinbestemmelse i AChE-prøvene. Ulike dager er markert.

Alle kjemikalier, buffere og løsninger som ble benyttet under analysene gjenfinnes i vedlegg 4 og 5. Utstyrliste og instrumentinnstillinger følger i vedlegg 6 og 7.

2.14 Statistiske metoder

De statistiske analysene ble utført med statistikkprogrammene JMP 8.0 og GraphPad Prism. Alle data ble først testet for homogen varians og normalfordeling som er krav som skal oppfylles ved variansanalyse (Siegel, 1957). Homogen varians ble undersøkt med Levenes test med signifikansnivå $\alpha = 0,05$. Normalfordeling ble vurdert ut fra et grafisk normalfordelingsplot og residualplott. En toveis ANOVA-test med område og kjønn som forklaringsvariabler ble gjort for dataene som oppfylte forutsetningene. Signifikansnivået ble satt til $\alpha = 0,05$. En test i forkant viste at det ikke var noen interaksjon mellom område og kjønn. Derfor ble ikke interaksjon inkludert i ANOVA-modellen.

Ved ikke-homogen varians (1-OH-pyren, EROD) eller i datasett med uteliggere som påvirket normalfordelingen (MT, LSI og GSI) ble dataene rottransformert (EROD) eller logtransformert (de øvrige). For CYP1A som hadde ikke-homogen varians etter logtransformering og for alder, vekt og lengde som ikke var normalfordelte ble det utført en parvis ikke-parametrisk Mann-Whitney-test (Ruxton, G.D, 2006).

For 3-OH-benzo(a)pyren og 1-OH-fenantren som hadde mange verdier under deteksjonsgrensen, ble det ikke gjennomført noen statistisk test. En kategorisering i ulike verdiintervaller ble gjort for å synliggjøre spredningen i datasettet.

En ikke-parametrisk Spearman korrelasjonsanalyse ble gjort mellom alder og de ulike effektvariablene (biomarkørene) med et signifikansnivå med $\alpha = 0,05$. Samme ikke-parametriske Spearmann-korrelasjonsanalyse ble utført for å finne eventuelle korrelasjoner mellom de ulike effektvariablene (Siegel, 1957).

Forklaringsvariablene (uavhengige variabler) i denne oppgaven var område, kjønn og alder. Effektvariablene (avhengige variabler) som ble statistisk vurdert i denne oppgaven var lengde, vekt, kondisjonsfaktor, LSI, GSI, ALA-D- aktivitet, MT-konsentrasjon, CYP1A-konsentrasjon, EROD-aktivitet, 1-OH-pyren, DNA-skade og AChE-aktivitet.

Utvalgsstørrelsen ble i noen tilfeller redusert. En fisk (YF 36) var ikke med i aldersanalysene fordi otolittene var tapt. En fisk fra hvert område manglet levervekt og LSI. To fisker fra Ytre Oslofjord manglet gonadevekt og dermed GSI. ALA-D-resultater fra 17 fisk fra Ytre og 16 fra Indre Oslofjord manglet pga feil under analysen. Ved PAH-målingene manglet galleprøve fra en fisk fra Indre Oslofjord. Utvalgsstørrelsen ble mye redusert ved måling av DNA-skade. Det skyldtes for stor tetthet av blodceller oppbevart på lysusbuffer og for stor skade på

nedfryste blodceller slik at scoring ble umulig. Alle rådata og bearbeidede data for de enkelte fiskene følger i vedlegg 2 og 3.

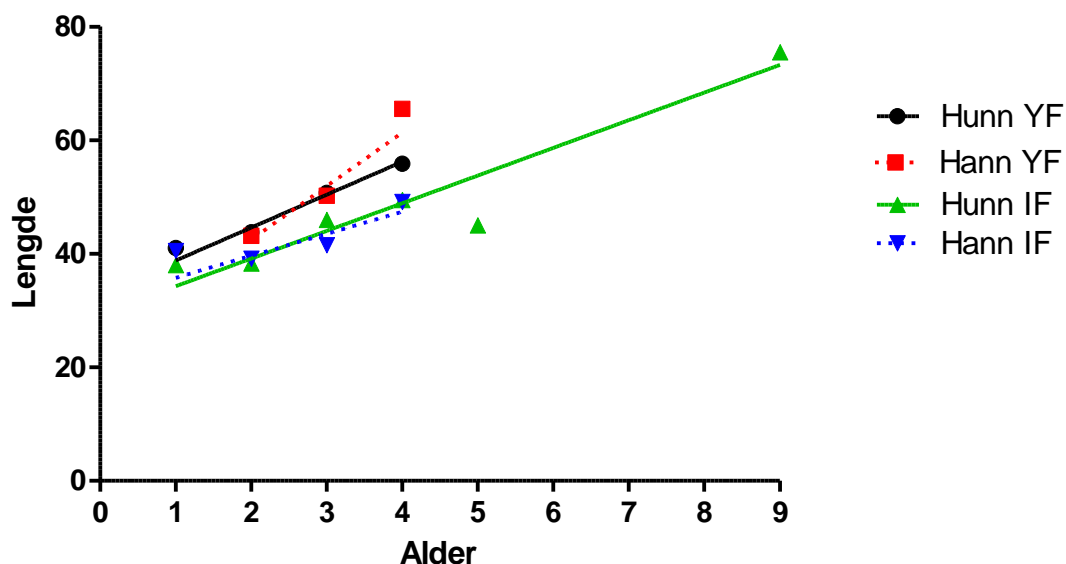
3 Resultat

3.1 Fysiologiske parametere

Det var ingen signifikante aldersforskjeller mellom kjønn innenfor et område (Mann-Whitney; Ytre: $p=0,28$, Indre: $p=0,29$). Det var heller ingen signifikant aldersforskjell mellom samme kjønn fra de to områdene (Mann-Whitney; hunner: $p=0,72$, hanner: $p=0,89$).

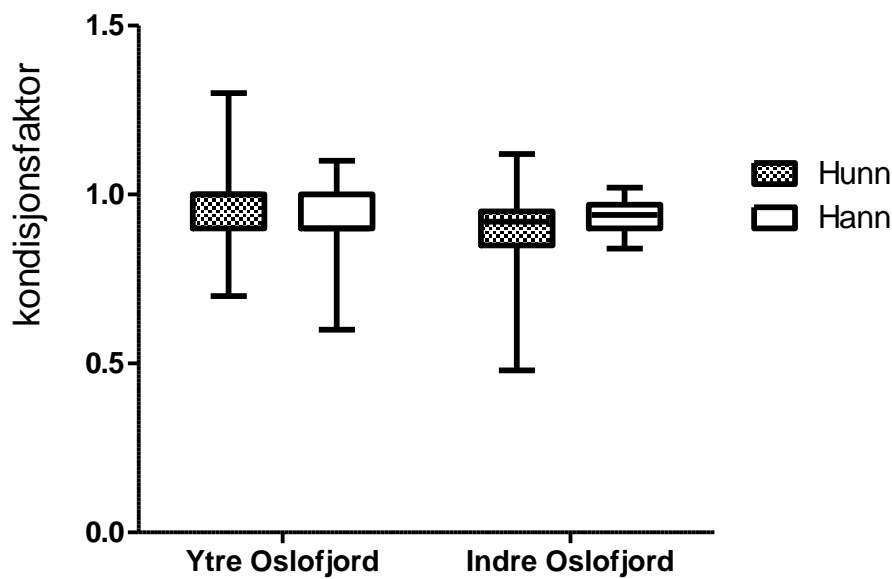
Det var ingen signifikante forskjeller i vekt mellom kjønnene innenfor et område (Mann-Whitney; Ytre: $p=0,53$, Indre: $p=0,56$). Hunner og hanner i Ytre Oslofjord veide signifikant mer enn samme kjønn i Indre Oslofjord (Mann-Whitney; hunn: $p=0,007$, hann: $p=0,005$) (Tabell 2.2).

Det var ingen signifikante forskjeller i lengde mellom kjønnene innefor ett område (Mann-Whitney; Ytre: $p=0,43$, Indre: $p=0,30$). Hunner og hanner fra Ytre Oslofjord var signifikant lengre enn samme kjønn i Indre Oslofjord (Mann-Whitney; hunn: $p=0,018$, hann: $p=0,0066$).



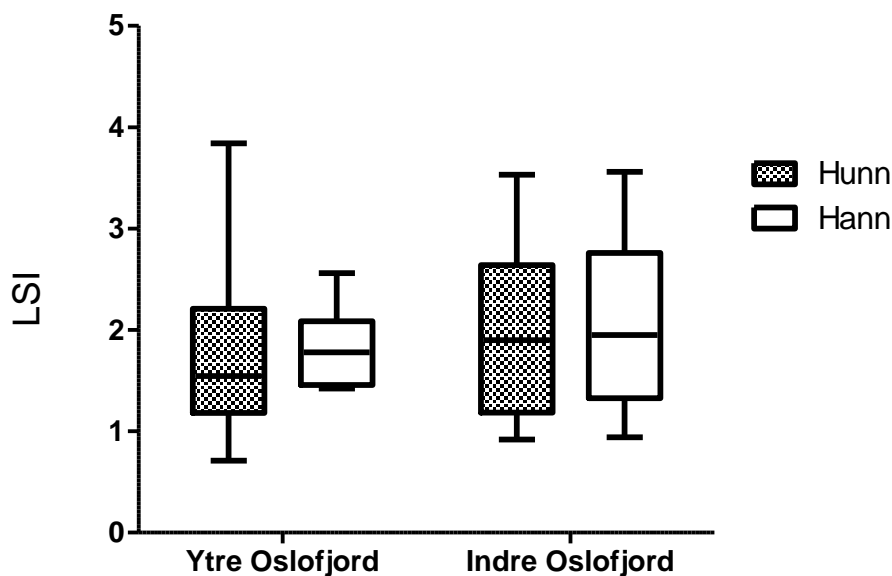
Figur 3.1: Korrelasjonen mellom alder (år) og lengde (cm) hos hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord. Punktene viser gjennomsnittslengden ved hver alder.

Det var ingen signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor mellom områdene ($p=0,26$) eller kjønn ($p=0,75$) i en toveis ANOVA- test. Variasjonsbredden var størst hos hunner, men forskjellen mellom kjønnene er kun markant i Indre Oslofjord (Figur: 3.2).



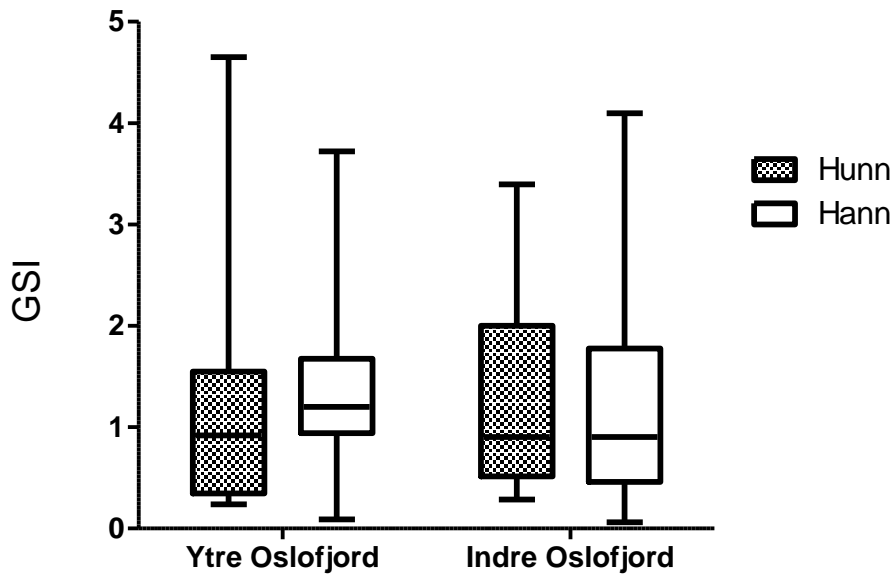
Figur 3.2: Kondisjonsfaktoren ($100 \times \text{vekt} / \text{lengde}^3$) til hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler og maks- og minimumverdier.

Det var ingen signifikante forskjeller i leversomatisk indeks (LSI) mellom områdene ($p=0,37$) og kjønn ($p=0,26$) i en toveis ANOVA-test på logtransformerte data. Det var betydelig større spredning i LSI hos hunner i Ytre Oslofjord enn hos hanner, mens spredningen mellom kjønnene i Indre Oslofjord var lik (Figur 3.3)



Figur 3.3: Leversomatisk indeks ($LSI= 100 \times \text{levervekt} / \text{kroppsvekt}$) for hunn- og hannfisk i Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

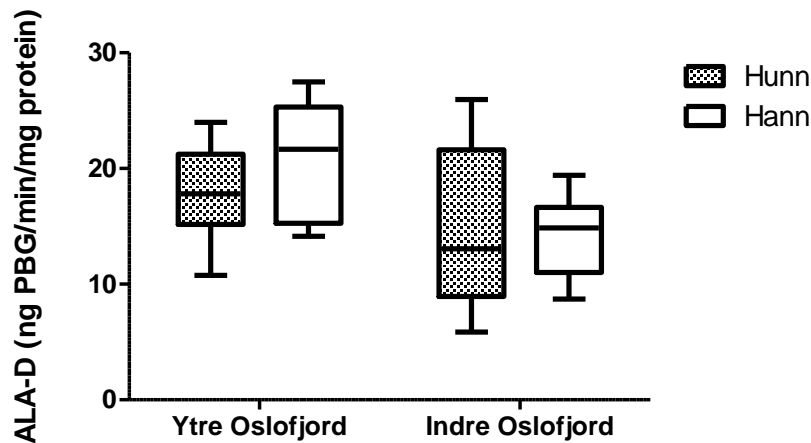
Det var ingen signifikante forskjeller i gonadesomatisk indeks (GSI) mellom områdene ($p=0,86$) eller kjønn ($p=0,92$) i en toveis ANOVA- test på logtransformerte data. Det var stor spredning i GSI i alle grupper med høye maksimumsverdier (Figur 3.4)



Figur 3.4: Gonadesomatisk indeks (GSI= 100 x gonadevekt/kroppsvekt) for hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

3.2 Aminolevulinsyredehydrogenase (ALA-D) aktivitet i røde blodceller

Det var signifikante forskjeller i ALA-D aktivitet i røde blodceller mellom områdene ($p=0,0035$), men ikke mellom kjønn ($p=0,47$) i en toveis ANOVA- test. ALA-D aktiviteten var høyest i Ytre Oslofjord (Figur 3.5). Det var stor spredning i ALA-D aktivitet hos hunner i Indre Oslofjord hvor kvartilbredden var størst og de laveste verdiene ble registrert i tillegg til de nest høyeste.

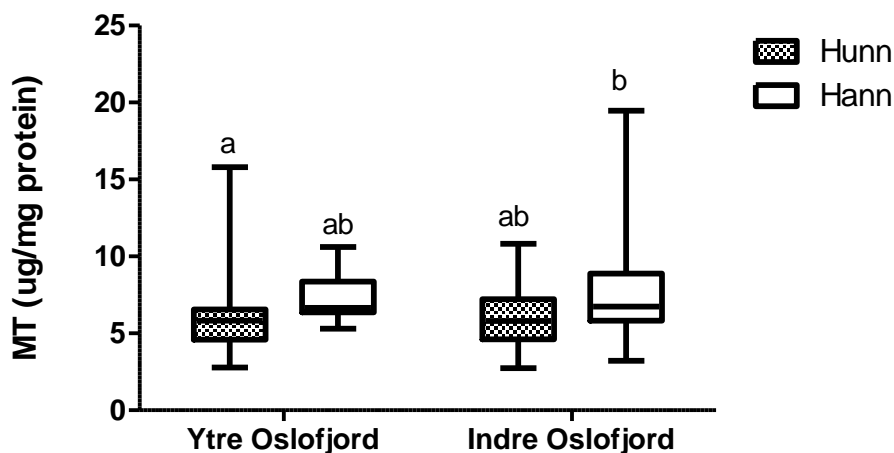


Figur 3.5: ALA-D aktiviteten (ng PBG/min/mg protein) i røde blodceller hos hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

3.3 Metallotionein (MT) i lever

Det var signifikant forskjell i MT-konsentrasjonen i lever mellom kjønn ($p=0,0031$), men ikke mellom områdene ($p=0,78$) i en toveis ANOVA-test på logtransformerte data.

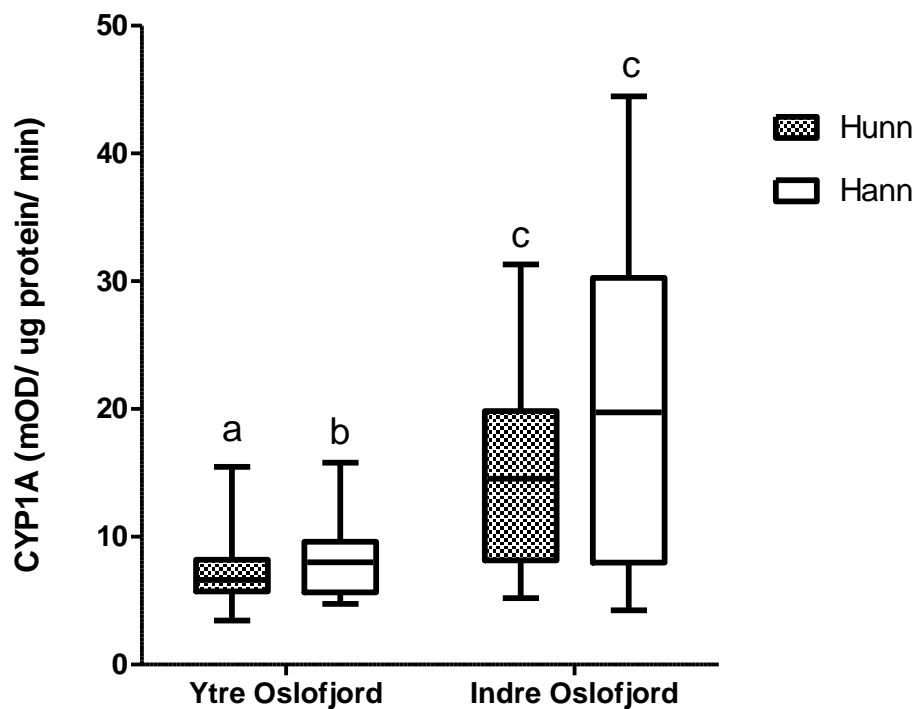
Medianverdiene var høyere hos hannfisk enn hunnfisk i begge områdene og medianene innen samme kjønn var nær lik i de to områdene. Variasjonsbredden var stor hos hunner i Ytre Oslofjord og i hanner fra Indre Oslofjord. Høye maksimumsverdier ble registrert i disse gruppene (Figur 3.6).



Figur 3.6: Metallotioneinkonsentrasjonen i lever ($\mu\text{g MT/mg protein}$) hos hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord presentert som median, kvartiler samt maks- og minimumsverdier. Like bokstaver indikerer ikke-signifikant forskjell, mens ulike bokstaver viser signifikant forskjell.

3.4 CYP1A- konsentrasjon i lever

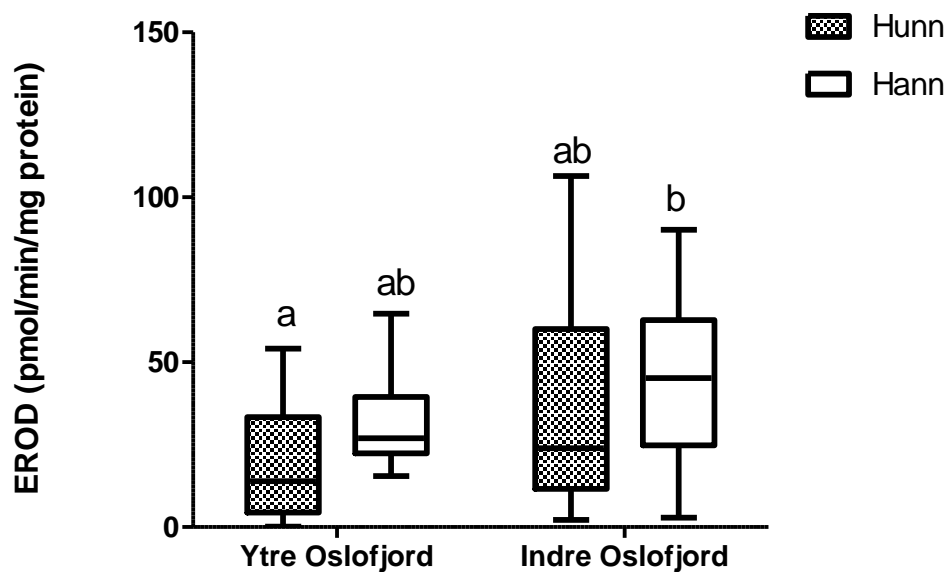
Det var signifikante forskjeller CYP1A-konsentrasjonen i leveren mellom kjønnene i Ytre Oslofjord, men ikke mellom kjønnene i Indre Oslofjord (Mann-Whitney: Ytre: $p=0,0432$, Indre: $p=0,1014$). Hunner og hanner fra Indre Oslofjord hadde signifikant mer CYP1A-konsentrasjon enn samme kjønn i Ytre Oslofjord (Mann-Whitney: hunn: $p=0,018$, hann: $p=0,0051$). Det var større spredning i Indre Oslofjord med stor variasjonsbredde og kvartilbredde for begge kjønn, men mest markant for hanner (Figur 3.7).



Figur 3.7: CYP1A- konsentrasjonen i lever (mOD/ μ g protein/min) hos hunn- og hannfisk i Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartile samt maks- og minimumverdier. Like bokstaver indikerer ikke- signifikant forskjell, mens ulike bokstaver viser signifikant forskjell.

3.5 EROD- aktivitet i lever

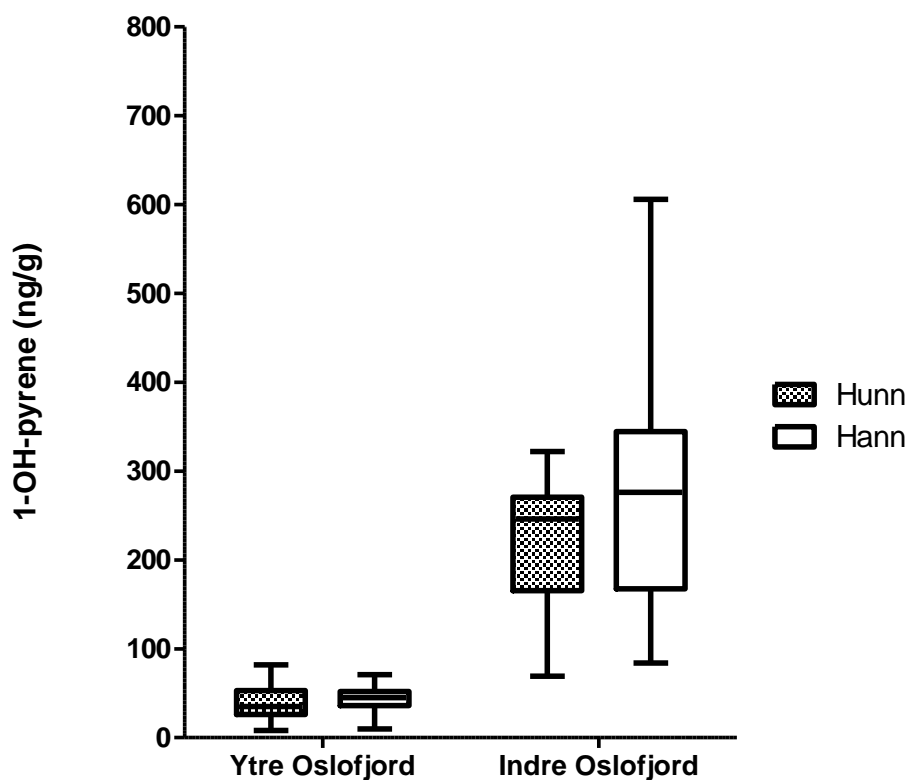
Det var signifikante forskjeller i EROD-aktiviteten i lever mellom de to områdene ($p= 0,025$) og mellom ulike kjønn ($p= 0,039$) i en toveis ANOVA-test på rottransformerte data. EROD-aktiviteten var høyest i Indre Oslofjord (Figur 3.8). Spredningen var størst i Indre Oslofjord og større hos hunner enn hanner i dette området (Figur 3.8).



Figur 3.8: EROD-aktivitet i lever (pmol/min/mg protein) hos hunn- og hannfisk i Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier. Like bokstaver indikerer ikke- signifikant forskjell, mens ulike bokstaver viser signifikant forskjell.

3.6 PAH-metabolitter i galle

En toveis ANOVA-test med område og kjønn som forklaringsvariabler viste at det var signifikant forskjell i 1-OH-pyrenkonsentrasjonen i gallen hos fisk fra Ytre Oslofjord og i gallen fra fisk i Indre Oslofjord ($p= <0,0001$), men ingen signifikant forskjell mellom kjønn ($p= 0,064$). 1-OH-konsentrasjonen var høyest i Indre Oslofjord (Figur 3.9). Det var størst spredning i Indre Oslofjord, med størst variasjons-og kvartilbredde hos hannene (Figur 3.9).



Figur 3.9: Konsentrasjonen av 1-OH-pyren i galle (ng/g) i hunn og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

For en stor andel av fiskene fra både Ytre og Indre Oslofjord var konsentrasjonene av gallemetabolitten 3-OH-benzo(a)pyren under deteksjonsgrensen på 1,8 ng/g. I Ytre Oslofjord hadde 89 % av hunnene og 100 % av hannene verdier under deteksjonsgrensen, mot henholdsvis 75 % og 76 % i Indre Oslofjord (Tabell 3.1).

Tabell 3.1: Antall og prosentandelen hunn- og hannfisk fra Ytre (YF) og Indre Oslofjord (IF) som hadde 3-OH-benzo(a)pyren-konsentrasjoner (ng/g) innenfor ulike intervaller av konsentrasjoner målt i gallen.

	Under deteksjonsgrensen (1,8 ng/g)		< 1,8- 4 ng/g		< 4- 6 ng/g		Totalt (n)
	Antall	Prosent	Antall	Prosent	Antall	Prosent	
Hunn YF	24	88,9	2	7,4	1	3,7	27
Hann YF	13	100	0	0	0	0	13
Hunn IF	12	75,0	4	25	0	0	16
Hann IF	16	76,2	4	19,0	1	4,8	21

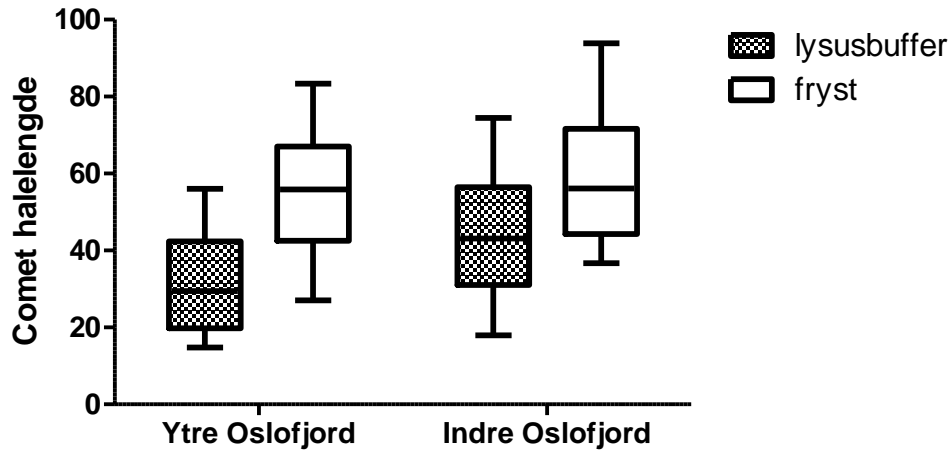
Måling av gallemetabolitten 1-OH-fenantren viste at det var høyere konsentrasjoner i fisk fra Ytre Oslofjord enn i fisk fra Indre Oslofjord. To hunner fra Ytre Oslofjord hadde verdier innenfor det høyeste konsentrasjonsintervallet fra 10-15 ng/g. Prosentandelen fisk innenfor de ulike konsentrasjonsintervallene var ellers like for begge kjønn innenfor samme område. Andelen fisk fra Ytre Oslofjord var større i det midtre intervallet med konsentrasjoner fra 5-10 ng/g enn fra Indre Oslofjord, henholdsvis ca 37 % og 7 %. Andelen fisk med de lavest målte konsentrasjonene fra 1-5 ng/g varierte ikke så mye mellom de to områdene. Ca 70 % fisk hos begge kjønn fra Indre Oslofjord hadde verdier under deteksjonsgrensen på 1,0 ng/g mot ca 30 % for fisk av begge kjønn i Ytre Oslofjord (Tabell 3.2).

Tabell 3.2: Antallet og prosentandelen hunn- og hannfisk fra Ytre og Indre Oslofjord som hadde 1-OH-fenantrenkonsentrasjoner (ng/g) innenfor ulike intervaller av konsentrasjoner målt i gallen.

	Under deteksjonsgrensen (1,0 ng/g)		< 1 - 5 ng/g		< 5 - 10ng/g		< 10 - 15 ng/g		Totalt (n)
	Antall	%	Antall	%	Antall	%	Antall	%	
Hunn YF	9	33,3	6	22,2	10	37,0	2	7,4	27
Hann YF	4	30,8	4	30,8	5	38,5	0	0	13
Hunn IF	11	68,8	4	25	1	6,3	0	0	16
Hann IF	19	70,4	6	22,2	2	7,4	0	0	27

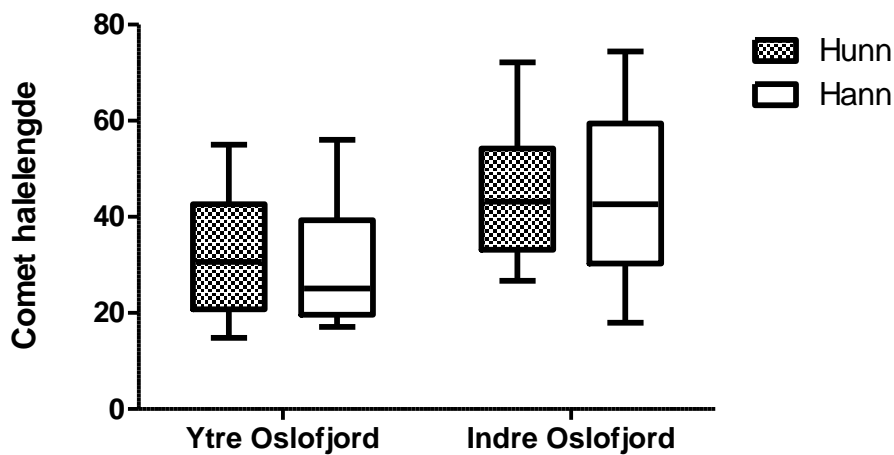
3.7 DNA-skade i røde blodceller

De røde blodcellene som hadde vært nedfrost i 14 måneder hadde signifikant mer DNA-skader enn de som hadde blitt oppbevart på lyseringsbuffer i 8 dager (uparet t-test: $p=0,0071$). Medianen for DNA-skade var høyere i de fryste prøvene enn i prøvene oppbevart i lyseringsbuffer både i Ytre og Indre Oslofjord (Figur 3.10).



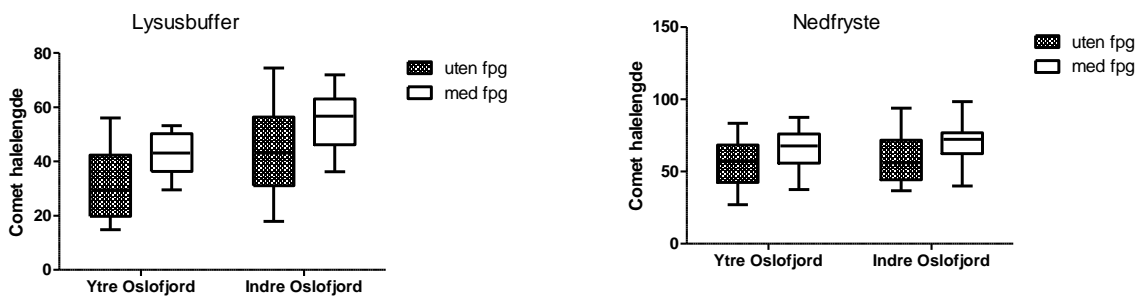
Figur 3.10: DNA-skader i blodceller som har blitt oppbevart på lyseringsbuffer og i fryser for Ytre og Indre Oslofjord. DNA-skadene er uttrykt som Comet-halelengde. (Blodcellene ble ikke enzymbehandlet.)

Det var signifikante forskjeller i DNA-skade målt i røde blodceller fra fisk fra de to områdene ($p=0,0024$), men ikke mellom kjønn ($p=0,74$) i en toveis ANOVA-test. Det var mest DNA-skade i Indre Oslofjord (3.11). Dette gjaldt blodceller oppbevart på lyseringsbuffer og som ikke fikk enzymbehandling. Medianverdiene for de andre behandlingene viste samme trenden med unntak av de fryste blodcellene uten fpg der medianverdiene var like for Ytre og Indre Oslofjord (Figur 3.12). Det var liten forskjell i spredning mellom gruppene. Spredningen var størst hos hanner fra Indre Oslofjord (Figur 3.11).



Figur 3.11: DNA- skade målt som Comet halelengde i røde blodceller oppbevart på buffer og uten fpg hos hanner og hunner fra Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

Røde blodceller behandlet med fpg hadde mer DNA-skade i begge områdene både ved buffer- og fryseoppbevaring (Figur 3.12). Netto fpg-sensitive seter var nesten lik i de to områdene når blodcellene hadde blitt oppbevart på lyseringsbuffer, mens den var noe høyere i Indre Oslofjord for nedfryste blodceller (Tabell 3.3). Netto fpg-sensitive seter beregnes ved å trekke DNA-skade med fpg fra DNA-skade uten fpg.



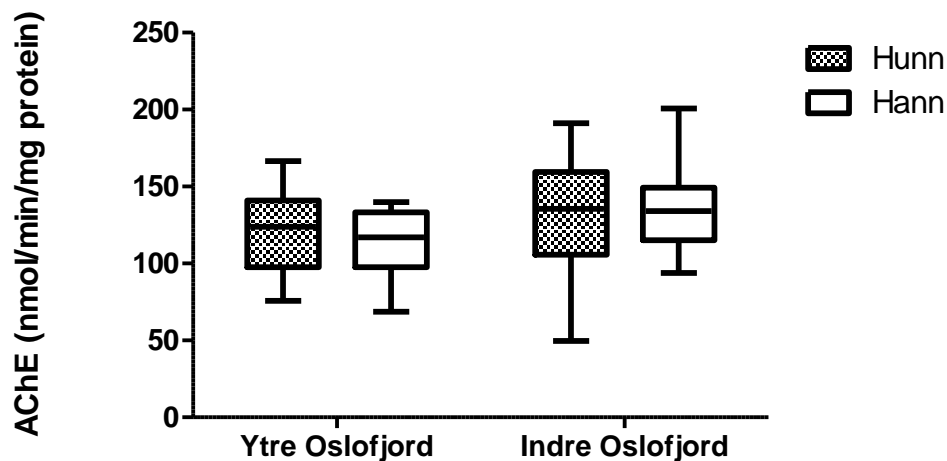
Figur 3.12: DNA-skader i røde blodceller fra Ytre og Indre Oslofjord som har blitt oppbevart på lyseringsbuffer (til venstre) og nedfryste (til høyre) og behandlet med og uten enzymet fpg. DNA-skade er uttrykt som Comet halelengde.

Tabell 3.3: Netto fpg- sensitive seter (DNA-skade med enzym minus DNA-skade uten enzym) som uttrykk for oksidative DNA-baseskader.

Behandling	Netto fpg- sensitive seter	Netto fpg- sensitive seter
	Ytre Oslofjord	Indre Oslofjord
Buffer	13,7	13,5
Nedfryste	13,1	16,1

3.8 Acetylcholinesterase-aktivitet i muskel

En toveis ANOVA-test viste at det var signifikante forskjeller i AChE-aktiviteten i muskel mellom de to områdene ($p= 0,013$), men ikke mellom kjønn ($p= 0,58$). AChE-aktiviteten var høyest i Indre Oslofjord (Figur 3.13). Spredningen var størst i Indre Oslofjord, med størst variasjonsbredde hos hunner.



Figur 3.13: AChE-aktivitet i muskel (nmol/min/mg protein) hos hunn- og hannfisk i Ytre og Indre Oslofjord presentert med median, kvartiler samt maks- og minimumverdier.

3.9 Alderskorrelasjon

En Spearman-korrelasjonsanalyse mellom alder og de ulike biomarkørene viste at det i de fleste tilfeller ikke var en signifikant samvariasjon i forhold til alder. Hos hunner fra Indre Oslofjord var det en signifikant positiv korrelasjon mellom alder og LSI, GSI og MT-konsentrasjon i lever. Hos hanner fra Indre Oslofjord var det en signifikant negativ korrelasjon mellom alder og EROD-aktivitet i lever (Tabell 3.4).

Tabell 3.4: Resultatene fra en Spearman-korrelasjonsanalyse mellom alder og alle biomarkørene i hunn- og hannfisk fra Ytre (YF) og Indre Oslofjord (IF). Signifikant korrelasjon er markert med *.

Parameter		Hunn YF	Hann YF	Hunn IF	Hann IF
LSI	R	0,2	0,04	0,5	0,0
	p-verdi	0,24	0,91	0,04*	0,99
	N	26	12	17	20
GSI	R	0,4	-0,2	0,6	-0,3
	p-verdi	0,075	0,50	0,016*	0,28
	N	26	11	17	21
ALA-D	R	-0,2	0,3	-0,1	-0,1
	p-verdi	0,38	0,42	0,76	0,70
	N	15	8	12	10
MT	R	0,0	-0,1	0,6	0,3
	p-verdi	0,99	0,66	0,015*	0,27
	N	27	12	17	21
CYP1A	R	0,3	-0,1	-0,3	-0,2
	p-verdi	0,17	0,76	0,20	0,29
	N	27	12	17	27
EROD	R	0,0	-0,2	0,1	-0,6
	p-verdi	0,96	0,47	0,60	0,0065*
	N	27	13	17	21
1-OH-pyren	R	-0,08	0,04	0,5	0,2
	p-verdi	0,70	0,89	0,072	0,46
	N	27	12	16	21
DNA-skade	R	-0,08	-0,6	0,2	-0,3
	p-verdi	0,75	0,13	0,53	0,31
	N	19	7	13	18
AChE	R	-0,23	-0,45	-0,4	-0,3
	p-verdi	0,25	0,15	0,12	0,19
	N	27	12	17	21

R: Spearman korrelasjonsfaktor, N: utvalgsstørrelse

3.10 Korrelasjonsanalyse

Tabellene 3.5 og 3.6 viser resultatet fra en ikke-parametrisk Spearman-korrelasjonsanalyse mellom alle effektvariablene som var med i oppgaven. Tabellene viser bare de variabelparene som hadde en signifikant korrelasjon i et av kjønnene innenfor et område. I Ytre Oslofjord ble det hovedsakelig funnet korrelasjon mellom de fysiologiske parameterne. I dette området var det også en positiv korrelasjon mellom EROD-aktivitet og MT-konsentrasjon hos hanner og mellom EROD-aktivitet og ALA-D i hunner. AChE-aktivitet var negativt korrelert til GSI hos hunner og også til de andre fysiologiske parameterne, men da ikke signifikant.

Tabell 3.5: Resultatet fra en Spearman-korrelasjonsanalyse mellom alle effektvariablene hos hunner og hanner fra Ytre Oslofjord. Bare resultatet der et av kjønnene viste signifikant korrelasjon er tatt med. Signifikant korrelasjon er markert med *.

Ytre Oslofjord		Hunn		Hann	
Variabel	Variabel	Korrelasjonskoeffisient	p-verdi	Korrelasjonskoeffisient	p-verdi
Lengde	Vekt	1,0	<0,0001*	1,0	<0,0001*
LSI	Vekt	0,5	0,014*	0,1	0,66
LSI	Lengde	0,4	0,044*	0,1	0,87
GSI	Vekt	0,4	0,031*	0,2	0,62
Kondisjonsfaktor	LSI	0,6	0,002*	0,3	0,26
Kondisjonsfaktor	GSI	0,4	0,024*	0,2	0,51
EROD	MT	-0,1	0,52	0,6	0,039*
EROD	ALA-D	0,6	0,021*	0,2	0,69
DNA-skade	EROD	0,6	0,0040*	0,2	0,69
AChE	GSI	-0,5	0,005*	0,1	0,68

I Indre Oslofjord var det generelt flere signifikante korrelasjoner enn i Ytre Oslofjord. Det var også flere signifikante korrelasjoner hos hunner enn hanner i begge områdene. De fleste korrelasjonene ble funnet mellom de fysiologiske parameterne eller mellom en biomarkør og en fysiologisk parameter. MT-konsentrasjon hos hunner og AChE-aktivitet i begge kjønn pekte seg særlig ut som korrelert til de fysiologiske parameterne (MT positivt og AChE negativt korrelert). Mellom biomarkørene var det hos hunner en positiv korrelasjon mellom CYP1A og både EROD-aktivitet og AChE-aktivitet og en negativ korrelasjon mellom AChE-

aktivitet og MT-konsentrasjon. Det var også en negativ korrelasjon mellom AChE- aktivitet og MT-konsentrasjon hos hanner (Tabell 3.6).

Tabell 3.6: Resultatet fra Spearman korrelasjonsanalyse mellom alle effektvariablene hos hunner og hanner fra Indre Oslofjord. Bare resultatet der et av kjønnene viste signifikant korrelasjon er tatt med. Signifikant korrelasjon er markert med *.

Indre Oslofjord		Hunn		Hann	
Variabel	Variabel	Korrelasjons- koeffisient	p-verdi	Korrelasjons- koeffisient	p-verdi
Lengde	Vekt	0,9	<0,0001*	1,0	<0,0001*
LSI	Vekt	0,6	0,006*	-0,1	0,734
LSI	Lengde	0,5	0,028*	-0,1	0,678
GSI	Vekt	0,6	0,005*	-0,2	0,278
GSI	Lengde	0,5	0,027*	-0,3	0,260
GSI	LSI	0,9	<0,0001*	0,7	<0,0001*
Kondisjonsfaktor	LSI	0,5	0,024*	0,1	0,600
Kondisjonsfaktor	GSI	0,5	0,029*	0,0	0,951
MT	Vekt	0,6	0,009*	0,1	0,598
MT	Lengde	0,5	0,031*	0,1	0,751
MT	LSI	0,6	0,014*	0,0	0,895
MT	GSI	0,5	0,048*	-0,1	0,563
MT	Kondisjonsfaktor	0,2	0,379	0,5	0,016*
CYP1A	GSI	-0,5	0,040*	0,3	0,138
CYP1A	Kondisjonsfaktor	-0,5	0,029*	0,4	0,094
EROD	Vekt	0,1	0,63	-0,5	0,015*
EROD	Lengde	0,0	0,94	-0,5	0,014*
EROD	CYP1A	0,5	0,046*	0,2	0,464
1-OH-pyren	Lengde	0,5	0,041*	0,2	0,493
1-OH-pyren	GSI	0,3	0,345	0,5	0,036*
AChE	Vekt	-0,5	0,028*	-0,5	0,033*
AChE	Lengde	-0,4	0,082	-0,4	0,044*
AChE	LSI	-0,8	<0,0001*	-0,3	0,186
AChE	GSI	-0,6	0,013*	-0,2	0,382
AChE	MT	-0,5	0,050*	-0,5	0,013*
AChE	CYP1A	0,5	0,043*	-0,1	0,606

4 Diskusjon

4.1 Effekter på fysiologiske parametere

Det var ingen signifikante forskjeller i torskens alder mellom de to områdene eller mellom kjønn. Lik alder mellom gruppene gir et godt grunnlag å sammenligne dem.

Korrelasjonsanalysen mellom alder og de ulike biomarkørene viste at alder ikke påvirket dem i betydelig grad. Alder korrelerte positivt og signifikant med LSI, GSI og MT hos hunner fra Indre Oslofjord og med EROD hos hanner fra samme område. Dette kan vise at alderen påvirker faktorene som vi måler og at det derfor er viktig med minst mulig aldersvariasjon mellom gruppene. I hunner fra Indre Oslofjord var aldersspredningen størst. Det kan være årsaken til at det var flere signifikante korrelasjoner i denne gruppen.

Hunn- og hannfisk fra Ytre Oslofjord var både signifikant tyngre og lengre enn fisk av samme kjønn fra Indre Oslofjord. Det var ingen forskjell i lengde og vekt mellom kjønnene innenfor et område. Siden fisken var både lengre og tyngre i Ytre Oslofjord tross for at alderen var lik mellom områdene, kan det indikere at det er bedre vekstforhold i ytre fjord. Bedre vekstforhold kan skyldes mindre miljøgiftbelastning. Vekst reduseres ved miljøgifteksponering fordi energiopptaket reduseres eller fordi energiforbruket øker ved detoksifisering, vevsreparasjon eller fordi fisken prøver å unnsnippe eksponering (Schlenk et al., 2008). Studier har vist at miljøgifter gir veksthemming hos fisk. Heintz et al. (2000) viste sammenheng mellom PAH-eksponering og redusert vekt hos laks.

Siden det ikke var signifikante forskjeller i kondisjonsfaktoren mellom de to områdene, kan vekstforskjellene skyldes ulikt fødeutvalg og ulik veksthastighet i to adskilte populasjoner heller enn reduserte vekstforhold og helsetilstand på grunn av miljøgifter. Olsen et al., (2004) registrerte livshistorievariasjoner og ulik lengde hos torsk fra forskjellige lokale populasjoner langs Skagerrakkysten. Hvis torskens føde er dominert av fisk, kan det gi ulik effekt på vekst i forhold til en diett dominert av evertebrater (Lee og Kahn, 1999). Lee og Kahn (1999) sammenlignet torskepopulasjoner og fant at torsk som hovedsakelig spiste fisk var større enn torsk som spiste evertebrater.

Vekt påvirkes i større grad av biokjemiske påvirkninger i fisken enn lengden. Slik vil kondisjonsfaktoren kunne speile misforholdet mellom vektøkning og lengdevekst som skyldes miljøgiftpåvirkning (Heintz et al., 2000; Poels et al., 1980). Korrelasjonsanalysen

viste at vekt og lengde var nær perfekt korrelert både i fisk fra Indre og Ytre Oslofjord. Det kan støtte at det var andre årsaker til vekstforskjellene enn miljøgifter.

Det var ingen signifikante forskjeller i leversomatisk indeks (LSI) verken mellom område eller kjønn. Det støtter antagelsen fra kondisjonsfaktoren om at det var liten forskjell i helsetilstanden til torsken fra de to områdene. Lik LSI kan fortelle at fettinnholdet i leveren og dermed næringsstatusen var lik mellom områdene (Leamon et al., 2000). LSI medianene for torsken i denne oppgaven lå nær nivået målt i torsk i et referanseområde utenfor Karmøy ($2,0 \pm 0,8$) i oktober (Aas et al., 2001). Det støtter antagelsene om at miljøgifter ikke har gitt signifikant ulik effekt på LSI i de to områdene.

Det ble registret en viss spredning i LSI-verdiene. Hunner i Ytre Oslofjord hadde størst spredning med den høyeste målte LSI-verdien, men både hunner og hanner i Indre Oslofjord hadde også variasjon i LSI-verdiene. LSI var signifikant positivt korrelert til kondisjonsfaktor i hunner fra begge områdene og det var også størst variasjon i kondisjonsfaktoren i disse gruppene. Det antyder at LSI ble redusert når kondisjonen ble dårligere. Miljøgifter kan påvirke LSI og gi variasjon. Ulik eksponering for miljøgifter kan ha bidratt til variasjonen som ble sett. I studier med torsk ble det registrert redusert LSI med økt belastning av miljøgifter som PCB-er og PAH-er (Aas et al., 2001; Goksøyr et al., 1994). Noen høye verdier ble målt for 1-OH-fenantren og MT hos hunner i Ytre Oslofjord og det kan ha påvirket LSI i denne gruppen. Det var en svak negativ korrelasjon mellom LSI og MT hos hunner i Ytre Oslofjord, men den var ikke signifikant. Hellou et al., (1992) fant en negativ sammenheng mellom metallkonsentrasjonen i lever og levervekt hos torsk. For hunner i Indre Oslofjord var det derimot en signifikant positiv korrelasjon mellom LSI og MT-konsentrasjon. En slik positiv korrelasjon ble også registrert i torsk langs norskekysten (Hylland et al., 2009). Klorerte hydrokarboner og PAH-er har også vist seg å gi økning i leverstørrelse og LSI hos fisk (Poels et al., 1980; Slooff et al., 1983). Dette viser at miljøgifter kan påvirke LSI og bidra til variasjon, men det er vanskelig å se en klar sammenheng. Det ser også ut til å være artsforskjeller. I to områder med ulik dioksinbelastning ble LSI målt i både skrubbe og torsk. Selv om forskjellen i LSI ikke var signifikant mellom områdene, så det ut til at LSI i torsk lå lavest i det mest belastede området, mens motsatt ble registret i skrubbe (Hylland et al., 2006). LSI har vist seg å variere gjennom året og påvirkes av næringstilgang og kjønnsmodning og det kan forklare noe av variasjonen som er observert (Slooff et al., 1983; Aas et al., 2001; Hylland et al., 2006).

Goksøyr et al. (1994) fant at fettinnholdet i leveren økte med belastningen av miljøgifter og at fettinnholdet speilte miljøgiftbelastningen bedre enn LSI.

Det var ingen forskjell i GSI mellom områdene eller kjønnene. GSI sier noe om reproduksjonsstatusen og kjønnsmodningen til fisken. Lik GSI og dermed lik reproduksjonsstatus gir bedre grunnlag for å sammenligne gruppene. Biomarkørene som MT-konsentrasjon og EROD-aktivitet viser årstidsvariasjoner knyttet til gonadutvikling og kjønnsmodning (Hylland et al., 1992; Andersson og Förlin, 1992). Slik kan en variasjon i GSI påvirke resultatene, og GSI bør derfor være så lik som mulig hos fiskene som sammenlignes.

Spredningen var stor i alle gruppene med noen høye GSI-verdier. Høye verdier indikerer at noen var kommet lengre i oppbyggingen av gonader til gyting og lave verdier kan tilsa at ikke alle var kjønnsmodne. Olsen et al. (2004) studier støtter dette. De fant at torsk fra nordøstlige deler av Skagerrakkysten som Indre Oslofjord og Fredrikstad var tidlig kjønnsmodne. De ble kjønnsmodne i 2-3 årsalder med en gjennomsnittslengde på henholdsvis 35 cm og 42 cm. Fisken i denne oppgaven var dermed hovedsakelig kjønnsmodne, men med noen unntak som kan ha bidratt til variasjonen.

GSI kan også være en grov indikasjon på endokrin forstyrrelse. I regbueørret fant man redusert testikkelvekst hos hannfisk eksponert for alkylfenoler som har østrogenhermende effekt (Jobling et al., 1996). En negativ sammenheng mellom metallkonsentrasjoner i gonadene og gonadevekt er registrert i torsk (Hellou et al., 1992). Det var en signifikant negativ korrelasjon mellom CYP1A-mengde og GSI hos hunner i Indre Oslofjord. Spredningen i GSI kan derfor også skyldes ulik miljøgiftbelastning.

De grove indikasjonene på fiskens helsetilstand og miljøstress gjennom kondisjonsfaktor, LSI og GSI viste liten forskjell mellom områdene og antyder at tilstanden til torsken i Indre Oslofjord var god.

4.2 Effekter av metaller

Det var signifikant høyere ALA-D aktivitet i Ytre Oslofjord enn i Indre Oslofjord, men ingen forskjeller knyttet til kjønn. Det indikerer mer blybelastning i Indre Oslofjord og effekt av bly gjennom hemming av ALA-D aktiviteten. Dette stemmer overens med at det er registrert høyere blykonsentrasjoner i torskelever, blåskjell og sedimenter i Indre enn Ytre Oslofjord

(Green et al., 2010). Resultatene og de målte ALA-D verdiene samsvarer med registreringer gjort hos torsk fra Indre og Ytre Oslofjord gjennom JAMP tidligere år (Ruus et al., 2003).

Det var stor spredning i ALA-D-aktivitet hos hunner i Indre Oslofjord. Hylland et al., (2009) fant stor variasjon i ALA-D-aktivitet i torsk innenfor samme område og mellom år i samme område. Samme studie fant en sammenheng mellom ALA-D-aktivitet og størrelse. Hunner i Indre Oslofjord hadde størst variasjon i størrelsen. Min korrelasjonsanalyse viste derimot ingen sammenheng mellom lengde og ALA-D-aktivitet hos hunner i Indre Oslofjord. ALA-D-aktiviteten antas å være robust i forhold til fysiologiske parametere, så kanskje er det andre miljøgifter som bidrar til ALA-D-variasjon i denne gruppen. Hylland et al. (2009) registrerte en positiv sammenheng mellom ALA-D aktivitet og klororganiske forbindelser og metaller som kvikksølv, kobber og sink (Hylland et al., 2009). Studier viser at sink kan øke ALA-D-aktiviteten. Det kan føre til at blyeksponeringen underestimeres der sinkkonsentrasjonene er høye (Schmitt et al., 2005; Krajnovic-Ozretic og Ozretic, 1980). Økte sinkkonsentrasjoner gir også høyere MT-konsentrasjoner (Beyer et al., 1996), men det var liten variasjon i MT-konsentrasjonen hos hunner i Indre Oslofjord, og ingen korrelasjon ble funnet mellom MT og ALA-D. Sinkkonsentrasjonen i leveren øker under vitellogenese (Olsson et al., 1995). Også hos hanner øker sinkkonsentrasjonene under utviklingen av gonadene (Nissen-Lie, 1997). Slik kan GSI indirekte forklare variasjonen i ALA-D. Men variasjonen i GSI samsvarer derimot ikke med ALA-D i de ulike gruppene, og korrelasjonsanalysen viste heller ingen sammenheng. Sink ser ikke ut til å forklare variasjonen i ALA-D.

EROD-aktiviteten varierte også mest hos hunner fra Indre Oslofjord. Kanskje kan de klororganiske forbindelser som vi vet påvirker EROD-aktivitet, også ha en sammenheng med variasjon i ALA-D aktivitet. Hos hunner i Ytre Oslofjord ble det sett en positiv korrelasjon mellom EROD og ALA-D. Hylland et al. (2009) fant som nevnt også en sammenheng mellom ALA-D-aktivitet og klororganiske forbindelser. Denne sammenhengen diskuteres videre i avsnitt 4.3.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom metallotioneinkonsentrasjonen i leveren fra fisk fra de to områdene. Metallotionin er en biomarkør for metallbelastning og mange forsøk både i felt og eksponeringsforsøk viser at MT i fisk induseres av ikke-essensielle metaller som kadmium og kvikksølv og av de essensielle metallene sink og kobber (Goksøyr et al., 1996; Hylland et al., 1996; Olsson et al., 1995; Schlenk og Rice, 1998). Man skulle forventet en større forskjell i MT-konsentrasjonen mellom områdene, med en høyere konsentrasjon i Indre

Oslofjord. Green et al., (2010) har registrert forhøyede verdier av kvikksølv i torskefilet og sediment (Steilene) (klasse II: Klif klassifiseringssystem). I flere områder i Indre Oslofjord har det blitt målt betydelig høyere kvikksølvkonsentrasjoner (klasse V) i sedimentet (Helland et al., 2003). Kadmiumnivåer målt i torskelever og sedimentene ved Steilene er forholdsvis lave (klasse I). Nivåene for kobber og sink i blåskjell og sediment er også begrenset (henholdsvis klasse I og klasse II.) Dette viser at metallbelastningen var begrenset i Indre Oslofjord. Prøver fra antall rent område i Ytre Oslofjord (Færder) inneholdt også lave nivåer (Klasse I) av disse metallene i sedimentet (Green et al., 2010). Havneområder langs Ytre Oslofjord har i likhet med Indre Oslofjord høyere kvikksølvkonsentrasjoner i sedimentene (klasse II-III) (Helland et al., 2003). I torskemuskel fra Ytre Oslofjord var kvikksølvnivået det samme som i torskemuskel fra Indre Oslofjord (Klasse II), mens kadmiumnivået i torskelever ligger lavere enn bakgrunnsnivået (Green et al., 2010). Disse undersøkelsene kan støtte at forskjellene mellom metallbelastningen i de to områdene var marginal, men viser også at metallbelastningen er størst i Indre Oslofjord. MT-konsentrasjonen i leveren til hannfisk fra Indre Oslofjord var signifikant høyere enn i leveren til hunnfisk fra Ytre Oslofjord. Dette kan speile den noe ulike metallbelastningen i områdene.

Årlige målinger i perioden 1999-2003 i torsk viste at medianene for MT-konsentrasjonene i lever fra Ytre Oslofjord har ligget høyere enn i lever fra Indre Oslofjord. År 2001 var et unntak (Ruus et al., 2003, Holth, 2004). Medianene mine lå på nivå med årene med lavest registrerte MT-verdier og på beregnet basisnivå (6,5-15-16 µg/mg protein). Det kan se ut til at metallbelastningen blir mindre. Men MT-konsentrasjonen har vist seg å variere mellom år (Hylland et al., 2009). MT-målinger i torsk og andre fisker har ikke som forventet fulgt metallbelastningsgradienter i sedimenter (Beyer et al., 1996; Ruus et al., 2003; Hylland et al., 2009). Dette kan skyldes ulik biotilgjengelighet knyttet til ulike sedimentkvaliteter eller ulik akkumulering hos bentiske byttedyr (Hylland et al, 1996; Ruus et al., 2005). Forsøk viser også at MT kan nå en metning i forhold til å binde metaller og at MT-målinger i sterkt forurensede områder. Det kan føre til en underestimering av metallbelastningen (Hamza-Chaffai et al., 1997). Et eksponeringsforsøk med kadmium og fisken *Seriola dumerilli* viste at MT-konsentrasjonen nådde et platå hvor økte konsentrasjoner av kadmium ikke ga økning i MT (Jebali et al., 2006).

Andre miljøgifter kan påvirke induksjonen av MT. Forsøk med skrubbe viste at PCB-156 og benzo(a)pyren påvirket og senket induksjonseffekten fra kadmium og at rekkefølgen på

eksponeringen hadde noe å si for MT-induksjonen (Sandvik et al., 1997). Indre Oslofjord er belastet med begge disse stoffene. Målinger har vist at torskelever var markert forurenset av Σ PCB-7 og at blåskjell var moderat forurenset med b(a)p. Σ PCB-7 har blitt målt i torskelever i Ytre Oslofjord, men i mindre grad (usignifikant forurenset) (Green et al, 2010). Denne faktoren kan ha bidratt til redusert induksjon hos torsk i Indre Oslofjord.

Hanner fra Indre Oslofjord hadde signifikant høyere MT-konsentrasjoner enn hunner fra Ytre Oslofjord, og hanner fra begge områder hadde noe høyere medianer (ikke signifikant) enn hunner i samme område. Studier har registrert høyere kadmiumkonsentrasjoner i lever hos hanner enn hunner fra samme område, i tillegg til kjønnsforskjeller i andre metaller (Hylland et al., 1992; Hamza-Chaffai et al., 1997). Variasjonen i MT-induksjon knyttet til kjønn har vist seg å være relatert til de essensielle metallene sink og kobber (Ruus et al., 2003; Hylland et al., 1992). Sink- og kobberkonsentrasjonene i lever øker spesielt hos hunner under vitellogenese, men også hos hanner under gonadeutviklingen. Dette gir høyere MT-konsentrasjoner i leveren (Hylland et al., 1992; Nissen-Lie, 1997). Hanner i Ytre Oslofjord hadde også noe høyere GSI-medianer enn hunner i samme område. Det kan tilsi at høyere MT-induksjon hos hanner skyldes høyere sinkkonsentrasjoner fordi de hadde kommet lengre i gonadeutviklingen enn hunnene. Hunnene i Ytre Oslofjord hadde også størst variasjon både i GSI og MT-konsentrasjon, men korrelasjonsanalysen støtter ikke dette. Ingen korrelasjon mellom GSI og MT-konsentrasjonen ble sett i disse to gruppene (hunner YF: $r_s = 0$ og hanner YF: $r_s = -0,1$). Det var en signifikant korrelasjon mellom GSI og MT-konsentrasjon i hunner fra Indre Oslofjord og variasjonen i denne gruppen kan skyldes variasjon i sinkkonsentrasjon pga ulik gonadeutvikling.

Hos hunner i Indre Oslofjord var det også en signifikant positiv korrelasjon mellom MT-induskjon og alder, lengde, vekt og LSI. Dette kan forklares med at metaller med lang biologisk halveringstid som kadmium og kvikksølv akkumuleres og øker med alderen (Roesijadi og Robinson, 1994). Evans et al. (1993) fant at metallkonsentrasjonene i fiskelever økte med fiskens lengde og andre relaterte fysiologiske parametere. Det gjaldt alle metallene som ble undersøkt, både ikke-essensielle metaller som kadmium og kvikksølv og essensielle metaller som sink og kobber.

Både hunner og hanner i Indre Oslofjord hadde en signifikant negativ korrelasjon mellom AChE-aktivitet og MT-konsentrasjon. Det kan indirekte være knyttet til størrelsesparameterne. AChE- aktiviteten korrelererte negativt med vekt og lengde i begge kjønn (ikke signifikant med lengde hos hunner), mens det motsatte var tilfelle for MT-konsentrasjonen. Metaller har også vist seg å ha hemmende effekt på AChE-aktiviteten (Jebali et al., 2006). Dette diskuteres nærmere i avsnitt 4.6.

I Ytre Oslofjord var det en signifikant positiv korrelasjon mellom EROD-aktivitet og MT-konsentrasjon hos hanner. MT- induksjon er observert som en del av den akutte stressproteinresponsen i cellen og har trolig en rolle i detoksifisering av frie radikaler (Hamer, 1986). I biotransformasjonsprosessene av miljøgifter som involverer CYP1A-enzymmer kan det dannes frie oksygenradikaler som gir økt oksidativt stress (Eastman og Barry, 1992). Slik kan økt EROD-aktivitet og økte MT-konsentrasjoner henge sammen. Metaller har også vist seg å inducere CYP1A i fisk (Anwar-Mohamed et al., 2009). Dette diskuteres nærmere i 4.3.

4.3 Effekter av plane organiske miljøgifter

CYP1A-konsentrasjonen og EROD-aktiviteten i leveren viste samsvarende trend i de ulike gruppene, selv om en signifikant positiv korrelasjon mellom disse biomarkørene bare ble registret i hunnfisk fra Indre Oslofjord. Det var en signifikant høyere CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet i fisk fra Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. Dette indikerer at belastningen av CYP1A-induserende miljøgifter som PCB-er, PAH-er, dioksiner og dibenzo furaner var større i Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. EROD nivåene som ble målt så derimot ut til å ligge innenfor basisnivåene fra referanseområdene i JAMP med øvre grense på 90 pmol/min/mg protein (Ruus et al., 2003). Den høyeste verdien for hunnfisk i Indre Oslofjord overskred så vidt 100 pmol/min/mg protein, mens medianverdiene lå betydelig under dette nivået. Nivåene målt i referanseområdet var lave og under verdier målt de siste årene i referanseområdene som benyttes i JAMP (Ruus et al., 2003).

Effekten av plane organiske miljøgifter så ut til å være begrenset på torsk i Indre Oslofjord og målinger antyder at belastningen synker i dette området (Green et al., 2010). Men belastningen av spesielt PCB er betydelig i Indre Oslofjord, og Σ PCB-7-nivåene målt i torskelever og torskefilet er høye (henholdsvis Klasse III og klasse II). Blåskjell fra Indre Oslofjord har lave verdier (Klasse: I) av dioksiner og Σ PAH, men benzo(a)pyren-nivåene var noe høyere (Klasse: II). Målinger i denne oppgaven av PAH-metabolitter i gallen viste

signifikant høyere konsentrasjoner av 1-OH-pyren og mer belastning av 3-OH-benzo(a)pyren i fisk fra Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. PCB -konsentrasjonene i sedimentene varierer mellom de ulike områdene i Indre Oslofjord og er stedvis veldig høye, spesielt i havneområdene (Klasse: III-V). PAH-verdiene er også stedvis høye, men nivåene ligger noe lavere enn for PCB (Klasse: II-III) (Helland et al., 2003).

PAH-er, PCB-er og andre polyklorerte forbindelser utgjør store og diverse stoffgrupper. Selv om de hovedsakelig regnes som Ah-reseptor agonister, har forsøk vist at noen kan ha en antagonistisk (hemmende) effekt på denne reseptoren (Safe, 1990). I et studie med abbor som hadde levd i et PCB-belastet område så man ingen CYP1A induksjon når de ble eksponert for PCB med kjent induserende effekt, mens samme behandling ga økt EROD-aktivitet og CYP1A-konsentrasjon i abbor fra et referanseområde (Förlin og Nordgren, 1998). Andre studier har vist at fisk fra PAH-belastede områder responderer mindre på PAH-er (Nacci et al., 2002). CYP1A-aktiviteten ser ut til avta gradvis i områder med kronisk belastning (Hylland et al., 2006). Det kan tenkes at de relativt lave nivåene i EROD-aktivitet i Indre Oslofjord har en slik årsak. Et omfattende studie av torsk viste overraskende liten sammenheng mellom 1-OH-pyren og CYP1A-aktivitet (Hylland et al., 2009). En slik korrelasjon ble heller ikke registrert i denne oppgaven. At *in vitro* studier med leverceller fra flyndre viste hemmende effekt av 1-OH-pyren på CYP1A-aktivitet, kan forklare dette (Eggens og Boon, 1997).

Det var en positiv korrelasjon mellom EROD-aktiviteten og både MT-konsentrasjon og ALA-D-aktivitet i henholdsvis hunner og hanner fra Ytre Oslofjord. Goksøyr et al., (1996) fant at kadmium påvirker CYP1A-induksjonen fra PCB og benzo(a)pyren i skrubbe. Studier med leverceller viste at tungmetaller som kvikksølv, bly og kadmium kan hemme CYP1A som er induert av PAH-er (Anwar-Mohamed et al., 2009). Det kan være at økt blybelastning som gir redusert ALA-D-aktivitet kan føre til redusert EROD-aktivitet. Dannelsen av CYP-enzym er avhengig av heme produsert i hemsyntesen (Stegeman et al., 1992). At MT og EROD korrelerte blir motstridene til denne teorien. Her gir økt metallbelastning økt EROD-aktivitet. Omfattende studier med torsk i felt fant en positiv sammenheng mellom kvikksølv og EROD-aktivitet (Hylland et al., 2009). Anwar- Mohamed et al. (2009) studie med leverceller viser også at disse metallene kan virke induserende på CYP1A. Mekanismen synes å være avhengig av hvilken PAH-forbindelse som er involvert. De viser også til at studier med fisk som hai og havabbor har gitt hemmende effekt av kvikksølv på CYP1A. Mekanismene for

metallinnvirkning er tydelig komplekse og innblanding av andre miljøgifter forsterker kompleksiteten. Mine korrelasjoner mellom EROD-aktivitet og metallbiomarkørene støtter oppfatningen om at metaller spiller inn på reguleringen av CYP1A-enzymet.

Det var ingen signifikante forskjeller i CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet mellom hunner og hanner i Indre Oslofjord. I Ytre Oslofjord hadde hanner signifikant høyere CYP1A-konsentrasjoner enn hunner. Hanner fra Indre Oslofjord hadde signifikant høyere EROD-aktivitet enn hunner fra Ytre Oslofjord. Hanner hadde ellers høyere medianverdier enn hunner i samme område for begge parameterne, men forskjellene var ikke signifikante. Kjønn antas å påvirke EROD-aktiviteten hos fisk. I regnbueørret har man funnet at flere CYP 450-avhengige leveraktiviteter er høyere hos kjønnsmodne hanner enn kjønnsmodne hunner (Andersson og Förlin, 1992). EROD-aktiviteten hos laks ble fulgt gjennom et år og man så tydelige variasjoner gjennom året knyttet til reproduksjon, men liten forskjell mellom kjønnene. Men før gyteperioden i september falt EROD-aktiviteten markant hos hunner og ga signifikante forskjeller mellom hunner og hanner (Larsen et al., 1992). Selv om det ikke var signifikante forskjeller i GSI mellom hunner og hanner, var spredningen stor og kan indikere at en noen fisk har startet forberedelsen til gyteperioden slik at EROD-aktiviteten påvirkes.

Variasjonen var størst for torsk i Indre Oslofjord, både for CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet. Flere av biomarkørene som 1-OH-pyren, viste størst variasjon i Indre Oslofjord. Det kan forklares med at det har vært en mer ujevn fordeling av miljøgifter og punktkilder og at individene kan ha ulik forurensingshistorie med eksponering for ulike mikser av miljøgifter i Indre Oslofjord. Det er tidligere diskutert at det kan forekomme ulik grad av tilpasning til et forurenset miljø med mindre CYP1A-induksjon når eksponeringstiden øker. Hanner i Indre Oslofjord hadde en negativ korrelasjon til alder, vekt og lengde og hanner i Ytre Oslofjord var også svakt negativt korrelert til disse parameterne. Det kan indikere at eldre fisk har tilpasset seg belastningen. LSI har også vist å forklare variasjon CYP1A-induksjon i torsk, og man tror at økte fettmengder i leveren kan gi en svampe-effekt for fettløselige organiske forbindelser (Hylland et al., 2009). En slik korrelasjon ble ikke sett her.

Det var en signifikant positiv korrelasjon mellom DNA-skade og EROD-aktivitet i hunner fra Ytre Oslofjord. Det er ikke uventet da vi vet at CYP1A-metaboliseringen i tillegg til å detoksifisere fremmedstoffer kan føre til både frie oksygenradikaler og til bioaktivering til mer skadelige metabolitter. Oksygenradikaler kan gi ulike DNA-skader som baseoksidering, DNA-addukter og DNA-trådbrudd (Stegeman et al., 1992). Reaktive metabolitter kan gi

mutagen effekt og DNA-addukter (Aas et al., 2001). En slik positiv korrelasjon ble også sett mellom EROD-aktivitet og DNA-addukter i torsk eksponert for råolje (Aas et al., 2000).

4.4 PAH-metabolitter i galle

Det var signifikant høyere konsentrasjoner av PAH-metabolitten 1-OH-pyren i gallen hos fisk fra Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. Forskjellen i konsentrasjonen av gallemetabolittene 3-OH-benzo(a)pyren og 1-OH-fenantren ble ikke statistisk testet. Forskjellen i belastningen av disse stoffene mellom områdene ble dermed grovt anslått ut fra prosentvisfordelingen i intervaller av ulike konsentrasjoner. Det var høyere prosentandel av fisk under deteksjonsgrensen for 3-OH-benzo(a)pyren i Ytre Oslofjord og fordelingen antydte en større belastning av benzo(a)pyren i Indre Oslofjord. For 1-OH-fenantren så tendensen ut til å være motsatt. Det var en betydelig høyere prosentandel av fisk under deteksjonsgrensen fra Indre Oslofjord (65 %) sammenlignet med Ytre Oslofjord (33 %). De høyeste konsentrasjonene av 1-OH-fenantren ble også funnet i Ytre Oslofjord. Ut fra dette antar jeg at eksponeringen for fenantren var større i Ytre enn i Indre Oslofjord.

Denne forskjellen kan knyttes til at disse tre PAH-ene har ulike kilder. Man kan dele PAH-er i petrogene (oljederiverte) og pyrogene (forbrenningsrelaterte) avhengig om de stammer fra oljeforbindelser eller forbrenningsprosesser. De petrogene består typisk av lettere PAH-er (2-3 ringer) som fenantren, mens pyrogene består av flere ringer (3-7) som pyren og benzo(a)pyren (Ariese et al., 2005). Kilder til fenantren og andre petrogene PAH-er i Ytre Oslofjord kan være lekkasjer og søl fra oljeraffineriet på Slagentangen ved Horten og ved transport og lossing av olje til omfattende industri og til Norsk Spesialolje på Kambo som er behandlingsanlegg for spillolje. Kilder til pyrogene PAH-er hovedsakelig industri, vedfyring og vei- og båttrafikk og dermed knyttet til urbane strøk som Indre Oslofjord (Ruus et al., 2009). De pyrogene har lav vannløselighet og bindes til sotpartikler. De transporteres atmosfærisk og kan slik bli avsatt i havet langt fra kilden. De bindes til partikler og ender i sedimentene. Ulik sedimentkvalitet og spesielt innholdet av organisk karbon, gir ulik biotilgjengelighet (Ruus et al., 2005). De mindre og petrogene er mer vannløslige og brytes raskere ned (Hylland et al., 2006). En mer permanent kilde som et oljeraffineriet i Ytre Oslofjord vil kunne gi høyere nivåer her.

Hovedveien for opptak av PAH-er i vannorgansimer ansees generelt å foregå gjennom vannutvekslingen over kropps- og respirasjonsoverflatene. Eksponeringsforsøk med torsk har

vist at opptak via føden også er en betydelig opptaksvei for PAH-er (Aarre, 2008). Ulik diett hos fiskene i de to områdene og mellom individer kan forklare forskjeller vi ser i denne oppgaven. En diett med hovedvekt av fisk vil kunne gi mindre PAH-opptak enn en diett av evertebrater. PAH-er metaboliseres raskt i vertebrater som fisk og bioakkumuleres og biomagnifiseres i liten grad (Aas et al., 2000). I evertbrater er metabolismeringen mindre effektiv, og de vil akkumulere disse stoffene i større grad avhengig av bland annet fettinnhold og levevis (Ruus et al., 2009). Artsforskjeller blant evertebrater har blitt studert.

Flerbørstemark akkumulerte PAH-er i større grad enn snegler. Spesielt pyren, men også benzo(a)pyren vist høy grad av bioakkumulering i flerbørstemark (Ruus et al., 2005).

Oppvirvling av sediment pga båttrafikk i grunne havneområder som i Indre Oslofjord, kan gjøre PAH-er som pyren mer biotilgjengelig (Aarre, 2008).

Det var ingen signifikant forskjell i 1-OH-pyren-konsentrasjonen mellom kjønn. Det så også ut til å gjelde for de to andre metabolittene. Hanner i begge områdene hadde noe høyere 1-OH-pyren-medianer enn hunner. Denne trenden så vi også for CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet hvor kjønnsvariasjoner knyttes til reproduksjonssyklusen. 1-OH-pyren var signifikant positivt korrelert til GSI hos hanner i Indre Oslofjord. Gonadeutviklingen påvirker CYP1A-aktivitet og det kan igjen påvirke metabolismeringen av PAH-er til gallemetabolitter.

Variasjonen i 1-OH-pyren var størst i Indre Oslofjord, med størst spredning hos hanner. PCB-156 senket metabolismeringen av benzo(a)pyren i et eksponeringsforsøk med skrubbe (Hylland et al., 2006). Slik kan variasjonen i Indre Oslofjord knyttes til mer komplekse effekter ved eksponering for en blanding av miljøgifter.

1-OH-pyren konsentrasjonen var bare signifikant korrelert til lengde hos hunner i Indre Oslofjord. Ruus et al. (2003) så en positiv sammenheng mellom størrelse og 1-OH-pyrenmetabolitter hos torsk i felt. Det kan henge sammen med ulikt fødevalg når fisken blir større.

4.5 DNA-skader

De røde blodcellene som hadde vært nedfrost viste signifikant mer skade enn de som hadde blitt oppbevart på lyseringsbuffer. Nedfrysingen i 14 måneder har derfor forårsaket mer DNA-skade. Nivåene målt i disse blodcellene kan ikke sammenlignes med blodceller som ikke har blitt skadet ved oppbevaring. De ble allikevel brukt til å si noe om relative forskjeller

i DNA- skade og som støtte til resultatene fra blodcellene som hadde blitt oppbevart på lyseringsbuffer.

Det var signifikant mer DNA-skade i røde blodceller fra fisk fra Indre Oslofjord enn i fisk fra Ytre Oslofjord. Dette må sees i sammenheng med høyere konsentrasjoner av potensielle gentoksiske forbindelser i Indre Oslofjord. En oversikt over kreftfremkallende stoffer i det marine miljøet viser en lang rekke forbindelser som oppdeles i 3 grupper: metaller, PAH-er og klororganiske forbindelser. De mest potente metallene er kadmium og bly. En lang rekke PAH-er regnes for kreftfremkallende med benzo(a)pyren og benz(a)antracen som de mest potente. Pyren regnes som potensielt kreftfremkallende. Av de klororganiske forbindelsene peker PCB seg ut som den mest potente, men lista inkluderer også en del insekticider som DDT, lindan og toksafren. Her er endepunktet DNA-skade og ikke kreft. Alle kreftfremkallende stoffer er ikke nødvendigvis gentoksiske, men kreft er oftest initiert av en DNA-skade (De Flora et al., 1991).

Mine Comet-verdier var noe høyere sammenlignet med målinger i Ålekvabbe fra sterkt forurenset havneområde. Spesielt nivåene i Ytre Oslofjord var høye sammenlignet med referanseområdet i dette studiet (Frenzelli et al., 2004). Et eksponeringsforsøk med ål som hadde sammenlignbare benzo(a)pyren-nivåer viste samme grad av DNA-skade som i Ålekvabbe-studiet og nivåene i Indre Oslofjord (Nigro et al., 2002). Det kan tyde på at også Ytre Oslofjord var belastet med gentoksiske forbindelser. Artsforskjellene gjør forøvrig sammenligningen usikker.

Resultatet fra måling av PAH-metabolittene viste at fisken i Indre Oslofjord var moderat belastet av pyren og benzo(a)pyren. Fisken i Ytre Oslofjord var signifikant mindre pyrenbelastet. Benzo(a)pyren som er et meget potent karsinogen, ble registret i noen grad hos hunner i Ytre Oslofjord. Fenantreneksponeringen så ut til å være betydelig større i Ytre enn i Indre Oslofjord. I biotransformasjonsprosessen blir noen PAH-er bioaktivert til mer reaktive og skadelige metabolitter som inneholder en epoxidgruppe. Disse epoxidene kan binde seg til DNA og danne addukter. Benzo(a)pyren har vist seg å danne slik addukter i stor grad hos flyndre (Varanasi et al., 1989). I torsk fra Østersjøen registrerte man flest DNA-addukter i det området som hadde de høyeste verdiene av 1-OH-pyren i gallen (Schnell et al., 2008). Torsk som ble eksponert for lave konsentrasjoner av råolje viste også betydelig grad av DNA-adduktdannelse (Aas et al., 2000). Det kan indikere at den petrogene belastningen som ble observert gjennom fenantrenmetabolitten i Ytre Oslofjord kan ha bidratt til DNA-skade der.

PAH-er kan også endres av sollys til mer reaktive og gentoksiske forbindelser og føre til økt DNA-skade (Steinert et al., 1998). PAH-biotransformasjonsprosessen kan også lede til dannelse av frie radikaler som hydroksylradikaler som kan gi oksidative DNA-skader. Nigro et al. (2002) så sammenheng mellom DNA-trådbrudd og reaktive oksygenradikaler hos ål eksponert for gentoksiske forbindelser.

Siden de klororganiske forbindelsene er meget persistente, blir de værende i miljøet i lang tid etter at utslippet har stanset. I et studie med ål ble dieldrin og lindane påvist i fisken henholdsvis 30 og 14 år etter at stoffene ble forbudt (Roche et al., 2002). DDT ble ikke påvist i torskelever eller torskefilet i Indre og Ytre Oslofjord under JAMP-programmet. Dioksinprøver ble ikke tatt i torsk fra Indre Oslofjord, men torskefilet fra Ytre Oslofjord (Færder) var moderat forurenset (Klasse II) med dioksiner (Green et al., 2010).

Dioksinet 2-3,7-8-TCDD resulterte i betydelig mer DNA-skade enn benzo(a)pyren i et eksponeringsforsøk med ål. Benzo(a)pyren-eksponeringen resulterte også i betydelig gentoksiske effekt. En PCB-blanding ga derimot bare respons ved de laveste dosene (Nigro et al., 2002). PCB-konsentrasjonene målt i fett hos torsk i Østersjøen samsvarte i liten grad med DNA-adduktdannelsen (Schnell et al., 2008). Det kan bety at dioksinbelastningen som er påvist i Ytre Oslofjord kan ha gitt de observerte DNA-skadene. Den reduserte AChE-aktivitet som ble registrert i Ytre Oslofjord antyder en pesticidbelastning i dette området. AChE-aktivitet hemmes av spesifikke pesticider som organofosfater og karbamater, men kan også antyde at det finnes kilder til andre pesticider som de klororganiske i dette området. I torsk fra Østersjøen var det samsvar mellom Σ DDT- og dieldrinkonsentrasjonene i fett og DNA-adduktdannelse (Schnell et al., 2008).

ALA-D-aktiviteten ble hemmet av bly i Indre Oslofjord. Bly er klassifisert som et karsinogent metall og kan ha bidratt til DNA-skade i Indre Oslofjord. Metaller er gentoksiske ved at de binder seg til DNA og forandrer strukturen (Sharma og Talukder, 1987). Bly binder seg sterkt til fosfatgruppene i nukleinsyrene. Blåskjell eksponert for bly ga DNA-dobbeltrådbrudd (Black et al., 1996). Kadmium har vist seg å gi gentoksiske effekter som DNA-protein kryssbinding, DNA-trådbrudd og oksidativ skade (Fatur et al., 2002). Studier med kadmiumeksponert karpe viste DNA-skade relatert til lipid peroksidering og oksidativt stress (Jia et al., 2010). MT-målingene i denne oppgaven og tidligere metallmålinger i sediment og fisk kan støtte en innvirkning av metaller på DNA hos fisk fra både Indre og Ytre Oslofjord.

Det var ikke forskjell mellom netto-fbg-sensitive seter mellom områdene. Man skulle forvente at disse fulgte graden av DNA-skade og dermed var størst i Indre Oslofjord. Enzymet fpg innføres for å omdanne oksidative baseskader til trådbrudd. Metaboliseringen av mange gentoksiske stoffer fører til dannelsen av frie radikaler som hydroksyradialer som reagerer med basene i DNA (Eastmann og Barry, 1992). Forsøk med karpe som er nevnt tidligere registrerte økt oksidativt stress ved ekponering for kadmium og PAH-er (Jia et al., 2010; Nigro et al., 2004). Det er en mulighet for å underestimer oksidative baseskader hvis baseskaden er utilgjengelig for fpg-enzymet. Det kan skje hvis skadene forekommer i klustere slik at flere baseskader forekommer i en loop (Collins et al., 2008).

Det var ingen signifikante forskjeller mellom kjønn. Studier med Ålekvaabbe fant heller ingen effekt av kjønn på DNA-skade (Frenzilli et al., 2004). I torsk fra Østersjøen fant man ingen forskjell i DNA-addukter mellom kjønnene (Schnell et al., 2008).

I denne oppgaven har Comet-halelengde blitt brukt som mål på DNA-skade. Det finnes mange comet-måleparametere og det er haleintensitet (% DNA i hale i forhold til hodet) som blir anbefalt å bruke. Det hevdes at halelengden når en metning og ikke øker proporsjonalt når dosene blir høye (Collins, 2004). Jeg valgte allikevel å bruke halelengde som mål. Det skyldtes at en del av de fryste blodcellene hadde veldig brede og diffuse kometer som programmet ikke kunne registrere fullstendig. Halelengden så derimot ut til å bli riktig registrert. Tettheten av blodcellene som lå på lyseringsbuffer var også veldig høy, så det var en viss fare for overlapping mellom kometer. Halelengden var lettere å kontrollere. Forsøket med kadmiumeksponering av en karpefisk viste samsvarende resultater mellom halelengde, halemoment og haleintensitet også under høye konsentrasjoner (Jia et al, 2010). I felt vil trolig ikke dosene være så høye at halemetning inntreffer og slik gir uriktig halelengde. Mine resultater viste godt samsvar mellom DNA-skade og effekter på andre biomarkører i de to områdene. Men på grunn av ovennevnte problemer med Cometscoring, var det en del prøver som ikke lot seg analysere slik at utvalget ble noe begrenset. Disse forholdene ga mer usikkerhet i disse resultatene sammenlignet med de andre.

4.6 Effekter av organofosfater og karbamater

Det var signifikant høyere AChE-aktivitet i muskel fra fisk fra Indre Oslofjord enn i muskel fra fisk fra Ytre Oslofjord. Dette antyder at fisk i Ytre Oslofjord har vært utsatt for mer AChE-hemmende stoffer enn fisk i Indre Oslofjord. Insektisider som organofosfater og

karbamater som benyttes i jord-og skogbruk har vist spesifikk binding til AChE i fisk (Magnotti, et al., 1994; Jebali et al., 2006). Elvene som løper ut i Indre Oslofjord kommer hovedsakelig fra Nordmarka og er ellers lite knyttet til jordbruksområder. De store jordbruksområdene på Ringerike dreneres ut i Drammenselva som munner ut sør for Drøbak og landbruksområdene øst for Oslo drenerer ut i Glomma ved Hvaler. Det kan tilsi at tilførselen av pesticider kan være større i Ytre Oslofjord.

Pesticidbruken i Norge har blitt betydelig redusert siden 80-tallet etter forbud og restriksjoner. Insektmidler utgjør bare 1 % av sprøytemiddelbruken i Norge. Pesticidprøver i bekker viser lav grad av avrenning og gjenfinnes i lave konsentrasjoner i vannmiljøet, men ca 12 % av påvisningen overskrider miljøfarlighetsgrensen (Pengerud et al., 2007). Pesticider som organofosfater og karbamater er hydrofobe og bindes til jordpartikler, og de vaskes i liten grad ut hvis de ikke følger erodert jord (Miles et al., 1992; Ramos et al., 2000).

Studier har vist at det kan være andre kilder til AChE-hemmere. Payne et al. (1996) fant betydelig AChE-hemming i flyndrer nær treforedlingsindustri og uten opplagte pesticidkilder. Muskelektstrakt fra ørret som ble eksponert for trefiber løst i aceton ga 50 % AChE-hemming. Det er en betydelig trefordelings-og papirindustri i Østfold samt at papirfabrikker ved Høksund og Hønefoss drenerer ut i Drammenselva. De kan være en kilde til AChE-hemmende forbindelser i Ytre Oslofjord som ikke finnes Indre Oslofjord. Urban avrenning kan inneholde betydelig grad av forbrenningshydrokarboner fra eksos, sot og maskinolje. Payne et al., (1996) eksponerte også ørretmuskel for maskinolje. Det resulterte i 25 % AChE-hemming. Maskinolje i avrenningen fra urbane strøk som Indre Oslofjord, kan ha bidratt til hemmingen som ble registret der. Det ble også observert et tydelig ”drop” i AChE-aktivitet i skrubbe før og etter et oljespill i Østersjøen. AChE-aktiviteten forble lav, mens den hadde begynt å øke igjen i referanseområdet ved måling 6 måneder senere (Kopecka et al., 2004). En forurensingsgradient fra tyskebukten og utover i havet viste økende AChE-aktivitet i sandflyndre fra kystområdet til den nådde oljeflattform hvor aktiviteten sank signifikant (Galgani et al., 1992). Dette kan støtte teorier om at oljeforbindelser som PAH-er hemmer AChE (Roche et al., 2002). Fenantrenbelasningen som ble registret i Ytre Oslofjord kan slik ha bidratt til AChE-hemmingen i dette området.

Det var en signifikant negativ korrelasjon mellom AChE-hemming og MT-konsentrasjon i fisk av begge kjønn i Indre Oslofjord. Det kan indikere en sammenheng mellom AChE-hemming og metaller. Både in vivo og in vitro studier har vist at metaller som kadmium

(Jebali et al., 2006), kobber, bly og kvikksølv kan hemme AChE i fisk (Olson og Christensen, 1980). Eksponeringsforsøket med kadmium viste også negativ korrelasjon mellom AChE-aktivitet og MT-konsentrasjon i karpe (Jebali et al., 2006). At det ikke var en korrelasjon mellom MT og AChE i Ytre Oslofjord, kan skyldes at MT beskytter fisken mot AChE-hemming. I Indre Oslofjord kan MT ha nådd en metallmetning og slik ikke beskytter AChE mot metaller.

AChE-aktivitet var negativt korrelert til vekt og lengde i alle grupper, men denne korrelasjonen var bare signifikant i Indre Oslofjord. Fiskens lengde kan påvirke AChE-aktiviteten. Flere studier har vist at AChE-aktiviteten avtar med økende lengde (Flammarion et al., 2002; Schnell et al., 2008). Fisken fra Ytre Oslofjord var signifikant lengre enn fisken fra Indre Oslofjord. Dermed kan dette ha bidra til øke forskjellen mellom gruppene. Flammarion et al. (2002) foreslår at man justerer for lengde før man sammenligner fisken. Det ble ikke gjort her. Årsaken til at lengden spiller en rolle kan være at eldre og dermed lengre fisk og har akkumulert mer miljøgifter. Det var en negativ korrelasjon mellom alder og AChE-aktiviteten, men den var ikke signifikant. Men siden alderen i de to ulike områdene ikke var signifikant forskjellig, bør andre årsaker til lengdeforskjell vurderes. Lengre torsk har i større grad annen fisk på dietten og akkumulerer vanligvis mer miljøgifter enn evertebrater. Sole et al. (2008) fant en negativ sammenheng mellom AChE aktiviteten og trofisk nivå i fisk.

Hunnene i Indre Oslofjord hadde størst variasjon. Dette kan sees i sammenheng med at variasjonen i alder, lengde og vekt varierte mest i denne gruppen. Disse parameterne kan, som tidligere nevnt, påvirke AChE-aktivitet i stor grad. Variasjonen var generelt størst i Indre Oslofjord og kan tyde på ulik belastning av AChE-hemmende stoffer i dette området på grunn av punktkilder. Alle fiskene i Ytre ser ut til å være utsatt for AChE-hemming. Det kan indikere at dette området har en permanent kilde.

Kjønnsforskjeller ble ikke sett i AChE-aktivitet. Det stemmer overens med resultater i andre studier med torsk og annen fisk (Galgani et al., 1992; Kopecka et al., 2004; Schnell et al., 2008).

AChE-aktiviten har vist deg å variere mellom ulike fiskearter (Sole et al., 2008). Det er ikke gjort så mange studier med AChE-hemming i torsk og noe basisnivå er ikke satt (Schnell et al., 2008). Dermed er det vanskelig å anslå hvordan verdiene observert i dette studiet samsvarer med forurensingsgrad. Studier med torsk i Østersjøen fra 8 ulike stasjoner viste

nivåer fra 14-74 nmol/min/ mg protein (10-90 prosentiler) (Schnell et al., 2008). Sole et al., (2008) fant basisnivå i 5 andre torskefisker hvor mediane varierte fra 43-90 nmol/min/mg protein. Dermed kan verdiene fra Ytre Oslofjorden virke uforholdsmessig høye.

4.7 Avsluttende betraktninger

Det var flere signifikante korrelasjoner mellom de ulike effektparametrene i Indre Oslofjord enn i Ytre Oslofjord. Det var spesielt mange av biomarkørene som var korrelert til en fysiologisk parameter her. Det kan bety at de fysiologiske parametrene påvirker biomarkørene i stor grad. Med større variasjon i disse parametrene i Indre Oslofjord ga det også mer effekt på biomarkørene. Det var flere signifikante korrelasjoner mellom hunner enn mellom hanner i begge områdene. Det kan indikere at de fysiologiske parametrene spiller sterkere inn hos hunner enn hanner.

Det var i mange av biomarkørene betydelig variasjon. Noe av dette kan nok forklares med at jeg var ukjent med analyseteknikker og at det ga en grad av unøyaktighet. Referanseplottene indikerer det. Presisjonen økte med erfaringen. Siden prøvene ble analysert randomisert, vil utslagene av dette minimaliseres og ikke påvirke de relative forskjellene mellom områdene i stor grad.

Variasjonen var for de fleste biomarkørene størst i Indre Oslofjord. Det kan ha en sammenheng med at denne gruppen var minst homogen med hensyn på alder og størrelse. For alle biomarkørene er det påvist at endogene faktorer som kjønn, reproduksjonsstatus, hormonrytmer, næringsstatus og alder kan påvirke fiskens fysiologi og dermed resultatet (Larsson et al., 1985; Hylland et al., 2009). Ved å fange fisken på samme tidspunkt og i en periode utenfor gytesesongen, kunne vi redusere en del av disse påvirkningene. GSI viste seg imidlertid å variere en del og indikerte at noen fisk var i gang med oppbygging av gonader til gytesesongen. Ideelt burde fisken hatt mer homogen størrelse i Indre Oslofjord, men begrenset tilgang på fisk gjorde at vi måtte akseptere et større avvik. En mer kompleks forurensingssituasjon i Indre Oslofjord kan også forklare at variasjonen var større her.

Det var signifikante forskjeller mellom områdene for flere av biomarkørene.

Referanseområdet var slik velegnet til å si noe om relative forskjeller i effekten av en del miljøgifter, men 1-OH-fenantren målingene, MT- målinger og AChE-målingene antydte også at referanseområdet var påvirket av miljøgifter. Det gjorde det vanskeligere å slutte i hvor stor

grad Indre Oslofjord var påvirket av miljøgifter. Pålitelige og artspesifikke basisnivåer manglet også for noen av biomarkørene.

5 Konklusjon

Det var ingen signifikante forskjeller mellom områdene i de fysiologiske parametrene kondisjonsfaktor, leversomatisk indeks og gonadesomatisk indeks. Den generelle helsetilstanden til torskene i Indre Oslofjord var god. Torsken i Ytre Oslofjord var lengre og tyngre enn torsken i Indre Oslofjord selv om det ikke var signifikante aldersforskjeller. Det kan indikere dårligere vekstforhold i Indre Oslofjord knyttet til større miljøgiftbelastning, men ulik næringstilgang i de to områdene kan også være årsaken.

ALA-D aktiviteten i røde blodceller hos torsk fra Ytre Oslofjord var signifikant høyere enn i Indre Oslofjord. Det kan bety at blybelastningen i Indre Oslofjord har hatt hemmende effekter på ALA-D-aktiviteten i torsken. Det var derimot ingen forskjeller i MT-konsentrasjonen i lever mellom områdene. Det antyder at belastning av metaller som kadmium, kvikksølv, kobber og sink som induserer MT var lik i de to områdene. Nivåene som ble målt var også lave. Det kan være at andre miljøgifter som PCB og benzo(a) har hemmet induksjonen av MT, slik at effekten av metaller i Indre Oslofjord blir underestimert. Hypotesen om at det ikke var forskjell i effekter av metaller mellom områdene kan forkastes når det gjelder bly, men ikke for kadmium, kvikksølv, kobber og sink.

Det ble registrert både signifikant høyere CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet i torsk fra Indre Oslofjord enn i torsk fra Ytre Oslofjord. Dette kan indikere at belastningen av CYP1A-induserende miljøgifter som PCB-er, PAH-er, dioksiner og dibenzofuraner, var større i Indre Oslofjord enn i Ytre Oslofjord. Dette gir grunnlag for å forkaste nullhypotesen om at det ikke var forskjell i effekter av plane organiske miljøgifter mellom områdene.

Det var signifikant høyere konsentrasjoner av PAH-metabolitten 1-OH-pyren i gallen hos torsk fra i Indre Oslofjord enn i torsk fra Ytre Oslofjord. Det ble også registrert høyere konsentrasjoner av gallemetabolitten 3-OH-benzo(a)pyren og lavere konsentrasjoner av 1-OH-fenantren i Indre Oslofjord sammenlignet med Ytre Oslofjord. Hvis man bruker 1-OH-pyren som biomarkør for PAH-belastningen generelt, må nullhypotesen om at det ikke er forskjell i PAH-metabolitter forkastes. Imidlertid vil man kunne hevde at belastningen av pyrogene PAH-er var størst i Indre Oslofjord, mens de petrogene PAH-ene var størst i Ytre Oslofjord.

Det var signifikant mer DNA-skade i røde blodceller fra torsk i Indre Oslofjord enn i røde blodceller fra torsk Ytre Oslofjord. Det stemmer godt overens med belastningen vi ser av

potensielt gentoksiske stoffer som PAH-er, klororganiske forbindelser og metaller. Det gir grunnlag for å forkaste nullhypotesen om at det ikke var mer DNA-skade i røde blodceller i Indre Oslofjord enn i Ytre Oslofjord.

Det var signifikant høyere AChE-aktivitet i muskel hos fisk fra Indre Oslofjord enn i muskel fra fisk fra Ytre Oslofjord. Dette antyder at fisk i Ytre Oslofjord har vært utsatt for mer AChE-hemmende stoffer. Pesticider som organofosfater og karbamater er AChE-hemmere. Landbruk er hovedkildene til disse stoffene. Elvene fra de store landbruksområdene vest og øst for Oslo drenerer ut i Drammenselva og Glomma som munnar ut i Ytre Oslofjord. Det kan være en forklaring på forskjellen. Nullhypotesen om det ikke var forskjell i effekter av organofosfater og karbamater må forkastes.

Den totale effekten og eksponering for miljøgifter så ut til å være størst i Indre Oslofjord. Torsken fra Indre Oslofjord viste mer effekter av plane organiske miljøgifter og bly samt mer DNA-skade. Belastningen av metaller som kvikksølv, kadmium, sink og kobber så derimot ikke ut til være større i Indre Oslofjord enn i Ytre Oslofjord. Kanskje er ikke MT-induksjon en sensitiv nok biomarkør for metalleksponering hos torsk. Dette bør undersøkes videre. Eksponering for AChE-hemmende miljøgifter som pesticidene organofosfater og karbamater, var mindre i Indre Oslofjord enn i Ytre Oslofjord. Pesticidbuen i Norge er begrenset og det var uventet å finne så stor effekt av organofosfater i et antatt rent område som Ytre Oslofjord. Bidrag til AChE-hemming fra forbindelser tilknyttet treforedlingsindustri virker sannsynlig med tanke på den omfattende treforedlingsindustrien langs Østfoldkysten. Dette bør undersøkes videre.

Referanser

- Andersson, T. og Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* **24**:1–20.
- Anwar-Mohamed, A., Elbekai, R.H. og El-Kadi, A.O.S (2009). *Expert Opinion Drug Metabolism and Toxicology* **5**: 501-521.
- Ariese, F., Beyer, J., Jonsson, G., Visa, C.P. og Khran, M.M (2005). Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* **39**: 1-41.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D. og Widdows, J. (1985). *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger, New York, USA.
- Berge, J.A, Alve, E. og Helland, A. (2009). Miljøgifter i sediment fra en datert kjerne fra Bærumsbassenget. NIVA Rapport 5825-2009. 39 sider
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skåre, J.U. og Goksøyr, A. (1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* **36**: 75-98.
- Black, M.C., Ferrell, R.C., Honning, R.C. og Martin, L.K. (1996). DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in laboratory and field. *Environmental Toxicology and Chemistry* **212**: 802-808.
- Bradbury, S.P, Carlson, R.W, Henry, T.R, Padilla, S. og Cowden, J. (2008). Toxic responses of the fish nervous system. I: Di Giulio, R.T og Hinton, D.E. *The toxicology of fishes*, CRC Press, 417-455.
- Burke, M.D. og Mayer, R.T. (1974). Ethoxyresorufin - direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* **2**: 583-588.
- Carr, R.L., Straus, D.L. og Chambers, J.E. (1995). Inhibition and aging of channel catfish brain acetylcholinesterase following to two phosphorothionate insecticides and their active metabolites. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **45**: 325-336.
- Clark, R.B. (2001). *Marine Pollution*. Oxford University Press.
- Collins, A.R. (2004). The Comet Assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biothechnology* **26**: 249-261.
- Collins, A.R., Osoz, A.A., Brunborg, G., Gavião, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C og Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**: 143-151.
- Carlson, E. og Zelikoff, J.T. (2008). The immune system of fish: A target organ of toxicity. I: Di Giulio, R.T og Hinton, D.E. *The toxicology of fishes*, CRC Press, 489-529.

- Crim, L.W., Watts, E.G. og Evans, D.M. (1975) The plasma gonadotropin profile during sexual maturation in a variety of salmonid fishes. *General and Comparative Endocrinology* **27**: 62-70.
- De Flora, S., Bagnasco, M. og Zanacchi, P. (1991). Gentoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research* **258**: 285-320.
- Dignam, J.D. (1990). Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods in Enzymology* **182**: 194-203.
- Eastman, A. og Barry, M.A. (1992). The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis? *Cancer Investigation* **10**: 229-240.
- English Nature (2004). Evaluation of potential use of biomarkers as long-term monitoring tools in assessing ecological quality in terrestrial and aquatic environments of the UK. English Nature Research Reports 593. 27 sider
- Ellman, G.L., Courtney, K.D, Anders Jr, V. og Featherstone, M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95.
- Eggens, M.L., Opperhuizen, A. og Boon, J.P. (1996). Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere* **33**: 1579-1596.
- Eggens, M.L. og Galgani, F. (1992). Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research* **33**: 213-221.
- Evans, D.W., Dodoo, D.K og Hanson, P.J. (1993). Trace elements concentrations in fish livers: Implications of variations with fish size in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. **26**: 329-334.
- Flammarion, P., Noury, P. og Garric J. (2002). The measurement of cholinesterase activities as a biomarker I chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* **120**: 325-330.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C. og Sturve, J. (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research* **552**: 187-195.
- Förlin, L. og Norrgren, L. (1998). Physiological and morphological studies of feral perch before and after remediation of a PCB contaminated lake: Järnsjön. *Ambio* **27**: 418-424.

- Galgani, F., Bocquenè, G. og Cadiou, Y. (1992). Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series* **91**: 77-82.
- Goksøyr, A. (1991). A semiquantitative cytochrome P4501A1 ELISA: A simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. *Science of the Total Environment* **101**: 255-262.
- Goksøyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grøsvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M. og Skaare, J.U. (1996). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **33**: 36-45.
- Goksøyr, A., Beyer, J., Husøy, A.M, Larsen, H.E., Westrheim, K., Wilhelmsen, S. og Klungsøyr, J. (2004). Accumulation and effects of aromatic og chlorinated hydrocarbons in juvenil Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). *Aquatic Toxicology* **29**: 21-35.
- Goksøyr, A. og Husøy, A. M (1992). The cytochrom P450 1A1 response in fish: Application of immunodetection in environmental monitoring and toxicology testing. *Marine Environmental Research* **34**: 147-150.
- Green, N. W., Schøyen, M., Øxnevad, S., Ruus, A., Høgåsen, T. Håvardstun, Gudmundson J., Rogne, Å.K og Tveiten, L. (2010). Hazardous substances in fjords and coastal waters - 2010. Levels, trends and effects. Long-term monitoring of environmental quality in Norwegian coastal waters. NIVA Rapport O-29106. Løpenr. OR-5867. 284 sider
- Grung, M., Holth, T.F., Jacobsen, M.R., Hylland, K. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolitter in atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **72**: 254-265.
- Habig, C. og Di Giulio, R.T. (1991). Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. Mineau, P. *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment*. Elsevier, Amsterdam, 20-30.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annual Review Biochemistry* **55**: 913-951.
- Mamza-Chaffai, A., Amiard-Triquet, C. og El Abed, A. (1997). Metallothionein-like protein: Is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**: 53-62.
- Haux, C. og Larsson, Å. (1984). Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquatic Toxicology* **5**: 129-142.
- Heintz, R.A., Rice, S.D., Wertheimer, A.C. Bradshaw, R.F., Thrower, F.p., Joyce, J.E og Short, J.W. (2000). Delayed effects of growth and marine survival of pink salamon (*Oncorhynchus gorbuscha*) after exposure to crude oil during embryonic development. *Marine Ecolog. Progress Series* **208**: 205-216.

- Helland, A., Lindholm, O., Traaen, T., Uriansrud, F. og Rygg, B. (2003). Tiltaksplan for forurensede sedimenter i Oslofjorden. Fase 1. Miljøtilstand, kilder og prioriteringer. NIVA Rapport 4742-2003. 102 sider
- Hellou, J., Warren, W.G, Payne, J.F., Belkhode, S. og Lobel, P. (1992). Heavy metals and other elements in three tissues of cod, *Gadus morhua* from the Northwest Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, **24**: 452-458.
- Herbert, A., Guilhermino, L., da silvia, H.C., og Hansen, P.-C. (1995). *Z Angewandte Zoo* **3**: 1-15.
- Hodson, P.V. (1976). δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **33**: 268-271.
- Holladay, S.D., Smith, S.A., Besteman, E.G., Deyab, A.S.M.I., Gogal, R.M., Hrubec, T., Robertson, J.L. og Ahmed, S.A. (1998). Benzo(a)pyren-induced hypocellularity of pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alteration in stomal and parynchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **64**: 69-82.
- Holth, T.F. (2004). *Effekter av miljøgifter på torsk og skrubbe fra indre Oslofjord*. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Hop, H., Gjørseter, J. og Danielssen, D.S. (1992). Seasonal feeding ecology of cod (*Gadus morhua* L) on the norwegian Skagerrak coast. *Ices Journal of Marine Science* **49**: 453-461.
- Hosnedl, T., Hajslová, J., Kocourek, V., Tomaniová, M. og Volka, K. (2003). 1-hydroxypyrene as a biomarker for fish exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **71**: 465-472.
- Hylland, K. (2004). Biological effects of contaminants: Quantification of d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) acitivity in fish blood. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, **34**: 9 sider
- Hylland, K. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **69**: 109-123.
- Hylland, K., Aspholm, Ø., Knutsen, J.A. og Ruus, A. (2006). Biomarkers in fish from dioxin-contaminated fjords. *Biomarkers* **11**: 97-117.
- Hylland, K., Haux, C. og Hogstrand, C. (1992). Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Marine Ecology-Progress Series* **91**: 89-96.

- Hylland, K., Ruus, A., Børseth, J.F., Bechmann, R., Barsiene, J., Grung, M., Tollefsen, K-E. og Myhre, L-P. (2006). Biomarkers in monitoring-a review. NIVA. 5205-2006. 106 sider
- Hylland, K., Ruus, A., Grung, M. og Green, N. (2009). Relationships between physiology, tissue contaminants and biomarker response in Atlantic cod (*Gadhus morhua* L.). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **72**: 226-233.
- Hylland, K., Sandvik, M., Skåre, J.U., Beyer, J., Egaas, E. og Goksøyr, A. (1996). Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): An evaluation of their use in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* **42**: 223-227.
- Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E.A., Bannaoui, A. og Boussetta, H. (2006). Effects of malathion and cadmium on achetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli* **32**: 93-98.
- Jia, X., Zhang, H. og Liu, X. (2010). Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mattheissen, P. og Sumpter, J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 194-202
- Johansson-Sjöbeck, M-L. og Larsson, Å. (1979). Effects of inorganic lead on delta-aminoluvelinic acid dehydratase activity and hematological variables in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Environmental Contamination and Toxicolog* **8**: 419-431
- Khran, M.M, Burrows, D.G., Ylitalo, G.M, Brown, D.W., Wigren, C.A, Collier, T.K, Chan, S.L og Varanasi, U. (1992). Mass-spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish samplet after Exxon Valdez oil spill. *Environmental Science and Technology* **26**: 116-126.
- Knutsen, H., Jorde, P.E., Andre, C. og Stenseth, N.C. (2003). Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology* **12**: 385-394.
- Kopecka, J., Rybakowas, A., Barsiene. J og Pempkowiak, J. (2004). AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (southern Baltic). *Oceanologia* **46**: 405-418.
- Krajnovic-Ozretic, M. og Ozretic, B. (1980). The ALA-D activity test in lead-exposed grey mullet *Mugil auratus*. *Marine Ecology progress Series* **3**:187-191.
- Kurelec, B. (1993). The gentoxic disease syndrome. *Marine Environmental Reseach* **51**: 241-258.
- Larsen, H.E., Celander, M. og Goksøyr, A. (1992). The cytochrome-P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). 2. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* **10**: 291-301.

- Larsson, A., Haux, C. og Sjöbeck, M.L. (1985). Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **9**: 250-281.
- Leamon, J.H, Schultz, E.T og Crivello, J.F (2000). Variation among four health indices in natural populations of estuarine fish, *Fundulus heteroclitus* (Pisces, Cyprinodontidae), from five geographically proximate estuaries. *Environmental Biology of Fishes* **57**: 451-458.
- Lee, E.M. og Khan, R.A. (2009). Length-weight-age-relationships, food, and parasites of Atlantic cod (*Gadus morhua*) off coastal Labrador within NAFO Division 2H and 2J-3K. *Fisheries Research* **45**: 65-72.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. og Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- Magnotti Jr, R.A., Zaino, J.P og McConnell R.S. (1994). Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology* **108**: 187-194.
- Magnusson, J., Andersen, T., Amundsen, R., Berge, J.A., Beylich, B., Bjerkgeng, B., Bjerknæs, E., Gjørseter, J., Grung, M., Holth, T.F, Hylland, K., Johnsen, T., Lømsland, E.R., Paulsen, Ø., Rønning, I., Sørensen, K., Schøyen, M. og Walday, M. (2008). Overvåking av forurensings situasjonen i Indre Oslofjord 2007. NIVA rapport 5637-2008. 116 sider
- Marks, G.S., (1985). Exposure to toxic agents: The heme biosynthetic pathway and hemoproteins as indicator. *Critical Reviews in Toxicology* **15**: 151-179.
- Mayer F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., og Rattner, B.A (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. I: Huggett, R.J, Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M og Bergman, H. L. *In Biomarkers. Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, 5-58.
- Miles C.J., Leong, G. og Dollar, S. (1992). Pesticides in marine sediments associated with golf course runoff. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **49**: 179-185.
- Navas, J.M og Segner, H. (2000). Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: Evidens for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicology* **51**: 79-92.
- Nigro, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S. og Regoli, F. (2002). Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research* **54**: 517-520.
- Nissen-Lie, T. (1997). Årstidsvariasjon i spormetallmetabolismen til skrubbe, *Platichthys flesus* L., fra Hvalerområdet. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo.

- Olafson, R.W. og Olsson, P.E. (1991). Electrochemical detection of metallothionein. *Methods in Enzymology* **205**: 205-213.
- Olsen, E.M., Knutsen, H., Gjørseter, J., Jorde, P.E., Knutsen, J.A. og Stenseth, N.C. (2004). Life-history variation among local populations of Atlantic cod from the Norwegian Skagerrak coast. *Journal of Fish Biology* **64**: 1725-1730.
- Olson, D.L. og Christensen, G.M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environmental research* **21**: 327-335.
- Olsson, P.-E., Kling, P., Petterson, C. og Silversand, C. (1995). Interaction of cadmium and estradiol-17- β on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical Journal* **307**:197-203.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W. og Fancey, L.L. (1996). Achetylcholinesterase an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* **32**: 225-231.
- Peakall, D.B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology* **3**: 157-160.
- Pengerud, A. mfl (2007). Jord- og vannovervåking i landbruket (JOVA). Feltrapporter fra programmet i 2006. Bioforsk. Rapport nr: 130/2007. 347 sider
- Poels, C.L.M, van der Gaag, M.A. og van de kerkhoff, J.F.J. (1980). An investigation into the long-term effects of Rhine water on rainbow trout. *Water research* **14**: 1029-1035.
- Ramos, C., Carbonell, G., Garcia Baudin, J.Ma. og Tarazona, J.V. (2000). *The Science of the Total Environment* **247**: 269-278.
- Roche, H., Buet, A. og Ramade, F. (2002). Accumulation og lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue Biosphere Reserve. *Ecotoxicology* **11**: 155-164.
- Roesijadi, G. og robinson, W.E. (1994). Metal regulation in aquatic animals: Mecanisms of uptake, accumulation, and release. I: Malins, D.C. og Ostrander, G.K: *Aquatic Toxicology. Molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Lewis Publichers, 387-420.
- Ruus A., Hylland, K. og Green, N.W. (2003). Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). Biological effect methods, Norwegian Monitoring 1997-2001. Rapport nr 4649-2003, NIVA, Oslo. 139 sider
- Ruus, A., Næs, K., Grung, M., Green, N., Bakke, T., Oug, E. og Hylland, K: (2009). PAH-forurensing av sjøbunnen. En oversikt over kunnskapsstatus. NIVA-rapport 5888-2009. 80 sider

- Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S. og Hylland, K. (2005). Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquatic Toxicology* **72**: 273-292.
- Ruus, A., Skaare, J.U. og Ingebrigtsen, K. (2001). Disposition and depuration of lindane (gamma-HCH) and polychlorinated biphenyl-110 (2,3,3',4',6-pentachlorobiphenyl) in cod (*Gadus morhua*) and bullrout (*Myoxocephalus scorpius*) after single oral exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 2377-2382.
- Ruxton, G.D. (2006). The unequal variance t-test is an underused alternative to student's t-test and the Mann-Whitney U test. *Behavioral Ecology* **17**: 688-690.
- Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology*, **21**: 51-88.
- Sandvik, M., Beyer, J., Goksøyr, A., Hylland, K., Egaas, E. og Skåre, J. U. (1997). Interaction of benzo(a)pyren, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB_156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) *Biomarkers* **2**: 153-160.
- Sarkar A., Ray, D., Shrivastava, A. N. og Sarkar, S. (2006): Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* **15**: 333-340.
- Scharma, A. og Talukder, G. (1987). Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environmental Mutagenesis* **9**: 191-226.
- Schlenk, D., Handy, R. Steinert, S., Depledge, M.H og Benson, W. (2008). Biomarkers. I: Di Giulio, R.T og Hinton, D.E. *The toxicology of fishes*, CRC Press, 683-731.
- Schlenk, D. og Rice, C.D (1998). Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxid-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* **43**: 121-129.
- Schmitt, C.J., Whyte, J.J, Brumbaugh, W.G og Tillitt, D.E (2005). Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from mining on fish in the tri-states district of northeastern Oklahoma, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**:1483-1495.
- Schnell, S., Schiedek, D., Schneider, R., Balk, L., Vuorinrn, P.J., Karvinen, H. og Lang, T. (2008). Biological indications of contaminant exposure in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic Sea. *Canadian Journal of fisheries and Aquatic Sciences* **65**: 1122-1134.
- Siegel, S. (1957). Nonparametric statistics. *The American Statistician* **11**: 13-19.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. og Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* **175**: 184-191.

- Slooff, W. van Krejl, C.F og Baars, A.J (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in Netherlands. *Aquatic Toxicology* **4**: 1-14.
- Smolders, R. De Boeck, G. og Blust, R. (2003). Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 890-899.
- Sole, M., Lobera, G., Aljinovic, B., Rios, J: Garcia de la Parra, L.M, Maynou, F. og Cartes, J.E. (2008). Cholinesterases activities and lipid peroxidation levels muscle from shelf and slope dwelling fish from the NW Mediterranean: Its potential use in pollution monitoring. *Science of the total environment* **402**: 306-317.
- Steinert, S.A., Streib-Montee, R. og Sastre, M.P. (1998). Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* **46**: 355-358.
- Stegeman J.J., Brouwer, M., Di Guilio, R.T., Förlin L., Fowler, B.A., Sanders B. M.og Van Veld, P. (1992). Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. I: *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of Antropogenic Stress*. Lewis Publishers, 235-335.
- Stegeman, J.J. og Hahn, M.E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. I: *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Eds: Malins, D.C. og Ostrander, G.K. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton: 87-206.
- Stegeman J.J. og Lech J.J. (1991). Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect* **90**:101-109.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. og Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**: 206-221.
- Varanasi, U., Reichert, W.L., Le Eberhart, B.T., og Stein, J.E. (1989). Formation and persistence of benzo[a]pyrenediolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chemico-Biological Interactions* **69**: 203-16.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F. Marro, A. og Fabbri, R. (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programs. *Biomarkers* **4**: 455-466.
- Williams, T. og Bedford, B.C. (1974). The use of otoliths for age determination. I: T.B. Bagenal. *Ageing of fish*, University of Reading, 114-123.

- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. og Tillitt, D.E. (2000). Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* **30**: 347-570.
- Aarre, I. (2008). *Opptak og effekter på torsk av miljøgifter fra sediment*. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B. og Andersen, O.K. (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* **51**: 241-258.
- Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L. og Andersen, O.K. (2001). Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Marine Environmental Research* **52**: 213-229.

Vedlegg 1: Forkortelser

Tabell 1A: Tabell over forkortelser brukt i oppgaven.

Forkortelse	Fullt navn
AB	alamar blue
ACh	Acetylcholin
AChE	acetylcholin esterase
ALA-D	aminolevulinaciddehydrogenase
ATC	acetylthiocholine iodide
b(a)p	Benzo(a)pyren
BSA	bovint serum albumin
CFDA-AM	5-carboksyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester
DDT	diklor-difenyl-trikloretan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTNB	Dithiobisnitrobenzosyre
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacid
EROD	7-Ethoxy-Resorufin O-Deethylase
GSI	Gonadesomatisk indeks
KF	Kondisjonsfaktor
LSI	Liversomatisk indeks
mBCl	Monochlorobimate
MT	Metallothionein
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PAH	polyaromatiske hydrokarboner
PBS	fosfatbufret saline
PCB	Polyklorertebifenyl
TBS	Trisbuffret saltløsning
TTBS	Trisbuffret saltløsning med Tween 20

Vedlegg 2: Rådata

Tabell 2A: Rådata for fisk fra Ytre Oslofjord

Kode fisk	Område	Dato	Lokalitet	Kjønn	Alder	Vekt	Lengde	Lever vekt	Gonade vekt	LSI	KF	GSI
YF1	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	2+	846	46	16	3	1,89	0,87	0,35
YF2	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	4+	1539	54	22	4,7	1,43	0,98	0,31
YF3	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	2	3+	1067	48	19	10	1,78	0,96	0,94
YF4	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	3+	1168	49,5	19	22,4	1,63	0,96	1,92
YF5	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	4+	1744	56	67	15,8	3,84	0,99	0,91
YF6	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	2	2+	891	46	18	12,1	2,02	0,92	1,36
YF7	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	2+	693	42	6	2,3	0,87	0,94	0,33
YF8	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	2	2+	693	42	10	6,6	1,44	0,94	0,95
YF9	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	2	3+	1016	46	18	12,4	1,77	1,04	1,22
YF10	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	2	3+	1451	54	26		1,79	0,92	
YF11	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	3+	1513	55	19	3,8	1,26	0,91	0,25
YF12	Ytre Oslofjord	24.11.2008	Travbanen	1	3+	1664	54	35	34	2,10	1,06	2,04
YF13	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Blåkollrenna	2	2+	248	31	3,6	0,5	1,45	0,83	0,20
YF14	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	2+	797	47,5	8	1,9	1,00	0,74	0,24
YF15	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1339	50	36	12,5	2,69	1,07	0,93
YF16	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	3+	1303	52,5	28	12,3	2,15	0,90	0,94
YF17	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1242	50	35	12,5	2,82	0,99	1,01
YF18	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	4+	1736	65,5	35	30,1	2,02	0,62	1,73
YF19	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1010	49	14	15,6	1,39	0,86	1,54
YF20	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1521	55	27	7,9	1,78	0,91	0,52
YF21	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	985	49,5	7	3,9	0,71	0,81	0,40
YF22	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	3+	1165	50,5	17	1,1	1,46	0,90	0,09
YF23	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	4+	1497	56	38	14	2,54	0,85	0,94
YF24	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1257	50	17	58,4	1,35	1,01	4,65
YF25	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	2+	731	43	9	2,6	1,23	0,92	0,36
YF26	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	2+	685	37,5		2,9		1,30	0,42
YF27	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	1+	641	41	8		1,25	0,93	
YF28	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	2+	687	41,5	11	1,7	1,60	0,96	0,25
YF29	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1149	49	20	20	1,74	0,98	1,74
YF30	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	2+	898	45	23	33,4	2,56	0,99	3,72
YF31	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	2+	1114	47	27,6	13,2	2,48	1,07	1,18
YF32	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	984	48,5	10	5,2	1,02	0,86	0,53
YF33	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	966	46,5	10	2,9	1,04	0,96	0,30
YF34	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1509	53,5	46	34,5	3,05	0,99	2,29
YF35	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1473	53	22	17,1	1,49	0,99	1,16
YF36	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2		1406	54	20	21,2	1,42	0,89	1,51
YF37	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	3+	1099	48,5	18	17,2	1,64	0,96	1,57
YF38	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	2	2+	1068	48	17	30,9	1,59	0,97	2,89
YF39	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	2+	1173	49	33	11,3	2,81	1,00	0,96
YF40	Ytre Oslofjord	25.11.2008	Travbanen	1	4+	1750	57,5	18	19	1,03	0,92	1,09

hunn; 1, hann; 2, lengde; gram, vekt; gram,

Tabell 2B: Rådata for fisk fra Indre Oslofjord

Kode fisk	Område	Dato	Lokalitet	Kjønn	Alder	Vekt	Lengde	Lever vekt	Gonade vekt	LSI	KF	GSI
IF1	Indre Oslofjord	26.11.2008	Gråøyrenna	1	2+	513	47,5	6	1,5	1,17	0,48	0,29
IF2	Indre Oslofjord	26.11.2008	Gråøyrenna	1	4+	544	41,5	5	3,5	0,92	0,76	0,64
IF3	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	349	33	9	14,3	2,58	0,97	4,10
IF4	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	3+	1504	54	43	50,1	2,86	0,96	3,33
IF5	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	4+	1622	56,5	20	1	1,23	0,90	0,06
IF6	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	4+	1737	57	33	9,7	1,90	0,94	0,56
IF7	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	623	42	9	6,2	1,44	0,84	1,00
IF8	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	829	42	17	8,9	2,05	1,12	1,07
IF9	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	5+	815	45	16	3,9	1,96	0,89	0,48
IF10	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	3+	747	43	7	6,2	0,94	0,94	0,83
IF11	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	4+	1140	48	27	38,7	2,37	1,03	3,39
IF12	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	4+	963	47	34	29,8	3,53	0,93	3,09
IF13	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	1+	460	38	7	3	1,52	0,84	0,65
IF14	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	743	43	18	27,4	2,42	0,93	3,69
IF15	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	4+	1038	47	36	7,2	3,47	1,00	0,69
IF16	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	797	43,5	13	7,2	1,63	0,97	0,90
IF17	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	413	35	12	6,1	2,91	0,96	1,48
IF18	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	3+	636	40,5	22	25,5	3,46	0,96	4,01
IF19	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	385	34,5	4	1,1	1,04	0,94	0,29
IF20	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	477	38,5	6	3,6	1,26	0,84	0,75
IF21	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	450	36,5	16	13,1	3,56	0,93	2,91
IF22	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	4+	1381	53	39	17,2	2,82	0,93	1,25
IF23	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	4+	1083	47,5	14	2,4	1,29	1,01	0,22
IF24	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	1+	620	40,5	12	8,5	1,94	0,93	1,37
IF25	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	4+	933	46,5	26	26,3	2,79	0,93	2,82
IF26	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	504	38	6	3,7	1,19	0,92	0,73
IF27	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	680	40,5	14	6,8	2,06	1,02	1,00
IF28	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	426	35,5	5	0,3	1,17	0,95	0,07
IF29	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	338	33,5		1,5		0,90	0,44
IF30	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	336	34,5	4	1,5	1,19	0,82	0,45
IF31	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	9+	3743	75,5	103	44,2	2,75	0,87	1,18
IF32	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	510	38,5	6	2,4	1,18	0,89	0,47
IF33	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	4+	1143	50	20	11,9	1,75	0,91	1,04
IF34	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	3+	520	38	6	3	1,15	0,95	0,58
IF35	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	3+	853	46	19	17,7	2,23	0,88	2,08
IF36	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	3+	672	41	17	7,6	2,53	0,98	1,13
IF37	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	2	2+	776	43	12	1,1	1,55	0,98	0,14
IF38	Indre Oslofjord	26.11.2008	Steilene	1	2+	488	38,5	10	4,4	2,05	0,86	0,90

hunn; 1, hann; 2, lengde; gram, vekt; gram,

Vedlegg 3: Bearbeidede data

Tabell 3A: Bearbeidede data for Ytre Oslofjord.

Kode fisk	MT	ALA-D	CYP1A	EROD	1-OH-pyren	1-OH-fenantren	3-OH-b(a)p	TL buf u/fpg	AChE
YF1	5,5		6,9	1,1	34,7	5,0	nd	18,3	124,0
YF2	6,5		15,1	5,9	28,7	Nd	nd	20,8	97,5
YF3	6,1	22,1	9,6	15,5	39,7	Nd	nd	17,1	99,0
YF4	3,0	12,9	9,6	0,2	44,7	6,2	nd	17,6	101,6
YF5	4,6	18,5	7,4	15,2	7,8	Nd	nd	nd	120,3
YF6	6,3	27,5	5,2	26,9	45,7	6,2	nd	19,6	119,3
YF7	15,8		5,4	3,5	56,7	6,0	nd	14,8	123,9
YF8	8,4		10,5	30,5	52,7	4,9	nd	26,4	123,3
YF9	8,5	16,3	7,6	24,6	31,7	5,0	nd	19,8	132,2
YF10	7,0	23,5	6,8	64,7	54,7	6,7	nd	nd	68,7
YF11	2,8		8,1	53,7	81,7	8,4	1,4	nd	142,6
YF12	6,4	15,2	5,7	8,1	41,7	12,6	3,0	18,9	97,7
YF13	10,6	14,9	4,8	51,8	46,7	7,2	nd	nd	113,0
YF14	6,9	17,6	6,1	12,9	28,7	3,7	nd	nd	166,5
YF15	3,9		8,8	27,7	22,7	Nd	nd	nd	124,7
YF16	8,2		6,1	34,9	9,4	Nd	nd	nd	134,1
YF17	6,2	10,8	7,2	24,1	24,7	4,9	nd	nd	154,1
YF18	6,5		8,0	17,8	70,7	Nd	nd	nd	87,9
YF19	5,3	19,5	3,4	54,1	28,7	Nd	nd	53,4	100,1
YF20	4,2		6,4	13,1	30,7	3,1	nd	42,2	98,5
YF21	6,0		8,2	0,3	24,7	Nd	nd	26,4	158,4
YF22	6,7	25,9	9,6	30,3	44,7	4,5	nd	nd	96,3
YF23	6,6		15,5	12,2	72,7	8,0	4,5	42,7	82,5
YF24	4,9		10,7	1,2	65,7	6,5	nd	42,3	90,1
YF25	3,9		7,9	23,5	26,7	2,8	nd	nd	114,3
YF26	6,6	17,8	4,6	1,0	25,7		nd	41,5	143,0
YF27	5,7	21,7	6,6	53,3	42,7	6,0	nd	48,9	97,1
YF28	3,5	16,8	7,4	42,4	35,7	Nd	nd	55,0	125,2
YF29	6,4	21,2	6,6	29,9	48,7	Nd	nd	24,9	75,7
YF30	8,3		8,1	22,9	30,7	3,6	nd	56,0	117,0
YF31	6,4	14,1	8,3	21,9	41,7	Nd	nd	41,8	139,8
YF32	6,3		6,4	33,4	24,7	2,4	nd	47,6	140,9
YF33	6,2	15,2	8,6	4,4	52,7	5,4	nd	30,6	129,2
YF34	5,8	14,4	5,0	8,5	17,7	Nd	nd	22,4	85,8
YF35	5,6	24,0	6,6	26,5	52,7	7,7	nd	32,3	87,4
YF36	5,3		4,7	22,7	44,7	6,1	nd	23,9	139,6
YF37	5,1	19,8	4,9	14,0	70,7	11,8	3,8	nd	123,8
YF38	6,5	21,2	15,8	44,1	50,7	5,7	nd	31,6	114,4
YF39	7,4	23,0	6,3	35,7	44,7	5,7	nd	nd	132,7
YF40	8,7		5,0	42,6	27,7	6,7	nd	29,5	146,5

MT; µg/mg protein, ALA-D; ng PBG/min/ mg protein, CYP1A; mOD/µg protein/min, EROD; pmol/min/mg protein, PAH; ng/g, AChE; nmol/min/mg protein

Tabell 3B: Bearbeidede data for Indre Oslofjord

Kode fisk	MT	ALA-D	CYP1A	EROD	1-OH-pyren	1-OH-fenantren	3-OH-b(a)p	TL buf u/fpg	AChE
IF1	3,8		22,5	8,6				190,9	
IF2	4,7	21,3	15,8	23,9	Nd	273,7	1,7	191,1	44,1
IF3	5,9	13,4	30,6	52,4	Nd	305,7	1,7	200,8	
IF4	7,3	23,5	8,5	18,1	Nd	260,7	nd	79,8	34,3
IF5	5,7		8,4	52,6	2,9	269,7	nd	135,9	31,0
IF6	8,2	26,0	15,2	62,8	Nd	276,7	nd	102,2	46,9
IF7	5,5		20,6	30,8	4,1	587,7	5,2	143,9	50,2
IF8	5,4	13,6	9,7	34,0	Nd	246,7	0,5	126,4	35,9
IF9	5,8		5,9	26,6	Nd	318,7	3,0	148,0	24,5
IF10	6,6	9,9	19,7	2,9	Nd	379,7	nd	112,0	24,1
IF11	6,2	10,0	7,1	14,0	Nd	275,7	nd	144,7	
IF12	7,1	8,6	7,8	15,8	3,9	249,7	2,4	107,0	27,3
IF13	3,2	19,4	7,6	62,8	Nd	83,7	nd	184,1	28,3
IF14	6,8		6,4	45,2	4,0	369,7	0,4	114,8	48,1
IF15	10,0		4,3	27,7	4,6	275,7	nd	96,2	18,0
IF16	5,9		29,9	15,9	Nd	278,7	3,0	149,7	34,3
IF17	4,6	12,2	11,3	62,8	Nd	234,7	nd	168,3	33,4
IF18	7,4	11,4	44,5	57,2	5,7	300,7	2,4	127,7	
IF19	2,7	21,7	5,2	3,6	Nd	203,7	1,7	157,2	
IF20	4,6		11,0	2,2	Nd	250,7	2,4	112,7	26,7
IF21	11,6	16,8	27,4	67,3	Nd	605,7	nd	93,9	58,3
IF22	7,6		23,3	7,6	6,2	453,7	2,2	111,4	54,5
IF23	19,5	16,6	20,9	30,2	Nd	232,7	nd	137,0	55,2
IF24	6,4		35,1	65,6	Nd	289,7	nd	128,5	
IF25	10,8	9,2	8,5	57,2	Nd	124,7	nd	79,5	61,3
IF26	5,8	12,5	14,5	9,3	4,3	169,7	3,2	149,6	53,4
IF27	8,8		38,2	58,6	4,4	155,7	nd	116,3	31,3
IF28	8,9		17,1	23,0	Nd	167,7	nd	184,6	62,8
IF29	6,7	8,7	8,7	90,2	Nd	190,7	nd	190,3	63,9
IF30	6,8		31,3	83,3	Nd	240,7	1,9	152,3	56,8
IF31	6,7		6,8	15,4	7,2	321,7	0,1	49,8	45,1
IF32	5,2	5,9	22,6	30,9	3,2	163,7	nd	120,6	42,2
IF33	7,6	8,8	23,2	50,6	Nd	68,7	nd	166,5	40,5
IF34	11,9	16,4	31,3	30,3	Nd	140,7	nd	132,4	37,2
IF35	6,0	16,4	7,4	6,7	Nd	166,7	nd	141,1	74,5
IF36	4,5		15,2	106,4	Nd	244,7	nd	115,5	72,2
IF37	7,7		17,4	70,0	1,9	159,7	nd	125,5	69,5
IF38	5,5	14,7	17,2	97,7	2,5	104,7	nd	148,5	29,8

MT; µg/mg protein, ALA-D; ng PBG/min/ mg protein, CYP1A; mOD/µg protein/min, EROD; pmol/min/mg protein, PAH; ng/g, AChE; nmol/min/mg protein

Tabell 3C: Bearbeide data fra Comet-analyse for Ytre Oslofjord. TL= halelengde, TI=haleintensitet,

Kode fisk	TL buf u/fpg	TL Buf m/fpg	TL frys u/fpg	TL frys m/fpg	TI buf u/fpg	TI Buf m/fpg	TI frys u/fpg	TI frys m/fpg
YF1	18,3	34,3	63,3	74,5	3,4	32,5	49,4	50,4
YF2	20,8		67,9	74,5	5,9		35,1	52,7
YF3	17,1	31,1	62,8	72,5	5,0	27,0	44,4	49,7
YF4	17,6				6,5			
YF5			59,1	85,2			59,6	85,2
YF6	19,6	43,7			5,3	26,2		
YF7	14,8	36,4			5,2	19,9		
YF8	26,4	51,1	65,9	85,7	15,5		75,8	83,3
YF9	19,8		66,2	62,8	13,5		84,8	74,9
YF10			42,3	64,2			28,5	43,2
YF11								
YF12	18,9	40,5	41,7	44,0	5,0	30,8	42,4	44,5
YF13			73,3	64,9			84,0	83,2
YF14			73,8	70,5			53,2	56,3
YF15			48,9	38,1			23,8	47,1
YF16			55,8	59,8			34,8	41,6
YF17			61,1	87,5			58,7	83,5
YF18			45,8	66,4			35,2	50,0
YF19	53,4	53,0	72,8	82,0	73,9	79,5	48,7	66,5
YF20	42,2	49,4	83,4	72,8	67,5	88,9	78,4	73,9
YF21	26,4	38,5	32,9	55,2	23,0	38,6	27,7	45,0
YF22			65,6	69,8			80,4	83,8
YF23	42,7	51,4	46,0	66,6	76,8	87,5	46,5	65,9
YF24	42,3	43,8	42,7	50,6	32,0	43,9	44,8	48,3
YF25								
YF26	41,5	44,3	79,4	66,7	39,7	42,1	48,5	55,4
YF27	48,9	36,6	70,0		86,4		82,8	
YF28	55,0	51,1	49,7	56,2	89,4	87,8	65,9	70,5
YF29	24,9	44,1	39,4	43,5	19,4	28,8	41,0	46,6
YF30	56,0	52,1	27,0	37,6	90,1	90,6	35,1	45,5
YF31	41,8	43,7	44,3	76,6	35,5	35,6	26,0	64,3
YF32	47,6	42,7	80,4	78,7	86,9	79,2	80,3	80,1
YF33	30,6	36,2	43,5	71,3	16,9	28,2	24,4	54,1
YF34	22,4	35,7	39,0	55,8	8,9	36,4	34,4	48,3
YF35	32,3	43,2	60,9	68,9	31,4	73,8	51,5	59,1
YF36	23,9	29,5	42,2	80,4	8,8	25,6	17,1	58,7
YF37		37,6	51,9	50,7		27,9	48,8	45,0
YF38	31,6				20,3			92,5
YF39		36,2	42,2	71,0		15,6	25,5	44,2
YF40	29,5	53,2		79,6	8,5	87,5		89,7

Tabell 3D: Bearbejdede data fra Comet-analyse for fisk fra Indre Oslofjord. TL=halelengde, TI= haleintensitet

Kode fisk	TL buf u/fpg	TL Buf m/fpg	TL frys u/fpg	TL frys m/fpg	TI buf u/fpg	TI Buf m/fpg	TI frys u/fpg	TI frys m/fpg
IF1		57,8	55,8	49,1		91,3	69,9	77,5
IF2	44,1	44,0	41,7	79,6	22,7	25,9	18,7	61,8
IF3			71,2	72,3			84,2	84,6
IF4	34,3	52,7	52,1	67,2	24,8	40,8	33,0	38,0
IF5	31,0	45,3	37,9	64,2	23,7	29,1	31,8	52,4
IF6	46,9	39,9	56,3	60,9	20,3	25,4	36,4	45,2
IF7	50,2	46,6	50,4	51,9	41,6	34,5	40,0	49,8
IF8	35,9	47,3	41,7	72,3	22,6	34,4	23,5	45,4
IF9	24,5	50,1	42,7	66,9	24,8	28,5	24,3	49,9
IF10	24,1	57,7	56,5	73,0	17,3	38,8	37,1	46,3
IF11			36,7	40,0			53,3	54,6
IF12	27,3	40,4			23,5	27,4		
IF13	28,3	42,5	54,5	71,8	20,1	27,9	37,4	63,2
IF14	48,1	55,0		64,7	82,1	87,7		79,9
IF15	18,0	49,7	38,2	75,3	8,6	29,8	36,9	41,5
IF16	34,3	36,2	44,1	59,1	16,9	21,9	30,0	49,9
IF17	33,4	45,8	74,0	78,2	21,9	41,7	44,0	64,5
IF18								
IF19		43,0				25,2		
IF20	26,7		51,1	77,8	14,7		41,5	66,2
IF21	58,3	56,7			36,9	44,5		
IF22	54,5	69,2	71,8	75,1	33,4	61,3	51,1	64,6
IF23	55,2	58,3	48,4	61,8	38,4	47,5	37,9	52,9
IF24								
IF25	61,3	63,9	44,3	54,2	32,1	55,3	37,5	45,6
IF26	53,4	63,1	75,1	75,8	21,8	49,8	37,3	53,7
IF27	31,3	55,3	44,3	73,1	20,4	35,4	23,5	57,5
IF28	62,8	62,8	88,5	84,7	38,9	57,6	64,8	69,2
IF29	63,9	62,9	93,9	98,3	55,3	59,8	55,7	62,6
IF30	56,8	64,2	57,0	63,7	32,9	49,0	38,2	60,5
IF31	45,1	58,5	72,5	75,8	15,2	40,8	45,1	53,4
IF32	42,2	70,7	59,6	56,5	12,4	47,2	50,8	54,6
IF33	40,5	60,8	62,4	71,7	10,1	39,2	34,2	54,2
IF34	37,2	56,8	74,5	78,1	16,0	41,9	48,4	53,5
IF35	74,5	64,9	76,1	91,8	95,1	94,0	78,2	82,9
IF36	72,2	72,0	58,1	63,1	87,6	90,1	62,6	63,7
IF37	69,5	69,8	67,7	81,9	61,9	77,5	72,2	75,5
IF38	29,8	55,8	45,3	74,8	9,7	26,2	22,7	48,1

Vedlegg 4: Kjemikalieliste

Tabell 4A: Oversikt over kjemikalier med produktnummer og leverandør

Kjemikalie	Produktnummer	Leverandør
Acetylthiocholine iodid	A5751	Sigma
Agarose	A9414	Sigma
Albumine fra bovine serum	A7906	Sigma
Alkaline kobber tartrat løsning	500-0113	BioRad
Almar blue, AB	DAL1100	Invitrogen
Ammoniumhydroksid	K34656632 519	MERCK
Ammoniumklorid	1.01145	MERCK
Kanin-anti-fisk antistoff CYP1A, CP226	C024061201	Biosense Laboratories
Bovine Serum Albumin	A2153	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenfosfat trihydrat	22,131-7	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenfosfat, trihydrat	P-5504	Sigma
Dikaliumhydrogenfosfat, vannfri	A140504 924	MERCK
Dimethylsulfoxide	472310	Sigma-Aldrich
Dimetylsulfoxid	K40013731 920	Merck
Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat	1.06580	MERCK
Dinatriumhydrogenfosfat vannfri	S-9763	Sigma
Dithiobisnitrobenzoyre	D8130	Sigma
Dithiotreitol	MB1015	Melford laboratories Ltd.
Eddiksyre	33209	Sigma-Aldrich
Etanol	Art.nr.: 600068	Arcus Kjemi
Etylenediaminetetraeddiksyre	ED2SS	Sigma
Etylenediamintetraacid disodium salt løsning, 0,5M	E7889	Sigma- Aldrich
Folin reagent	500-0114	BioRad
Formamidopyrimidine DNA glycosylase		
Geit anti-kanin IgG konjugert med HRP, GAR-HRP		Biosense Laboratories
Heksaaminkobolt(III)klorid	H-7891	Sigma-Aldrich
Hepes	H3375	Sigma
Kaliumdihydrogenfosfat	1.04873	MERCK
Kaliumdihydrogenfosfat	P-5379	Sigma
Kaliumklorid	P-3911	Sigma
Karbonat-bikarbonatbuffer	C3041	Sigma
Kvikksølv(II)klorid	203777	Sigma-Aldrich
Metallothionin I&II fra kanin	M 7641	Sigma
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat	806 A299746??	MERCK
Natriumhydrogenkarbonat	S5761	Sigma
Natriumhydroksid	1.06498	MERCK
Natriumklorid	1.06404	MERCK
Natriumklorid	S-7653	Sigma
N-lauroylsarcosine natriumsalt	L5125	Sigma- Aldrich

NuSieve®GTG®Agarose	Cat.nr: 50081	Cambrex BioScience
Perklorsyre 70%	CODE article: 20589.293	PROLABO
Porphobilinogen	P-1134	Sigma
Resorufin ethyl ether	E 3763	Sigma
Resorufin natrium salt	R 3257	Sigma
SYBR®Gold 10000x i kons.DMSO	S11494	Invitrogen
Svovelsyre	100731	MERCK
TMB PLUS	4390A	Kem-En-Tech Diagnostics AS
Trifenylamin		
Triklorreddiksyre	1.00807	MERCK
Triton® X-100	23,472-9??	Aldrich
Triton® X-100	X100	Sigma
Triton® X-100	T8787	Sigma
Trizma®base	T-1503	Sigma
Trizma®hydrogenklorid	T3253	Sigma
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich
β-glucoronidase/arylsulfatase (fra Helix pomatia)	1.04114	MERCK
β-nicotinamide adenine dinukleotide fosfat red. tetrasodium salt	N1630	Sigma-Aldrich
δ-aminolevulinsyre hydrogenklorid	A3785	Sigma-Aldrich
ρ-dimetylaminobenzaldehyd (Ehrlich`s reagens)	D2004	Sigma-Aldrich

Vedlegg 5: Buffere og løsninger

Fortynningsbuffer (ALAD)	
Natriumfosfatbuffer pH 7,0	100ml 0,1M
Triton X-100	1ml
dH ₂ O	Til totalt 200ml

Modifisert Ehrlich reagens (ALAD)	
Kvikksølv(II)klorid	0,35g i 6ml dH ₂ O
70% perklorsyre	20ml
Eddiksyre	til totalt 110ml
Ehrlich reagent	2g

Fellingsløsning (ALAD)	
Triklorediksyre	40,0g/l
Kvikksølv(II)klorid	27,0g/l

ALA-reagens (ALAD)	
δ-aminolevulin syre	33,5mg
Fortynningsbuffer	50ml

Fortynningsbuffer (protein)	
Tris-buffer	0,1M
pH 8,0 ved 4 ⁰ C	

Homogeniseringsbuffer (Opparbeiding av lever)	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
KCl	0,15M
DTT	1mM
Glyserol	5%
pH 7,8	

Elektrolytt (MT)	
Co(NH ₃) ₆ Cl ₃	0,321g/l
NH ₄ Cl	3,4g/l
NH ₄ OH	154ml til 1l

Detergent (MT)	
Triton X-100	0,025%

Fortynningsløsning (MT)	
NaCl	0,9%

Mikrosomalbuffer (opparbeiding av lever)	
Homogeniseringsbuffer u/glyserol	
Glyserol	20%
EDTA	1mM

Coatingbuffer (CYP1A)	
Karbonat-bikarbonatbuffer	10 kapsler/l

TTBS (CYP1A)	
Tris-buffer, pH 8,5	20mM
NaCl	0,5M
Tween-20	0,0005%

Blokkeringsløsning (CYP1A)	
TTBS	
BSA	1%

Antistoffbuffer (CYP1A)	
TTBS	
BSA	0,1%

Fortynningsbuffer (EROD)	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
pH 8,0	

Lyseringsstock (Comet)	
NaCl	2,5M
EDTA	100mM
Tris-base	10mM
NaOH(s)	8,43g/l
N-Laurosylysarcosine natrium salt	11,24g/l
pH 10	Justering: HCl eller NaOH

Lyseringsbuffer (Comet)	
Lyseringsstock	300ml (89,1%)
DMSO	33,3ml (9,9%)
Triton X-100	3,33 ml (1,0%)

Collinsbuffer (Comet)	
Hepes	40mM
KCl	0,1M
EDTA	0,5mM
pH 7,6	Justering: 7M KOH

Elektroforesestock (Comet)	
NaOH	120g/l
EDTA	3,72g/l

Elektroforesebuffer (Comet)	
Elektroforesestock 1:10 i dH ₂ O	
pH 13.2	Justering: kons. HCl

Nøytraliseringsbuffer (Comet)	
Tris-base	48,5g/l
pH 7,5	Justering: HCl

TE-buffer (Comet)	
0,2M EDTA	5ml/l (0,5%)
0,5M Tris HCl	20ml/l (2%)
pH 8,0	

PBS med 10mM EDTA u/ Ca og Mg (Comet)	
NaCl	7,2g/l
Na ₂ HPO ₄ (vannfri)	1,48g/l
KH ₂ PO ₄	0,43g/l
EDTA	3,72g/l PBS
pH 7,4	

Fortynningsbuffer (opparbeiding av muskel, AChE)	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
pH 7,2	

AChE reagens (AChE)	
0,1M kaliumfosfatbuffer	30ml
0,075M ATC	0,2ml
DTNB	1,0ml

Vedlegg 6: Utstyrliste

Utstyr/instrumenter/Software	Leverandør
Centrifuge 581 OR	Eppendorf
Dri-Block®DB-3	Techne
Elektroforesetank	Folkehelseinstituttet
Biofuge pico	Heraeus
Waters 2695 Separations Module	
Multifuge 3 S-R (ALA-D)	Heraeus
E max precision microplate reader (ALA-D)	Molecular Devices
Mikrotest plate 96-brønner, flat bunn	Sarstedt
Thermomax microplatereader (CYP1A)	Molecular Devices Corp.
Gen5	Biotex
Probind, AssayPlate 96-brønn flat bunn	Falcon
Potter-Elverhjem homogenisator	
Biofuge 28RS (lever opparb.)	Heraeus sepatech
SORVALL RC 6 (lever opparb.)	Sorvall Instruments
SKAN Washer 300	Skaton Instruments
96-brønn MaxiSorp mikroplater (CYP1A)	NUNC
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
Fresco 21 Centrifuge, Thermo Electron Corporation (MT)	Heraeus
757 VA Computrace v1.0	Metrohm Ion Analysis
663VA Strand Polarograf	Metrohm
μ Autolab typeII potentiostat/galvanostat	Eco Chemie B.V.
IME663 røre/bobler	Eco Chemie B.V.
WWR Digital Heatblock	
QBT 2 varmeblokk	Grant
SynergyMX (EROD, AChE)	BioTex
SynergyMX Cuvette port (EROD)	BioTex
MicroAssay Plate, Chimney, 96-brønn, svart, klar bunn (EROD)	Greiner Bio One
Ultraturax, PRO 200	PRO Scientific Inc.
Multifuge 3 S-R (AChE)	Heraeus
Probind, Assay Plate 96-brønn flat bunn	Falcon

Vedlegg 7: Instrumentinnstillinger

Polarograf (MT)	
DP-Differensial Pulse	
Elektrodemodus	SMDE
Dråpestørrelse (Hg)	4
Rører (rpm)	2000
N ₂ - bobling ved start (s)	60
N ₂ - bobling ved tilsetning (s)	10
Cellevolum (ml)	1,2-1,4
Antall replikater	3
Startpotensial (V)	-1,2
Sluttpotensial (V)	-1,2
Spennings trinn (V)	0,005951
Puls Amplitude (V)	0,05
Pulstid (s)	0,04
Sweep rate (mV/s)	14,9
Min. topp vidde (V-step)	5
Min. topphøyde (A)	1e-010
Elektrolyttemperatur (°C)	25

Fluorescensmikroskop (Comet)	
Innstillinger	photo
Bertrand lens	Tubefactor 1.0x
Reflector/filter system turret	3
IC objective prism disc	BF
Incident light diaphragm module:	Venstre og høyre spak: helt opp 1. bryter: 0 2. bryter: 1 ved bruk

HPLC-system (PAH)	
Kolonne (mm)	4,6x250
Kolonnepartikler (µm)	5
Gjennomstrømningshastighet	1ml/min
Varighet (min)	30
Kolonnetemperatur (°C)	35
Fluorescens	Optimum for hver komponent
Injeksjonsvolum (ul)	25

Vedlegg 8: Spearman korrelasjonsanalyse

Tabell 8A: Spearman rankkorrelasjon mellom alle parameterene for begge kjønn i Ytre og Indre Oslofjord. r_s = Spearman korrelasjonsfaktor.

Ytre Oslofjord						Indre Oslofjord			
Parametere	Parametere	Hunn		Hann		Hunn		Hann	
		r_s	p-verdi	r_s	p-verdi	r_s	p-verdi	r_s	p-verdi
Lengde cm	Vekt g	1,0	0,000	1,0	0,000	0,9	0,000	1,0	0,000
LSI	Vekt g	0,5	0,014	0,1	0,655	0,6	0,006	-0,1	0,734
LSI	Lengde cm	0,4	0,044	0,1	0,865	0,5	0,028	-0,1	0,678
GSI	Vekt g	0,4	0,031	0,2	0,618	0,6	0,005	-0,2	0,278
GSI	Lengde cm	0,4	0,066	0,1	0,704	0,5	0,027	-0,3	0,260
GSI	LSI	0,4	0,036	0,3	0,354	0,9	0,000	0,7	0,000
KF	Vekt g	0,3	0,202	-0,3	0,325	0,4	0,080	0,1	0,741
KF	Lengde cm	0,1	0,662	-0,4	0,182	0,2	0,349	0,0	0,958
KF	LSI	0,6	0,002	0,3	0,263	0,5	0,024	0,1	0,600
KF	GSI	0,4	0,024	0,2	0,513	0,5	0,029	0,0	0,951
MT	Vekt g	0,0	0,823	-0,5	0,122	0,6	0,009	0,1	0,598
MT	Lengde cm	-0,1	0,793	-0,5	0,053	0,5	0,031	0,1	0,751
MT	LSI	-0,2	0,338	-0,1	0,789	0,6	0,014	0,0	0,895
MT	GSI	0,0	0,864	-0,2	0,513	0,5	0,048	-0,1	0,563
MT	KF	0,0	0,889	0,1	0,803	0,2	0,379	0,5	0,016
ALA-D	Vekt g	-0,1	0,621	0,2	0,651	0,1	0,795	0,2	0,511
ALA-D	Lengde cm	-0,2	0,540	0,4	0,283	0,1	0,704	0,2	0,567
ALA-D	LSI	-0,2	0,493	0,1	0,867	-0,2	0,633	0,1	0,898
ALA-D	GSI	-0,1	0,771	0,1	0,879	-0,2	0,499	-0,1	0,829
ALA-D	KF	0,0	0,970	-0,5	0,233	0,3	0,379	-0,1	0,701
ALA-D	MT	0,1	0,612	-0,3	0,420	-0,1	0,795	0,1	0,829
CYP1A	Vekt g	0,1	0,522	-0,1	0,734	-0,3	0,196	-0,2	0,284
CYP1A	Lengde cm	0,2	0,296	-0,1	0,686	-0,2	0,349	-0,3	0,186
CYP1A	LSI	0,0	0,880	0,0	0,986	-0,5	0,053	0,0	0,975
CYP1A	GSI	-0,2	0,331	0,0	0,983	-0,5	0,040	0,3	0,138
CYP1A	Kondisjonsfaktor	0,0	0,899	0,5	0,058	-0,5	0,029	0,4	0,094
CYP1A	MT	-0,4	0,072	0,0	1,000	0,0	0,907	0,3	0,214
CYP1A	ALA-D	-0,3	0,283	0,0	1,000	-0,2	0,527	0,0	0,907
EROD	Vekt g	0,1	0,665	-0,2	0,578	0,1	0,633	-0,5	0,015
EROD	Lengde cm	0,1	0,673	-0,2	0,564	0,0	0,944	-0,5	0,014
EROD	LSI	0,0	0,896	-0,3	0,405	0,3	0,311	0,3	0,286
EROD	GSI	0,0	0,970	-0,2	0,457	0,1	0,687	0,0	0,862
EROD	Kondisjonsfaktor	-0,1	0,569	-0,2	0,603	0,2	0,548	0,0	0,973
EROD	MT	-0,1	0,516	0,6	0,039	0,4	0,130	-0,1	0,801
EROD	ALA-D	0,6	0,021	0,2	0,693	0,0	0,914	0,1	0,855
EROD	CYP1A	-0,2	0,246	-0,1	0,668	0,5	0,046	0,2	0,464
1-OH-pyren	Vekt g	-0,1	0,769	0,2	0,615	0,5	0,068	0,1	0,638

1-OH-pyren	Lengde cm	-0,1	0,791	0,2	0,530	0,5	0,041	0,2	0,493
1-OH-pyren	LSI	-0,2	0,460	-0,4	0,197	0,2	0,405	0,3	0,145
1-OH-pyren	GSI	0,0	0,862	0,1	0,729	0,3	0,345	0,5	0,036
1-OH-pyren	Kondisjonsfaktor	-0,1	0,650	-0,4	0,187	0,2	0,579	-0,2	0,372
1-OH-pyren	MT	0,0	0,949	0,0	0,872	0,0	0,957	-0,1	0,626
1-OH-pyren	ALA-D	0,4	0,124	0,2	0,570	0,5	0,101	-0,3	0,425
1-OH-pyren	CYP1A	0,2	0,451	0,1	0,768	-0,5	0,075	0,1	0,737
1-OH-pyren	EROD	0,0	0,952	0,3	0,334	-0,3	0,222	-0,2	0,354
TL buf u/fpg	Vekt g	-0,3	0,290	0,1	0,779	0,0	0,911	-0,2	0,443
TL buf u/fpg	Lengde cm	-0,2	0,509	-0,3	0,526	-0,1	0,735	-0,2	0,420
TL buf u/fpg	LSI	-0,1	0,570	0,3	0,493	-0,1	0,653	0,1	0,823
TL buf u/fpg	GSI	-0,1	0,842	0,5	0,183	-0,2	0,474	0,0	0,919
TL buf u/fpg	Kondisjonsfaktor	-0,3	0,293	0,5	0,233	0,2	0,605	-0,1	0,766
TL buf u/fpg	MT	-0,3	0,260	0,4	0,385	0,1	0,670	0,3	0,226
TL buf u/fpg	ALA-D	0,6	0,090	-0,8	0,104	0,1	0,829	-0,1	0,823
TL buf u/fpg	CYP1A	0,0	0,926	0,3	0,531	0,2	0,502	0,2	0,423
TL buf u/fpg	EROD	0,6	0,004	0,2	0,693	0,4	0,114	0,2	0,494
TL buf u/fpg	1-OH-pyren	0,0	0,892	-0,1	0,867	-0,1	0,771	-0,1	0,622
AChE	Vekt g	-0,3	0,185	-0,2	0,529	-0,5	0,028	-0,5	0,033
AChE	Lengde cm	-0,2	0,243	-0,3	0,397	-0,4	0,082	-0,4	0,044
AChE	LSI	-0,4	0,076	0,1	0,831	-0,8	0,000	-0,3	0,186
AChE	GSI	-0,5	0,005	0,1	0,681	-0,6	0,013	-0,2	0,382
AChE	Kondisjonsfaktor	-0,2	0,341	0,3	0,280	-0,4	0,103	-0,2	0,407
AChE	MT	0,1	0,489	-0,1	0,817	-0,5	0,050	-0,5	0,013
AChE	ALA-D	-0,3	0,302	-0,5	0,183	0,0	0,931	-0,1	0,751
AChE	CYP1A	-0,1	0,462	-0,2	0,529	0,5	0,043	-0,1	0,606
AChE	EROD	0,0	0,858	-0,2	0,505	-0,1	0,653	0,1	0,746
AChE	1-OH-pyren	-0,3	0,110	-0,5	0,059	-0,4	0,134	-0,3	0,125
AChE	TL buf u/fpg	0,0	0,989	0,2	0,570	0,0	0,994	0,2	0,510