

**Effekter av miljøgifter på
torsk og skrubbe fra indre
Oslofjord**

Tor Fredrik Holth



Cand. Scient. oppgave i toksikologi

Oslo, november 2004

Program for toksikologi og økofysiologi
Biologisk institutt

Forord

Denne hovedfagsoppgaven er utført ved biologisk institutt ved Universitetet i Oslo og ved Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA). Arbeidet er veiledet av amanuensis Thorvin Andersen (Universitetet i Oslo) og professor Ketil Hylland (NIVA og Universitetet i Oslo). En stor takk til dem. Stor takk går også til Fagrådet for vann- og avløpsteknisk samarbeid i indre Oslofjord som ga økonomisk støtte til deler av arbeidet.

En stor takk til besetningene på Trygve Braarud og G.M. Dannevig, som var behjelpelige med innsamling av materiale på en effektiv måte. Odd Sørensen takkes for sin innsats og hjelpsomhet ved innsamling av flatfisk i Hubukta ved Fredrikstad. Terje Laskemoen og Joachim Tørum Johansen takkes for hjelp til innsamling og prøvetaking av fiskene.

Takk til alle ansatte ved biologisk laboratorium på NIVA for støtte, interesse og hjelp til oppgaven, noe som også har gjort tiden på NIVA til en hyggelig opplevelse. Takk også til Knut Erik Tollefsen for faglig støtte og hjelpsomhet.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til alle medstudenter og ansatte for en lærerik og morsom studietid.

Oslo, november 2004

Tor Fredrik Holth

Sammendrag

Denne oppgavens formål var å undersøke om det fantes effekter av miljøgifter på torsk eller skrubbe fra indre Oslofjord. Markører for biologiske effekter, også kalt biomarkører, ble brukt til å identifisere og kvantifisere effekter av organiske miljøgifter, spormetaller og østrogenliknende stoffer. Fisk fra ytre Oslofjord ble brukt som referanse. Metodene som ble benyttet var kvantifisering av mengde cytokrom P450 1A (CYP1A) protein i lever, måling av CYP1A proteinets aktivitet (EROD aktivitet) i lever og nyre, kvantifisering av mengde metabolitter av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) i gallen, kvantifisering av metallothionein (MT) i nyre, måling av aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i røde blodceller og kvantifisering av vitellogenin i blodplasma.

Det ble totalt samlet inn 55 skrubbe og 60 torsk ved lokaliteter som representerte indre og ytre Oslofjord. Skrubbe fra indre Oslofjord hadde hatt høyere vekst og hadde høyere leversomatisk indeks (LSI) enn skrubbe fra ytre Oslofjord, noe som trolig skyldtes forskjeller i næringstilgang mellom områdene. Skrubbe hadde også stor forskjell i LSI mellom kjønnene, noe som trolig skyldtes at hunnskrubbe hadde startet forberedelser til gytingen. For torsk fantes det ingen forskjeller i LSI, selv om det ble funnet ut ved vitellogeninanalysen at hunntorsk fra Gråøyrenna hadde startet gyteforberedelser.

Både torsk og skrubbe fra indre Oslofjord hadde mer PAH metabolitter i gallen og hadde blitt eksponert for høyere nivåer av PAH enn fisk fra ytre Oslofjord. Torsk fra lokaliteten midt i indre Oslofjord (Steilene) hadde en større andel fenantren i gallen enn fisk fra de andre lokalitetene, noe som tydet på at fisk herfra var eksponert for en større andel PAH fra forbrenningsprosesser. Mengden CYP1A protein i lever og EROD aktiviteten i nyre var høyere i fisk fra indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord, og for skrubbe var også EROD aktiviteten i lever høyere i fisk fra indre Oslofjord. For torsk var det derimot ingen forskjeller i EROD aktiviteten i lever, noe som trolig skyldtes at denne var hemmet i torsk fra indre Oslofjord. Hemmingen av EROD aktivitet i torsk fra indre Oslofjord kunne skyldes effekter av metaller, høye nivåer av organiske miljøgifter eller en lavere sensitivitet for eksponering av organiske miljøgifter.

Det fantes store kjønnsforskjeller i nivåene av metallotionein. Hunnfisk av torsk og skrubbe fra ytre Oslofjord hadde høyere MT nivåer enn hunnfisk av torsk og skrubbe fra indre Oslofjord. For hannfisk fantes det ingen forskjeller mellom lokalitetene. Det fantes også lokalitetsforskjeller i MT nivå for hunntorsk i indre Oslofjord, noe som trolig var en effekt av lokalitetsforskjeller i gytteforberedelser. Forskjellen i MT mellom indre og ytre Oslofjord kunne skyldes en større metallbelastning på fisk fra ytre Oslofjord, men også at opptaket eller fordelingen av spormetaller i fisk fra indre Oslofjord var lavere på grunn av eksponering for PAH eller PCB.

Skrubbe og hanntorsk fra indre Oslofjord hadde hemmet ALA-D aktivitet. Skrubbe og hanntorsk fra indre Oslofjord hadde henholdsvis 59% og 39-45% av ALA-D aktiviteten som ble målt i skrubbe og hanntorsk fra ytre Oslofjord. Dette var en tydelig effekt av bly på fisk fra indre Oslofjord. Hos torsk hadde hannfisk kraftigere respons i ALA-D aktivitet enn hunnfisk, noe som ikke har blitt funnet i andre undersøkelser. Dette kan tyde på at kjønnshormoner påvirker ALA-D aktivitet i torsk.

Det fantes ingen signifikante effekter av østrogenliknende stoffer i torsk. Belastningen av østrogenliknende stoffer på torsk i indre Oslofjord er derfor liten.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
2. Materiale og Metoder.....	8
2.1 Valg av stasjoner.....	8
2.2 Innsamling av prøver	10
2.3 Aldersbestemmelse	11
2.4 Leversomatisk indeks og kondisjonsfaktor.....	12
2.5 Opparbeiding	14
2.6 Måling av protein.....	15
2.7 Optimalisering av EROD analysen.....	16
2.8 Måling av EROD aktivitet i lever.....	18
2.9 Måling av EROD aktivitet i nyre.....	19
2.10 Måling av mengde CYP1A protein i lever.....	20
2.11 Måling av PAH-metabolitter i galle.....	21
2.12 Måling av aminolevulinsyre dehydratase aktivitet i røde blodceller.....	22
2.13 Måling av metallotionein i nyre	23
2.14 Optimalisering av analysen for vitellogenin	25
2.15 Måling av vitellogenin i blodplasma fra torsk	25
2.16 Statistiske metoder.....	27
3. Resultater	29
3.1 Alder, lengde og vekt for innsamlet fisk.....	29
3.2 Leversomatisk indeks og kondisjon.....	31

3.3	<i>Mengde CYP1A protein og EROD aktivitet i lever</i>	35
3.4	<i>Metabolitter av PAH i galle</i>	39
3.5	<i>EROD-aktivitet i nyre</i>	45
3.6	<i>Metallotionein i nyre</i>	47
3.7	<i>Aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i røde blodceller</i>	49
3.8	<i>Vitellogeninkonsentrasjoner i blodplasma fra hanntorsk</i>	51
3.9	<i>Multivariat metode</i>	52
4.	Diskusjon	58
4.1	<i>Biologiske parametere</i>	58
4.2	<i>Effekter av organiske miljøgifter</i>	60
4.3	<i>Effekter av metaller</i>	66
4.4	<i>Effekter av østrogenliknende stoffer</i>	69
5.	Konklusjon	71
6.	Referanser	72

Vedlegg 1-9

1. Innledning

Nesten all menneskelig aktivitet fører til utslipp av forurensende stoffer. Det kan være fra gruvedrift og metallindustri, forbrenning av organisk materiale, bruk av pesticider, matproduksjon eller produksjon og avfallshåndtering av for eksempel plastikk og betong. Forurensinger som slippes ut til luft eller vann vil etter en stund ende opp i det marine miljøet. Havet vil derfor inneholde en mengde ulike forurensende stoffer. Noen av disse stoffene kan være giftige for organismer selv ved lave konsentrasjoner eller de kan oppkonsentreres av organismene til skadelige konsentrasjoner. Hvis disse stoffene også brytes dårlig ned, kalles de med en fellesbetegnelse for miljøgifter (SFT 2003).

Indre Oslofjord er en fjord som mottar store mengder antropogent avfall. Oslofjorden har en grunn terskel rett nord for Drøbak som i denne undersøkelsen danner skillet mellom ytre og indre Oslofjord. Denne terskelen er på sitt dypeste 19,5 meter, og danner et hinder for vannutskiftning mellom ytre og indre Oslofjord. Om sommeren dannes det også sjiktninger som forhindrer vertikal sammenblanding av vannsøylen, noe som skyldes lavt saltinnhold og høy temperatur i overflatevannet. Disse forholdene fører til at vannet i indre Oslofjord sirkulerer dårligere, noe som kan føre til store variasjoner i vannkvaliteten.

Polyklorerte bifenyler (PCB) regnes for å være den mest belastende miljøgiften i indre Oslofjord. Konsentrasjoner i sediment på opptil 764 µg/kg tørrvekt har blitt registrert, men generelt minsker belastningen utover fjorden (Konieczny 1994). Konsentrasjonen av PCB i torsk og skrubbe fra indre Oslofjord har vært markert til sterkt forurenset i henhold til SFT's klassifiseringssystem (Knutzen *et al.* 2000). Det finnes store lokale forskjeller i belastningen av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), men konsentrasjoner i sediment i indre Oslofjord har generelt vært mellom 8-35 mg/kg tørrvekt (Konieczny 1994). Av spormetaller er det kvikksølv og kadmium som dominerer belastningen i sedimenter. Konsentrasjonen av kadmium og kvikksølv i sedimentene har vært mellom 0,06-6,20 mg/kg tørrvekt og avtar generelt utover fjorden. Bly har vist god samvariasjon med kvikksølv og kadmium og har hatt konsentrasjoner mellom 30-395 mg/kg tørrvekt. Cu har vært i omtrent samme størrelsesorden som bly. For metaller virker det derimot ikke som konsentrasjonene i fisk følger belastningsforholdene i sedimentene. For eksempel har konsentrasjonene av kvikksølv i fisk ligget så vidt over normalverdiene (0,1 mg/kg våtvekt) (Knutzen *et al.* 2000). I indre

Oslofjord har også konsentrasjonen av tinnorganiske forbindelser vært høy i fisk (Knutzen *et al.* 2000).

Indre Oslofjord er sterkt trafikkert av skip, ferger og småbåter og har i mange år hatt tilførsler fra avløpssystemer og vassdrag med påvirkninger av industri. Renseanleggene er hovedkilden til utslipp av miljøgifter foruten PAH og bly til indre Oslofjord, men alle vassdragene i Osloområdet bidrar også med betydelige tilførsler (Johansen *et al.* 1995). Sandvikselva har klart størst vannføring og bidrar særlig med tilførsel av spormetaller, spesielt kvikksølv. Loelva bidrar spesielt med tilførsel av PCB, mens Akerselva har relativt stor vannføring og bidrar generelt med betydelige tilførsler av miljøgifter (SFT 2003). Samtlige av disse vassdragene tilfører også kadmium, krom og sink, og er klassifisert som meget sterkt forurensede av spormetaller etter SFT's klassifiseringssystem (Johansen *et al.* 1995). Den totale tilførselen av PAH til indre Oslofjord domineres av nedfall fra luft, som er ca. 3 ganger større enn utslippene til fjorden fra renseanleggene (Johansen *et al.* 1995). Bly er det eneste spormetallet der tilførselen hovedsakelig kommer fra vassdragene, noe som tyder på at utslippene av bly kommer fra trafikk og andre diffuse kilder (Johansen *et al.* 1995; SFT 2003).

Miljøgiftene som slippes ut vil kunne påvirke organismene i havet og bidra til forskjellige biologiske effekter. Slike biologiske effekter kan være alt fra endringer i metabolismen til utvikling av kreft eller deformasjoner. Det vil finnes miljøgifter som har sterkere eller svakere biologisk effekt enn andre, og det vil finnes miljøgifter med effekter som kan motvirke hverandre. Dersom sammenhengen mellom eksponering for miljøgift og biologisk effekt er kjent, kan denne biologiske effekten måles og brukes som en indikasjon på eksponering for miljøgiften (van der Oost *et al.* 2003). Slike biologiske effekter i organismer som er relatert til en redusering av helsetilstanden kalles biomarkører (WHO 1993; Peakall 1994; van Gestel *et al.* 1996).

Det stilles visse krav til valg av organismene som benyttes i undersøkelser av biomarkører. Organismene som benyttes må ha vid utbredelse, stor forekomst, være relativt stasjonære, ta opp miljøgifter og kunne leve i forurensede miljøer. Dette vil si at organismen kan representere området den kommer fra og at den er lett tilgjengelig. En slik organisme kalles for en indikatorart (Stich *et al.* 1976; Goksøyr *et al.* 1996). I denne undersøkelsen ble det valgt torsk (*Gadus morhua* L.) og skrubbe (*Platichthys flesus* L.) som indikatorarter. Torsk er

meget vanlig i Norge og er en av våre viktigste kommersielle fiskearter. Torsken i indre Oslofjord danner en egen separat stamme, genetisk forskjellig fra torskestammer andre steder på Sør-Østlandet (Knutsen *et al.* 2003). Stammen i indre Oslofjord kjønnsmodnes ved en alder på omtrent 3 år og 35 cm lengde, noe som er det tidligste som er observert i Sør-Norge (Olsen *et al.* 2004). Generelt gyter kysttorsken i februar – april og oppholder seg som regel i det samme fjordsystemet hele året, der den også har sine gyteplasser (Salvanes *et al.* 1992; Olsen *et al.* 2004). I indre Oslofjord veksler torskens diett mellom tiftokreps som reker (mudderreker, dypvannsreker) og krabber, flerbørstemark, krill og slangestjerner, men fødevalget avhenger også av tilgjengelige byttedyr og torskens størrelse (Hop *et al.* 1992; Heggelund 2001). Torsken har en lever rik på fett (40-80%) (Addison *et al.* 1968; Dey *et al.* 1983), og er derfor utsatt for akkumulering av fettløselige miljøgifter. Det er utført en rekke undersøkelser av biomarkører på torsk (Goksøyr *et al.* 1987; Hylland *et al.* 1994; Beyer *et al.* 1996; Aas *et al.* 2000a; Aas *et al.* 2001), noe som gjør torsk til en god indikatorart.

Skrubbe er en flatfisk utbredt i hele Øst-Atlanteren og er en meget vanlig bunnfisk i Norge. Arten er hovedsakelig marin, men kan også leve i brakkvann eller ferskvann. Om sommeren finnes skrubba grunt på alle bunntyper, mens den om vinteren kan gå ned til ca 120 meters dyp (Pethon 1989). I Sør-Norge holder skrubba seg innfor et lokalt område hele året og er altså forholdsvis stasjonær (Hansen 1979). Skrubba tilbringer mye tid nedgravd i sedimentet. I Oslofjorden består skrubbas føde for det meste av flerbørstemark, men også andre bunndyr som ulike krepsdyr, slangestjerner, muslinger og småfisk (Wigeland 1975). Skrubba gyter i tidsrommet februar – august, men stort sett foregår gytingen om våren (Hansen 1979; Pethon 1989). Det er utført en rekke undersøkelser av biomarkører på skrubbe (Eggens *et al.* 1996; Goksøyr *et al.* 1996; Hylland *et al.* 1996b; Richardson *et al.* 2001; Kleinkauf *et al.* 2004a), og den er derfor også en god indikatorart.

Grove indikasjoner på fiskenes helsetilstand kan måles som leversomatisk indeks (LSI) eller kondisjonsfaktor (Slooff *et al.* 1983; Bolger *et al.* 1989). Disse biomarkørene kan være nyttige ved en ”screening” for å indikere effekter av miljøgifter eller for å gi informasjon om fiskenes næringsstatus. Disse biomarkørene blir også sterkt påvirket av faktorer som årstid eller sykdom og er derfor ikke særlig robuste (van der Oost *et al.* 2003). Næringsstatus kan ha mye å si for metabolismen i fisk, og må taes hensyn til ved tolking av responser i enzymer eller enzymsystemer (Lemaire *et al.* 1992; Jørgensen *et al.* 1999; Metón *et al.* 2003).

Et enzymesystem med bred substratspesifisitet er cytokrom P450 (CYP) systemet. Disse enzymene kan biotransformere både endogene og eksogene stoffer. Totalt er det beskrevet 814 subfamilier i CYP systemet, og 233 av disse har blitt beskrevet i dyreriket (Nelson 2004). Cytokrom P4501A (CYP1A) er den eneste av disse subfamiliene som særlig induseres av aromatiske og/eller klorerte hydrokarboner (Stegeman *et al.* 1994). Aromatiske og/eller klorerte hydrokarboner omfatter organiske miljøgifter som PAH, PCB og dioksiner. Det har blitt beskrevet to medlemmer av CYP1A subfamilien i regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*), CYP1A1 og CYP1A3 (Nelson 2004). Disse to medlemmene ser derimot ut til å være så nært beslektet at de er vanskelig å skille fra hverandre (Gooneratne *et al.* 1997). Cytokrom P4501A subfamilien i regnbueørret regnes for å være den grenen innen CYP systemet i fisk som har divergert mest fra dets felles opphav (Morrison *et al.* 1995), og det er ikke funnet noen lignende medlemmer av CYP1A subfamilien i torsk eller skrubbe. Videre i undersøkelsen vil derfor disse enzymene i torsk og skrubbe bli omtalt på subfamilienivå, som CYP1A.

Regulering av CYP1A i organismen er en av de første målbare effektene etter eksponering for organiske miljøgifter. Responsen måles som oftest som forskjeller i mengden CYP1A mRNA, mengden CYP1A protein, eller som forskjeller i den katalytiske aktiviteten til CYP1A proteinet. Mengden CYP1A protein i fisk ser ut til å reguleres gjennom Ah¹ reseptoren på samme måte som i pattedyr (Hahn *et al.* 1995). Ligander som bindes til Ah-reseptoren transporteres da til kjernen og fungerer som en transkripsjonsfaktor for gener som regulerer blandt annet CYP1A. Deetylering av etoksyresorufin er spesifikt avhengig av CYP1A aktivitet, og er nå den mest brukte metoden for måling av CYP1A aktivitet (EROD² aktivitet) (Whyte *et al.* 2000). Responstiden i CYP1A er generelt rask, men avhenger av art, eksponeringsvei, vanntemperatur og stofftype. I skrubbe kan eksponering for benzo[a]pyren inducere CYP1A innen 1-2 dager, mens PCB-156 inducerer CYP1A innen en uke ved 10°C (Beyer *et al.* 1997). Induksjonen av CYP1A etter eksponering for PCB vedvarer også lenger, noe som trolig skyldes en depot-effekt av PCB i fettvev (Beyer *et al.* 1997). Mengden CYP1A protein og EROD aktivitet måles som oftest i leveren, men ekstrahepatiske vev som nyrer, hjerte og tarmen inneholder også signifikante nivåer av CYP enzymer (Stegeman *et al.* 1979; Lindström-Seppä *et al.* 1981). Av disse har særlig nyrer relativt høy CYP aktivitet (Lindström-Seppä *et al.* 1981). Det finnes også korrelasjoner mellom forandringer i mengde

¹ Aryl hydrokarbon

² 7-Etoksyresorufin O-deetylase

og aktivitet av CYP1A og utvikling av leverkreft i flere fiskearter (Malins *et al.* 1985; Myers *et al.* 1994; Johnson *et al.* 1998; Myers *et al.* 1998). Dette gjør forandringer i mengde og aktivitet av CYP1A til en biomarkør for effekter av aromatiske og/eller klorerte hydrokarboner.

Polysykliske aromatiske hydrokarboner som taes opp av fisk metaboliseres i leveren og skilles ut til gallen som konjugerte forbindelser. Konjugering til glukuronsyre regnes for å være den viktigste utskillingsveien i fisk, men også sulfatering og konjugering til glutatation kan finne sted (George 1994). Metabolismen av PAH i fisk er rask, og innholdet av PAH-metabolitter i gallen viser god korrelasjon til eksponering for PAH, både i forhold til dose og eksponeringens varighet (Jimenez *et al.* 1987; Collier *et al.* 1991; Brumley *et al.* 1998). Mengden metabolitter i gallen økes signifikant allerede 12 timer etter eksponering og forblir forhøyet omtrent en uke (Aas *et al.* 2000a). Pyrenmetabolitter i gallen benyttes ofte som markør for den totale metabolismen av PAH forbindelser, da som 1-hydroksypyren (Krahn *et al.* 1987; Ariese *et al.* 1993). Sammenhengen mellom 1-hydroksypyrennivåer i galle og konsentrasjonen av PAH i sedimenter er proporsjonale og positivt korrelert (Hosnedl *et al.* 2003). Derfor gir kvantifisering av PAH metabolitter i gallen, særlig 1-hydroksypyren, en god indikasjon på belastningen av PAH innenfor den siste uken før prøvetaking.

Som biomarkør for spormetalleksponering benyttes metallotionein (MT). Metallotionein er en gruppe proteiner som har lav molekylvekt, er varmestabile og har et meget høyt cysteininnhold (~30 %) (Hylland *et al.* 1994). De har en særlig stor evne til å binde metaller, men antas også å ha en rolle som antioksidanter (Hogstrand *et al.* 1991; Viarengo *et al.* 2000). Metallotionein er trolig den viktigste lagrings- og forsyningsplassen for essensielle metaller som Cu og Zn (Roesijadi 1992). Metallotionein finnes i de fleste vev, men har hos torsk størst konsentrasjon i lever og hjerne (Hylland *et al.* 1994). Reguleringen av MT i nyrene ser derimot ut til å være mindre sensitiv for påvirkning av andre faktorer enn MT i leveren (Gerpe *et al.* 2000). Induksjonen av MT viser gode korrelasjoner til både dose og tid etter eksponering av spormetaller som Zn, Cd, Hg og Cu selv om responstiden kan være lang (over tre uker) (Hogstrand *et al.* 1991; Beyer *et al.* 1997; Castaño *et al.* 1998). I pattedyr induseres MT også av stoffer som cytokiner, antibiotika eller etanol, men i fisk ser induksjonen av MT ut til å være mer spesifikk overfor metaller (Overnell *et al.* 1987; Kägi 1991; Kille *et al.* 1992).

Bly, et metall med bred toksisk virkning, hemmer den enzymatiske aktiviteten til δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) (Hodson 1976; Hodson *et al.* 1977). ALA-D er et enzym som katalyserer det andre trinnet i hemsyntesen, der to molekyler aminolevulinsyre (ALA) kondenseres til ett molekyl porfobilinogen (PBG). PBG er byggesteinen for proteiner som hemoglobiner og forskjellige cytokromer. I pattedyr og fugl kan hemming av ALA-D aktiviteten føre til anemi, men slike skadelige effekter etter hemming av ALA-D observeres ikke i fisk (Larsson *et al.* 1985). Hemmingen av ALA-D i fisk relateres derfor til de kjente skadelige langtidseffektene av bly som kan være neurotoksitet (sort hale) eller misdannelser i benvev (Hodson *et al.* 1978; Hodson *et al.* 1984; Larsson *et al.* 1985; Haux *et al.* 1989). Hemmingen av ALA-D i fisk inntreffer raskt, innen 1-2 dager, og viser en klar dose-respons for blyeksponering (Hodson *et al.* 1982). Responsens halveringstid avhenger av hvor mye bly som har akkumulert i vevene i organismen. En blyeksponering som har vart lenge kan føre til en hemming av ALA-D aktivitet i lang tid selv om fisken ikke lenger eksponeres for bly (Hodson *et al.* 1977; Johansson-Sjöbeck *et al.* 1979). Ployklorerte bifenyler eller spormetaller som kadmium, kobber, sink og kvikksølv har ingen kjent virkning på ALA-D aktivitet i blod *in vivo* (Westman *et al.* 1975; Hodson *et al.* 1977). Forandringer i ALA-D aktivitet regnes derfor som en spesifikk biomarkør for blyeksponering.

Antropogene stoffer som påvirker reproduksjonen i fisk kan være et problem i områder med stor belastning av forurensing. Østrogener og antiøstrogener er hormoner som påvirker reguleringen av reproduksjonssyklusen. Stoffer som østradiol og testosteron er de naturlige hormonene, mens stoffer som interfererer med virkningen av disse, kalles hormonforstyrrende stoffer. Østradiol stimulerer leveren til å syntetisere vitellogenin (VTG). Vitellogenin, forløperen til eggeplommeprotein, er et glykoprotein som syntetiseres i leveren i hunndyr i alle ovipare vertebrater etter østrogenpåvirkning (Emmersen *et al.* 1976; Mommsen *et al.* 1988). Genet for VTG finnes også i hanndyr, men uttrykkes vanligvis ikke (Solé *et al.* 2000). Ett unntak er rødspette (*Pleuronectes platessa*), der hanner har et høyere østrogennivå i blodplasma enn hanner av andre flatfisk (Scott *et al.* 2000). De har derfor også et naturlig, lavt vitellogeninnivå. Til tross for dette ser induksjonen av vitellogenin i ungfisk ut til å fungere som biomarkør for slike effekter også i denne arten (Craft *et al.* 2004). Økning av VTG-nivåer i hannfisk og ungfisk skyldes eksponering for østrogenliknende stoffer (Sumpter 1995). Et økt vitellogeninnivå i hannfisk kan føre til nyresvikt og hemming av gonadevekst (Herman *et al.* 1988; Gimeno *et al.* 1996). Sammenhengen mellom eksponering for slike hormonforstyrrende stoffer og skader både på individ og populasjonsnivå begynner derfor å bli godt dokumentert.

Endringer i nivået av VTG i hannfisk og ungfisk regnes derfor som en biomarkør for effekter av østrogen og østrogenliknende stoffer.

Denne oppgavens formål var å undersøke om det fantes effekter av miljøgifter på torsk eller skrubbe fra indre og ytre Oslofjord. Dette innebar å undersøke:

- Finnes det effekter av organiske miljøgifter i skrubbe eller torsk fra indre og/eller ytre Oslofjord?
- Finnes det effekter av spormetaller i skrubbe eller torsk fra indre og/eller ytre Oslofjord?
- Finnes det effekter av østrogenliknende stoffer i torsk fra indre og/eller ytre Oslofjord?
- Er det forskjeller i miljøgift-belastningen for fisk fra indre Oslofjord sammenliknet med fisk fra ytre Oslofjord?

Som biomarkører for effekt av organiske miljøgifter ble det målt forandringer i mengde CYP1A protein i lever og EROD aktivitet i lever og nyre. Som biomarkør for effekt av spormetaller generelt ble det målt forskjeller i mengden av metallotionein i nyre. Som biomarkør for bly ble det målt forskjeller i aktiviteten av enzymet aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D). Som biomarkør for effekter av østrogenliknende stoffer ble det målt forskjeller i eggeplommeproteiniet vitellogenin i hanntorsk.

2. Materiale og Metoder

2.1 Valg av stasjoner

Torsk ble fanget ved tre lokaliteter i indre Oslofjord: Killingen i Lysakerfjorden, Steilene og Gråøyrenna. Disse lokalitetene er spredt fra nord til sør i indre Oslofjord og regnes å representere populasjonen av torsk i indre Oslofjord (Figur 2.1).



Figur 2.1. Kart over indre Oslofjord med fangstlokaliteter.

Torsk fra ytre Oslofjord ble fanget i Langesundsfjorden i november 2001 og transportert til NIVAs forskningsstasjon på Solbergstrand. Der ble de oppbevart i tanker og fôret med reker i ett år før prøvetakingen fant sted. Vanninntaket til oppbevaringstankene var på 60 m dybde utenfor stasjonen, som ligger rett sør for Drøbak og Drøbaksterskelen. På grunn av denne behandlingen representerer ikke torsk fra ytre Oslofjord noe spesifikt område, men ble benyttet som antatt "ren" fisk.

For skrubbe ble det valgt en lokalitet i indre Oslofjord og en lokalitet i ytre Oslofjord. I indre Oslofjord ble skrubbe fanget ved Killingen i Lysakerfjorden. I ytre Oslofjord ble skrubbe fanget i Hubukta ved Fredrikstad. Hubukta ligger nord i Hvalerområdet, som er et gruntvannsområde på østsiden av Ytre Oslofjord. Bukta er grunn (6-7 m) med mudderbunn. Vesterelva, som er den delen av Glomma med minst vannføring, har utløp forbi Hubukta. Forurensingssituasjonen i Hvalerområdet har forbedret seg betraktelig fra 1980 til 1994, særlig med hensyn på spormetaller som kadmium og kvikksølv (Helland 1996). Sedimenter i området har hatt moderate til lave verdier av metaller, med unntak av kobber som har blitt funnet som markert forurensing over hele området (Helland 1996). De fleste undersøkte lokaliteter i Hvalerområdet har vist moderat forurensing av PCB og PAH. Leira, som er området utenfor Hubukta, har hatt laveste konsentrasjon av PCB i sedimentprøver (8 µg/kg), mens konsentrasjonen av PAH er (1200 µg/kg) har vært uforandret fra 1980 til 1994 (Helland 1996). Skrubbe fra Hubukta har tidligere blitt brukt i undersøkelser av biomarkører og har hatt relativt lav belastning av miljøgifter (Christensen 1996; Nissen-Lie 1997).

2.2 Innsamling av prøver

Det ble totalt samlet inn 55 skrubbe og 60 torsk til denne undersøkelsen (Tabell 2.1). Torsk fra ytre Oslofjord, Steilene og Gråøyrenna ble fanget med trål, mens torsk fra Killingen ble fanget med garn. Det ble kun fanget fire torsk ved Killingen og det var ingen store alders- eller størrelsesforskjeller mellom torsk fra Killingen og fisk fanget andre steder i indre Oslofjord. Disse ble derfor slått sammen med torsk fra Steilene og danner en felles lokalitet i denne undersøkelsen: Steilene/Killingen. Skrubbe ble fanget med garn i både ytre og indre Oslofjord.

Tabell 2.1. Antall fisk av hvert kjønn som ble fanget ved de forskjellige lokalitetene.

	Indre Oslofjord			Ytre Oslofjord	
	Killingen	Gråøyrenna	Steilene	Solbergstrand	Hubukta
♀ Skrubbe	17				20
♂ Skrubbe	9				9
♀ Torsk	3	5	4	16	
♂ Torsk	1	9	8	14	

Prøvene ble samlet i løpet av november 2002. På hver toktdag ble vanntemperatur, saltholdighet og fangstdybde målt (Tabell 2.2). Målingene for indre Oslofjord ble gjort på Steilene. Ved innsamling av skrubbe i Hubukta 15/11-02 ble ikke vanntemperatur eller saltholdighet notert. Derfor er vanntemperaturen for Hubukta hentet fra temperaturmålinger samme dag fra Color Festival.

Tabell 2.2. Oversikt over temperatur, saltholdighet og dybde på fangststedene.

	Temperatur (°C)	Saltholdighet (‰)	Dybde (m)
Steilene 6/11-02	7,9	33,1	50-60
Killingen 7/11-02	6,4	29,7	5-20
Gråøyrenna 6/11-02	7,9	33,1	50-60
Solbergstrand 22/11-02	7,4	33,5	0-2
Hubukta 15/11-02	7	-	6-7

All fisk ble avlivet med et slag til hodet. Deretter ble lengde og vekt bestemt. Se vedlegg 1 og 2 for rådata for henholdsvis skrubbe og torsk. Fiskene ble så undersøkt for utvendige parasitter og skader/sykdommer.

Blodprøver ble tatt fra kaudalvenen med en sprøyte (kanylediameter 0,5 mm) som var forbehandlet med proteasehemmeren aprotinin og antikoaguleringsmiddelet heparin. Prøvene ble oppbevart maksimum 5 minutter på is før de ble sentrifugert ved 1000 x g i 5 minutter for separering av plasma og blodceller. Plasma ble suget av med en pasteurpipette, overført til kryorør og frosset ned på flytende nitrogen. Blodcellene ble frosset ned på flytende nitrogen i eppendorfrør.

Buken ble så åpnet og galleprøve tatt umiddelbart slik at den ikke skulle forurense leveren. Så mye galle som mulig ble suget ut med sprøyte (kanylediameter 0,4 mm) og frosset ned i eppendorfrør på flytende nitrogen.

Leveren ble så dissekert ut og veid. Farge, konsistens og eventuelle parasitter ble notert. Tre parallelle prøver tatt fra hver lever. Disse ble tatt så nær portalvenene som mulig, da det ble antatt at dette området får størst belastning fra blodbanen og dermed også størst belastning av eventuelle miljøgifter. Leverprøvene ble forsøkt å tilsvare 1 gram våtvekt. Alle leverprøver ble overført til kryorør og frosset ned på flytende nitrogen.

Fiskenes kjønn ble bestemt før innvoller og svømmeblære ble kastet og membraner fjernet for å komme til nyrene. En nyreprøve ble skrapet ut med spatel, overført til kryorør og frosset på flytende nitrogen. Det ble tatt kun en parallell siden nyrestørrelsen var svært varierende og ofte hadde lite tilgjengelig volum. Også for nyre ble det forsøkt å tilnærme 1 gram våtvekt.

Otolittene ble så tatt ut for aldersbestemmelse.

Alt innsamlet materiale ble merket med tallkoder. Dette ble gjort for at analysene skulle kunne gjennomføres uten kjennskap til prøvens opprinnelsessted. Dette gjorde at alle prøver ble analysert ”blindt”, og feil som kan skyldes et slikt kjennskap til opprinnelsessted ble utelukket.

2.3 Aldersbestemmelse

Fiskenes alder ble bestemt ved telling av hyaline og opake soner på otolittene (Williams *et al.* 1974). Beinfisk har tre par otolitter: *lapillus*, *astariscus* og *sagitta*. *Sagitta*, som er de største, ble tatt ut ved åpning av kraniet og benyttet til aldersbestemmelsen. De hyaline sonene blir lagt til otolittene om vintersesongen, og derfor ble alderen satt til antallet hyaline soner. Metoden var lik for begge arter, men usikkerheten noe større ved bestemmelsen av skrubbe. Dette var på grunn av den noe høyere alderen og at veksten blir tregere når fisken blir kjønnsmoden (Williams *et al.* 1974). Avstanden mellom opake og hyaline soner blir dermed liten, og noen ganger vanskelig å skille fra hverandre.

Otolitter av torsk ble brukket, pusset, lett brent med bunsenbrenner og penslet med glyserol. De ble deretter satt med bruddflaten opp i en leirklump og sonene telt under sidelys og lupe. Dersom man ikke får med otolittkjernen i bruddet, det vil si at man ikke brekker den midt på, vil man kunne underestimere alderen. Dette har vist seg å være den største usikkerhetsfaktoren ved denne metoden (Williams *et al.* 1974). Det var vanskelig å få til et slikt rent brudd på otolitter av skrubbe. Derfor ble hele otolitten lagt i en skål med 96% etanol og sonene telt under lupe og refleksjonslys. Denne metoden fungerte tilfredsstillende, men på noen individer ble det lettere å skille sonene fra hverandre etter en kort varmebehandling på bunsenbrenner.

2.4 Leversomatisk indeks og kondisjonsfaktor

Leversomatisk indeks (LSI) er et indirekte mål på hvor stor næringstilgang fisken har. Energi lagres primært i muskelvev, men ved stort næringsinntak vil leveren øke i størrelse og lipidinnhold (Tyler *et al.* 1976; Dossantos *et al.* 1993; Fahraeus-Van Ree *et al.* 2003). Leversomatisk indeks ble regnet ut for alle individer etter formelen $LSI = 100 * \text{levervekt} / \text{kroppsvekt}$ (Slooff *et al.* 1983), og angir leverens prosentandel av fiskens totale vekt.

En kondisjonsfaktor gir forholdet mellom målt vekt og forventet vekt i forhold til fiskens lengde. Kondisjon kan derfor være et mål på fiskens næringsstatus (Saborowski *et al.* 1996), men faktorer som forandring i metabolsk balanse, modningsgrad og bespising spiller en større rolle på kort sikt (Bolger *et al.* 1989). Dette kan derfor overskygge fiskenes generelle næringsstatus.

Torskens kondisjon ble regnet ut som Fultons kondisjonsfaktor etter formelen $K_F = 100 * \text{vekt} / \text{lengde}^3$ (Bolger *et al.* 1989). Fultons kondisjonsfaktor krever vekst uten forandring av kroppsproporsjoner (isometrisk vekst), noe som er tilnærmet riktig for torsk.

Ricker (1975) modifiserte Fultons formel til å inkludere allometrisk vekst, noe som gjør seg gjeldende for de fleste fiskearter. Særlig flatfisk vokser betydelig mer i bredden og dermed også vekt enn det Fultons kondisjonsfaktor for isometrisk vekst omfatter. Rickers kondisjonsfaktor har formelen $K_R = 100 * \text{vekt} / \text{lengde}^b$ (Bolger *et al.* 1989). Konstanten b bestemmes ved å finne stigningstallet i GM-regresjonen (geometrisk middel regresjon) mellom log vekt mot log lengde (Ricker 1973). En forutsetning for å bruke denne metoden er at fiskene fra de forskjellige lokalitetene har et felles stigningstall. Gruppeinndelingen under sammenlikningen av disse stigningstallene var hunnfisk og hannfisk fra indre og ytre Oslofjord (Tabell 2.3).

Tabell 2.3. Stigningstall \pm standard avvik og skjæringspunkt med y-aksen fra Gm regresjon på gruppene.

Gruppe	GM stigningstall	Skjæringspunkt
♀ Indre fjord	3,09 \pm 0,02	-2,11
♂ Indre fjord	2,87 \pm 0,29	-1,80
♀ Ytre fjord	2,93 \pm 0,10	-1,82
♂ Ytre fjord	2,79 \pm 0,20	-1,66

Standardavviket til stigningstallet etter GM regresjonen er det samme som etter vanlig lineær regresjon (Ricker 1973). Student's t-test ble benyttet til å sammenlikne stigningstallene. Hunnfisk fra indre Oslofjord hadde signifikant høyere stigningstall enn fisk fra alle de andre lokalitetene ($p < 0,02$). Hunnfisk fra ytre Oslofjord hadde signifikant høyere stigningstall enn hannfisk fra ytre Oslofjord ($p < 0,05$). Derfor var det ikke mulig å regne ut noe felles stigningstall, og heller ikke kondisjon når det gjaldt skrubbe.

2.5 Opparbeiding

2.5.1 Lever

Leverprøvene ble opparbeidet etter metode beskrevet av Dignam (1990). Leverprøvene ble veid og deretter tilsatt iskald homogeniseringsbuffer (0,1 M K-fosfatbuffer; pH 7,8; 0,15 M KCl; 1 mM DTT (ditiotreitol); 5% glyserol) til et totalvolum på 5,0 ml. For små prøver (<0,5 g) ble totalvolum satt til 2,5 ml. Prøvene ble så homogenisert på is, 10 repetisjoner, med et Potter-Elvehjem Teflon[®] homogeniseringssett og sentrifugert ved 600 x g i 10 minutter ved 4°C. Fett som samlet seg på toppen ble kastet. Supernatanten ble suget av med en pasteurpipette og overført til et nytt sentrifugerør. Pelleten, som består av hele celler og cellekjerner, ble kastet. Supernatanten ble så sentrifugert ved 5800 x g i 51 minutter ved 4°C. Fett som samlet seg på toppen ble suget av med pasteurpipette og kastet. Supernatanten (S9 fraksjonen), som inneholder mikrosomale organeller og cytosol, ble suget av med pasteurpipette, fordelt på eppendorfrør og frosset ned til -80°C. Pelleten, som består av mitokondrier, ble resuspendert i iskald 2,0 ml mitokondriell buffer (0,1 M K-fosfatbuffer; pH 7,8; 0,15 M KCl), homogenisert 5 ganger på is med glasspistill, og fordelt på eppendorfrør som ble frosset ned til -80°C.

2.5.2 Nyre

Nyrene ble opparbeidet på samme måte som leverprøvene. Prøver fra skrubbe ble opparbeidet til mikrosomal og cytosolisk fraksjon, mens prøver fra torsk ble opparbeidet til S9 fraksjon. For opparbeiding til mikrosomal og cytosolisk fraksjon ble S9 fraksjonen sentrifugert ved 48000 x g i 120min ved 4°C. Deretter ble supernatanten suget av med pasteurpipette og fordelt på eppendorfrør som ble frosset ned til -80°C. Pelleten ble resuspendert i iskald mikrosomalbuffer, homogenisert 5 ganger på is med glasspistill og fordelt på eppendorfrør som ble frosset ned til -80°C.

2.6 Måling av protein

Alle vev ble analysert for protein etter metoden av Lowry *et al.* (1951). Standardrekke ble laget fra en stamløsning av bovint serumalbumin (BSA) fortynnet i Tris-buffer (0,1 M; pH 8,0) til $1,37 \text{ mg ml}^{-1}$. Denne stamløsningen ble tint på is og fortynnet i Tris-buffer (0,1 M; pH 8,0) til $125 - 250 - 500 - 1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Standardrekken ble avsatt i $10 \text{ } \mu\text{l}$ triplikater på Sarstedt 96 mikrotiterplater. Prøver ble tint på is og fortynnet i buffer etter skjønn for å tilpasses standardkurven. Disse ble deretter avsatt i $10 \text{ } \mu\text{l}$ triplikater. I to av brønnene ble det avsatt buffer som blankprøver. Deretter ble henholdsvis $25 \text{ } \mu\text{l}$ reagens A (alkalisk kobber tartaratløsning) og $200 \text{ } \mu\text{l}$ reagens B (fortynnet Folin's reagens) tilsatt alle brønner. Brettene ble inkubert lyst ved romtemperatur i 15 minutter før avlesning av absorbans ved 750 nm på en Thermomax Microplate reader (Molecular Devices).

Proteinverdiene ble beregnet ut fra standardkurven med BSA. Hver prøve ble målt i triplikater og gjennomsnitt med variasjonskoeffisient (CV) under 5% ble akseptert. En intern standardprøve ble brukt for å fange opp variasjoner mellom brettene.

2.7 Optimalisering av EROD analysen

Proseduren som ble brukt for måling av EROD aktivitet er basert på en metode beskrevet av Burke *et al.* (1974), utviklet for plateleser av Eggens *et al.* (1992). Alt arbeid ble foretatt i rom med svak belysning. Metoden ble optimalisert med hensyn på stoffmengde substrat (ER), stoffmengde kofaktor (NADPH), pH og prøvevolum. Bruk av S9 fraksjonen til EROD-analyser gir 3-5 ganger lavere verdier enn bruk av mikrosomalfraksjonen (Whyte *et al.* 2000). Derfor ble det først utført optimalisering på mikrosomer fra leverceller og disse verdiene ble så brukt under optimaliseringen på S9 fraksjonen der kun prøvemengden ble variert. Konsentrasjonen av ER og NADPH ble justert under optimaliseringen på S9 fraksjonen slik at det hele tiden ble tilført samme stoffmengde til brønnene. Ved variasjon av de forskjellige parametere ble utgangspunkt tatt i 0,6 nmol ER, 0,06 µmol NADPH, pH 7,6 og 50 µl prøvevolum per brønn (Tabell 2.4). Det ble også forsøkt å lage en startløsning inneholdende både ER og NADPH. Dette ville gjøre det lettere å få blandet reaktantene med prøven under avsetningen på brettene.

Tabell 2.4. Parametere for mengde substrat, mengde kofaktor, pH og prøvevolum som ble testet under optimaliseringen av EROD analysen.

ER (nmol)	NADPH (µmol)	pH	Prøvevolum (µl)
2,4	0,24	8,0	100
1,2	0,12	7,8	75
0,6	0,06	7,6	50
0,3	0,03	7,4	

En test ble først satt opp for å bestemme variasjonen i metoden. En og samme prøve ble pipettert ut i samtlige brønner på en mikroplate. Dette gir 12 paralleller (kolonner) med åtte replikate målinger per parallell (rader). Halvparten av brønnene ble tilsatt spike før reaksjonsblanding ble tilsatt alle brønner. EROD aktivitet ble målt med et Cytofluor 2300 fluorometer (Millipore). Variasjonen innenfor hver parallell (kolonne) var under 3,5%, og variasjonen rundt gjennomsnittet av alle kolonnene var på 6,6%.

Ved optimalisering av mengden substrat var det stor variasjon i målingene med største CV på 38,7%. Mengder over 1,2 nmol ER så ut til å hemme reaksjonen, men dette var ikke signifikant. Under analysene av prøvene ble det benyttet 0,6 nmol ER som substrat.

Også ved optimalisering av mengden kofaktor var variasjonen i dataene stor med største CV på 56,7%. Den minste mengden NADPH som så ut til å kunne brukes var 0,06 μmol NADPH, selv om ingen av målingene var signifikant forskjellige. Under analysene av prøvene ble det brukt 0,06 μmol NADPH som kofaktor.

Optimal pH ble testet på mikrosomer for hver art. pH 7,6 ga høyest aktivitet i mikrosomer fra torskelever og pH 7,4 ga høyest aktivitet i mikrosomer fra skrubbelever. Forskjellen i EROD aktivitet mellom pH 7,4 og pH 7,6 for skrubbe var liten, og av praktiske hensyn ble det i analysene av prøvene benyttet pH 7,6 for både torsk og skrubbe.

Reaksjonen ble tidligere startet ved tilsetning av 25 μl NADPH. Siden dette volumet er mye mindre enn volumet av prøve og ER i brønnen (250 μl) var det vanskelig å få dette til å blande seg godt. Det ble derfor prøvet å starte reaksjonen med en reaksjonsblanding inneholdende både ER og NADPH. Dette ble først utført på mikrosomer, deretter på S9 fraksjonen. Det ble kun optimalisert med hensyn på volum og EROD aktiviteten er derfor ikke sammenlignbar med andre prøver. Hensikten var å teste utslaget med NADPH iblandet etoksyresorufinløsningen, samt å teste om S9 fraksjonen ga målbare utslag med denne metoden. Tre mikrosomvolumer ble analysert og aktiviteten økte lineært med prøvevolum. Høyeste volum av mikrosomer som ble testet var 100 μl . Konsentrasjonen av ER i startløsningen ble hele tiden justert slik at stoffmengden som ble satt til var 0,6 nmol ER per brønn. To paralleller med NADPH i etoksyresorufinen ble så testet. Både mikrosomalfraksjonen og S9 fraksjonen viste en økende aktivitet med økende prøvevolum. Høyeste verdi testet på S9 fraksjonen var 150 μl prøve og EROD aktiviteten økte tilnærmet lineært frem til denne verdien. I analysene ble det derfor brukt 150 μl S9 fraksjon og NADPH iblandet etoksyresorufinløsningen som startløsning.

2.8 Måling av EROD aktivitet i lever

Alle løsninger ble laget i iskald kaliumfosfat buffer (0,1 M; pH 7,6) og alt arbeid ble utført under svak belysning. 7-Etoksyresorufin (ER; 4,8 μM) ble brukt som substrat. Resorufin ble brukt som standard og spike (0,32 μM). Absorbans av stamløsningene til ER og resorufin ble målt før analysen for kontroll av konsentrasjonene med et Novaspec II spektrofotometer (Pharmacia LKB). Absorbans av ER-løsning ved 450 nm bør være $\sim 0,050$ og absorbans av 6,8 μM resorufin ved 572 nm bør være $\sim 0,50$. De eksakte verdiene av absorbansmålingene ble benyttet til korrigering av standardens konsentrasjon ved å bruke ekstinksjonskoeffisienten $73,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Klotz *et al.* 1984). Resorufinløsningen ble fortynnet i buffer til 0,005 – 0,01 – 0,02 – 0,04 – 0,08 – 0,16 – 0,32 – 0,64 μM og avsatt i duplikater på brettene. 150 μl S9 fraksjon ble avsatt i brønnene på et 96-brønners Brett, 6 replikater per prøve. En intern standard ble kjørt parallelt på alle Brett. 10 μl 0,32 μM resorufin ble så tilsatt halvparten av brønnene for å korrigere for quench i prøven. Dette tilsvarer 3,2 pmol resorufin. Dersom forholdet mellom forventet quench og målt quench var mindre enn 1, ble dette satt til 1. Startløsningen bestod av 0,75 mM NADPH og 4,8 μM ER i buffer. 125 μl startløsning ble så tilsatt med multipipette. Platen ble deretter satt til risting på whirl-mikser i 30 sekunder for å få en homogen løsning i brønnene. Brettet ble deretter avlest 8 ganger over fire minutter med et Cytofluor™2300 Fluorescence Measurement System (Millipore) (eks/em 530/590 nm). EROD aktiviteten ble utregnet som pmol resorufin $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein.

2.8.1 Kvalitetskontroll av EROD analysen

En intern standardprøve ble brukt for å fange opp variasjoner mellom brettene. Ett Brett utmerket seg med en meget høy verdi. Her gjorde spike veldig lite utslag, noe som øker forholdet mellom forventet fluorescens og målt fluorescens drastisk. Dette ga et stort utslag i quenchkorrigeringen. Andre prøver på dette Brettet hadde ikke unormale forholdstall mellom forventet og målt fluorescens. Derfor ble standardprøvens verdi tolket som en avviker, og verdiene fra Brettet ble brukt i de statistiske analysene. Midtveis i analysen av EROD aktivitet ble det byttet standardprøve, men standardene ble overlappet slik at kontrollen ble overholdt. Under analysen ble mengde spike økt til 20 μl da 10 μl ikke ga forventet utslag. Dette ble det korrigert for under utregningen av EROD aktivitet.

EROD aktivitet ble beregnet ut fra standardkurven av resorufin. Hver prøve ble målt i triplikater, med og uten spike for å korrigere quench. Målinger med CV under 20% ble akseptert (Whyte *et al.* 2000). Konsentrasjonene ble standardisert mot proteinmengden i de respektive leverprøvers S9 fraksjon. Denne verdien ble så korrigert for variasjon i standardprøven. Dette ble gjort ved å regne ut forholdet mellom gjennomsnittet av alle standardprøvene og standardprøven på det aktuelle brettet. Denne faktoren ble deretter ganget med prøvens EROD verdi for å opp- eller nedjustere denne.

2.9 Måling av EROD aktivitet i nyre

Alt arbeid ble utført under svak belysning. Prøvene ble inkubert i fire omganger i løpet av to dager og en intern standard fulgte alle inkuberinger. 3 µl 3 µM 7-Etoxyresorufin (ER), 20 µl 10 mM NADPH, 50 µl mikrosomalfraksjon og 675 µl Na-fosfatbuffer (0,1 M; pH 7,8) ble inkubert i eppendorfrør i 20 minutter ved 25,6°C. Blankprøver bestod av 725 µl buffer med 3 µl ER og 20 µl NADPH. Temperaturen ble holdt konstant med varmeblokk og overvåket med digitalt termometer. Inkuberingen ble stoppet med 750 µl iskald MeOH og prøvene satt på is. Prøvene ble sentrifugert ved 15000 x g i 15 minutter ved 4°C for fjerning av utfelt protein. Supernatanten ble så overført med pasteurpipette til HPLC rør og oppbevart ved -20°C til analyse.

Metoden som ble benyttet for kvantifisering av resorufin er modifisert etter Levine *et al.* (1994). Resorufin ble kvantifisert mot kjente standarder ved bruk av HPLC. Kolonnen som ble brukt var en Symmetry®C18 (3,9x150 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA, USA) og resorufin ble detektert på en Perkin-Elmer LS-4 (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) eller en Shimadzu RF-10A XL (Shimadzu, Kyoto, Japan) fluorescensdetektor. Eksitasjon ble målt ved 535 nm og emisjon ved 585 nm. Injeksjonene var på 5 µl og mobil fase bestod av 40/60 v/v acetonitril:vann. Flow ble satt til 1,0 ml/min.

2.10 Måling av mengde CYP1A protein i lever

2.10.1 Torsk

Metoden som ble benyttet var en semikvantitativ, kompetitiv ELISA (Goksøyr 1991). Alle S9 fraksjoner ble fortynnet til $10 \mu\text{g protein ml}^{-1}$ i coatingbuffer (karbonat-bikarbonatbuffer; 0,05 M; pH 8,7). En av prøvene ble benyttet som intern referanse på alle brett. Brønnene A1-D1 ble tilsatt $100 \mu\text{l}$ coatingbuffer. $100 \mu\text{l}$ fortynnet prøve ble så avsatt i 4 paralleller. Brettene ble inkubert mørkt under forsegling ved 4°C i 19 timer ± 1 time. Brettene ble så vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt), tilsatt $250 \mu\text{l}$ blokkeringsbuffer pr brønn (1% BSA i TTBS) og inkubert mørkt ved romtemperatur i 40 minutter. De ble så vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt) og tilsatt $100 \mu\text{l}$ fortynnet primærantistoff, NP-7. Brettene ble forseglet og inkubert mørkt ved 4°C i 18,5 timer. Brettene ble så vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt) og tilsatt $100 \mu\text{l}$ fortynnet sekundærantistoff, GAM-HRP. Brettene ble forseglet og inkubert mørkt ved 4°C i 6 timer. De ble så vasket i TTBS (4 x 30 sekunder + 1,5 minutt) og tilsatt $100 \mu\text{l}$ TMB. Brettene ble inkubert mørkt ved romtemperatur i 41 minutter og reaksjonen stoppet med $50 \mu\text{l}$ 3 N H_2SO_4 . Absorbansen ble umiddelbart avlest ved 450 nm på en Thermomax Microplate reader fra Molecular Devices. For vask av brettene i denne metoden ble det benyttet en Scanwasher 300 (Skatron Instruments).

2.10.2 Skrubbe

Samme fremgangsmåte som for torsk men med følgende modifikasjoner: Brettene ble inkubert med coatingbuffer i 17 ± 1 timer. Primært antistoff var CP226 og inkuberingstid var 20,5 timer. Sekundært antistoff var GAR-HRP med inkuberingstid 6 timer. Brettene ble inkubert med TMB i 18 minutter.

2.10.3 Kvalitetskontroll av CYP1A analysen

En standardprøve fulgte hvert brett for å fange opp variasjoner mellom brettene for skrubbe og torsk. Målinger med CV under 20% ble akseptert. Prøvene var allerede pipettert ut med en bestemt mengde protein i brønnene, og på den måten standardisert for protein. Den målte OD verdien ble korrigert for variasjon i standardprøven. Dette ble gjort som under kontroll av EROD analysen for lever.

2.11 Måling av PAH-metabolitter i galle

Galleprøvene ble tint på is i mørkt rom. 10-50 µl galle ble deretter pipettert ut i en kvartspipette og fortynnet med 2500 µl 50% etanol. Absorbans ble så målt ved 380 nm med et Novaspec II spektrofotometer (Pharmacia LKB). For å kontrollere apparatdrift ble det målt en blankprøve for hver femte prøve. Prøvene ble oppbevart ved – 80°C til analyse.

Før HPLC analysen ble prøvene tint på is, ca. 20 µl galle ble veid ut og tilsatt 50 µl 5% askorbinsyre i dH₂O. En tilsvarende mengde β-glucuronidase/aryl sulfatase ble så tilsatt. Dette er enzymer som spalter av konjugerte grupper på PAH. Ca. 10 µl ISD trifenylamin (spike) ble veid ut i metanol, tilsatt prøveblandingen og mikset på whirl-mikser. Prøvene ble så inkubert i varmeskap, 37°C, i en time. Prøvene ble deretter tilsatt 200 µl metanol, godt mikset på whirlmikser og kjølt ned. Denaturerte proteiner ble så skilt ved sentrifugering ved 4000 x g i 10 minutter. Supernatanten ble overført til HPLC rør.

HPLC apparatet som ble benyttet var utstyrt med en PAH kolonne med forkolonne, type Vydac 201TP5415. Systemet benyttet fluorescensdeteksjon med deteksjon for:

- naftalen innledende (eks/em, 325/358 nm)
- fenantren etter 8,5 minutter (eks/em, 251/364 nm)
- pyren etter 13,5 minutter (eks/em, 246/384 nm)
- B[a]P etter 22,5 minutter (eks/em, 380/430 nm)
- ISD picene etter 22,5 minutter (eks/em, 282/375 nm)

Mobilfase A bestod av 40:60 v/v acetonitril:vann. Mobilfase B bestod av 100% acetonitril. Mobilfasene ble filtrert før bruk gjennom et HV filter med 0,45 µm maskevidde. Reservoaret ble kontinuerlig degasset med helium (25 ml min⁻¹) under analysen. Injeksjonsvolumet var 25 µl og kolonnetemperaturen 30°C. Topphøyden av kurvene ble benyttet i kvantifiseringen. Deteksjonsgrensen for fenantren og pyren var 3,0 µg kg⁻¹, for B[a]P var deteksjonsgrensen 5,0 µg kg⁻¹.

Verdier for PAH metabolitter ble beregnet ut fra en ISD picene standard. Konsentrasjonen av PAH-metabolitter i gallen kan også påvirkes av fiskenes næringsstatus (Ariese *et al.* 1993; Brumley *et al.* 1998; Aas *et al.* 2001). For å utjevne forskjeller i fiskenes næringsstatus ble derfor innholdet av PAH-metabolitter i gallen standardisert til pigmentinnholdet i de respektive galleprøvene (OD₃₈₀) (Collier *et al.* 1991; Brumley *et al.* 1998). Ved store

forskjeller i pigmentkonsentrasjoner kan en slik standardisering skape støy i dataene (Aas *et al.* 2000a; Aas *et al.* 2000b).

Etter analysen ble stigningstallet mellom PAH metabolittene 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren regnet ut. Dette stigningstallet kan fortelle noe om kilden til PAH-forurensningen (Aas *et al.* 2000b). Dersom stigningstallene mellom metabolittene er like vil det si at andelen av metabolittene er den samme. Det kan da antas at også kildetypen til forurensingen er den samme. Ved forskjellige stigningstall har fisk blitt eksponert for en større eller mindre mengde av en av PAHene og dermed er det sannsynlig at opprinnelsen og også kildetypen er ulik.

Fisk ble inndelt i grupper etter art og lokalitet og en lineær regresjon mellom variablene 1-hydroksypyren og 1-hydroksyfenantren ble utført.

2.12 Måling av aminolevulinsyre dehydratase aktivitet i røde blodceller

Analysen ble utført som beskrevet i Hylland (2004), basert på metode av Hodson (1976). Blodcellene ble tint på is og fortynnet i eppendorfrør i 1,0 ml iskald fosfatbuffer (0,1 M; pH 7,0; 2,5% triton X-100). Prøvene ble homogenisert med ultralydstav, 2 watt i 4 * 2 sekunder på is, og godt blandet med whirlmikser. De ble så sentrifugert ved 10000 x g i 15 minutter ved 5°C. Supernatanten ble fordelt på seks eppendorfrør á 50 µl ved romtemperatur. 50 µl av supernatanten ble umiddelbart analysert for proteininnhold. Brukbar fortynning under proteinanalysen viste seg å være 1:300. Tre av rørene ble tilsatt 200 µl fosfatbuffer (blanke), og tre av rørene ble tilsatt 200 µl fersk ALA-løsning (0,67 mg ml⁻¹ i fosfatbuffer). Prøvene ble ristet og inkubert i 120 minutter i inkubasjonsskap ved 25°C. Reaksjonen ble stoppet med 300 µl fellingsreagens (4,0 g TCA; 2,7 g HgCl₂; 100 ml dH₂O). Rørene ble så ristet, inkubert i 5 minutter ved romtemperatur og sentrifugert ved 2500 x g i 5 minutter ved romtemperatur. 150 µl supernatant ble så avsatt i triplikater på et mikrotiterbrett (Sarstedt NUNC96). Fersk porfobilinogenløsning (40 µg ml⁻¹) ble fortynnet i fosfatbuffer til henholdsvis 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg ml⁻¹ og standardrekke ble avsatt på mikrobrettet i 150 µl duplikater. Alle brønnene ble så tilsatt 150 µl modifisert Ehrlich's reagens (0,35 g HgCl₂; 2,0 g Ehrlich's reagens; 20 ml 70% perklorsyre; 84 ml eddiksyre; 6 ml dH₂O) og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Absorbansen ble så målt ved 550 nm med en Thermomax Microplate reader (Molecular Devices).

2.12.1 Kvalitetskontroll av ALA-D analysen

En intern standardprøve fulgte alle inkuberinger for kontroll av variasjonen. ALA-D aktivitetene ble beregnet ut fra en standardkurve med PBG. Hver prøve ble målt i kvadrupler og gjennomsnitt med CV under 7% ble akseptert. Verdiene ble standardisert i forhold til proteinmengden i de respektive blodcelleprøver, og også til standardprøven som beskrevet under kvalitetskontroll av EROD analysen i lever.

2.13 Måling av metallotionein i nyre

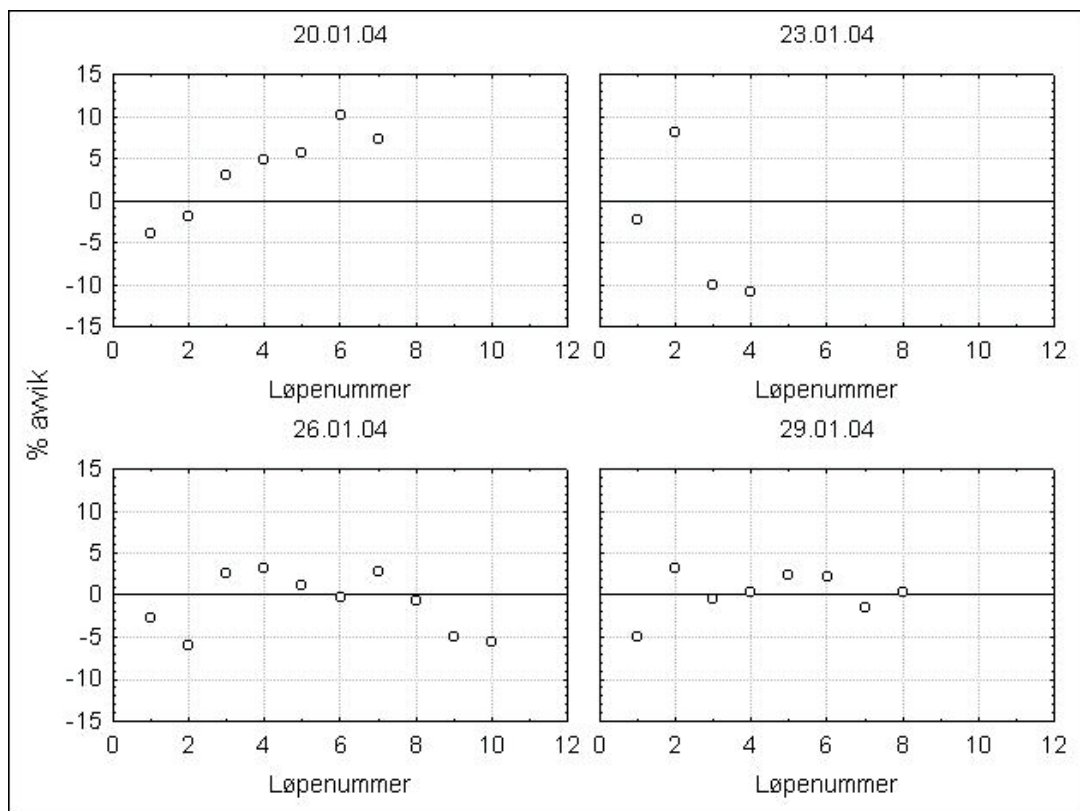
Cytosol fra nyre ble tint på is. Prøvene ble fortynnet i 0,9% NaCl med fortynningsfaktor 1:5. Deretter ble de denaturert på varmeblokk ved 95°C i 4 minutter. Temperaturen ble overvåket med kvikksølvtermometer. Prøvene ble så avkjølt på is og sentrifugert ved 10000 x g i 15 minutter ved 4°C for fjerning av denaturerte proteiner. Supernatanten ble overført til nytt eppendorfrør.

Analysen er basert på metode av Olafson *et al.* (1991). Det ble brukt en Metrohm 663 VA Stand polarograf fra Metrohm, samt en μ Autolab typeII potentiostat og IME663 rører fra Eco Chemie B.V. Standardprøve ble laget av metallotionein fra kanin (Sigma-Aldrich), 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ i 0,9% NaCl, og frosset ned i 0,5 ml porsjoner til -80°C. Elektrolytt (Heksamin kobolt(III)klorid 0,321 g l^{-1} ; Ammoniumklorid 53,4 g l^{-1} ; Ammoniakk 25% 154 ml l^{-1} ; dH_2O til 1,0 l) ble laget og lagret på en lystett flaske ved 4°C i maks en uke. Ved bruk må elektrolytten holde romtemperatur siden målingene er temperaturavhengige. En PARC glasscelle ble fylt med 10,0 ml elektrolytt og tilsatt 200 μl 0,025% Triton-X. Standardkurve ble laget ved å tilsette henholdsvis 10 – 20 – 20 – 30 – 40 – 40 μl standard med målinger mellom hver tilsetning. Før hver måling ble løsningen boblet med nitrogen i ett minutt. En ny beholder inneholdende elektrolytt og Triton-X ble tilsatt prøve (50-400 μl) og boblet med nitrogen i 1 minutt. Måling ble så startet (VA Computrace). Se vedlegg 3 for innstilling av apparat.

2.13.1 Kvalitetskontroll av MT analysen

Metallotioneinverdiene ble beregnet ut fra en standardkurve med kanin MT.

Metallotioneinkonsentrasjonen i prøvene ble regnet automatisk av software som $\mu\text{g MT}$. Hver prøve ble målt i triplikater, og disse tallene ble gitt fra software som et gjennomsnitt av de tre målingene uten noen CV, så alle målinger ble akseptert. For å holde kontroll med analysen ble det analysert en standardprøve for hver 5 prøve. Ved for stor apparatdrift ble målinger stoppet, ny standardkurve laget, og målinger gjenopptatt etter sjekk av en intern standard. Variasjonen i standardprøven var tilfeldig og under 10% (Figur 2.2). MT konsentrasjonene ble så standardisert til mg protein i prøven.



Figur 2.2. Variasjon i standardprøven under MT analysen. Figuren viser % avvik fra gjennomsnittet av målingene av standardprøven.

2.14 Optimalisering av analysen for vitellogenin

Vitellogeninanalysen ble optimalisert med hensyn på vitellogeninkonsentrasjon i coatingbufferen, fortynning av primært antistoff og fortynning av TMB.

Coatingkonsentrasjonene som ble testet var 50, 20 og 10 ng ml⁻¹. Det ble brukt en mikrotiterplate for hver coatingkonsentrasjon. 4 forskjellige fortynninger av primært antistoff og 3 forskjellige fortynninger av TMB ble testet. Prøve ble laget av intern NIVA torsk vitellogenin, og ble avsatt på brettet som standardrekke. Analysen ble så utført som beskrevet under.

Verdier som ga for lav absorbans ble forkastet. Av de aksepterte verdiene ble høy sensitivitet vektlagt som kriterie for bruk. Utvalgte verdier er presentert i vedlegg 4. Den kombinasjonen som viste høyest sensitivitet var 50 ng coating og 1:50000 fortynning av primært antistoff. Fortynningen av TMB viste seg å ikke ha noen særlig stor betydning og av økonomiske hensyn ble derfor 1:2 fortynning av TMB valgt.

2.15 Måling av vitellogenin i blodplasma fra torsk

Det ble kun utført vitellogenin-ELISA på torsk da egnet antigen eller antistoff ikke var tilgjengelig for skrubbe.

Metoden som ble benyttet var en semikvantitativ, kompetitiv ELISA (Specker *et al.* 1994). Antigen (Gm vitellogenin, intern NIVA standard) ble fortynnet i coatingbuffer (0,05 M karbonat-bikarbonatbuffer; pH 9,6) til 50 ng ml⁻¹ og 100 µl pipettert ut i alle brønner unntatt A1-D1. 100 µl coatingbuffer ble pipettert ut i brønnene A1-D1. Platene ble inkubert mørkt ved 4°C i 18,5 timer og deretter vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt) med en SkanWasher 300 (Skatron Instruments).

200 µl blokkeringsløsning (1% BSA i TTBS) ble tilsatt alle brønner og platene ble inkubert mørkt ved romtemperatur i 30 minutter. Platene ble vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt). Prøver ble så tint på is og fortynnet 1:25 og 1:1000 i fortynningsbuffer (0,1% BSA i TTBS). Standardrekke på 0 - 0,45 - 1,37 - 4,1 - 12,3 - 37 - 111 - 333 - 1000 - 3000 ng ml⁻¹ ble laget av antigen og fortynningsbuffer og 50 µl avsatt i brønnene E1-H4. Deretter ble 50 µl prøve avsatt i 4 paralleller per fortynning. Så ble 50 µl primært antistoff, fortynnet 1:50000,

tilsatt alle brønner unntatt A1-B1. Det ble brukt en intern referanse på alle brett. Brett 1-3 ble inkubert i 17 timer, brett 4-6 i 15 timer og brett 7-8 i 14 timer, alle mørkt ved 4°C. Denne forskjellen i tid oppstod på grunn av tiden det tok å avsette prøvene og fordi inkuberingen ble stoppet samtidig på alle brettene.

Brettene ble så vasket i TTBS (2 x 10 sekunder + 1minutt) og tilsatt 100 µl sekundært antistoff, GAR-HRP, fortynnet 1:15000 i fortynningsbuffer. Brønnene A1-B1 ble kun tilsatt 100 µl fortynningsbuffer. Brettene ble inkubert lyst ved 4°C i 7 timer, deretter vasket i TTBS (4 x 30 sekunder + 1,5 minutt). TMB PLUS ble fortynnet 1:2 i dH₂O og 100 µl tilsatt alle brønner. Brettene ble så inkubert mørkt i 30 minutter og fremkallingen stoppet ved å tilsette 50 µl 1M svovelsyre. Absorbansen ble målt umiddelbart ved 450 nm på en Thermo max Microplate reader.

2.15.1 Kvalitetskontroll av vitellogeninanalysen

Vitellogeninverdiene ble beregnet ut fra en standardkurve med torsk VTG. Hver prøve ble målt i kvadrupler og gjennomsnitt med CV under 45% ble akseptert. En standardprøve fulgte målingene. Verdiene ble standardisert til variasjon i standardprøven som beskrevet under kontroll av EROD i lever.

2.16 Statistiske metoder

De statistiske analysene ble utført med Statistica[®] software (versjon 6.1; Statsoft). Alle data ble analysert for varianselikhhet med Levenes test og undersøkt for normalfordeling ved grafisk fremstilling av forventede mot reelle residualer. Ved normalfordeling og varianselikhhet ble det utført enveis ANOVA med signifikansnivå $\alpha=0,05$ (Cowles *et al.* 1982; Zar 1998). For å undersøke hvilke parametere som var ulike ble ANOVA ettertestet med Tukey HSD-test med signifikansnivå $\alpha=0,05$ (Zar 1998). Ved ulikhhet i varianse eller normalfordeling ble dataene \log_{10} -transformert og nye tester for varianselikhhet og normalfordeling utført. Ved fortsatt ikke-normalfordeling eller ulik varianse ble det utført ikke-parametriske tester med signifikansnivå $\alpha=0,05$ (Zar 1998). Forskjeller mellom to lokaliteter eller kjønn ble da undersøkt med Mann Whitney U-test, mens forskjeller mellom flere lokaliteter ble undersøkt med Kruskall-Wallis test etterfulgt av Kruskall-Wallis posthoc-test ved signifikante forskjeller (Zar 1998). Dataene for GM regresjon ble testet med Students t-test.

Dersom over 25% av verdiene for en variabel var under deteksjonsgrensen ble ikke dataene for denne variabelen statistisk analysert. Det var kun mengden av benzo[a]pyren i galle som hadde så mange verdier under deteksjonsgrensen. Kun 23% av verdiene for torsk og 38% av verdiene for skrubbe fra ytre Oslofjord var over deteksjonsgrensen. For denne variabelen ble det derfor lagt inn verdier på deteksjonsgrensen for å kunne lage en grafisk fremstilling. Forskjellen mellom lokaliteter og/eller kjønn kan derfor ha vært større enn den grafiske fremstillingen av benzo[a]pyren viser.

Presentasjon av dataene i teksten er på formen: median; 25%-75% kvartil. Ved grafisk presentasjon av dataene ble det gjennomgående benyttet box-plot med median, 25 – 75% kvartiler og 10 – 90% persentiler dersom ikke noe annet står nevnt. Dette ble gjort for å få presentasjonen mer ryddig, og har ingen sammenheng med dataenes normalfordeling eller varianselikhhet. For de variablene som kunne testes med parametriske tester ble ANOVA tabellen presentert som en del av resultatene for lettere å kunne vise eventuelle effekter.

For å undersøke om det fantes eventuelle sammenhenger mellom biomarkørene ble det benyttet en multivariat metode: principal component analysis (PCA). Denne analysen lager

felles akser for de parameterne som sammenfaller, og gjør det mulig å vise sammenhenger mellom variablene grafisk. Lengden på variablenes vektorer i PCA antyder hvor mye av variasjonen i variablene som kan forklares av modellen. Dette ble også regnet ut som prosentvise bidrag for hver variabel. For begge arter ble det brukt følgende avhengige variable: LSI, MT, ALA-D aktivitet, mengde CYP1A protein, EROD aktivitet i lever, EROD aktivitet i nyre og 1-hydroksypyren. For torsk ble også kondisjon inkludert i analysen som avhengig variabel. For begge arter ble alder, lengde, vekst og kjønn brukt som tilleggsvariable. Tilleggsvariable er variable som ikke blir inkludert under beregningene, men som plasseres på aksene etter utregningene er ferdig. De bidrar derfor ikke til å påvirke resultatet av PCA.

Alle bearbejdede data for skrubbe og torsk ligger vedlagt som henholdsvis vedlegg 5 og 6. Alle kjemikalier som ble benyttet under analysene finnes i vedlegg 7, alt utstyr i vedlegg 8 og alle buffere i vedlegg 9.

3. Resultater

3.1 Alder, lengde og vekt for innsamlet fisk

Skrubbe fra indre Oslofjord veide signifikant mer enn skrubbe fra ytre Oslofjord (Mann-Whitney, $p=0,017$) (Tabell 3.1). Medianverdien for lengde var også høyere for skrubbe fra indre Oslofjord, men denne forskjellen var ikke statistisk signifikant. Skrubbe fra ytre Oslofjord var derimot eldre enn skrubbe fra indre Oslofjord (Mann-Whitney, $p=0,010$). To tredeler av all skrubbe som ble fanget var hunner og denne fordelingen var omtrent lik i begge områdene. Hunnskrubbe fra indre og ytre Oslofjord var signifikant større enn hannskrubbe fra samme områder (Mann-Whitney, $p<0,001$). Medianverdien for alder var også høyere for hunnskrubbe enn for hannskrubbe fra samme områder, men dette var ikke statistisk signifikant.

Tabell 3.1. Alder, lengde og vekt for innsamlet skrubbe fra de forskjellige områdene. (median; 25% - 75% kvartil)

Faktor	Antall	Alder (år)	Lengde (cm)	Vekt (g)
♀ Ytre fjord	20	5,5; 4,0 – 6,0	34,4; 33,0 – 36,4	434,5; 361,0 – 509,0
♀ Indre fjord	17	4,0; 3,0 – 5,0	36,0; 35,5 – 37,8	537,8; 496,4 – 629,5
♂ Ytre fjord	9	5,0; 2,0 – 6,0	30,3; 29,5 – 33,0	295,0; 264,0 – 371,0
♂ Indre fjord	9	3,0; 2,0 – 4,0	33,5; 31,5 – 34,0	369,8; 351,8 – 404,0

Torsk fra lokalitetene i indre Oslofjord var signifikant eldre og større enn torsk fra ytre Oslofjord (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) (Tabell 3.2). Kjønnfordelingen var omtrent lik (1:1) på hver lokalitet utenom Gråøyrenna der det ble fanget nesten dobbelt så mange hanntorsk som hunntorsk. Det var ingen signifikante kjønnsforskjeller for noen av variablene, men hunntorsk fra alle lokalitetene hadde høyere medianverdier for lengde og vekt enn hanntorsk fra samme lokaliteter.

Tabell 3.2. Alder, lengde og vekt for innsamlet torsk fra de forskjellige lokalitetene. (median; 25% – 75% kvartil)

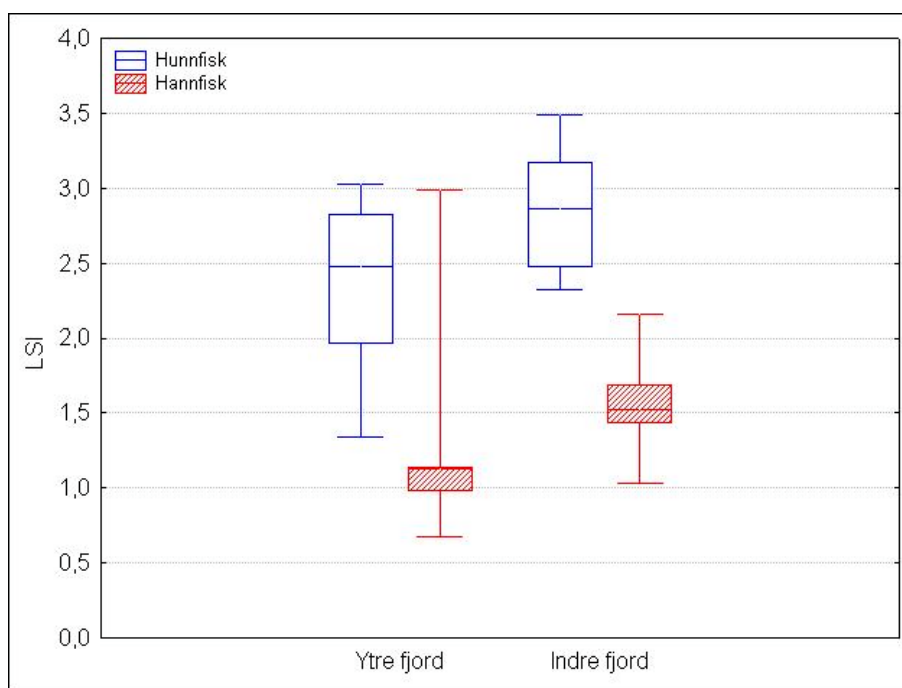
Faktor	Antall	Alder (år)	Lengde (cm)	Vekt (g)
♀ Solbergstrand	16	2,0; 1,0 – 2,0	37,2; 34,3 – 40,4	426,9; 368,4 – 524,8
♀ Steilene/Killingen	7	3,0; 2,0 – 4,0	39,5; 38,0 – 54,0	500,2; 481,6 – 1355,5
♀ Gråøyrenna	5	4,0; 3,0 – 5,0	44,5; 43,5 – 49,5	768,0; 759,0 – 1058,0
♂ Solbergstrand	14	1,0; 1,0 – 2,0	34,2; 32,3 – 36,5	354,1; 279,9 – 386,9
♂ Steilene/Killingen	9	2,0; 2,0 – 4,0	40,3; 36,0 – 44,5	544,0; 445,0 – 801,5
♂ Gråøyrenna	9	3,0; 3,0 – 4,0	39,6; 37,9 – 47,0	589,0; 465,2 – 959,0

3.2 Leversomatisk indeks og kondisjon

Forskjellen i leversomatisk indeks (LSI) for skrubbe var signifikant mellom både kjønn og område (Tabell 3.3). Skrubbe fra indre Oslofjord hadde høyere medianverdi for LSI (2,5; 1,7-3,0)³ enn skrubbe fra ytre Oslofjord (2,1; 1,3-2,7). Innen hvert område hadde også hunnskrubbe (Ytre fjord: 2,5; 2,0-2,8, Indre fjord: 2,9; 2,5-3,2) dobbelt så høy medianverdi for LSI som hannskrubbe (Ytre fjord: 1,1; 1,0-1,1, Indre fjord: 1,5; 1,4-1,7) (Figur 3.1).

Tabell 3.3. ANOVA tabell for LSI for skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

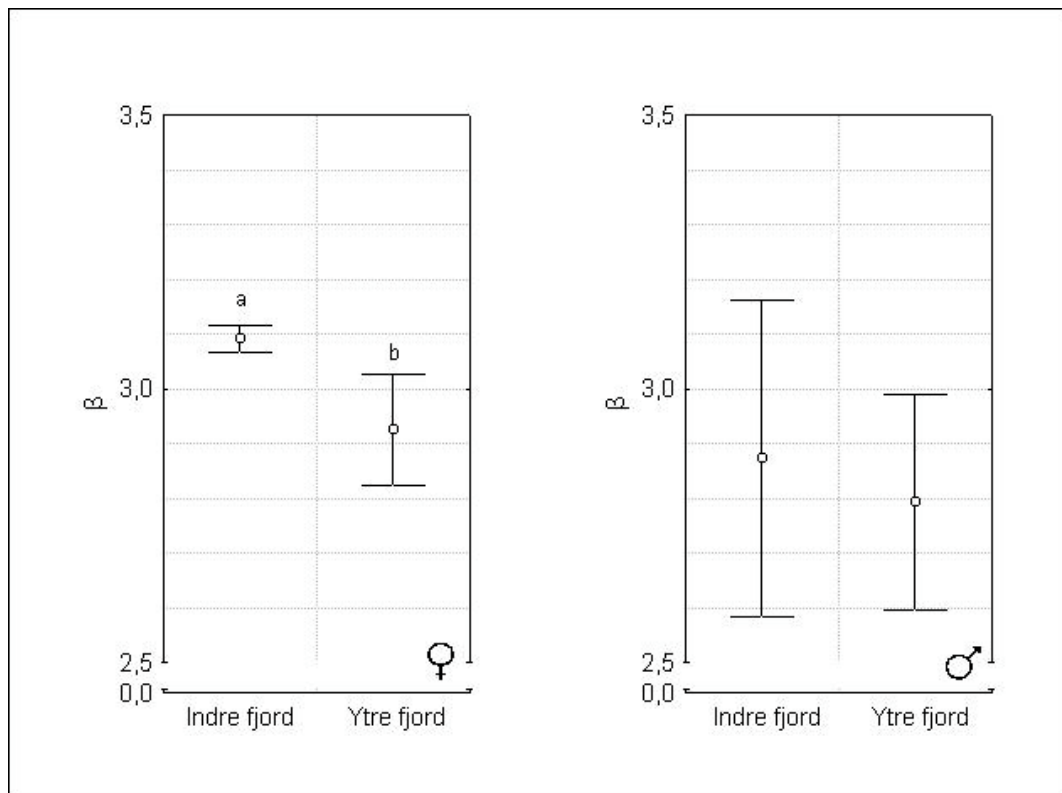
ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	655,2	0,00
Kjønn	1	56,3	0,00
Område	1	5,8	0,02
Kjønn*område	1	0,23	0,64
Feil	51		
Total	54		



Figur 3.1. LSI for skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen i LSI var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord og mellom hunnskrubbe - hannskrubbe for hvert område.

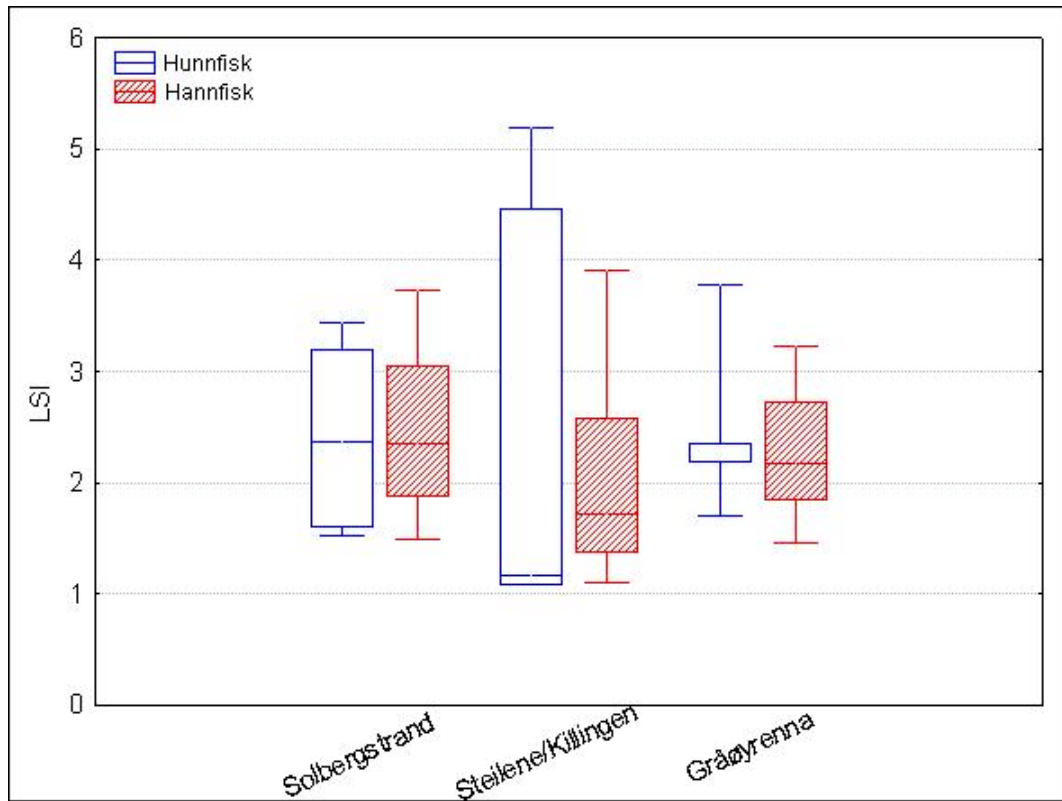
³ Alle parametere oppgis som: median; 25% - 75% kvartiler.

Det var ikke mulig å regne ut et felles stigningstall for forholdet mellom log lengde og log vekt for skrubbe. Stigningstallene i gruppene ble sammenliknet innen hvert kjønn, ettersom gonadevekten kunne skape forskjeller mellom kjønnene. Hunnskrubbe fra indre Oslofjord hadde et signifikant høyere stigningstall enn hunnskrubbe fra ytre Oslofjord (t-test, $p < 0,0005$) (Figur 3.2). For hannskrubbe fantes det ikke signifikant forskjell (t-test, $p > 0,25$).



Figur 3.2. GM regresjon på log lengde - log vekt for skrubbe presentert som stigningstall (β) \pm standard avvik. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

Det fantes ingen signifikante forskjeller i LSI for torsk hverken mellom lokaliteter (Kruskal-Wallis, $p=0,42$) eller mellom kjønn (Mann-Whitney: Solbergstrand; $p=0,85$, Steilene/Killingen; $p=0,76$, Gråøyrenna; $p=0,70$) (Figur 3.3).

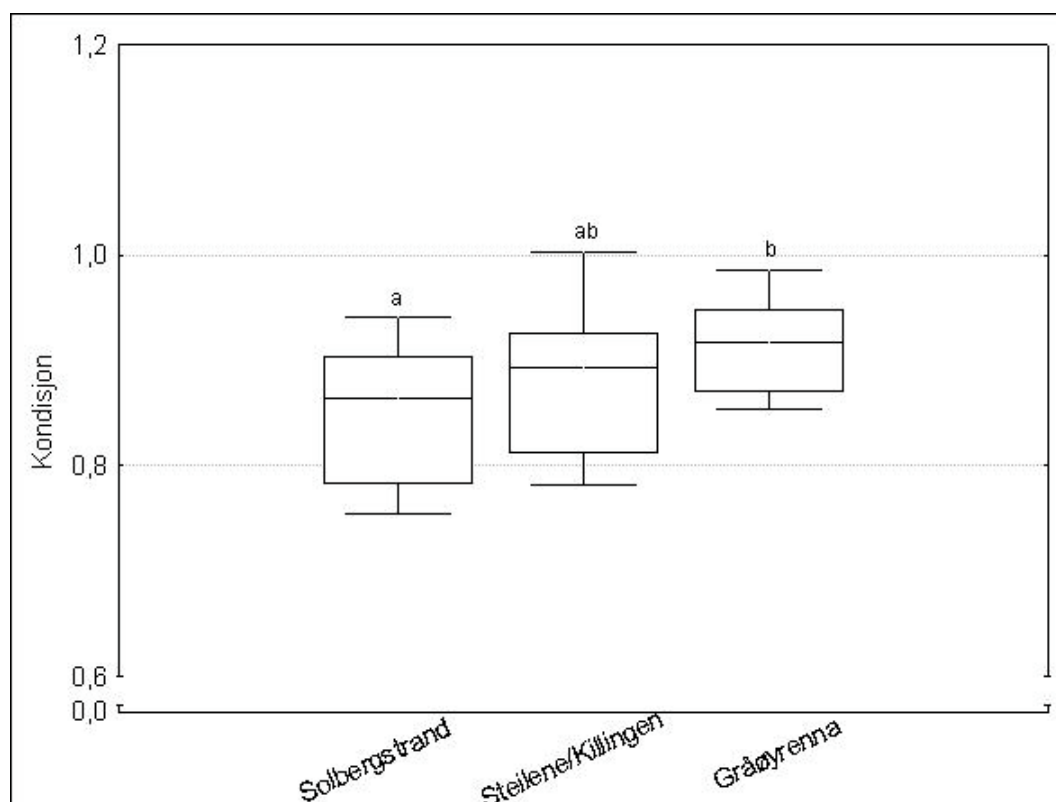


Figur 3.3. LSI for torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Det var ingen signifikante forskjeller i LSI mellom lokalitet eller kjønn.

Torskens kondisjon var signifikant forskjellig mellom lokalitetene (Tabell 3.4). Ved ettertest på lokalitet fantes det signifikant forskjell mellom lokalitetene Solbergstrand – Gråøyrenna (Tukey, $p=0,021$). Torsk fra Gråøyrenna hadde den beste kondisjonen (0,92; 0,87-0,95), mens torsk fra Solbergstrand hadde den dårligste kondisjonen (0,86; 0,78-0,90) (Figur 3.4).

Tabell 3.4. ANOVA tabell for kondisjon i torsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	8082,4	0,00
Kjønn	1	1,12	0,29
Lokalitet	2	3,73	0,03
Kjønn*lokalitet	2	0,54	0,59
Feil	54		
Total	59		



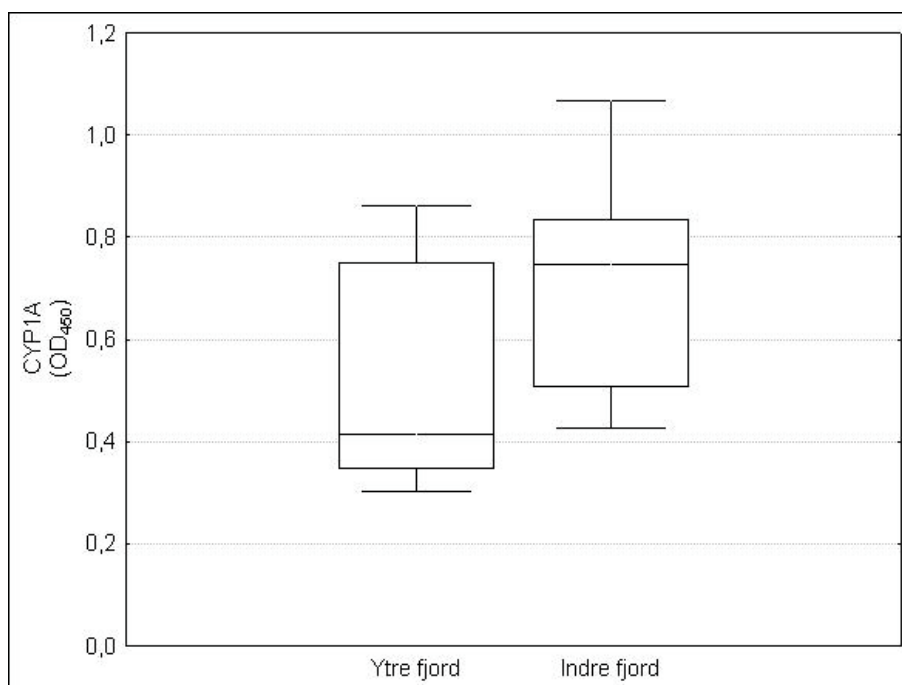
Figur 3.4. Kondisjon for torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

3.3 Mengde CYP1A protein og EROD aktivitet i lever

Mengden CYP1A protein i lever fra skrubbe var signifikant forskjellig mellom indre og ytre Oslofjord (Tabell 3.5). Medianverdien for mengde CYP1A protein i skrubbe fra indre Oslofjord (0,75; 0,51-0,83) var nesten dobbelt så høy som i skrubbe fra ytre Oslofjord (0,41; 0,35-0,75) (Figur 3.5). Det fantes ingen signifikante forskjeller i mengde CYP1A protein i lever mellom kjønn.

Tabell 3.5. ANOVA tabell for mengde CYP1A protein i lever fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	295,4	0,00
Kjønn	1	2,53	0,12
Område	1	6,95	0,01
Kjønn*område	1	0,29	0,59
Feil	51		
Total	54		

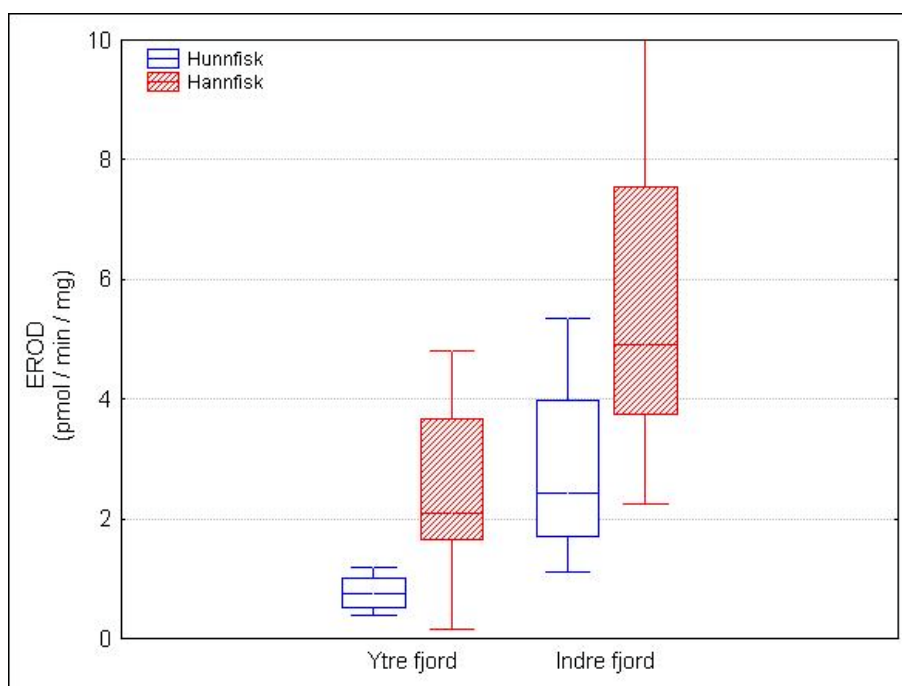


Figur 3.5. Mengde CYP1A protein (OD₄₅₀) i lever fra skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord.

Det var signifikant forskjell i EROD aktiviteten i lever fra skrubbe mellom både områder og kjønn (Tabell 3.6). Medianverdien for EROD aktivitet i skrubbe fra indre Oslofjord (3,4; 1,8-5,2) var over tre ganger så høy enn i skrubbe fra ytre Oslofjord (0,9; 0,5-1,6). Medianverdien for EROD aktivitet i hannskrubbe (Ytre fjord: 2,1; 1,6-3,7, Indre fjord: 4,9; 3,8-7,5) var over dobbelt så høy som i hunnskrubbe (Ytre fjord: 0,8; 0,5-1,0, Indre fjord: 2,4; 1,7-4,0) (Figur 3.6).

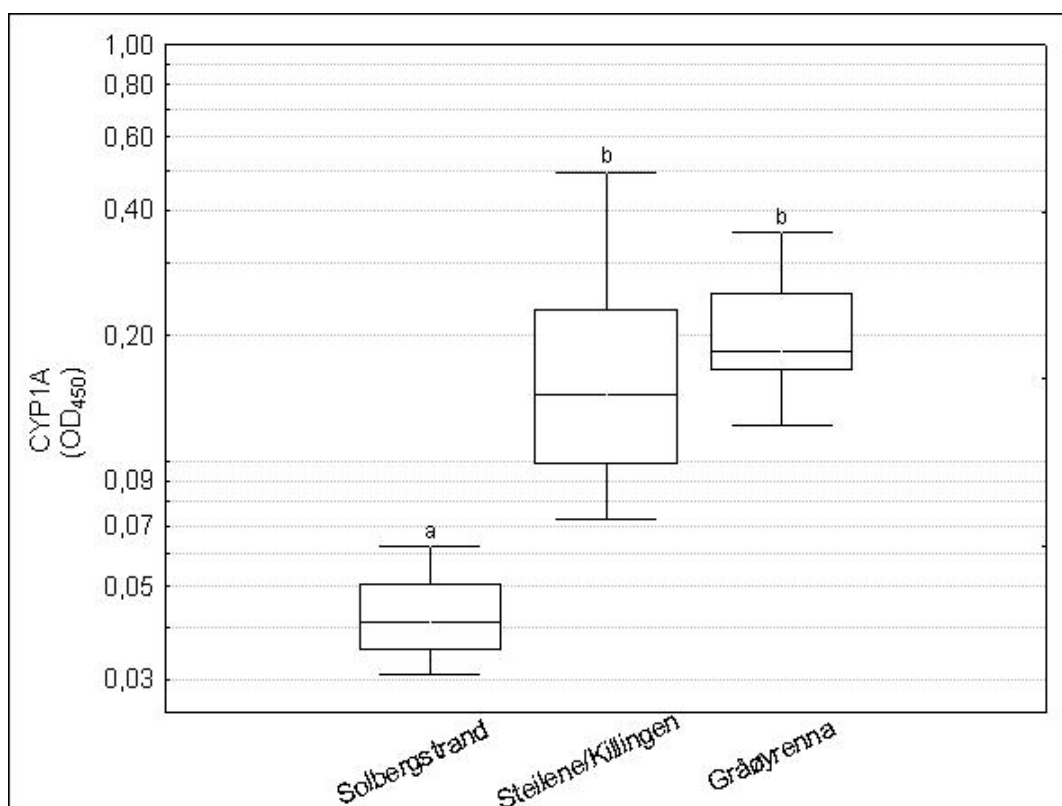
Tabell 3.6. ANOVA tabell for EROD aktivitet i lever fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	42,4	0,00
Kjønn	1	13,28	0,00
Område	1	32,31	0,00
Kjønn*område	1	0,00	0,96
Feil	51		
Total	54		



Figur 3.6. EROD aktivitet (pmol resorufin min⁻¹ mg⁻¹ protein) i S9-leverfraksjon fra skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen i EROD aktivitet var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord og mellom hunnskrubbe - hannskrubbe innen hvert område.

Mengden CYP1A protein i lever fra torsk var signifikant forskjellig mellom lokalitetene (Figur 3.7). Medianverdiene for mengde CYP1A protein i torsk fra Steilene/Killingen (0,15; 0,10-0,23) og Gråøyrenna (0,18; 0,17-0,25) var henholdsvis over tre og fire ganger så høye som i torsk fra Solbergstrand (0,04; 0,04-0,05). Forskjellen i mengde CYP1A protein var signifikant mellom Solbergstrand – Steilene/Killingen og Solbergstrand – Gråøyrenna (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller i mengde CYP1A protein (Mann-Whitney: Solbergstrand; $p = 0,35$, Steilene/Killingen: $p = 0,17$, Gråøyrenna: $p = 0,80$).

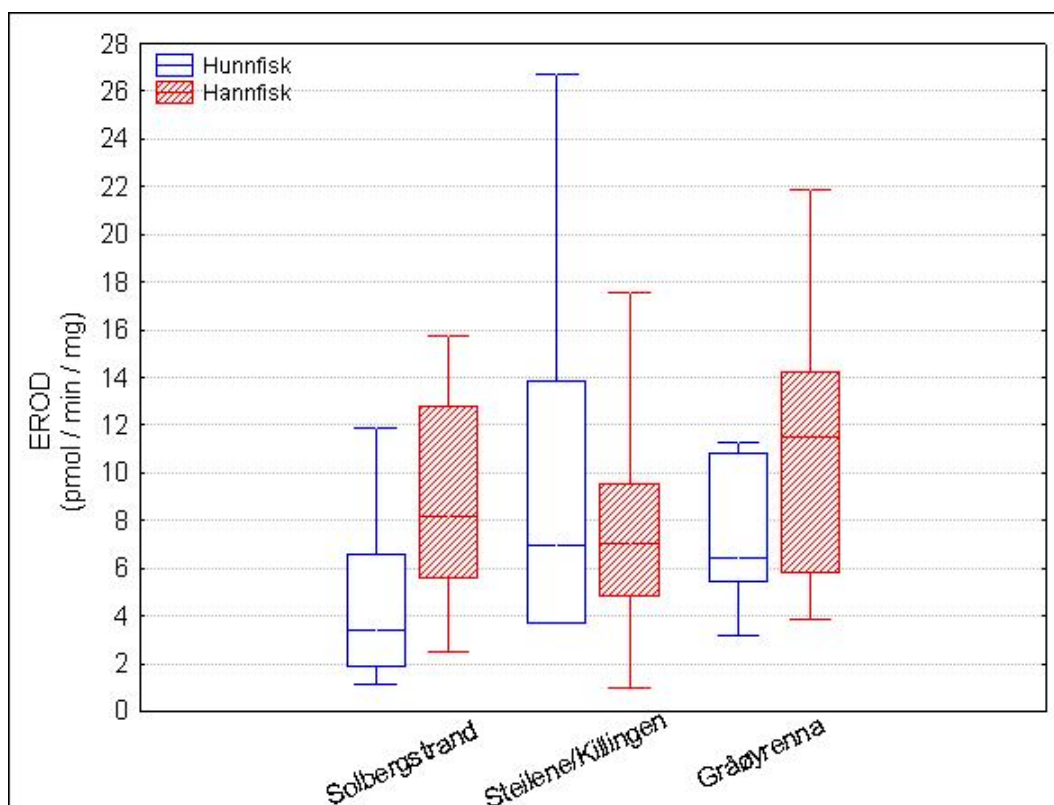


Figur 3.7. Mengde CYP1A protein (OD_{450}) i lever fra torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

Det fantes ingen signifikante forskjeller i EROD aktivitet i lever fra torsk mellom lokaliteter eller mellom kjønn (Tabell 3.7, Figur 3.8).

Tabell 3.7. ANOVA tabell for EROD aktivitet i lever fra torsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	118,8	0,00
Kjønn	1	1,47	0,23
Lokalitet	2	1,15	0,32
Kjønn*lokalitet	2	1,78	0,18
Feil	54		
Total	59		



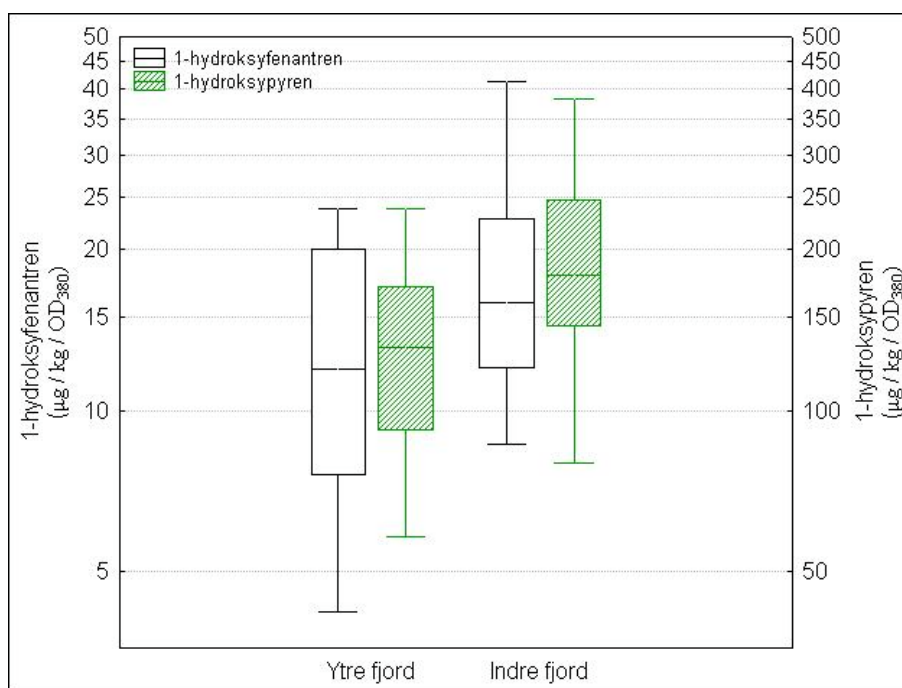
Figur 3.8. EROD aktivitet ($\text{pmol resorufin min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) i S9-leverfraksjon fra torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Det var ingen signifikante forskjeller i EROD aktivitet mellom lokalitet eller kjønn.

3.4 Metabolitter av PAH i galle

Mengden 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra skrubbe var signifikant forskjellig mellom områdene (Tabell 3.8). Medianverdiene for 1-hydroksyfenantren (16,0; 12,0-22,8) og 1-hydroksypyren (179,2; 144,5-247,5) i skrubbe fra indre Oslofjord var høyere enn medianverdiene for 1-hydroksyfenantren (11,9; 7,6-20,1) og 1-hydroksypyren (131,5; 92,4-170,7) i skrubbe fra ytre Oslofjord (Figur 3.9). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller for PAH metabolitter i galle fra skrubbe.

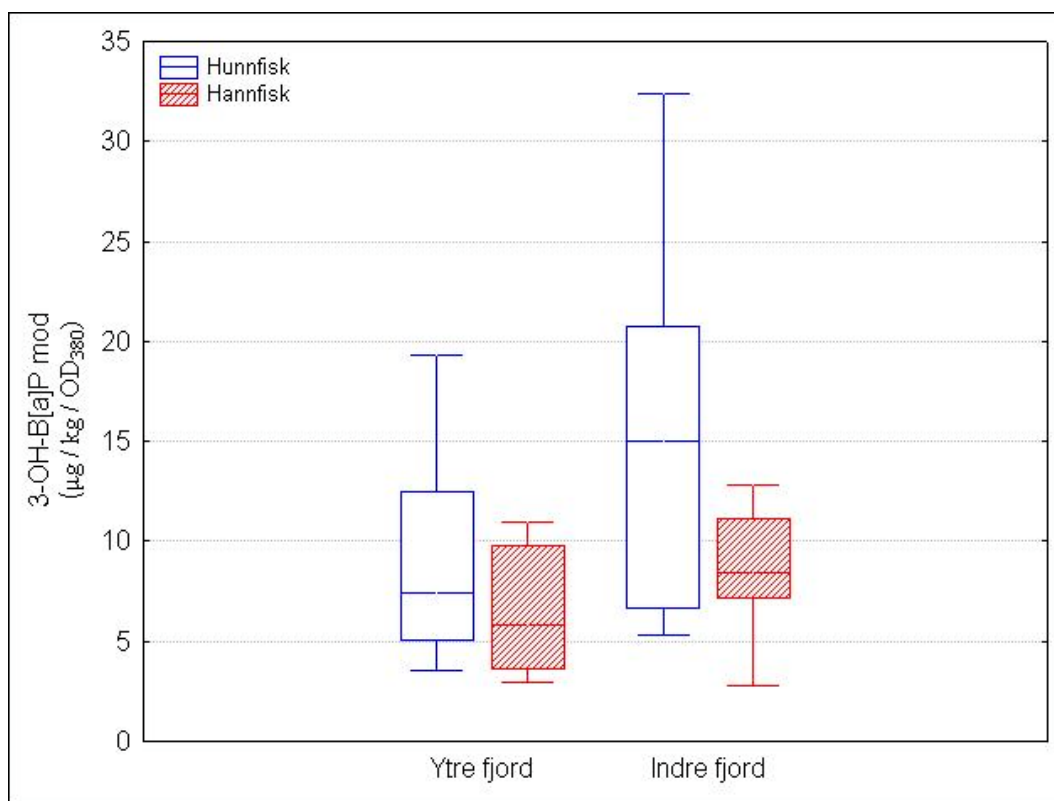
Tabell 3.8. ANOVA tabell for 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	1-Hydroksyfenantren			1-hydroksypyren		
	df	F	p	df	F	p
Skjæringspunkt	1	583,7	0,00	1	3891,6	0,00
Kjønn	1	3,53	0,07	1	2,51	0,12
Område	1	4,79	0,03	1	6,33	0,02
Kjønn*område	1	0,09	0,76	1	0,05	0,82
Feil	45			48		
Total	48			51		



Figur 3.9. 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra skrubbe (μg metabolitt kg^{-1} galle OD_{380}^{-1}) presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord for begge metabolittene.

Verdiene for 3-hydroksybenzo[a]pyren ble ikke statistisk analysert, men medianverdien for 3-hydroksybenzo[a]pyren så ut til å være høyere i galle i fisk fra indre Oslofjord enn ytre Oslofjord (Figur 3.3.10). Medianverdien for 3-hydroksybenzo[a]pyren så også ut til å være høyere for hunnskrubbe enn for hannfisk.



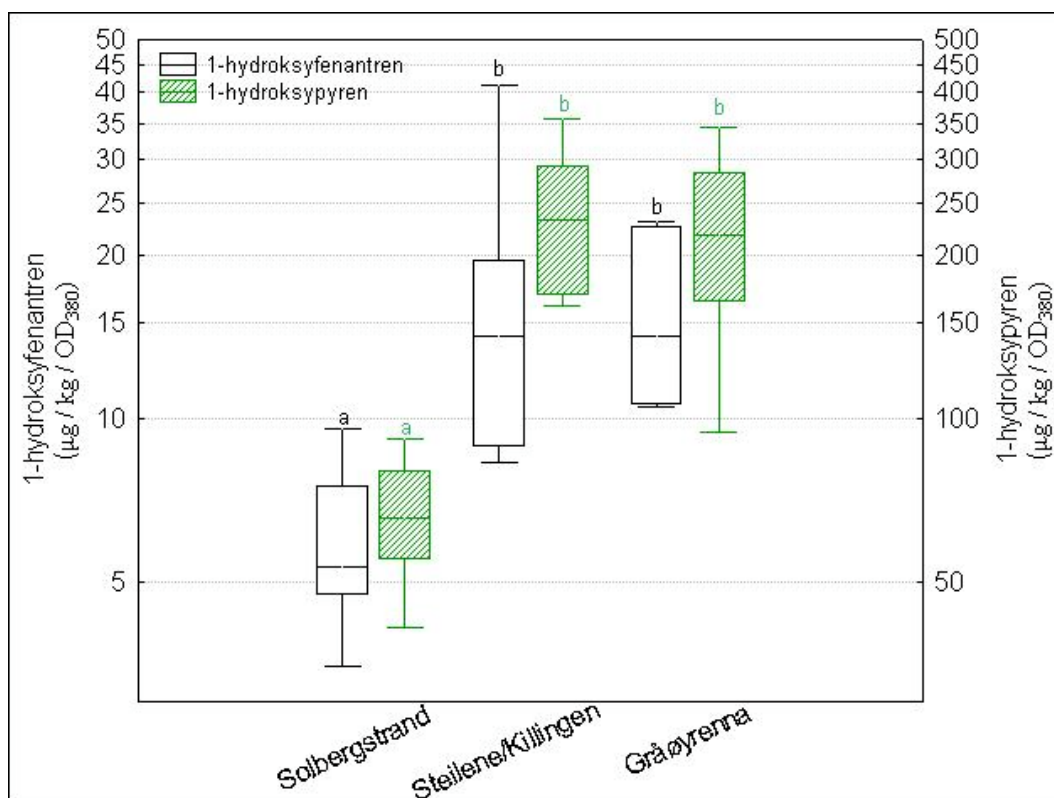
Figur 3.10. 3-hydroksybenzo[a]pyren i galle fra skrubbe (μg metabolitt kg^{-1} galle OD_{380}^{-1}) presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{Abs}_{380}^{-1}$ ble brukt til utregning av verdier og satt inn i figuren som erstatning for verdier som var under deteksjonsgrensen i PAH-analysen.

Mengden 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra torsk var signifikant forskjellig mellom lokalitetene (Tabell 3.9). Ved ettertest på lokalitet fantes det signifikant forskjell mellom lokalitetene Solbergstrand – Steilene/Killingen og Solbergstrand – Gråøyrenna for begge metabolittene (Tukey, $p=0,0001$) (Figur 3.11). Medianverdiene for 1-hydroksyfenantren i torsk fra Steilene/Killingen (14,2; 8,9-19,6) og Gråøyrenna (14,2; 10,6-22,6) var nesten tre ganger så høye som i torsk fra Solbergstrand (5,3; 4,7-7,5).

Medianverdiene for 1-hydroksypyren i torsk fra Steilene/Killingen (233,2; 169,5-292,7) og Gråøyrenna (217,3; 165,0-283,9) var over tre ganger så høye som i torsk fra Solbergstrand (65,6; 55,0-80,2). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller for PAH metabolitter i galle fra torsk.

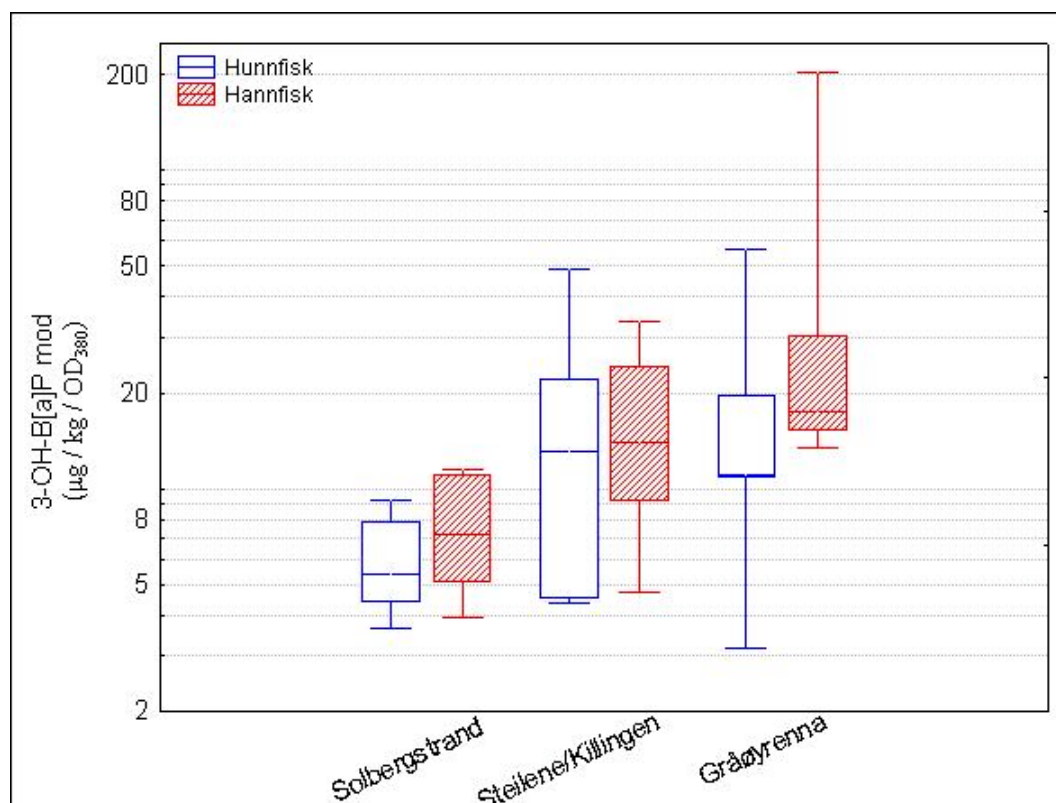
Tabell 3.9. ANOVA tabell for 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra torsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	1-Hydroksyfenantren			1-hydroksypyren		
	df	F	p	df	F	p
Skjæringspunkt	1	1091,2	0,00	1	6986,2	0,00
Kjønn	1	2,03	0,16	1	0,28	0,60
Lokalitet	2	26,11	0,00	2	59,29	0,00
Kjønn*lokalitet	2	2,73	0,08	2	0,99	0,38
Feil	39			49		
Total	44			54		



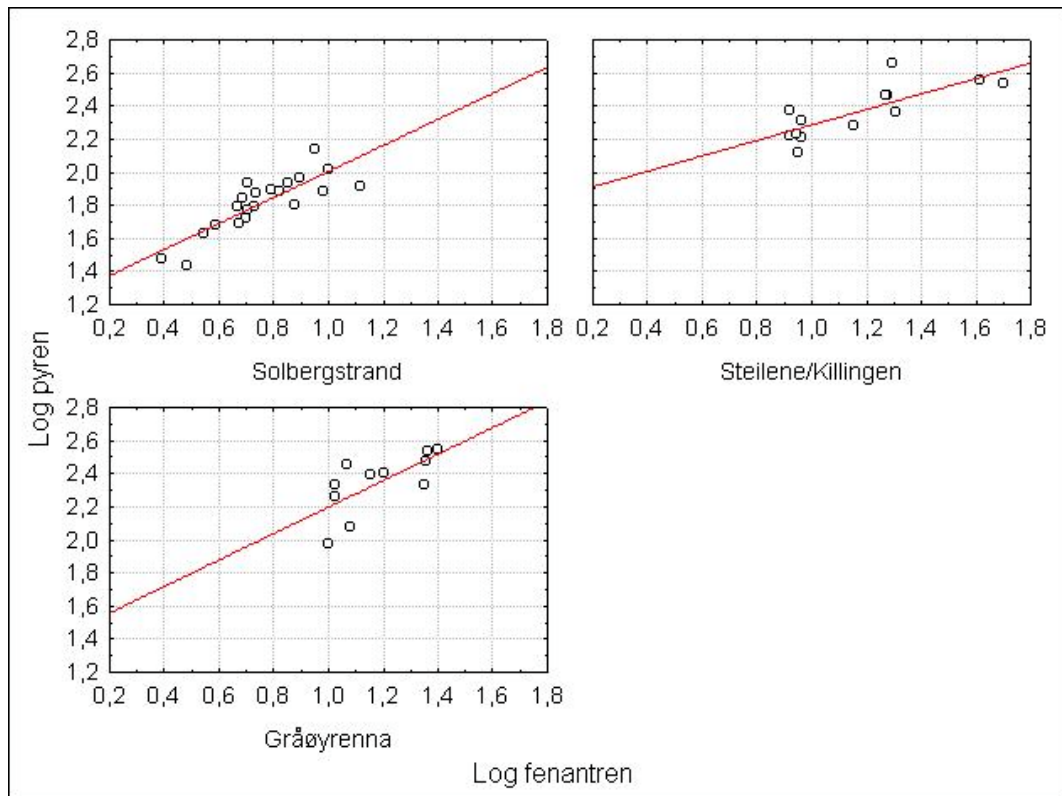
Figur 3.11. 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle fra torsk (μg metabolitt kg^{-1} galle OD_{380}^{-1}) presentert som median, 25 % - 75 % percentil og 10 % - 90 % percentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

Verdier for 3-hydroksybenzo[a]pyren ble ikke statistisk analysert, men medianverdien for 3-hydroksybenzo[a]pyren så ut til å være høyere i galle i fisk fra Steilene/Killingen og Gråøyrenna enn i fisk fra Solbergstrand (Figur 3.12). Medianverdien for 3-hydroksybenzo[a]pyren så også ut til å være høyere for hanntorsk enn for hunntorsk.



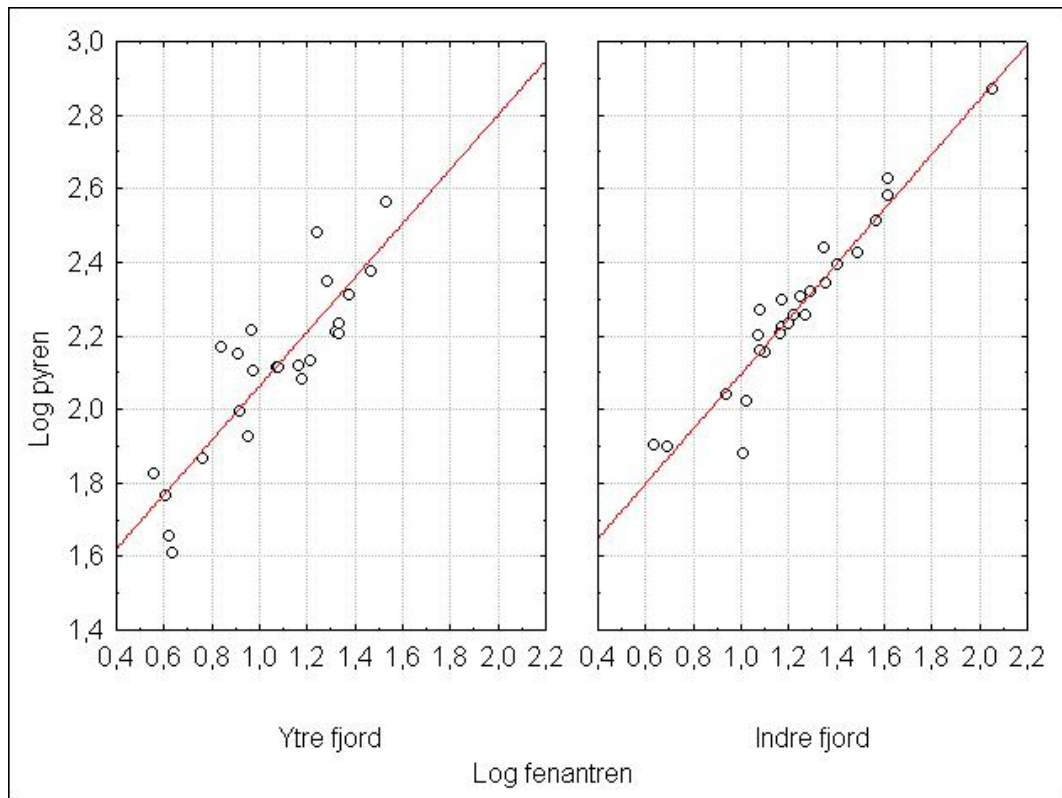
Figur 3.12. 3-hydroksybenzo[a]pyren i galle fra torsk (μg metabolitt kg^{-1} galle OD_{380}^{-1}) presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{Abs}_{380}^{-1}$ ble brukt til utregning av verdier og satt inn i figuren som erstatning for verdier som var under deteksjonsgrensen i PAH-analysen.

Torsk fra Steilene/Killingen hadde blitt eksponert for en større andel fenantren enn torsk fra de andre lokalitetene. For torsk var stigningstallene fra Solbergstrand, Steilene/Killingen og Gråøyrenna henholdsvis 0,79, 0,47 og 0,80 (Figur 3.13). Regresjonslinjene er ekstrapolert og er ikke representative utenfor datapunktene utstrekning.



Figur 3.13. Lineær regresjon mellom 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren for torsk fra Solbergstrand, Steilene/Killingen og Gråøyrenna.

For skrubbe var stingingstallet mellom metabolittene 0,74 for fisk fra ytre Oslofjord og 0,75 fra indre Oslofjord (Figur 3.14). Det var ingen forskjell i sammensetningen av metabolittene mellom de to lokalitetene. Regresjonslinjene er ekstrapolert og er ikke representative utenfor datapunktene utstrekning.



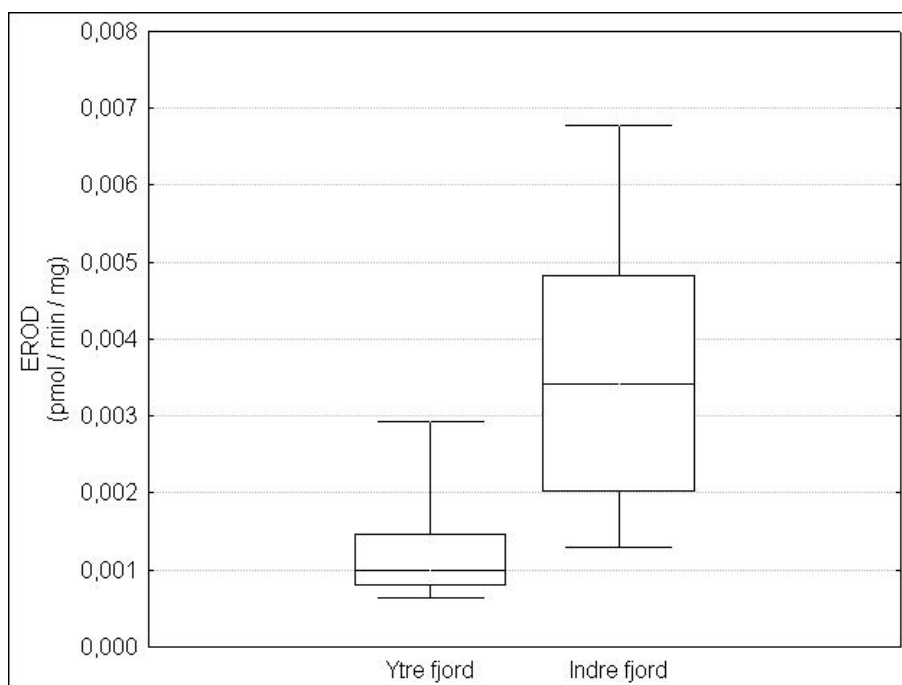
Figur 3.14. Lineær regresjon mellom 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren for skrubbe fra indre og ytre Oslofjord.

3.5 EROD-aktivitet i nyre

Det var signifikant forskjell i EROD aktivitet i nyre fra skrubbe mellom områdene (Tabell 3.10). Medianverdien for EROD-aktivitet i skrubbe fra indre Oslofjord (0,0034; 0,0020-0,0048) var over tre ganger så høy som i skrubbe fra ytre Oslofjord (0,0010; 0,0008-0,0015) (Figur 3.15). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller for EROD aktivitet i nyre fra skrubbe.

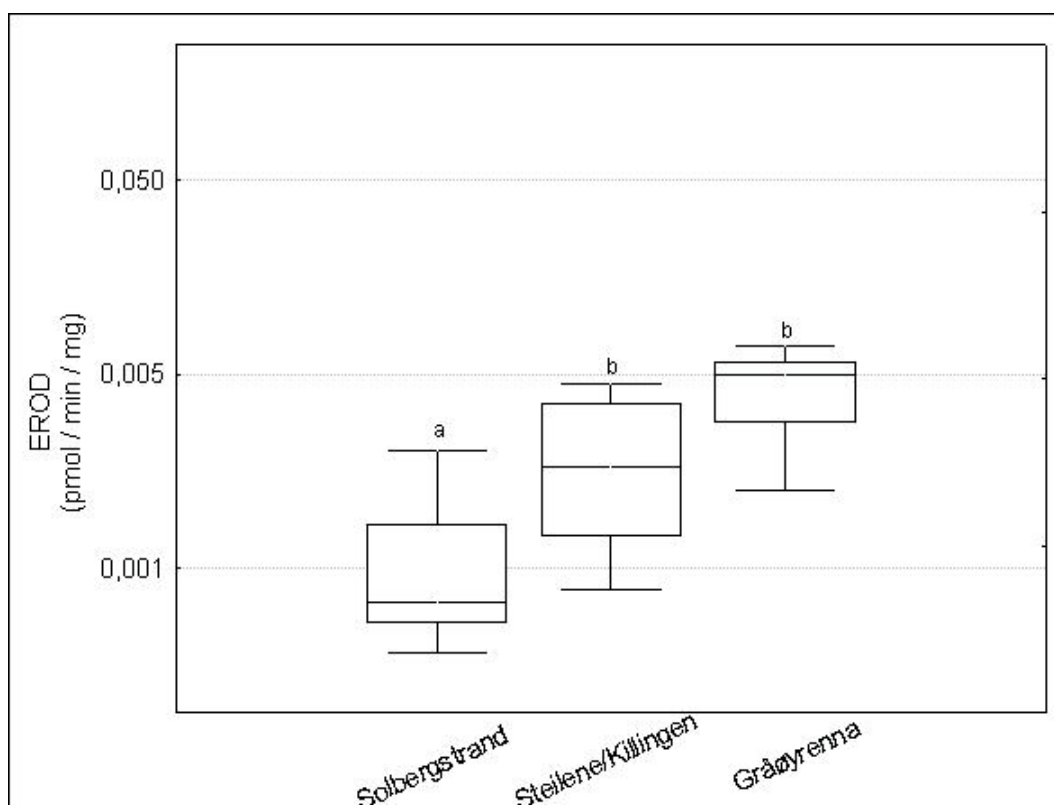
Tabell 3.10. ANOVA tabell for EROD aktivitet i nyre fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	4374,1	0,00
Kjønn	1	2,13	0,15
Område	1	20,91	0,00
Kjønn*område	1	0,62	0,44
Feil	49		
Total	52		



Figur 3.15. EROD-aktivitet (pmol resorufin min⁻¹ mg⁻¹ protein) i mikrosomal-nyrefraksjon fra skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen i EROD aktivitet var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord.

Det var signifikant forskjell i EROD aktivitet i nyre fra torsk mellom lokalitetene (Figur 3.16). Ved ettertest fantes signifikante forskjeller mellom både Solbergstrand - Gråøyrenna (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) og Solbergstrand - Steilene/Killingen (Kruskal-Wallis, $p = 0,021$). Medianverdiene for EROD-aktivitet i torsk fra Steilene/Killingen (0,0016; 0,0007-0,0035) og Gråøyrenna (0,0049; 0,0028-0,0057) var henholdsvis 5 og 16 ganger høyere enn i torsk fra Solbergstrand (0,0003; 0,0003-0,0008). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller for EROD aktivitet i nyre fra torsk (Mann-Whitney: Solbergstrand; $p = 0,90$, Steilene/Killingen; $p = 0,18$, Gråøyrenna; $p = 0,68$).



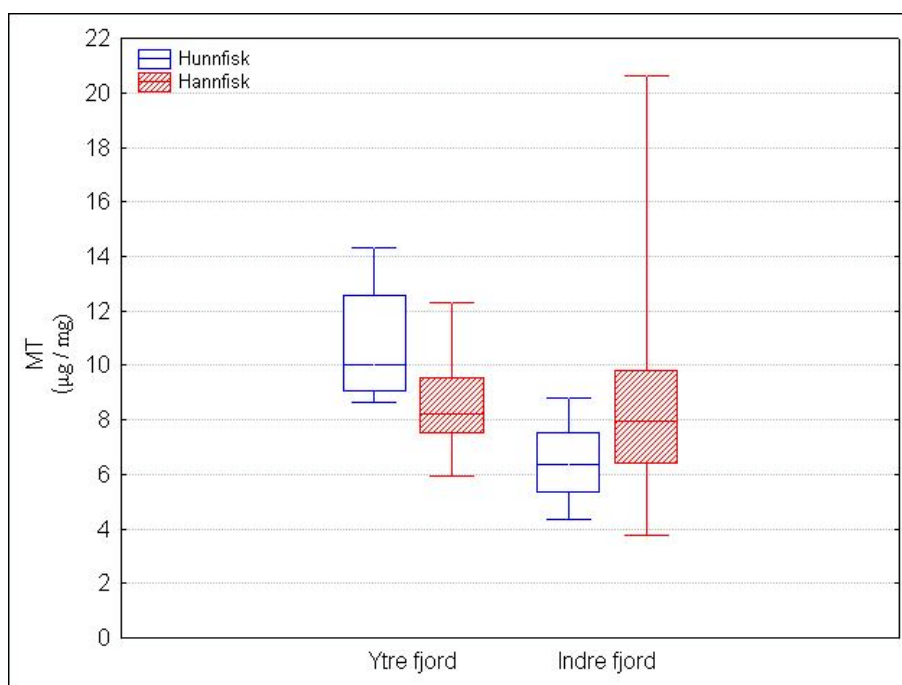
Figur 3.16. EROD-aktivitet ($\text{pmol resorufin min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) i mikrosomal-nyrefraksjon fra torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

3.6 Metallotionein i nyre

For skrubbe fantes det en interaksjon mellom kjønn og område for mengden metallotionein i nyre (Tabell 3.11). Medianverdien for hunnfisk fra ytre Oslofjord (10,0; 9,1-12,6) var signifikant høyere enn for hunnfisk fra indre Oslofjord (6,3; 5,4-7,5) (Tukey, $p=0,0003$) (Figur 3.17). Det fantes ingen signifikante forskjeller mellom områdene for hannfisk. På grunn av interaksjonen mellom kjønn og område ble det ikke gjort analyser på begge kjønn samlet.

Tabell 3.11. ANOVA tabell for metallotionein i nyre fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	433,4	0,00
Kjønn	1	0,00	1,00
Område	1	6,12	0,02
Kjønn*område	1	7,39	0,01
Feil	49		
Total	52		

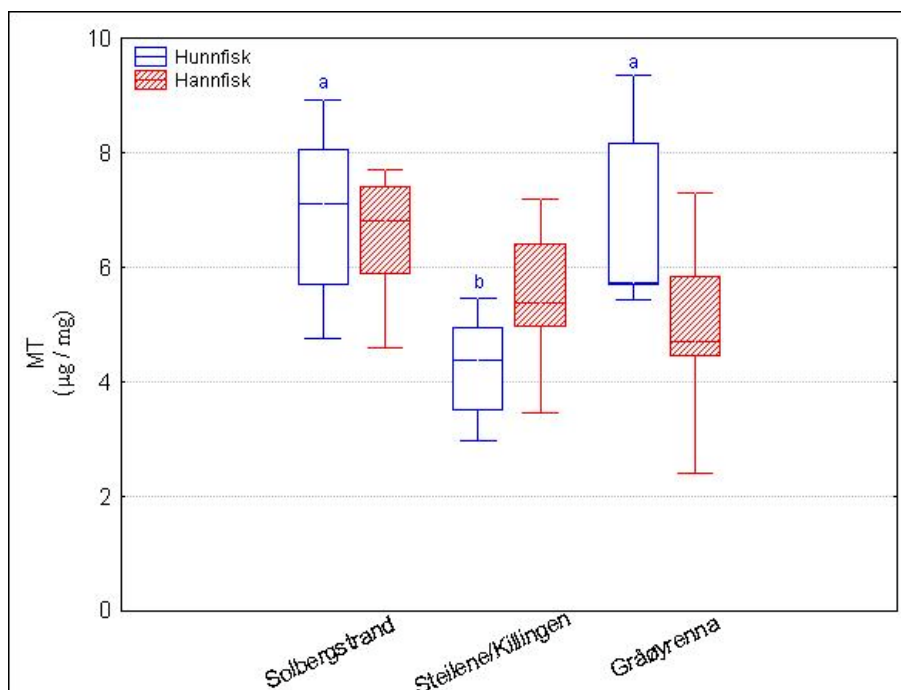


Figur 3.17. Metallotionein ($\mu\text{g MT mg}^{-1}$ protein) i nyre fra skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen i metallotioneinnivåer var signifikant mellom hunnfisk fra ytre - indre Oslofjord.

For torsk fantes det også en interaksjon mellom kjønn og lokalitet for mengden metallotionein i nyre (Tabell 3.12). Hunnfisk fra Steilene/Killingen hadde signifikant lavere MT nivå enn hunnfisk fra Solbergstrand (Tukey, $p=0,001$) og hunnfisk fra Gråøyrenna (Tukey, $p=0,024$) (Figur 3.18). Medianverdien for MT i hunnfisk fra Steilene/Killingen (4,4; 3,5-5,0) utgjorde kun 62 % av medianverdien i hunnfisk fra Solbergstrand (7,1; 5,7-8,0) og 77% av medianverdien for Gråøyrenna (5,7; 5,7-8,2). For hannfisk fantes det ingen signifikante forskjeller, men figuren antyder at fisk fra indre Oslofjord hadde lavere medianverdier enn fisk fra ytre Oslofjord.

Tabell 3.12. ANOVA tabell for metallotionein i nyre fra torsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	903,7	0,00
Kjønn	1	0,89	0,35
Lokalitet	2	8,89	0,00
Kjønn*lokalitet	2	4,45	0,02
Feil	54		
Total	59		



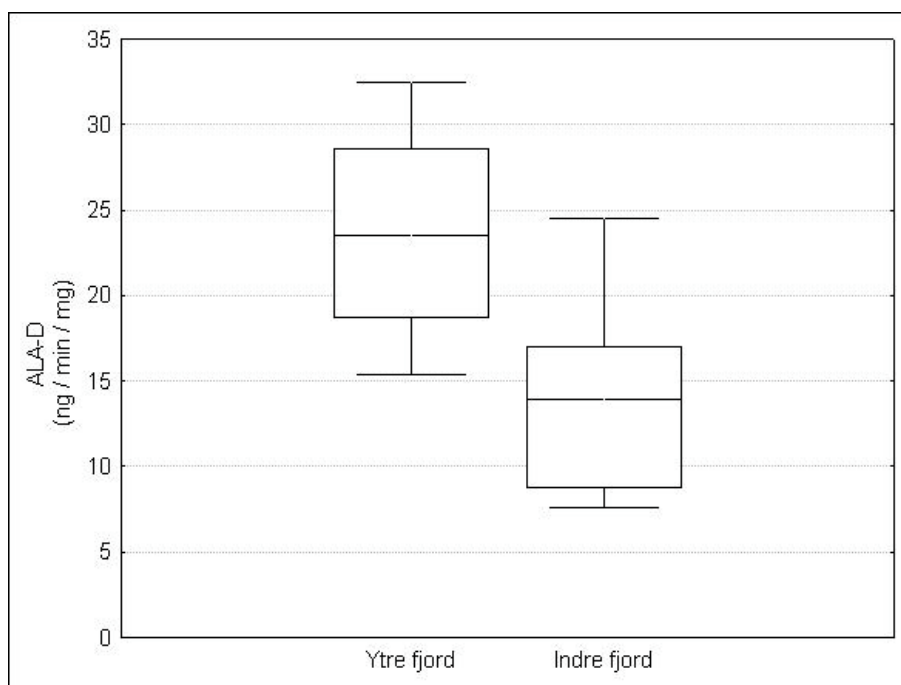
Figur 3.18. Metallotionein ($\mu\text{g MT mg}^{-1}$ protein) i nyre fra torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

3.7 Aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i røde blodceller

Det var signifikant forskjell i ALA-D aktivitet i røde blodceller fra skrubbe mellom områdene (Tabell 3.13). Medianverdien for skrubbe fra indre fjord (13,9; 8,8-17,0) var på kun 59 % av medianverdien for skrubbe fra ytre Oslofjord (23,5; 18,7-28,6) (Figur 3.19). Det fantes ingen signifikante kjønnsforskjeller i ALA-D aktivitet i røde blodceller fra skrubbe.

Tabell 3.13. ANOVA tabell for ALA-D aktivitet i røde blodceller fra skrubbe med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	305,3	0,00
Kjønn	1	0,67	0,42
Område	1	17,22	0,00
Kjønn*område	1	0,04	0,85
Feil	48		
Total	51		

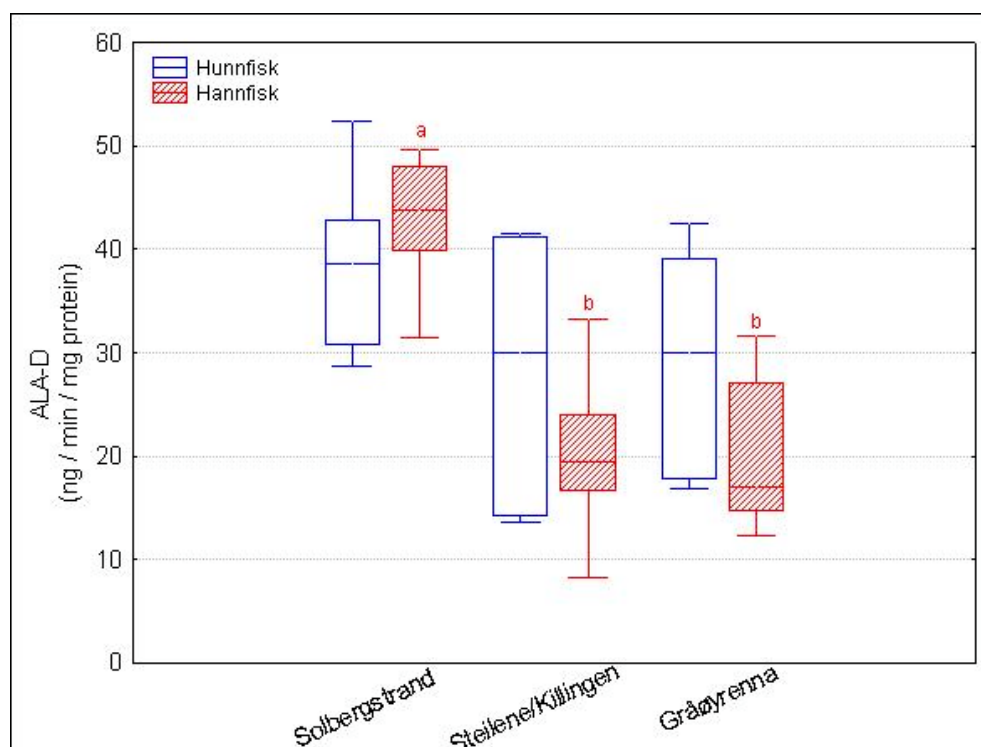


Figur 3.19. ALA-D aktivitet ($\text{ng PBG min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) i røde blodceller fra skrubbe presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Forskjellen i ALA-D aktivitet var signifikant mellom ytre - indre Oslofjord.

For torsk fantes det en interaksjon mellom kjønn og lokalitet for ALA-D aktivitet (Tabell 3.14). Medianverdien i hannfisk fra Solbergstrand (43,8; 39,9-48,0) var over dobbelt så høy som i hannfisk fra Gråøyrenna (17,1; 14,8-27,1) og Steilene/Killingen (19,5; 16,6-24,1) (Tukey, $p=0,0001$) (Figur 3.20). Disse verdiene er på henholdsvis 39% og 45% av aktiviteten i hanntorsk fra ytre Oslofjord. For hunntorsk fantes det ingen signifikante forskjeller, men figuren antyder at medianverdiene var lavere for hunntorsk fra indre Oslofjord.

Tabell 3.14. ANOVA tabell for ALA-D aktivitet i røde blodceller fra torsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	584,7	0,00
Kjønn	1	2,84	0,10
Lokalitet	2	24,42	0,00
Kjønn*lokalitet	2	3,76	0,03
Feil	54		
Total	59		



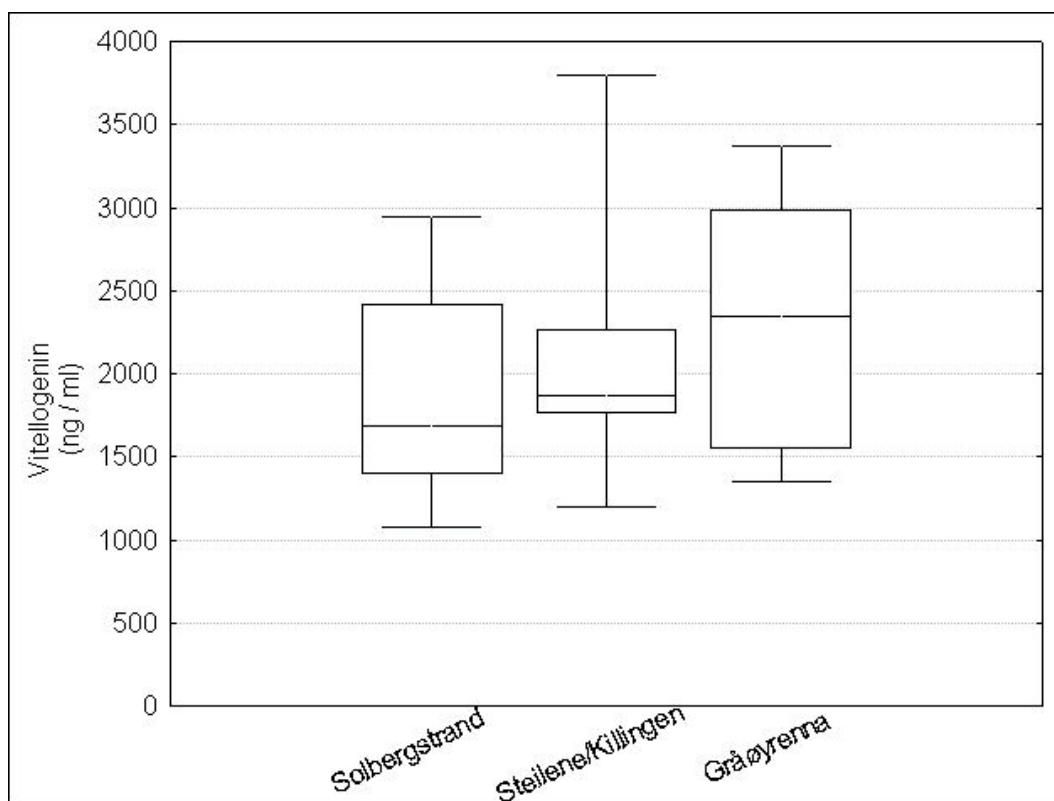
Figur 3.20. ALA-D aktivitet (ng PBG min⁻¹ mg⁻¹ protein) i røde blodceller fra torsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Signifikante forskjeller er markert med ulike bokstaver.

3.8 Vitellogeninkonsentrasjoner i blodplasma fra hanntorsk

Det fantes ingen signifikante forskjeller i vitellogeninkonsentrasjoner i blodplasma fra hanntorsk mellom lokalitetene i indre og ytre Oslofjord (Tabell 3.15, Figur 3.21). Det ble også analysert vitellogenin i hunntorsk, og hunntorsk fra Gråøyrenna hadde opptil 600 ganger høyere vitellogeninnivå enn hann- og hunntorsk fra de andre lokalitetene (resultater ikke vist).

Tabell 3.15. ANOVA tabell for vitellogenin i blodplasma fra hanntorsk med kjønn og område som forklarende variable.

ANOVA	df	F	p
Skjæringspunkt	1	204,2	0,00
Lokalitet	2	0,82	0,45
Feil	27		
Total	29		

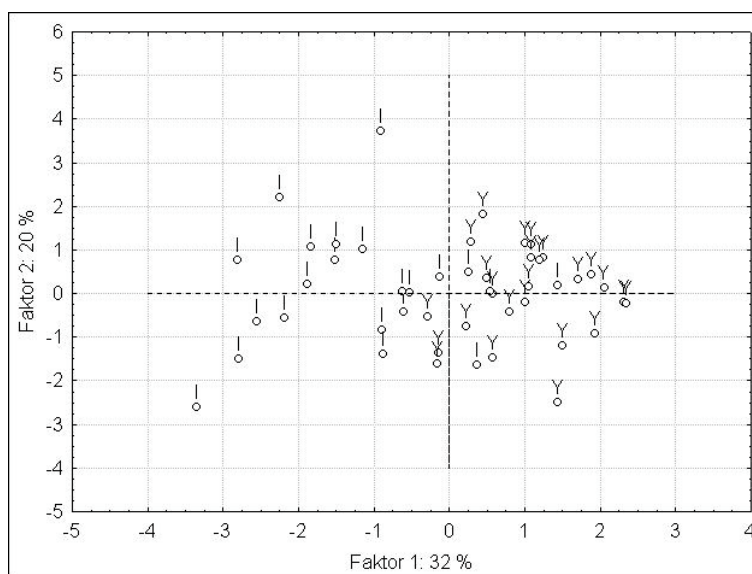


Figur 3.21. Vitellogeninkonsentrasjoner i blodplasma fra hanntorsk presentert som median, 25 % - 75 % persentil og 10 % - 90 % persentil. Det var ingen signifikante forskjeller i vitellogeninkonsentrasjon mellom lokalitetene.

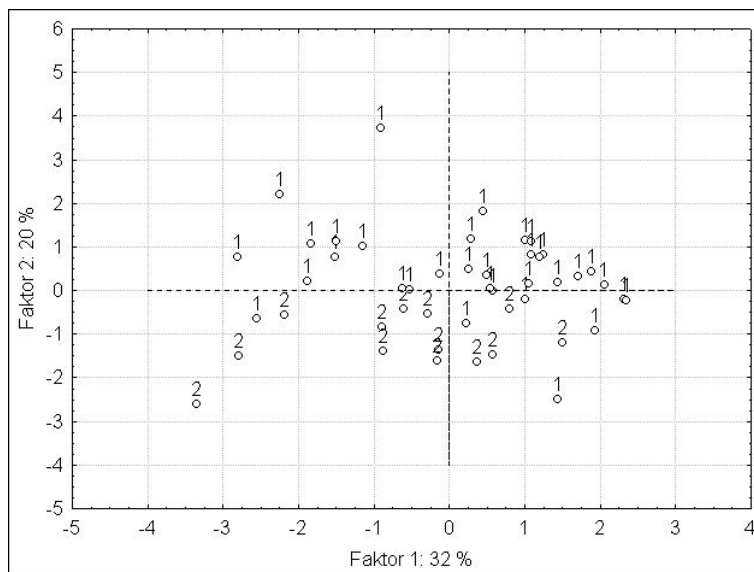
3.9 Multivariat metode

3.9.1 Skrubbe

Med en reduksjon til tre faktorer forklarte modellen 68 % av variasjonen i datasettet. Faktor 1 (horisontal akse) forklarte 32 % og faktor 2 (vertikal akse) 20 % av variasjonen. Skrubbe grupperte seg etter område langs faktor 1, med indre Oslofjord mot venstre og ytre Oslofjord mot høyre (Figur 3.22). Skrubbe hadde også en gruppering av kjønn langs faktor 2 (Figur 3.23). Dette viser at variable som plasserer seg langs faktor 1 hovedsakelig kan skyldes områdeforskjeller. Vektorer som peker mot venstre vil derfor ha en positiv korrelasjon til indre Oslofjord, mens vektorer som peker mot høyre vil ha en positiv korrelasjon til ytre Oslofjord. Variable som plasserer seg langs faktor 2, kan skyldes variasjon mellom kjønnene. Vektorer som peker oppover vil korrelere positivt til hunnfisk, mens vektorer som peker nedover vil korrelere positivt til hannfisk.



Figur 3.22. PCA med presentasjon av skrubbe etter område. Skrubbe grupperte seg etter områdene indre og ytre Oslofjord langs faktor 1 (horisontal akse). I=Indre Oslofjord, Y=Ytre Oslofjord.

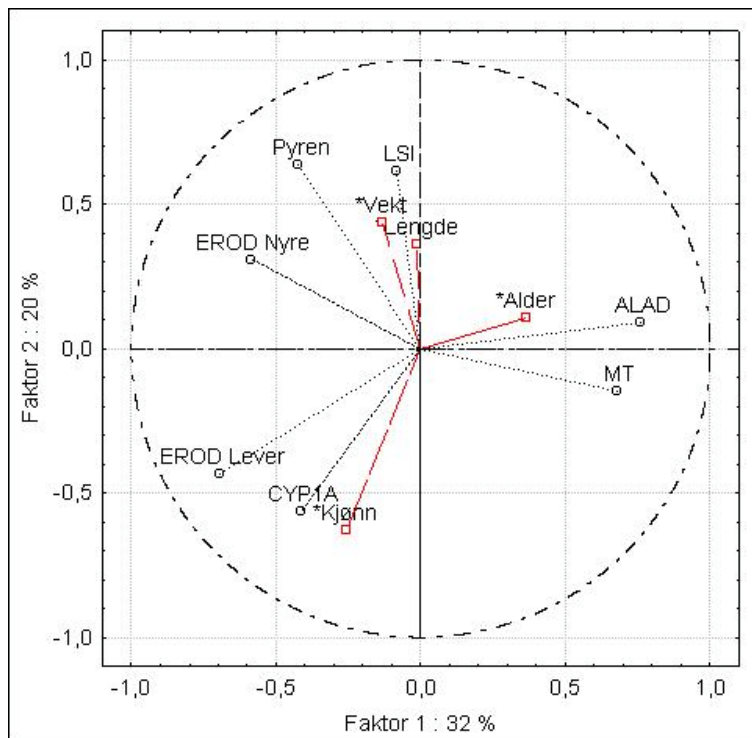


Figur 3.23. PCA med presentasjon av skrubbe etter kjønn. Skrubbe grupperte seg etter kjønn langs faktor 2 (vertikal akse). 1=hunnfisk, 2=hannfisk.

Mengde CYP1A protein og EROD aktivitet i lever grupperte seg sammen og korrelerte positivt til indre Oslofjord og hannskrubbe (Figur 3.24). Variasjonen i faktor 1 (område) ble forklart mer av EROD aktivitet i lever enn av mengden CYP1A protein (Tabell 3.16). Mengden CYP1A protein forklarte derimot mer av variasjonen i faktor 2 (kjønn) enn EROD aktiviteten. 1-hydroksypyren grupperte seg nær EROD aktivitet i nyre og korrelerte positivt til indre Oslofjord og hunnskrubbe. Disse to gruppene hadde felles positiv korrelasjon til indre Oslofjord, men motsatte korrelasjoner til kjønn. Leversomatisk indeks grupperte seg med vekt og lengde langs faktor 2, med positiv korrelasjon til hunnfisk. Metallothionein, ALA-D og alder dannet en gruppe langs faktor 1 og korrelerte positivt til ytre Oslofjord.

Tabell 3.16. Prosentvise bidrag av variablene til hver faktor i PCA. (Faktor 3 er ikke tatt med i den grafiske fremsillingen).

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
LSI	0,3	26,7	43,3
MT	20,8	1,5	9,3
ALA-D aktivitet	25,8	0,5	2,2
Mengde CYP1A protein	7,8	22,6	11,8
EROD aktivitet i lever	21,6	13,3	3,1
EROD aktivitet i nyre	15,6	6,7	23,3
1-hydroksypyren	8,1	28,7	7,0



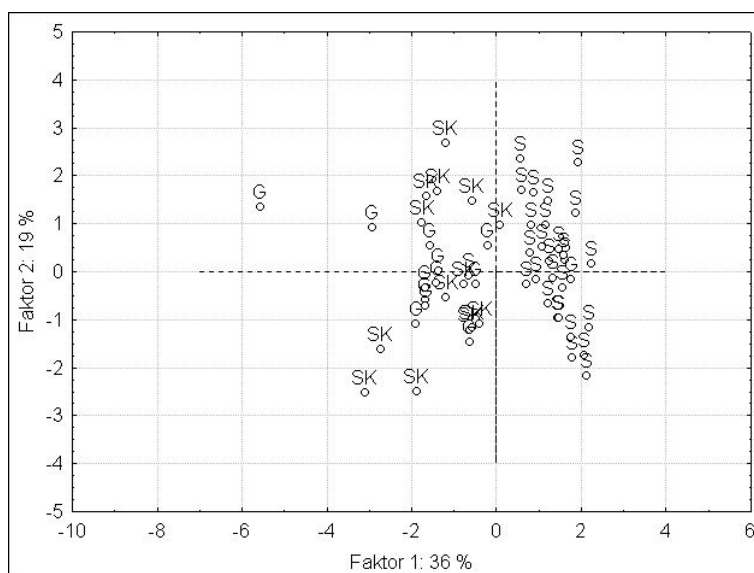
Figur 3.24. PCA av skrubbe (n=47). Alder, vekt, lengde og kjønn er tilleggsvARIABLE.

Det ble også utført en PCA for hvert kjønn (resultater ikke vist). For begge kjønnene så LSI ut til å ha en sammenheng med mengden CYP1A protein, men for hannskrubbe fantes også EROD i lever, lengde og vekt i denne gruppen. Vekt og lengde hadde liten innflytelse i hunnfisk, og EROD i lever så ikke ut til å henge sammen med mengden CYP1A protein i hunnfisk. Metallotionein og ALA-D så ut til å ha en sterkere sammenheng i hunnfisk enn i hannfisk.

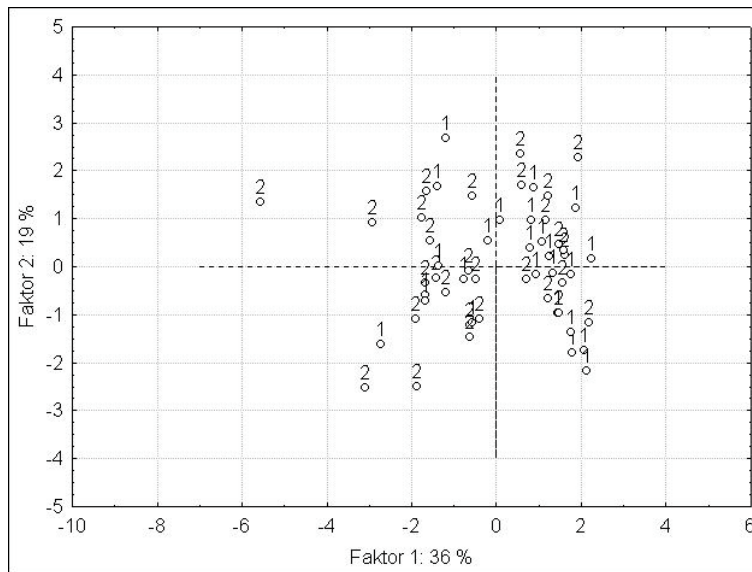
3.9.2 Torsk

Med en reduksjon til tre faktorer forklarte modellen 67 % av variasjonen i datasettet. Faktor 1 (horisontal akse) forklarte 36 % og faktor 2 (vertikal akse) forklarte 19 % av variasjonen.

Torsk grupperte seg etter lokaliteter langs faktor 1, med indre Oslofjord mot venstre og ytre Oslofjord mot høyre (Figur 3.25). Det ble ikke dannet noen sterke grupperinger av kjønn langs faktorene (Figur 3.26). Dette viser at variable som plasserer seg langs faktor 1 hovedsakelig kan skyldes lokalitetsforskjeller. Vektorer som peker mot venstre vil derfor ha en positiv korrelasjon til lokalitetene i indre Oslofjord, mens vektorer som peker mot høyre vil ha en positiv korrelasjon til ytre Oslofjord. Kjønn bidrar derimot ikke til variasjonen i variablene i datasettet.



Figur 3.25. PCA med presentasjon av torsk etter lokalitet. Torsk grupperte seg etter områdene i indre og ytre Oslofjord langs faktor 1 (horisontal akse). S=Solbergstrand, G=Gråøyrenna, SK=Steilene og Killingen.

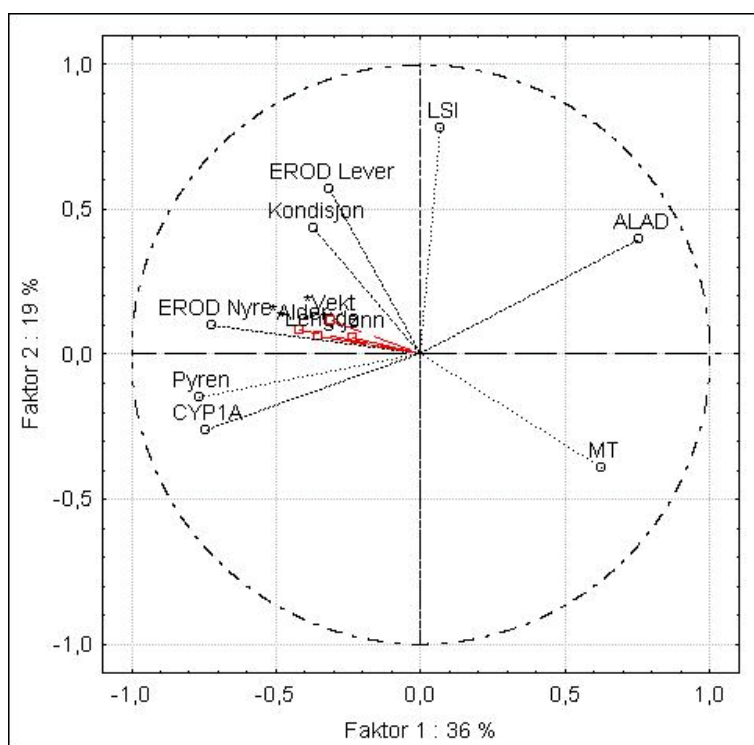


Figur 3.26. PCA med presentasjon av torsk etter kjønn. Ingen grupperinger oppstod etter kjønn. 1=hunnfisk, 2=hannfisk.

Av de avhengige variablene som ble analysert grupperte mengde CYP1A protein i lever, 1-hydroksypyren og EROD aktivitet i nyre seg sammen langs faktor 1 (Figur 3.27). Denne gruppen hadde de største prosentvise bidragene til faktor 1, og derfor en positiv korrelasjon til lokalitetene i indre Oslofjord (Tabell 3.17). Alder, lengde, vekt og kjønn så ut til å henge sammen med denne gruppen, men hadde kortere vektorer. Kondisjon grupperte seg med EROD aktivitet i lever, og begge disse variablene forklarte lite av variasjonen i faktor 1 (Tabell 3.17). Leversomatisk indeks forklarte lite av variasjonen i faktor 1, og derfor også lokalitet. Metallothionein og ALA-D skilte seg klart ut fra de andre gruppene av variable. De så ikke ut til å korrelere med hverandre, men begge hadde høye prosentvise bidrag til faktor 1 og korrelerte positivt til ytre Oslofjord (Tabell 3.17). Aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) så også ut til å korrelere negativt til gruppen mengde CYP1A protein, 1-hydroksypyren og EROD aktivitet i nyre. Metallothionein så ut til å korrelere negativt til gruppen EROD aktivitet i lever og kondisjon.

Tabell 3.17. Prosentvise bidrag av variablene til hver faktor i PCA. (Faktor 3 er ikke tatt med i den grafiske fremsillingen).

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
LSI	0,2	39,7	6,9
Kondisjon	4,8	12,4	46,4
MT	13,6	10,0	3,3
ALA-D aktivitet	19,9	10,3	5,6
Mengde CYP1A protein	19,4	4,4	4,8
EROD aktivitet i lever	3,5	21,2	21,4
EROD aktivitet i nyre	18,1	0,7	10,4
1-hydroksypyren	20,6	1,4	1,2



Figur 3.27. PCA av torsk (n=55). Alder, vekt, lengde og kjønn er tilleggsvARIABLE.

Det ble også utført en PCA for hvert kjønn (resultater ikke vist). En forskjell mellom kjønnene var grupperingen av mengde og aktivitet av CYP1A i lever og nyre og mengde 1-hydroksypyren i galle. Grupperingen av disse variablene for hanntorsk fremsto som for analysen av begge kjønn samlet, men EROD aktiviteten i nyre så ut til å ha en enda sterkere sammenheng med alder, lengde og vekt. For hunntorsk grupperte mengde CYP1A protein og EROD aktivitet i nyre seg langs faktor 1. I hanntorsk grupperte vitellogenin seg med EROD i lever og kondisjon, lite korrelert til lokaliteter.

4. Diskusjon

4.1 Biologiske parametere

De innsamlede skrubbene fra indre Oslofjord var større enn skrubbene fra ytre Oslofjord, men skrubbene fra ytre Oslofjord var eldre. Hos skrubbe er hannfisk mindre i størrelse enn hunnfisk av samme alder (Kleinkauf *et al.* 2004a), men fordelingen av hannskrubbe og hunnskrubbe mellom de to områdene var omtrent lik. Dette tyder derfor på at alders- og størrelsesforskjellen mellom områdene var et resultat av forskjeller i fiskenes vekst. Skrubbe fra indre Oslofjord har hatt en raskere vekst enn skrubbe fra ytre Oslofjord.

Forskjeller i vekst kan skyldes forskjeller i næringstilgang mellom områdene, men også forskjeller i fødevalg vil kunne virke inn på veksten (Tyler *et al.* 1976; Hebb *et al.* 2003). Det kan derfor tenkes at skrubbe fra indre Oslofjord har hatt bedre tilgang på føde, eller at føden har hatt en annen nærings sammensetning som har vært gunstig for veksten. En annen årsak til forskjeller i vekst kan være forskjeller i miljøgiftbelastning mellom områdene. Eksponering for miljøgifter kan hemme vekst i fisk, men dette er trolig meget artsspesifikt (Vignier *et al.* 1992; Weis *et al.* 1992; Johnson *et al.* 1998). Spormetaller som Pb, Cd eller Cu kan også hemme vekst i fisk (Lanno *et al.* 1985; Burden *et al.* 1998; Hansen *et al.* 2004), men motstridende resultater er funnet for de samme metallene (Farag *et al.* 1994; Hollis *et al.* 1999; Hollis *et al.* 2001).

Skrubbe fra indre Oslofjord hadde også høyere LSI enn skrubbe fra ytre Oslofjord. Dette kan skyldes forskjeller i næringstilgang eller komposisjonen av fettsyrer i føden mellom områdene. Føde med mye fettsyrer vil gi en høyere LSI (Ando *et al.* 1993; Fahraeus-Van Ree *et al.* 2003). Høyere LSI i skrubbe fra indre Oslofjord kan også skyldes en større belastning av miljøgifter. I noen undersøkelser har eksponering for miljøgifter ført til høyere LSI (Slooff *et al.* 1983; Baumann *et al.* 1991; Everaarts *et al.* 1993; Beyer *et al.* 1996), mens i andre har eksponeringen ikke hatt noen innvirkning (van der Oost *et al.* 1991) eller ført til lavere LSI (Örn *et al.* 1998; Aas *et al.* 2001). De fleste undersøkelser viser en positiv korrelasjon mellom LSI og konsentrasjonen av miljøgifter (van der Oost *et al.* 2003).

Dette viser at sammenhengen mellom næringsforhold, LSI, vekst og eksponering for miljøgifter er kompleks, og situasjonen forklares ikke av kun en faktor alene. Høyere vekst og høyere LSI i skrubbe fra indre Oslofjord tyder hovedsakelig på forskjeller i næringstilgang eller fødens nærings sammensetning, men også forskjeller i belastning av metaller eller miljøgifter kan ha ført til slike forskjeller i vekst og LSI.

Hunnskrubbe hadde høyere LSI enn hannskrubbe. Denne forskjellen i LSI mellom hunnskrubbe og hannskrubbe skyldtes trolig vitellogenese i hunnskrubbene. Østradiol, som setter i gang vitellogenese, fører også til en økning i LSI (Larsen *et al.* 1992; Åkerblom *et al.* 2000; Kleinkauf *et al.* 2004a). Det ble ikke målt vitellogenin i skrubbe, noe som eventuelt ville kunne gi en indikasjon på reprodusert status. Det er vist at skrubbe er under gyteforberedelser på høsten og at vitellogeninnivåene starter å øke allerede i september/oktober (Nissen-Lie 1997; Kleinkauf *et al.* 2004a). Dette tyder på at skrubbe hadde startet vitellogenese, noe som kan ha hatt en innvirkning på responsen i de andre biomarkørene.

Torsk fra indre Oslofjord var signifikant eldre og større enn torsk fra ytre Oslofjord. På grunn av denne sammenhengen mellom alder og størrelse, var det ikke mulig å finne eventuelle forskjeller fiskene kan ha hatt i vekst. Det fantes heller ingen signifikante forskjeller i LSI mellom lokaliteter eller kjønn for torsk. Dette tyder på at forskjellene i næringstilgang eller nærings sammensetning for torsk i denne undersøkelsen var små. Det tyder også på at eventuelle forskjeller i miljøgiftbelastning ikke har hatt noen innvirkning på LSI hos torsk.

Hunntorsk fra Gråøyrenna hadde høyere vitellogeninnivåer enn hanntorsk og hunntorsk fra de andre lokalitetene. Dette viser at hunntorsk fra Gråøyrenna hadde startet vitellogenese, men at nivåene av vitellogenin, og derfor også østradiol, i hunntorsken ikke hadde påvirket LSI. Torsk fra Gråøyrenna hadde høyere kondisjon enn torsk fra ytre Oslofjord. Årstidsvariasjonen i kondisjonsfaktor er lik for hunnfisk og hannfisk, noe som tyder på at den styres av faktorer felles for begge kjønn (Christensen 1996; Kleinkauf *et al.* 2004a). Denne forskjellen i fiskenes kondisjon var derfor trolig et resultat av forskjeller i næringstilgang.

4.2 Effekter av organiske miljøgifter

Fisk av begge arter fra indre Oslofjord hadde signifikant mer 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i gallen enn fisk fra ytre Oslofjord. Belastningen av PAH var derfor betydelig større for fisk i indre Oslofjord. Torsk var den arten som hadde størst forskjell mellom lokalitetene, og torsk fra indre Oslofjord hadde over tre ganger større mengde 1-hydroksypyren i gallen enn torsk fra ytre Oslofjord. Mengden av PAH metabolitter i gallen var lik for begge arter i indre Oslofjord, og forskjeller mellom lokalitetene i ytre Oslofjord hadde derfor mest å si for forskjellen i respons mellom artene.

Torsk fra Steilene/Killingen hadde en større andel 1-hydroksyfenantren i gallen enn fisk av begge arter fra de andre lokalitetene. 1-hydroksyfenantren er hovedmetabolitten av fenantrener som hovedsakelig er forbundet med forbrenning av fossilt brensel, særlig kull, olje og raffinerte produkter av disse (Solbakken *et al.* 1981; Aas *et al.* 2000b). 1-hydroksypyren er hovedmetabolitten av pyren som produseres ved mange pyrolytiske og petrogene industrielle prosesser (Ariese *et al.* 1993; Zhou *et al.* 1998; Aas *et al.* 2000b). Dette viser at sammensetningen av PAH i sjøvann er lik over store områder i indre og ytre Oslofjord, men ved lokaliteter midtfjords som Steilene, kan eksponering fra forbrenningsprosesser av PAH være mer dominerende. En årsak til dette kan være at fisk fra Steilene/Killingen utsettes for mer båttrafikk enn fisk ved de andre lokalitetene.

Aktiviteten til CYP1A i nyre og mengden CYP1A protein i lever var høyere i torsk fra indre Oslofjord enn i torsk fra ytre Oslofjord, og disse biomarkørene grupperte seg sammen med 1-hydroksypyren i PCA. Dette viser at mengden CYP1A protein i lever og EROD aktiviteten i nyre i torsk fra indre Oslofjord var påvirket av PAH. Det fantes derimot ingen signifikant forskjell mellom lokalitetene i EROD aktivitet i lever. Det var heller ingen korrelasjon mellom EROD aktivitet i lever og gruppen: EROD aktivitet i nyre, mengde CYP1A protein i lever og mengde 1-hydroksypyren i galle i PCA. Dette kan skyldes at EROD aktiviteten i lever i torsk fra indre Oslofjord var blitt hemmet. En slik hemming vil innebære en metabolisme eller en toksikodynamikk av disse hemmende stoffene i torsken som ikke involverer interaksjoner med nyrene eller påvirker mengden CYP1A protein.

Organotinnforbindelser er stoffer som hemmer EROD aktiviteten i større grad enn mengden CYP1A protein, noe som trolig skyldes en kompetitiv hemming av enzymaktiviteten til CYP1A (Fent *et al.* 1993; Bruschweiler *et al.* 1996; Fent *et al.* 1998; Morcillo *et al.* 2004).

Organotinnforbindelser har også vist seg å akkumulere hovedsakelig i lever og galle (Martin *et al.* 1989; Arnold *et al.* 1997). Spredningen av organotinnforbindelser i marint miljø kommer særlig fra bunnstoff på båter over 25 m (TBT⁴) og fra industrien (TPhT⁵), og belastningen av organotinnforbindelser i både fisk og blåskjell i indre Oslofjord har vært større enn i ytre Oslofjord (Berge *et al.* 1996; Knutzen *et al.* 2000; Green *et al.* 2004). Organotinnforbindelser kan derfor være en årsak til hemming av EROD aktivitet i torsk fra indre Oslofjord.

Andre potensielle hemmere av EROD aktiviteten i torsk fra indre Oslofjord kan være spormetaller og/eller høye miljøgiftkonsentrasjoner. Spormetaller som Cd, Cu, Fe og Hg kan hemme EROD aktiviteten og mengden CYP1A protein i fisk (George 1989; Goksøyr *et al.* 1994; Beyer *et al.* 1997; Stien *et al.* 1997; Viarengo *et al.* 1997; Risso-de Faverney *et al.* 1999). Det finnes derimot store forskjeller mellom arter i sensitiviteten for metallpåvirkning av CYP systemet (Lemaire-Gony *et al.* 1992; Lemaire-Gony *et al.* 1995; Beyer *et al.* 1997). En samtidig eksponering for metaller og organiske miljøgifter kan føre til at EROD aktiviteten hemmes av metaller, men også at MT hemmes av organiske miljøgifter (Sandvik *et al.* 1997). I PCA så det ut til å finnes en negativ korrelasjon mellom MT og EROD aktivitet i lever, noe som kan tyde på en interaksjon mellom disse stoffene på biomarkørene. Derfor kan en hemming av EROD aktiviteten i lever hos torsk fra indre Oslofjord også skyldes spormetaller som Cd, Cu, Fe eller Hg.

Torsk fra indre Oslofjord kan tenkes å ha blitt eksponert for høye nivåer av miljøgifter som har hemmet EROD aktiviteten. Ah-reseptor agonister kan hemme EROD aktivitet i induserte leverceller *in vitro*, og høye nivåer av PCB kan hemme EROD aktivitet også *in vivo* (Stegeman *et al.* 1994; Besselink *et al.* 1998; Schlezinger *et al.* 1999; Schlezinger *et al.* 2001; Gravato *et al.* 2002). Et av de mest belastende stoffene i indre Oslofjord er PCB, og nivåer av ΣPCB_7 på opptil 4,8 mg/kg våtvekt har blitt målt i torskelever (Konieczny 1994; Knutzen *et al.* 2000). I motsetning til torsk, fantes det forskjeller i EROD aktivitet i skrubbelever mellom indre og ytre Oslofjord. Likevel var EROD aktiviteten i lever hos skrubbe fra indre Oslofjord lavere enn hos torsk. Denne artsforskjellen i respons og/eller hemming av EROD aktivitet kan skyldes forskjeller i atferd og leveområde som gjør eksponeringen for miljøgifter ulik. Det

⁴ Tributyltinn

⁵ Trifenyltinn

kan også skyldes artsforskjeller i respons på organiske miljøgifter. Dette kan derfor også være en mekanisme for hemming av EROD aktivitet i lever i torsk fra indre Oslofjord.

Fisk som lever i et forurenset miljø kan over generasjoner utvikle høyere toleranse overfor miljøgifter. Denne toleransen er nedarvet og kan skyldes mutasjoner i Ah reseptoren som senker følsomheten overfor binding av ligander (Nacci *et al.* 1999; Nacci *et al.* 2002; Hahn *et al.* 2004). Responsen i mengde og aktivitet av CYP1A i fisk som lever i et forurenset miljø vil derfor kunne være svakere enn i fisk som lever i et miljø med mindre belastning av miljøgifter. Slik nedarvet adaptasjon har hittils kun blitt undersøkt i killifisk (*Fundulus heteroclitus*) (Hahn *et al.* 2004). Det kan tenkes torsk fra indre Oslofjord har utviklet en slik nedarvet resistens, ettersom det er vist at torsk fra indre Oslofjord danner en egen genetisk stamme (Knutsen *et al.* 2003). Dette kan være en forklaring på manglende forskjeller i EROD aktivitet mellom ytre og indre Oslofjord.

Hos skrubbe fantes det kjønnsforskjeller i EROD aktivitet i lever. Hannskrubbe hadde over dobbelt så høy EROD aktivitet i lever som hunnskrubbe. Mengden CYP1A protein var ikke signifikant forskjellig mellom kjønn, men i PCA fantes det en positiv korrelasjon mellom LSI, EROD aktivitet i lever og mengde CYP1A protein i hannskrubbe. Dette fantes derimot ikke i hunnskrubbe. Kjønnsforskjeller i mengde og aktivitet av CYP1A har også blitt funnet i andre undersøkelser av skrubbe i ytre Oslofjord (Christensen 1996; Hylland *et al.* 1998b; Gaarder 1999). I undersøkelsen av Hylland *et al.* (1998b) korrelerte derimot LSI og EROD aktivitet kun i hunnskrubbe. For kjønnsmoden fisk virker kjønn og årstid inn på mengden CYP1A protein, aktiviteten av CYP1A og LSI (Förlin *et al.* 1990; George *et al.* 1990; Lindström-Seppä *et al.* 1995; Hylland *et al.* 1998b). Dette skyldes særlig kjønnshormonet østradiol. Økte plasmanivåer av østradiol og østrogenliknende stoffer i fisk reduserer både mengden protein og enzymaktiviteten i CYP1A systemet (Förlin *et al.* 1982; George *et al.* 1990; Gray *et al.* 1991; Stegeman *et al.* 1994; Lindström-Seppä *et al.* 1995; Eggens *et al.* 1996; Arukwe *et al.* 1997; Navas *et al.* 2000; Solé *et al.* 2000). Virkningen av andre kjønnshormoner på CYP1A systemet, som testosteron, har gitt motstridende resultater og ser ikke ut til å være direkte involvert i reguleringen av CYP1A (Andersson *et al.* 1992). Det er også ennå usikkert hvordan østradiol hemmer CYP1A, men man antar at "cross-talk" mellom østrogen- og Ah-reseptoren kan føre til denne hemmingen (Williams *et al.* 1998; Navas *et al.* 2001; Elskus 2004). En interaksjon mellom østrogen- og Ah-reseptoren har blitt vist i kreftceller i mennesker og i leverceller i fisk (Angus *et al.* 1999; Michallet-Ferrier *et al.*

2004; Pearce *et al.* 2004). Responsen i CYP1A systemet vil også kunne reduseres som en følge av en høy LSI, og hunnskrubbe hadde høyere LSI enn hannskrubbe. Dette kan føre med seg en større kapasitet for lagring av fettløselige miljøgifter. Bindingen av lipofile forurensninger i lipider, kan føre til at de holdes utenfor interaksjoner med reseptorer og enzymer i hepatocytene (Geyer *et al.* 1993; Ruus *et al.* 2001). Når fettreserver senere forbrukes fra leveren, kan også lagrede lipofile miljøgifter frigis og føre til en induksjon av CYP1A (Jørgensen *et al.* 2002). Som en følge av effekten av østradiol, uavhengig av mekanismen, har kjønnsmoden hunnfisk generelt mindre CYP1A protein og lavere EROD aktivitet enn hannfisk.

I PCA for skrubbe grupperte EROD aktivitet i nyre seg med 1-hydroksypyren, og ingen av disse biomarkørene viste noen signifikante kjønnsforskjeller. Kjønnsavhengige faktorer, hovedsakelig østrogen, kan også påvirke EROD aktiviteten i nyre, men nyrene er mindre sensitive for denne påvirkningen enn leveren (Lindström-Seppä *et al.* 1995). I tillegg vil effekter av "crosstalk" mellom østrogen- og Ah-reseptoren være svakere i nyrene, ettersom disse har færre østrogenreseptorer enn leveren (Socorro *et al.* 2000; Pearce *et al.* 2004). Dette stemmer overens med resultatene for skrubbe i denne undersøkelsen. Dette viser at biomarkørene for effekter av organiske miljøgifter i skrubbe har vært påvirket av PAH, men påvirkning av østradiol kan ha skapt forskjeller mellom kjønnene i responsen av EROD aktivitet i leveren.

I denne undersøkelsen hadde torsk en kraftigere respons i biomarkørene for organiske miljøgifter enn skrubbe. Torsk og skrubbe fra indre Oslofjord hadde henholdsvis opptil 16 og 3 ganger høyere EROD aktivitet i nyre sammenliknet med torsk og skrubbe fra ytre Oslofjord. En slik artsforskjell for induksjon av CYP1A i nyre har også blitt funnet i andre undersøkelser (Husøy *et al.* 1996). Torsk hadde også opptil 4 ganger høyere mengde CYP1A protein i lever, mens skrubbe hadde dobbelt så mye. Det kan derimot være vanskelig å evaluere artsforskjellene ettersom torsk fra ytre Oslofjord ikke ble viltfanget, og derfor ikke representerer en populasjon utsatt for naturlig eksponering for miljøgifter. De hadde for eksempel blitt eksponert for lavere nivåer av PAH enn skrubbe fra ytre Oslofjord. Skrubbe har blitt foreslått å være en mer responsiv art enn torsk (Beyer *et al.* 1996; Gaarder 1999), noe som er motsatt av resultatene i denne undersøkelsen. Skrubbe fra indre Oslofjord, som hadde høyere LSI, kan ha hatt større kapasitet enn skrubbe fra ytre Oslofjord til å bioakkumulere fettløselige miljøgifter i leveren. Dette vil kunne minske forskjellen i mengden CYP1A

protein og EROD aktivitet mellom lokalitetene ved å senke responsen i fisk fra indre Oslofjord. Lokalitetsforskjeller i LSI fantes ikke for torsk, og denne mekanismen kan derfor være med på å forklare forskjellen i respons i CYP1A mellom artene.

Forskjellen i alder mellom lokalitetene kan ha ført til forskjeller i akkumulerte miljøgifter i fiskene, og derfor også til artsforskjeller i responsen i biomarkørene. Torsk fra indre Oslofjord var eldre enn torsk fra ytre Oslofjord og kan derfor ha akkumulert høyere konsentrasjoner av miljøgifter som PCB, dioksiner eller metaller som Cd eller Hg. For skrubbe var det motsatt, da skrubbe fra ytre Oslofjord var eldre enn skrubbe fra indre Oslofjord. I PCA var alder positivt korrelert til CYP1A i torsk, men negativt korrelert i skrubbe. Noen PCB og dioksin kongenerer kan bioakkumulere i fisk (Malins *et al.* 1985; van den Berg *et al.* 1994; Andersson *et al.* 2001), og fisk med høy alder kan derfor ha høyere CYP1A aktivitet enn fisk med lav alder fanget på samme sted (Sleiderink *et al.* 1995b). Fiskenes alder virker derimot lite inn på opptaket og akkumuleringen av PAHer ettersom de metaboliseres raskt, men noen PAHer kan bioakkumulere i muskelvev i fisk (Malins *et al.* 1985; Jimenez *et al.* 1987; van der Oost *et al.* 1991; Hellou *et al.* 1994). En slik akkumulering av miljøgifter over tid kan ha ført til en økning i responsen i torsk fra indre Oslofjord og i skrubbe fra ytre Oslofjord, og dermed også øke forskjellen i respons mellom artene.

Temperatur er en faktor som kan påvirke både mengde og aktivitet av CYP1A (Stegeman *et al.* 1994). Det finnes forskjellige resultater for sammenhengen mellom temperatur og mengde og aktivitet av CYP1A. Kuldeakklimering kan senke mengden og aktiviteten av CYP1A protein i killifisk, men ikke mengden CYP1A mRNA (Klopper-Sams *et al.* 1992).

Vanntemperatur og EROD aktivitet ser derimot ut til å være negativt korrelert i flere flatfisk, og mengden CYP1A protein påvirkes ikke like mye som EROD aktiviteten (Stegeman 1979; Sleiderink *et al.* 1995a; Christensen 1996). Det stilles også spørsmål til om vanntemperaturen virkelig påvirker disse systemene direkte, eller om den påvirker CYP1A systemet indirekte gjennom reproduksjonssyklusen (Christensen 1996; Lange *et al.* 1998). Forskjellen i vanntemperatur i denne undersøkelsen var under 2 °C, noe som er lite sammenliknet med forskjeller i disse andre forsøkene og undersøkelsene, der man ikke registrerte signifikante effekter ved temperaturforskjeller < 8 °C.

Pyretroider og klororganiske stoffer som insektmidlene endosulfan og deltametrin og trepreserveringsmiddelet pentaklorofenol (PCP) kan gi signifikante økninger i EROD aktivitet

i fisk (Jensen *et al.* 1991; Deer *et al.* 1996; Savelli *et al.* 1997). I Norge er bruken av disse midlene lite utbredt (Ludvigsen *et al.* 2002), og har derfor trolig liten innvirkning på måling av responser i CYP1A. I områder med høy jordbruksaktivitet bør derimot dette evalueres som en mulig grunn eller interferens i undersøkelser av EROD aktivitet (Vindimian *et al.* 1993).

Et protein i post-mikrosomal fraksjon isolert fra brasme og regnbueørret kalt CERODIP⁶ har vist seg å kunne hemme EROD aktivitet (Achazi *et al.* 1994; Neunaber *et al.* 1999). Dette proteinet, som er varme-, syre- og etanolsensitivt, har en molekylvekt på 185 kDa. Om proteinet finnes i torsk og skrubbe vites ikke. Dette proteinet vil eventuelt være til stede i S9 fraksjonen som ble benyttet under EROD analysene i denne undersøkelsen, og hvordan dette proteinet påvirkes ved eksponering for forurensing eller ved forskjeller i temperatur eller kjønn er ikke kjent. Det kan derfor ikke utelukkes som en kilde til feilmålinger i EROD aktivitet (Whyte *et al.* 2000).

⁶ Cytosolic EROD-inhibiting protein

4.3 Effekter av metaller

Nivåene av metallotionein var i begge arter preget av større forskjeller mellom lokalitetene i hunnfisk enn i hannfisk. Hunnfisk av begge arter fra ytre Oslofjord hadde høyere MT nivå enn hunnfisk fra indre Oslofjord. Eneste unntak var hunntorsk fra Gråøyrenna som hadde samme MT nivå som hunntorsk fra Solbergstrand. Det var ingen signifikante forskjeller mellom henholdsvis hannfisk av torsk eller hannfisk av skrubbe fra de forskjellige lokalitetene.

Hunntorsk fra Gråøyrenna var i vitellogenese (se ovenfor). Mengden av MT i lever og nyrer påvirkes begge av østradiol, men MT i nyrene er vanligvis mindre sensitivt enn MT i leveren (Olsson 1996; Gerpe *et al.* 2000; Werner *et al.* 2003). Østradiol påvirker MT trolig gjennom spormetallmetabolismen i forbindelse med vitellogeninsyntesen. Zn^{2+} kreves ved vitellogeninsyntese og lagres i kroppsvev i hunnfisk før oppbyggingen av gonader (Fletcher *et al.* 1978; Shears *et al.* 1983). Zn^{2+} er da bundet opp i forbindelser med høy molekylvekt (> 40 kDa) (Hylland *et al.* 1994), men frigis fra disse i forbindelse med vitellogenese (Olsson *et al.* 1989). Frigivelsen av Zn^{2+} fører til en økning av MT nivået, som tenkes å ha en beskyttende effekt mot eventuelle toksiske effekter av fritt Zn^{2+} (Shears *et al.* 1985; Olsson *et al.* 1987; Overnell *et al.* 1987; Olsson *et al.* 1995). Hunnfisk inkorporerer også større mengder essensielle metaller som Zn^{2+} , Cu^{2+} og Ca^{2+} i rognen enn hannfisk gjør i melken, noe som fører til at kjønnsmoden hunnfisk har et høyere årlig opptak av disse metallene i forhold til hannfisk (Fletcher *et al.* 1978). I pattedyr fører østradiol til induksjon av MT i nyrer enten ved økt opptak av sirkulerende spormetaller eller som en direkte effekt av østradiol (Nishiyama *et al.* 1987; Blazka *et al.* 1991). Forskjellen i MT nivå i nyrer mellom hunntorsk fra lokalitetene i indre Oslofjord kan derfor ha vært en følge av vitellogenese i hunntorsk fra Gråøyrenna.

For hunnskrubbe kan derimot ikke forskjellen i MT nivå mellom områdene forklare av vitellogenese alene. Som tidligere nevnt var hunnskrubbe fra begge lokaliteter kjønnsmodne og trolig under oppbygging av gonader, og det fantes heller ingen slike interaksjonsforskjeller mellom kjønn og område for noen av de andre biomarkørene i skrubbe. Det er derfor usikkert hvorfor forskjellen i MT var større i hunnskrubbe enn i hannskrubbe.

For torsk så det ut til å finnes kun en svak trend i metallotioneinnivået. Torsk fra ytre Oslofjord hadde høyere medianverdier enn torsk fra indre Oslofjord. Unntaket var hunntorsk fra Gråøyrenna, men tatt i betraktning at MT nivået i hunntorsk herfra kan ha vært induert av østradiol, stemmer dette overens med observasjoner gjort i andre undersøkelser (Green *et al.* 2004). Torsk og skrubbe fra ytre Oslofjord har tidligere også hatt høyere metallnivåer av henholdsvis Cd og Cu enn torsk og skrubbe fra indre Oslofjord (Gaarder 1999). Fisk fra ytre Oslofjord kan derfor ha vært eksponert for høyere konsentrasjoner av spormetaller enn fisk fra indre Oslofjord, og som følge av dette fått ett høyere metallotioneinnivå.

Induksjonen av MT kan også påvirkes av forskjeller i fiskenes alder. Eldre fisk kan akkumulere mer Cd og Hg på grunn av den lange halveringstiden for disse metallene (Boudou *et al.* 1985; Riisgard *et al.* 1990; Hylland *et al.* 1992; Hollis *et al.* 2001). Torsk fra indre Oslofjord var eldre enn torsk fra ytre Oslofjord og kan ha akkumulert en større mengde Cd eller Hg. Derimot kan samtidig eksponering for organiske miljøgifter ha ført til en senking av MT nivået i fisk fra indre Oslofjord. Fisk fra områder med høyt innhold av metaller og organiske miljøgifter i sedimenter har ikke nødvendigvis noen akkumulering av metaller eller induksjon av MT (Hylland *et al.* 1992; Beyer *et al.* 1996). Ved injeksjon av PCB-156 eller benzo[a]pyren i fisk kan også induksjonen av MT hemmes (Hylland *et al.* 1996b; Sandvik *et al.* 1997). Dette tyder på at eksponering for organiske miljøgifter kan føre til en reduksjon i akkumuleringen av metaller. Biomarkørene for organiske miljøgifter viste at fisk fra indre Oslofjord hadde vært eksponert for høyere nivåer av disse miljøgiftene enn fisk fra ytre Oslofjord (se ovenfor). Opptaket eller distribusjonen av spormetaller i fisk fra indre Oslofjord kan derfor ha vært lavere på grunn av eksponering for PAH eller PCB, og dermed gitt en lavere respons i MT.

Metallotionein korrelerer negativt til vanntemperatur i flere fiskearter, men forskjellene som kreves i vanntemperatur for å registrere en signifikant forskjell i MT er relativt store (5-10 °C) (Olsson *et al.* 1996; Rotchell *et al.* 2001). Forskjellen i temperatur i denne undersøkelsen var under 2 °C mellom stasjonene, og forklarer derfor lite av variasjonen i MT.

Aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktiviteten i skrubbe fra indre Oslofjord var signifikant lavere enn i skrubbe fra ytre Oslofjord. Det fantes ingen kjønnsavhengige forskjeller for skrubbe. Hos torsk fantes det interaksjoner mellom kjønn og lokalitet. Hanntorsk fra Solbergstrand hadde signifikant høyere ALA-D aktivitet enn hanntorsk fra

begge lokaliteter i indre Oslofjord. Det fantes ingen signifikante forskjeller mellom lokalitetene for hunntorsk, selv om hunnfisk fra indre Oslofjord hadde lavere medianverdier enn hunntorsk fra ytre Oslofjord. Trenden for begge kjønn var derfor lavere ALA-D aktivitet i fisk fra indre Oslofjord.

Denne forskjellen i respons mellom kjønnene er ulikt resultatene i andre undersøkelser av ALA-D aktivitet, der hverken kjønn eller årstid har hatt noen innvirkning (Green *et al.* 2004). Forskjellen i respons mellom kjønnene kan skyldes forskjeller i opptaket, distribusjonen eller metabolismen av Zn^{2+} . Zn^{2+} er en kofaktor i ALA-D i pattedyr, men om Zn^{2+} kreves av ALA-D i fisk er usikkert (Tsukamoto *et al.* 1979; Hutton 1983; Conner *et al.* 1994). Derimot har tilgang på Zn^{2+} en beskyttende effekt mot hemming av ALA-D i fisk, ettersom hemmet ALA-D kan reaktiveres ved å tilføre Zn^{2+} (Schmitt *et al.* 1993; Schmitt *et al.* 2002). Det kan derfor tenkes at kjønnsforskjellen i ALA-D aktivitet skyldtes effekter av østradiol på Zn^{2+} metabolismen i hunntorsk.

Skrubbe og hanntorsk fra indre Oslofjord hadde signifikant lavere ALA-D aktivitet enn skrubbe og hanntorsk fra ytre Oslofjord. Dette er et tydelig tegn på Pb eksponering av fisk fra indre fjord. I denne undersøkelsen var ALA-D aktiviteten i hanntorsk og skrubbe fra indre Oslofjord på henholdsvis 39-45% og 59% av ALA-D aktiviteten i henholdsvis hanntorsk og skrubbe fra ytre Oslofjord. Dette er en større forskjell enn det som har blitt funnet i andre undersøkelser, der ALA-D aktiviteten i fisk fra indre Oslofjord har ligget på ~65 % av ALA-D aktiviteten i fisk fra ytre Oslofjord (Green *et al.* 2004).

4.4 Effekter av østrogenliknende stoffer

Mengden av vitellogenin i blodplasma fra hanntorsk var ikke signifikant forskjellig mellom noen av lokalitetene. Det fantes derfor ingen effekter av østrogenliknende stoffer på hanntorsk i denne undersøkelsen.

I norske kystfarvann er det kun utført noen få undersøkelser av effekter av østrogenliknende stoffer i fisk. Torsk fra områder på Østlandskysten har tidligere vist tegn på effekter av østrogenliknende stoffer, men vitellogeninnivåene i fiskene har vært svært lave og forskjellene mellom de undersøkte områdene har vært meget små sammenliknet med resultater fra undersøkelser i England (Hylland *et al.* 1998a). Torsk fra Grenlandsfjordene har hatt de høyeste nivåene av vitellogenin i disse undersøkelsene. Både burforsøk og innfanging av villfisk har da blitt utført. Etter eksponering for avløp fra renseanlegg i Norge har det blitt observert en økning av vitellogenin i juvenil torsk (Hylland *et al.* 1996a).

I engelske estuarier og elver finnes det sterke effekter av østrogenliknende stoffer på fisk, noe som skyldes naturlige og syntetiske antropogene steroidhormoner i avløpsvann (Sumpter 1995; Desbrow *et al.* 1998; Routledge *et al.* 1998; Kirby *et al.* 2004; Kleinkauf *et al.* 2004b). 17 α -etinylostradiol (EE₂), som brukes i p-piller, brytes dårlig ned i kloakkrenseanlegg og østrogene effekter som observeres i fisk eksponert for avløpsvann kan derfor skyldes dette syntetiske østrogenliknende stoffet (Larsson *et al.* 1999). Avhengig av strukturen kan PCB virke østrogen eller anti-østrogen i fisk (Andersson *et al.* 1999; Arukwe *et al.* 2000). PAH og Cd kan også virke anti-østrogen i fisk. Cd virker inn på metabolismen av Ca²⁺, noe som igjen påvirker vitellogenese og reproduksjonen (Haux *et al.* 1988; Pratap *et al.* 1989; Casillas *et al.* 1991). Sensitiviteten og effekten av PAH kan være veldig variabel mellom arter, populasjoner og individer, men generelt har PAH eksponert fisk lavere østrogennivåer i blod (Johnson *et al.* 1988; Stein *et al.* 1991; Nicolas 1999). Det finnes i tillegg større artsforskjeller i vitellogeninresponsen i marine fisk enn i ferskvannsfisk (Hylland *et al.* 1996a). For eksempel skrubbe fanget i områder i Nederland sterkt påvirket av antropogen aktivitet har ikke vist effekter av østrogenliknende stoffer (Vethaak *et al.* 2002).

Torsk ser derimot ut til å kunne være en egnet art for biomarkøranalyser på effekter av østrogenliknende stoffer. Andre faktorer som kan virke inn på vitellogeninresponsen er

vanntemperaturen eller fiskenes størrelse (Mackay *et al.* 1993). Det har også blitt foreslått at hannfisk kan være mindre sensitive for påvirkning av østrogenliknende stoffer enn hunnfisk (Janssen *et al.* 1997), men ingen av disse faktorene ser ut til å ha noen stor betydning for vitellogeninresponsen i ungfisk av torsk (Hylland *et al.* 1998a).

5. Konklusjon

Fisk fra indre Oslofjord hadde høyere nivå av PAH metabolitter i gallen og sterkere biologiske effekter av organiske miljøgifter enn fisk fra ytre Oslofjord. Det så ut til at EROD aktivitet i nyre hos torsk ga bedre respons enn EROD aktivitet i nyre hos skrubbe.

Gytedorberedelser kan ha senket responsen i EROD aktivitet i leveren i hunnskrubbe, og i torsk fra indre Oslofjord var EROD aktiviteten i lever trolig hemmet. Denne hemmingen kunne skyldes effekter av metaller eller høye nivåer av organiske miljøgifter som PCB. Hemmingen av EROD aktiviteten i torsk fra indre Oslofjord kunne også skyldes lavere sensitivitet for eksponering av organiske miljøgifter. Det kan derfor være interessant å undersøke om torsk fra indre Oslofjord har slike nedarvede egenskaper overfor eksponering for organiske miljøgifter.

Hunnfisk hadde større variasjon i metallotoneinnivå mellom lokalitetene enn hannfisk. Forskjellen i metallotonein mellom lokalitetene kunne tyde på at fisk fra ytre Oslofjord hadde en høyere metallbelastning eller at organiske miljøgifter hemmet responsen i MT i fisk fra indre Oslofjord. Denne effekten av organiske miljøgifter på MT er undersøkt i skrubbe, men mindre kjent i torsk. Derfor kan det være nyttig å undersøke denne effekten også i torsk.

Skrubbe og hanntorsk fra indre Oslofjord hadde tydelig hemmet ALA-D aktivitet, noe som er en effekt av blyeksponering. Skrubbe så ut til å være en mer egnet art for undersøkelser av ALA-D aktivitet enn torsk, ettersom det ble funnet kjønnsforskjeller i ALA-D aktivitet hos torsk. Hanntorsk så ut til å være mer responsiv enn hunntorsk. Resultatene i denne undersøkelsen tyder på at ALA-D aktiviteten i torsk påvirkes av kjønn, noe som bør undersøkes nærmere.

Det fantes ingen tegn på effekter av østrogenliknende stoffer i torsk fra noen av lokalitetene. Belastningen av østrogenliknende stoffer på fisk i Oslofjorden ser derfor ut til å være liten.

Totalt viste fisk fra indre Oslofjord tydelige tegn på en større miljøgiftbelastning enn fisk fra ytre Oslofjord. De hadde sterkere effekter av både organiske miljøgifter og av bly. Det fantes derimot ikke store forskjeller i effekter av spormetaller eller av østrogenliknende stoffer.

6. Referanser

Achazi, R.K., Chroszcz, G., Heimig, E., Neunaber, R. og Steudel, I. (1994). A high-molecular regulator of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **108**(2): 243-256.

Addison, R.F., Ackman, R.G. og Hingley, J. (1968). Distribution of fatty acids in cod flesh lipids. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **25**(10): 2083-2090.

Andersson, P.L., Berg, A.H., Bjerselius, R., Norrgren, L., Olsén, H., Olsson, P.-E., Örn, S. og Tysklind, M. (2001). Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback, and Arctic char after three different routes of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**(4): 519-530.

Andersson, P.L., Blom, A., Johannisson, A., Pesonen, M., Tysklind, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E. og Norrgren, L. (1999). Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: In vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(2): 145-150.

Andersson, T. og Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome-P450 enzyme-system in fish. *Aquatic Toxicology* **24**(1-2): 1-19.

Ando, S., Mori, Y., Nakamura, K. og Sugawara, A. (1993). Characteristics of lipid-accumulation types in 5 species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**(9): 1559-1564.

Angus, W.G.R., Larsen, M.C. og Jefcoate, C.R. (1999). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* **20**(6): 947-955.

Ariese, F., Kok, S.J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N.H. og Hofstraat, J.W. (1993). Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): 273-286.

Arnold, C.G., Weidenhaupt, A., David, M.M., Müller, S.R., Haderlein, S.B. og Schwarzenbach, R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: Effect of pH and ion composition. *Environmental Science & Technology* **31**(9): 2596-2602.

Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T. og Goksøyr, A. (2000). Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* **49**(3): 159-170.

Arukwe, A. og Goksøyr, A. (1997). Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus* L). *Journal of Experimental Zoology* **277**(4): 313-325.

- Baumann, P.C., Mac, M.J., Smith, S.B. og Harshbarger, J.C. (1991). Tumor frequencies in walleye (*Stizostedion vitreum*) and brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) and sediment contaminants in tributaries of the Laurentian Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**(9): 1804-1810.
- Berge, J.A., Brevik, E.M., Godal, A. og Berglind, L. (1996). Overvåking av Hvaler - Singlefjorden og munningen av Iddefjorden 1990 - 1994. Miljøgifter i organismer. NIVA, Oslo. Rapport 651/96, Løpenr 3443: 146 sider.
- Besselink, H.T., Denison, M.S., Hahn, M.E., Karchner, S.I., Vethaak, A.D., Koeman, J.H. og Brouwer, A. (1998). Low inducibility of CYP1A activity by polychlorinated biphenyls (PCBs) in flounder (*Platichthys flesus*): Characterization of the Ah receptor and the role of CYP1A inhibition. *Toxicological Sciences* **43**(2): 161-171.
- 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 Sørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): 75-98.
- Beyer, J., Sandvik, M., Skåre, J.U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbø, R. og Goksøyr, A. (1997). Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers* **2**(1): 35-44.
- Blazka, M.E. og Shaikh, Z.A. (1991). Sex-differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction: Role of estradiol. *Biochemical Pharmacology* **41**(5): 775-780.
- Bolger, T. og Connolly, P.L. (1989). The selection of suitable indexes for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology* **34**(2): 171-182.
- Boudou, A. og Ribeyre, F. (1985). Experimental study of trophic contamination of *Salmo gairdneri* by 2 mercury compounds - HgCl₂ and CH₃HgCl - Analysis at the organism and organ levels. *Water Air and Soil Pollution* **26**(2): 137-148.
- Brumley, C.M., Haritos, V.S., Ahokas, J.T. og Holdway, D.A. (1998). The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: Implications for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **39**(2): 147-153.
- Bruschweiler, B.J., Wurgler, F.E. og Fent, K. (1996). Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**(4): 475-482.
- Burden, V.M., Sandheinrich, M.B. og Caldwell, C.A. (1998). Effects of lead on the growth and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution* **101**(2): 285-289.

- 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**(6): 583-588.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., Rhodes, L.D., Collier, T.K., Stein, J.E., McCain, B.B. og Varanasi, U. (1991). Inducibility of spawning and reproductive success of female english sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of Puget Sound, Washington. *Marine Environmental Research* **31**(2): 99-122.
- Castaño, A., Carbonell, G., Carballo, M., Fernandez, C., Boleas, S. og Tarazona, J.V. (1998). Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **41**(1): 29-35.
- Christensen, P.G. (1996). Årstidsvariasjon i enzymsystemet cytokrom P4501A i skrubbe (*Platichthys flesus*) fra Hvalerområdet. *Avdeling for Marin Zoologi og Marin Kjemi*. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo.
- Collier, T.K. og Varanasi, U. (1991). Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in english sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **20**(4): 462-473.
- Conner, E.A. og Fowler, B.A. (1994). Biochemical and immunological properties of hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquatic Toxicology* **28**(1-2): 37-52.
- Cowles, M. og Davis, C. (1982). On the origins of the .05 level of statistical significance. *American Psychologist* **37**(5): 553-558.
- Craft, J.A., Brown, M., Dempsey, K., Francey, J., Kirby, M.F., Scott, A.P., Katsiadaki, I., Robinson, C.D., Davies, I.M., Bradac, P. og Moffat, C.F. (2004). Kinetics of vitellogenin protein and mRNA induction and depuration in fish following laboratory and environmental exposure to oestrogens. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 419-423.
- Deer, K.A., Banka, L., Nemcsok, J. og Abraham, M. (1996). Effects of deltamethrin on hepatic microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in carp. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **31**(3): 637-644.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. og Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
- Dey, A.C., Kiceniuk, J.W., Williams, U.P., Khan, R.A. og Payne, J.F. (1983). Long-term exposure of marine fish to crude petroleum. 1. Studies on liver lipids and fatty-acids in cod (*Gadus morhua*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **75**(1): 93-101.

- Dignam, J.D. (1990). Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods in Enzymology* **182**: 194-203.
- Dossantos, J., Burkow, I.C. og Jobling, M. (1993). Patterns of growth and lipid deposition in cod (*Gadus morhua* L) fed natural prey and fish-based feeds. *Aquaculture* **110**(2): 173-189.
- 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.
- 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**(8): 1579-1596.
- Elskus, A.A. (2004). Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 463-467.
- Emmersen, B.K. og Petersen, I.M. (1976). Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17-beta, of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **54**(4): 443-446.
- Everaarts, J.M., Shugart, L.R., Gustin, M.K., Hawkins, W.E. og Walker, W.W. (1993). Biological markers in fish - DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. *Marine Environmental Research* **35**(1-2): 101-107.
- Fahraeus-Van Ree, G.E. og Spurrell, D.R. (2003). Structure of and energy reserves in the liver of wild and cultured yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*. *Marine Biology* **143**(2): 257-265.
- Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F. og Bergman, H.L. (1994). Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(12): 2021-2029.
- Fent, K. og Stegeman, J.J. (1993). Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome-P450 forms in marine fish. *Aquatic Toxicology* **24**(3-4): 219-240.
- Fent, K., Woodin, B.R. og Stegeman, J.J. (1998). Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **121**(1-3): 277-288.
- Fletcher, G.L. og King, M.J. (1978). Seasonal dynamics of Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ in gonads and liver of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) - Evidence for summer storage of Zn²⁺ for winter gonad development in females. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **56**(2): 284-290.
- Förlin, L. og Hansson, T. (1982). Effects of oestradiol-17-beta and hypophysectomy on hepatic mixed-function oxidases in rainbow trout. *Journal of Endocrinology* **95**(2): 245-252.

- Förlin, L. og Haux, C. (1990). Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *Journal of Endocrinology* **124**(2): 207-213.
- George, S., Young, P., Leaver, M. og Clarke, D. (1990). Activities of pollutant metabolizing and detoxication systems in the liver of the plaice, *Pleuronectes platessa* - Sex and seasonal variations in noninduced fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **96**(1): 185-192.
- George, S.G. (1989). Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems - dose-response. *Aquatic Toxicology* **15**(4): 303-310.
- George, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Eds: Malins, D.C. og Ostrander, G.K. Lewis Publishers, CRC Press: 37-85.
- Gerpe, M., Kling, P., Berg, A.H. og Olsson, P.E. (2000). Arctic char (*Salvelinus alpinus*) metallothionein: cDNA sequence, expression, and tissue-specific inhibition of cadmium-mediated metallothionein induction by 17-beta-estradiol, 4-OH-PCB 30, and PCB 104. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(3): 638-645.
- Geyer, H.J., Steinberg, C.E., Scheunert, I., Bruggemann, R., Schutz, W., Kettrup, A. og Rozman, K. (1993). A review of the relationship between acute toxicity (LC(50)) of *gamma*-Hexachlorocyclohexane (*gamma*-HCH, lindane) and total lipid-content of different fish species. *Toxicology* **83**(1-3): 169-179.
- Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T. og Komen, H. (1996). Feminization of male carp. *Nature* **384**(6606): 221-222.
- 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**(3): 255-262.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsøyr, J., Zhang, Y. og Förlin, L. (1987). Species Characteristics of the Hepatic Xenobiotic and Steroid Biotransformation Systems of 2 Teleost Fish, Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology* **89**(3): 347-360.
- 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**(1-6): 36-45.
- Goksøyr, A., Bjornevik, M. og Maage, A. (1994). Effects of dietary iron concentrations on the cytochrome-P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**(2): 315-320.

- Gooneratne, R., Miranda, C.L., Henderson, M.C. og Buhler, D.R. (1997). Beta-naphthoflavone induced CYP1A1 and 1A3 proteins in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* **27**(2): 175-187.
- Gravato, C. og Santos, M.A. (2002). In vitro liver EROD activity inhibition by aromatic hydrocarbon-receptor agonists. *Fresenius Environmental Bulletin* **11**(7): 342-346.
- Gray, E.S., Woodin, B.R. og Stegeman, J.J. (1991). Sex-differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *Journal of Experimental Zoology* **259**(3): 330-342.
- Green, N.W., Hylland, K., Ruus, A. og Walday, M. (2004). Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). National comments regarding the Norwegian data for 2002. NIVA, Oslo. Rapport 894/2003: 223 sider.
- Gaarder, R. (1999). Variasjoner i cellulære responser på miljøgiftbelastning hos to marine fiskearter, torsk (*Gadus morhua*) og skrubbe (*Platichthys flesus*), fanget langs den norske Skagerakkysten og Indre Oslofjord. *Avdeling for Marin Zoologi og Marin Kjemi*. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo.
- Hahn, M.E. og Karchner, S.I. (1995). Evolutionary conservation of the vertebrate Ah (dioxin) receptor: Amplification and sequencing of the PAS domain of a teleost Ah receptor cDNA. *Biochemical Journal* **310**: 383-387.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Franks, D.G. og Merson, R.R. (2004). Aryl hydrocarbon receptor polymorphisms and dioxin resistance in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Pharmacogenetics* **14**(2): 131-143.
- Hansen, J.A., Lipton, J., Welsh, P.G., Cacula, D. og MacConnell, B. (2004). Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(8): 1902-1911.
- Hansen, Ø.K. (1979). Biologien til skrubba i Oslofjorden, med vekt på vekst- og forplantningsforhold. *Avdeling for Marin zoologi*. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo.
- Haux, C., Björnsson, B.T., Förlin, L., Larsson, Å. og Deftos, L.J. (1988). Influence of cadmium exposure on plasma calcium, vitellogenin and calcitonin in vitellogenic rainbow trout. *Marine Environmental Research* **24**(1-4): 199-202.
- Haux, C. og Förlin, L. (1989). Selected assays for health status in natural fish populations. *Chemicals in the aquatic environment: advanced hazard assessment 1989*. Landner, L. Springer Verlag, Berlin: 197-215.
- Hebb, C.D., Castell, J.D., Anderson, D.M. og Batt, J. (2003). Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. *Aquaculture* **221**(1-4): 439-449.

- Heggelund, H.I. (2001). Diett og matinntak til torsk, *Gadus morhua* L., i Oslofjorden. *Avdeling for Marin Zoologi og Marin Kjemi*. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo.
- Helland, A. (1996). Overvåking av Hvaler - Singlefjorden og munningen av Iddefjorden 1990-1994. Sedimenterende materiale og bunnsedimenter 1994. NIVA, Oslo. Rapport 652/96, Løpenr 3440: 83 sider.
- Hellou, J., Payne, J.F., Upshall, C., Fancey, L.L. og Hamilton, C. (1994). Bioaccumulation of aromatic hydrocarbons from sediments: A dose-response study with flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**(4): 477-485.
- Herman, R.L. og Kincaid, H.L. (1988). Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* **72**(1-2): 165-172.
- Hodson, P.V. (1976). Delta-amino levulinic 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.
- Hodson, P.V., Blunt, B.R. og Spry, D.J. (1978). Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water. *Water Research* **12**(10): 869-878.
- Hodson, P.V., Blunt, B.R., Spry, D.J. og Austen, K. (1977). Evaluation of erythrocyte delta-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **34**(4): 501-508.
- Hodson, P.V., Blunt, B.R. og Whittle, D.M. (1984). Monitoring lead exposure of fish. *Contaminant effects on fisheries*. Ed: Cairns, V.W. Wiley, New York: 87-98.
- Hodson, P.V., Dixon, D.G., Spry, D.J., Whittle, D.M. og Sprague, J.B. (1982). Effect of growth-rate and size of fish on rate of intoxication by waterborne lead. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**(9): 1243-1251.
- Hogstrand, C. og Haux, C. (1991). Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **100**(1-2): 137-141.
- Hollis, L., Hogstrand, C. og Wood, C.M. (2001). Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**(4): 468-474.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G. og Wood, C.M. (1999). Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **46**(2): 101-119.

- 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**(4): 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**(3): 465-472.
- Husøy, A.M., Myers, M.S. og Goksøyr, A. (1996). Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): 53-74.
- Hutton, M. (1983). The effects of environmental lead-exposure and invitro zinc on tissue delta-aminolevulinic acid dehydratase in urban pigeons. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **74**(2): 441-446.
- Hylland, K. (2004). Biological effects of contaminants: Quantification of d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) acitivity in fish blood. *ICES Techniques in Marine Environmental Scienses*, **34**: 9 sider
- Hylland, K., Berge, J.A., Pettersen, O., Sætre, T., Efraimsen, H. og Goksøyr, A. (1998a). Effekter av østrogen-lignende stoffer i norske kystfarvann. NIVA, Oslo. Løpenr 3668: 71 sider.
- Hylland, K. og Braaten, B. (1996a). Kartlegging av mulige østrogenlignende effekter i miljøet i Norge, a) biologiske effekter. NIVA, Oslo. Løpenr. 3422: 44 sider.
- 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**(1-3): 89-96.
- Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C., Sletten, K. og Andersen, R.A. (1994). Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment. *Fish Physiology and Biochemistry* **13**(1): 81-91.
- Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P.G. og Sandvik, M. (1998b). Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): 51-55.
- Hylland, K., Sandvik, M., Skåre, J.U., Beyer, J., Egaas, E. og Goksøyr, A. (1996b). Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): An evaluation of their use in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* **42**(1-4): 223-227.
- Janssen, P.A.H., Lambert, J.G.D., Vethaak, A. og Goos, H.J.T. (1997). Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L). *Aquatic Toxicology* **39**(3-4): 195-214.

- Jensen, E.G., Skaare, J.U., Egaas, E. og Goksøyr, A. (1991). Response of xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Aquatic Toxicology* **21**(1-2): 81-91.
- Jimenez, B.D., Cirimo, C.P. og McCarthy, J.F. (1987). Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo[a]pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology* **10**(1): 41-57.
- Johansen, S.S. og Samdal, J.E. (1995). Miljøgifter i indre Oslofjord. Delrapport 5. Kartlegging av kilder. NIVA, Oslo. Rapport 611/95, Løpenr 3291: 80 sider.
- Johansson-Sjöbeck, M.L. og Larsson, A. (1979). Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and hematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **8**(4): 419-431.
- Johnson, L.L., Casillas, E., Collier, T.K., McCain, B.B. og Varanasi, U. (1988). Contaminant effects on ovarian development in english sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**(12): 2133-2146.
- Johnson, L.L., Landahl, J.T., Kubin, L.A., Horness, B.H., Myers, M.S., Collier, T.K. og Stein, J.E. (1998). Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. *Journal of Sea Research* **39**(1-2): 125-137.
- Jørgensen, E.H., Bye, B.E. og Jobling, M. (1999). Influence of nutritional status on biomarker responses to PCB in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* **44**(4): 233-244.
- Jørgensen, E.H., Foshaug, H., Andersson, P., Burkow, I.C. og Jobling, M. (2002). Polychlorinated biphenyl toxicokinetics and P4501A responses in anadromous Arctic charr during winter emaciation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(8): 1745-1752.
- Kille, P., Kay, J., Leaver, M. og George, S. (1992). Induction of piscine metallothionein as a primary response to heavy-metal pollutants: Applicability of new sensitive molecular probes. *Aquatic Toxicology* **22**(4): 279-286.
- Kirby, M.F., Allen, Y.T., Dyer, R.A., Feist, S.W., Katsiadaki, I., Matthiessen, P., Scott, A.P., Smith, A., Stentiford, G.D., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L. og Waldock, M.J. (2004). Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: Temporal trends, 1996 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(3): 748-758.
- Kleinkauf, A., Connor, L., Swarbreck, D., Levene, C., Walker, P., Johnson, P.J. og Leah, R.T. (2004a). General condition biomarkers in relation to contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**(3): 335-355.
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G. og Leah, R.T. (2004b). Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**(3): 356-364.

- Klopper-Sams, P.J. og Stegeman, J.J. (1992). Effects of temperature acclimation on the expression of hepatic cytochrome-P4501A messenger-Rna and protein in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **299**(1): 38-46.
- Klotz, A.V., Stegeman, J.J. og Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome-P450 monooxygenase activity. *Analytical Biochemistry* **140**(1): 138-145.
- 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**(2): 385-394.
- Knutzen, J., Brevik, E.M., Følsvik, N.A.H. og Schlabach, M. (2000). Overvåking i indre Oslofjord. Miljøgifter i fisk og blåskjell 1997-1998. NIVA, Oslo. Rapport 784/99, Løpenr 4126: 89 sider
- Konieczny, R.M. (1994). Miljøgiftundersøkelse i Indre Oslofjord. Delrapport 4. Miljøgifter i sedimenter. NIVA, Oslo. Rapport 561/94, Løpenr 3094: 134 sider.
- Krahn, M.M., Burrows, D.G., Macleod, W.D. og Malins, D.C. (1987). Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolyzed bile of english sole (*Parophrys vetulus*) from polluted pites in Puget Sound, Washington. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(5): 511-522.
- Kägi, J.H.R. (1991). Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology* **205**: 613-626.
- Lange, U., Saborowski, R., Siebers, D., Buchholz, F. og Karbe, L. (1998). Temperature as a key factor determining the regional variability of the xenobiotic-inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of dab (*Limanda limanda*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**(2): 328-338.
- Lanno, R.P., Slinger, S.J. og Hilton, J.W. (1985). Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo Gairdneri* Richardson). *Aquaculture* **49**(3-4): 257-268.
- 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**(4): 291-301.
- Larsson, A., Haux, C. og Sjobeck, M.L. (1985). Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **9**(3): 250-281.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E. og Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* **45**(2-3): 91-97.
- Lemaire, P., Mathieu, A., Giudicelli, J. og Lafaurie, M. (1992). Effect of diet on the responses of hepatic biotransformation enzymes to benzo[a]pyrene in the european sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **102**(3): 413-420.
- Lemaire-Gony, S. og Lemaire, P. (1992). Interactive Effects of Cadmium and Benzo(a)Pyrene on Cellular Structure and Biotransformation Enzymes of the Liver of the European Eel *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology* **22**(2): 145-160.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P. og Pulsford, A.L. (1995). Effects of cadmium and benzo[a]pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* **31**(4): 297-313.
- Levine, S.L., Oris, J.T. og Wissing, T.E. (1994). Comparison of P4501A1 monooxygenase induction in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following intraperitoneal injection or continuous waterborne exposure with benzo[a]pyrene: Temporal and dose-dependent studies. *Aquatic Toxicology* **30**(1): 61-75.
- Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U. og Hänninen, O. (1981). Extrahepatic xenobiotic metabolism in north-european freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **69**: 259-263.
- Lindström-Seppä, P. og Stegeman, J.J. (1995). Sex differences in cytochrome P4501A induction by environmental exposure and beta-naphthoflavone in liver and extrahepatic organs of recrudescing winter flounder. *Marine Environmental Research* **39**(1-4): 219-223.
- 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.
- Ludvigsen, G.H. og Lode, O. (2002). Jordsmonnovervåking i Norge. Pesticider 2001. Jordforsk, Ås. Rapport 82/02: 109 sider
- Mackay, M.E. og Lazier, C.B. (1993). Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. *General and Comparative Endocrinology* **89**(2): 255-266.
- Malins, D.C., Krahn, M.M., Brown, D.W., Rhodes, L.D., Myers, M.S., McCain, B.B. og Chan, S.L. (1985). Toxic chemicals in marine sediment and biota from Mukilteo, Washington: Relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in english sole (*Parophrys vetulus*). *Journal of the National Cancer Institute* **74**(2): 487-494.
- Martin, R.C., Dixon, D.G., Maguire, R.J., Hodson, P.V. og Tkacz, R.J. (1989). Acute toxicity, uptake, depuration and tissue distribution of tri-N-butyltin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquatic Toxicology* **15**(1): 37-51.
- Metón, I., Fernández, F. og Baanante, I.V. (2003). Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **225**(1-4): 99-107.

- Michallet-Ferrier, P., Ait-Aissa, S., Balaguer, P., Dominik, J., Haffner, G.D. og Pardos, M. (2004). Assessment of estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated activities in organic sediment extracts of the Detroit River, using in vitro bioassays based on human MELN and teleost PLHC-1 cell lines. *Journal of Great Lakes Research* **30**(1): 82-92.
- Mommsen, T.P. og Walsh, P.J. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. *The physiology of developing fish. Part A. Eggs and Larvae*. Eds: Hoar, W.S. og Randall, D.J. Academic Press Inc, San Diego. **11 Part A**: 347-406.
- Morcillo, Y., Janer, G., O'Hara, S.C.M., Livingstone, D.R. og Porte, C. (2004). Interaction of tributyltin with hepatic cytochrome P450 and uridine diphosphate-glucuronosyl transferase systems of fish: In vitro studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(4): 990-996.
- Morrison, H.G., Oleksiak, M.F., Cornell, N.W., Sogin, M.L. og Stegeman, J.J. (1995). Identification of cytochrome P4501A (CYP1A) genes from two teleost fish, toadfish (*Opsanus tau*) and scup (*Stenotomus chrysops*), and phylogenetic analysis of CYP1A genes. *Biochemical Journal* **308**: 97-104.
- Myers, M.S., Johnson, L.L., Olson, O.P., Stehr, C.M., Horness, B.H., Collier, T.K. og McCain, B.B. (1998). Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and Pacific Coasts, USA. *Marine Pollution Bulletin* **37**(1-2): 92-113.
- Myers, M.S., Stehr, C.M., Olson, O.P., Johnson, L.L., McCain, B.B., Chan, S.L. og Varanasi, U. (1994). Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in english sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coast, USA. *Environmental Health Perspectives* **102**(2): 200-215.
- Nacci, D., Coiro, L., Champlin, D., Jayaraman, S., McKinney, R., Gleason, T.R., Munns, W.R., Specker, J.L. og Cooper, K.R. (1999). Adaptations of wild populations of the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to persistent environmental contaminants. *Marine Biology* **134**(1): 9-17.
- Nacci, D.E., Kohan, M., Pelletier, M. og George, E. (2002). Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology* **57**(4): 203-215.
- Navas, J.M. og Segner, H. (2000). Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): 157-162.
- Navas, J.M. og Segner, H. (2001). Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chemico-Biological Interactions* **138**(3): 285-298.
- Nelson, D.R. (2004). Cytochrome P450 Homepage. Oppdatert: 21/10-04, Online, <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>

Neunaber, R. og Achazi, R.K. (1999). A novel, endogenous inhibitor of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity isolated from liver cytosolic fractions of bream (*Abramis brama* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **124**(1): 89-100.

Nicolas, J.M. (1999). Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology* **45**(2-3): 77-90.

Nishiyama, S., Taguchi, T. og Onosaka, S. (1987). Induction of zinc-thionein by estradiol and protective effects on inorganic mercury-induced renal toxicity. *Biochemical Pharmacology* **36**(20): 3387-3391.

Nissen-Lie, T. (1997). Årstidsvariasjon i spormetallmetabolismen til skrubbe, *Platichthys flesus* L., fra Hvalerområdet. *Avdeling for Marin Zoologi og Marin Kjemi*. 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**(6): 1725-1730.

Olsson, P.-E. (1996). Metallothioneins in biomonitoring. *Toxicology of aquatic pollution: Physiological, cellular and molecular approaches*. Ed: Taylor, E.W. Cambridge University Press, Cambridge. **57**: 187-204.

Olsson, P.-E., Haux, C. og Förlin, L. (1987). Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry* **3**(1): 39-47.

Olsson, P.-E., Kling, P., Petterson, C. og Silversand, C. (1995). Interaction of cadmium and estradiol-17-beta on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical Journal* **307**: 197-203.

Olsson, P.-E., Larsson, A. og Haux, C. (1996). Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Marine Environmental Research* **42**(1-4): 41-44.

Olsson, P.-E., Zafarullah, M. og Gedamu, L. (1989). A role of metallothionein in zinc regulation after estradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biochemical Journal* **257**(2): 555-559.

Overnell, J., McIntosh, R. og Fletcher, T.C. (1987). The enhanced induction of metallothionein by zinc, its half-life in the marine fish *Pleuronectes platessa*, and the influence of stress factors on metallothionein levels. *Experientia* **43**(2): 178-181.

- Peakall, D.B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. 1. Introduction. *Ecotoxicology* **3**(3): 157-160.
- Pearce, S.T., Liu, H., Radhakrishnan, I., Abdelrahim, M., Safe, S. og Jordan, V.C. (2004). Interaction of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran with estrogen receptor alpha. *Cancer Research* **64**(8): 2889-2897.
- Pethon, P. (1989). Fiskene i farger. Aschehoug, Oslo.
- Pratap, H.B., Fu, H., Lock, R.A.C. og Bonga, S.E.W. (1989). Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**(4): 568-575.
- Richardson, D.M., Davies, I.M., Moffat, C.F., Pollard, P. og Stagg, R.M. (2001). Biliary PAH metabolites and EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) from a contaminated estuarine environment. *Journal of Environmental Monitoring* **3**(6): 610-615.
- Ricker, W.E. (1973). Linear regressions in fishery research. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **30**(3): 409-434.
- Riisgard, H.U. og Hansen, S. (1990). Biomagnification of mercury in a marine grazing food chain - algal cells *Phaeodactylum tricorutum*, mussels *Mytilus edulis* and flounders *Platichthys flesus* studied by means of a stepwise reduction cvaa method. *Marine Ecology-Progress Series* **62**(3): 259-270.
- Risso-de Faverney, C., de Sousa, G., Lafaurie, M. og Rahmani, R. (1999). Expression and induction of CYP1A1 in black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) hepatocyte cultures: Effects of heavy metals. *Polycyclic Aromatic Compounds* **13**(3): 285-299.
- Roesijadi, G. (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* **22**(2): 81-114.
- Rotchell, J.M., Clarke, K.R., Newton, L.C. og Bird, D.J. (2001). Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* **52**(2): 151-171.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. og Sumpter, J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1559-1565.
- 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**(10): 2377-2382.
- Saborowski, R. og Buchholz, F. (1996). Annual changes in the nutritive state of North Sea dab. *Journal of Fish Biology* **49**(2): 173-194.

Salvanes, A.G.V. og Ulltang, O. (1992). Population parameters, migration and exploitation of the cod (*Gadus morhua* L) in Masfjorden, western Norway. *Fisheries Research* **15**(3): 253-289.

Sandvik, M., Beyer, J., Goksøyr, A., Hylland, K., Egaas, E. og Skaare, J.U. (1997). Interaction of benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L). *Biomarkers* **2**(3): 153-160.

Savelli, C., Fossi, M.C., Focardi, S., Gavilan, J.F., Barra, R., Parra, O., Casini, S., Corsolini, S. og Leonzio, C. (1997). Effect of pentachlorophenol on some mixed function oxidase activities and on porphyrin metabolism in *Carassius auratus*. *Pharmacological Research* **35**(3): 221.

Schlezing, J.J. og Stegeman, J.J. (2001). Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquatic Toxicology* **52**(2): 101-115.

Schlezing, J.J., White, R.D. og Stegeman, J.J. (1999). Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: Production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Molecular Pharmacology* **56**(3): 588-597.

Schmitt, C.J., Caldwell, C.A., Olsen, B., Serdar, D. og Coffey, M. (2002). Inhibition of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in fish from waters affected by lead smelters. *Environmental Monitoring and Assessment* **77**(1): 99-119.

Schmitt, C.J., Wildhaber, M.L., Hunn, J.B., Nash, T., Tieger, M.N. og Steadman, B.L. (1993). Biomonitoring of lead-contaminated Missouri streams with an assay for erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in fish blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **25**(4): 464-475.

Scott, A.P., Stewart, C., Allen, Y. og Matthiessen, P. (2000). 17-beta-oestradiol in male flatfish. Nordberg, B. *International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, 6, Bergen, Norway, July 4-9, 1999

SFT (2003). Miljøstatus i Norge. Oppdatert: 30/6-04, Online, http://www.miljostatus.no/templates/PageWithRightListing_3834.aspx

Shears, M.A. og Fletcher, G.L. (1983). Regulation of Zn²⁺ uptake from the gastrointestinal tract of a marine teleost, the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **40**: 197-205.

Shears, M.A. og Fletcher, G.L. (1985). Hepatic metallothionein in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **63**(7): 1602-1609.

Sleiderink, H.M., Beyer, J., Scholtens, E., Goksøyr, A., Nieuwenhuize, J., Van Liere, J.M., Everaarts, J.M. og Boon, J.P. (1995a). Influence of temperature and polyaromatic

contaminants on CYP1A levels in North-Sea dab (*Limanda limanda*). *Aquatic Toxicology* **32**(2-3): 189-209.

Sleiderink, H.M., Oostingh, I., Goksøyr, A. og Boon, J.P. (1995b). Sensitivity of cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern North-Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **28**(4): 423-430.

Slooff, W., van Kreijl, C.F. og Baars, A.J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* **4**(1): 1-14.

Socorro, S., Power, D.M., Olsson, P.E. og Canario, A.V.M. (2000). Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *Journal of Endocrinology* **166**(2): 293-306.

Solbakken, J.E. og Palmork, K.H. (1981). Metabolism of phenanthrene in various marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **70**(1): 21-26.

Solé, M., Porte, C. og Barcelo, D. (2000). Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17- α -ethynylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**(4): 494-500.

Specker, J.L. og Anderson, T.R. (1994). Developing an ELISA for a model protein - vitellogenin. *Analytical techniques*. Eds: Hochachka, P.W. og Mommsen, T.P. Elsevier Science, Amsterdam. **3**: 567-578.

Stegeman, J.J. (1979). Temperature influence on basal activity and induction of mixed-function oxygenase activity in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **36**(11): 1400-1405.

Stegeman, J.J., Binder, R.L. og Orren, A. (1979). Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor*. *Biochemical Pharmacology* **28**(23): 3431-3439.

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. *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Eds: Malins, D.C. og Ostrander, G.K. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton: 87-206.

Stein, J.E., Hom, T., Sanborn, H.R. og Varanasi, U. (1991). Effects of exposure to a contaminated sediment extract on the metabolism and disposition of 17- β -estradiol in english sole (*Parophrys vetulus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **99**(1-2): 231-240.

Stich, H.F., Acton, A.B. og Forrester, C.R. (1976). Fish tumors and sublethal effects of pollutants. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **33**(9): 1993-2001.

Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M. og Lafaurie, M. (1997). Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(2): 214-219.

Sumpter, J.P. (1995). Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* **82-3**: 737-742.

Tsukamoto, I., Yoshinaga, T. og Sano, S. (1979). Role of zinc with special reference to the essential thiol-groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochimica Et Biophysica Acta* **570**(1): 167-178.

Tyler, A.V. og Dunn, R.S. (1976). Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **33**(1): 63-75.

van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H. og Olson, J.R. (1994). The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **24**(1): 1-74.

van der Oost, R., Beyer, J. og Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): 57-149.

van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. og Vermeulen, N.P.E. (1991). Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **100**(1-2): 43-47.

van Gestel, C.A.M. og van Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* **5**(4): 217-225.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Kuiper, R.V., Grinwis, G.C.M., Rankouhi, T.R., Giesy, J.P. og Gerritsen, A. (2002). Estrogenic effects in fish in The Netherlands: some preliminary results. *Toxicology* **181**: 147-150.

Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B. og Lafaurie, M. (1997). Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Marine Environmental Research* **44**(1): 1-11.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. og Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* **46**(2): 407-417.

Vignier, V., van der Meulen, J.H. og Fraser, A.J. (1992). Growth and food conversion by Atlantic salmon parr during 40 days exposure to crude-oil. *Transactions of the American Fisheries Society* **121**(3): 322-332.

- Vindimian, E., Namour, P., Munoz, J.F., Gril, J.J., Migeon, B. og Garric, J. (1993). Ethoxyresorufin-*O*-deethylase induction in fish from a watershed exposed to a nonpoint source pollution of agricultural origin. *Water Research* **27**(3): 449-455.
- Weis, P., Weis, J.S., Chen, C.M. og Greenberg, A. (1992). Treated municipal wastewaters: Effects of organic fractions on development and growth of fishes. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**(10): 1451-1459.
- Werner, J., Wautier, K., Evans, R.E., Baron, C.L., Kidd, K. og Palace, V. (2003). Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquatic Toxicology* **62**(4): 321-328.
- Westman, I., Johansson-Sjöbeck, M.-L. og Fänge, R. (1975). The effect of PCB on the activity of delta-amino-levulinic acid dehydratase (ALA-D) and on some hematological parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Sublethal Effects of Toxic Chemicals on Aquatic Animals: proceedings of the Swedish - Netherlands Symposium, Wageningen, The Netherlands, September 2-5, 1975*. Eds: Koeman, J.H. og Strik, J.J.T.W.A. Elsevier, Amsterdam: 111-119.
- WHO (1993). Environmental health criteria 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. World Health Organization, Geneva. 53 sider
- 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**(4): 347-570.
- Wigeland, T.J. (1975). Ernæringsforhold hos skrubbe, *Platichthys flesus* (L.), på utvalgte lokaliteter i Oslofjorden. *Institutt for Marinbiologi og Limnologi*. Cand. scient. Thesis, Universitetet i Oslo
- Williams, D.E., Lech, J.J. og Buhler, D.R. (1998). Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **399**(2): 179-192.
- Williams, T. og Bedford, B.C. (1974). The use of otoliths for age determination. Bagenal, T.B. *Ageing of fish*, University of Reading, 234 sider.
- Zar, J.H. (1998). Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Upper Saddle River, N.J., 663 sider.
- Zhou, J.L., Fileman, T.W., Evans, S., Donkin, P., Llewellyn, C., Readman, J.W., Mantoura, R.F.C. og Rowland, S.J. (1998). Fluoranthene and pyrene in the suspended particulate matter and surface sediments of the Humber estuary, UK. *Marine Pollution Bulletin* **36**(8): 587-597.
- Örn, S., Andersson, P.L., Förlin, L., Tysklind, M. og Norrgren, L. (1998). The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **35**(1): 52-57.

Åkerblom, N., Olsson, K., Berg, A.H., Andersson, P.L., Tysklind, M., Förlin, L. og Norrgren, L. (2000). Impact of polychlorinated naphthalenes (PCNs) in juvenile Baltic salmon, *Salmo salar*: Evaluation of estrogenic effects, development, and CYP1A induction. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**(2): 225-233.

Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B. og Andersen, O.K. (2000a). 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**(2): 241-258.

Aas, E., Beyer, J. og Goksøyr, A. (2000b). Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* **5**(1): 9-23.

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**(3): 213-229.

Vedlegg 1. Rådata for skrubbe

	Prøve	Lokalitet	Område	Kjønn	Alder	Lengde	Vekt	Levervekt	LSI	Temp	Dato
1	300S1	Hubukta	Ytre fjord	2	2	29,5	241,0	2,0	0,8	7	15/11/02
2	300S2	Hubukta	Ytre fjord	2	5	30,0	295,0	2,0	0,7	7	15/11/02
3	301S1	Hubukta	Ytre fjord	1	4	36,0	429,0	12,0	2,8	7	15/11/02
4	301S2	Hubukta	Ytre fjord	1	9	37,5	654,0	16,0	2,4	7	15/11/02
5	302S10	Hubukta	Ytre fjord	1	6	36,0	517,0	15,0	2,9	7	15/11/02
6	302S11	Hubukta	Ytre fjord	1	3	33,8	403,0	8,0	2,0	7	15/11/02
7	302S12	Hubukta	Ytre fjord	2	6	34,7	371,0	4,2	1,1	7	15/11/02
8	302S13	Hubukta	Ytre fjord	1	6	38,0	575,0	15,7	2,7	7	15/11/02
9	302S14	Hubukta	Ytre fjord	1	9	36,5	450,0	5,7	1,3	7	15/11/02
10	302S15	Hubukta	Ytre fjord	1	6	33,5	491,0	13,2	2,7	7	15/11/02
11	302S16	Hubukta	Ytre fjord	2	5	33,5	371,0	4,2	1,1	7	15/11/02
12	302S17	Hubukta	Ytre fjord	1	5	34,5	354,0	4,7	1,3	7	15/11/02
13	302S18	Hubukta	Ytre fjord	1	4	30,5	332,0	8,4	2,5	7	15/11/02
14	302S19	Hubukta	Ytre fjord	2	2	29,0	260,6	2,9	1,1	7	15/11/02
15	302S1	Hubukta	Ytre fjord	2	7	30,3	268,0	8,0	3,0	7	15/11/02
16	302S20	Hubukta	Ytre fjord	1	5	30,7	320,8	9,6	3,0	7	15/11/02
17	302S21	Hubukta	Ytre fjord	1	6	36,5	494,5	10,6	2,1	7	15/11/02
18	302S22	Hubukta	Ytre fjord	1	6	33,0	398,6	9,5	2,4	7	15/11/02
19	302S23	Hubukta	Ytre fjord	1	8	36,0	588,1	16,8	2,9	7	15/11/02
20	302S24	Hubukta	Ytre fjord	1	4	33,0	329,4	7,0	2,1	7	15/11/02
21	302S25	Hubukta	Ytre fjord	1	6	34,2	402,1	12,3	3,1	7	15/11/02
22	302S2	Hubukta	Ytre fjord	1	2	32,0	368,0	5,0	1,4	7	15/11/02
23	302S3	Hubukta	Ytre fjord	2	3	33,0	417,0	6,0	1,4	7	15/11/02
24	302S4	Hubukta	Ytre fjord	2	2	29,0	264,0	3,0	1,1	7	15/11/02
25	302S5	Hubukta	Ytre fjord	1	4	41,5	770,0	15,0	1,9	7	15/11/02
26	302S6	Hubukta	Ytre fjord	1	4	29,0	272,0	10,0	3,7	7	15/11/02
27	302S7	Hubukta	Ytre fjord	2	6	31,1	304,0	3,0	1,0	7	15/11/02
28	302S8	Hubukta	Ytre fjord	1	6	36,3	501,0	9,0	1,8	7	15/11/02
29	302S9	Hubukta	Ytre fjord	1	3	33,6	440,0	11,0	2,5	7	15/11/02
30	272S1	Killingen	Indre fjord	1	4	36,8	594,8	15,4	2,6	7,9	07/11/02
31	272S2	Killingen	Indre fjord	1	4	35,5	453,0	15,8	3,5	7,9	07/11/02
32	272S3	Killingen	Indre fjord	2	3	33,5	404,0	7,7	1,9	7,9	07/11/02
33	273S1	Killingen	Indre fjord	1	6	39,0	712,0	23,6	3,3	7,9	07/11/02
34	294S1	Killingen	Indre fjord	1	3	36,0	520,4	18,2	3,5	7,9	07/11/02
35	294S2	Killingen	Indre fjord	1	6	36,5	587,2	17,8	3,0	7,9	07/11/02
36	294S3	Killingen	Indre fjord	1	4	37,8	629,5	14,6	2,3	7,9	07/11/02
37	295S1	Killingen	Indre fjord	1	3	38,5	665,0	16,5	2,5	7,9	07/11/02
38	295S2	Killingen	Indre fjord	1	4	36,0	529,4	17,8	3,4	7,9	07/11/02
39	295S3	Killingen	Indre fjord	2	2	32,5	368,6	5,6	1,5	7,9	07/11/02
40	296S1	Killingen	Indre fjord	2	2	34,5	369,8	5,3	1,4	7,9	07/11/02
41	296S2	Killingen	Indre fjord	1	2	39,6	709,5	22,5	3,2	7,9	07/11/02
42	296S3	Killingen	Indre fjord	2	3	30,5	301,4	3,1	1,0	7,9	07/11/02
43	296S4	Killingen	Indre fjord	2	5	34,0	417,4	5,6	1,3	7,9	07/11/02
44	296S5	Killingen	Indre fjord	1	3	34,0	436,6	10,6	2,4	7,9	07/11/02
45	296S6	Killingen	Indre fjord	1	3	31,0	367,0	9,2	2,5	7,9	07/11/02
46	296S7	Killingen	Indre fjord	1	3	35,5	496,4	15,4	3,1	7,9	07/11/02
47	296S8	Killingen	Indre fjord	1	5	36,0	537,8	15,6	2,9	7,9	07/11/02
48	296S9	Killingen	Indre fjord	1	4	40,5	807,0	20,1	2,5	7,9	07/11/02
49	298S1	Killingen	Indre fjord	1	5	35,4	526,0	12,3	2,3	7,9	07/11/02
50	298S2	Killingen	Indre fjord	2	4	31,5	351,8	7,6	2,2	7,9	07/11/02
51	298S3	Killingen	Indre fjord	1	5	37,8	568,4	16,3	2,9	7,9	07/11/02
52	299S1	Killingen	Indre fjord	2	2	35,0	484,8	8,2	1,7	7,9	07/11/02
53	299S2	Killingen	Indre fjord	2	3	34,0	391,4	5,9	1,5	7,9	07/11/02
54	299S3	Killingen	Indre fjord	2	5	31,5	347,4	5,5	1,6	7,9	07/11/02
55	299S4	Killingen	Indre fjord	1	3	28,8	297,8	6,6	2,2	7,9	07/11/02

Kjønn: 1=hunnfisk, 2=hannfisk; Alder: år; Lengde: cm; Vekt: g; Levervekt: g; Temp: °C

Vedlegg 2. Rådata for torsk

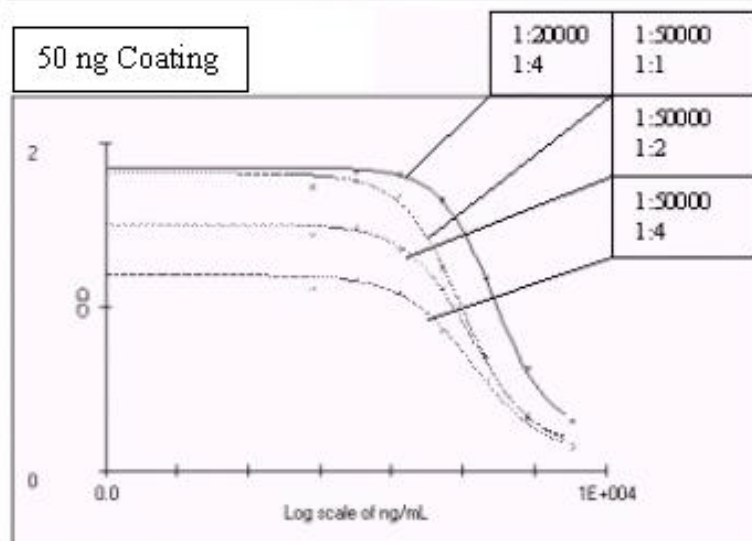
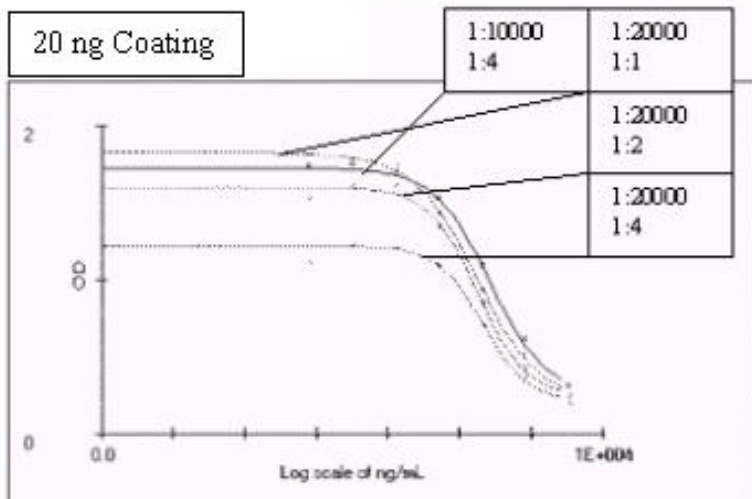
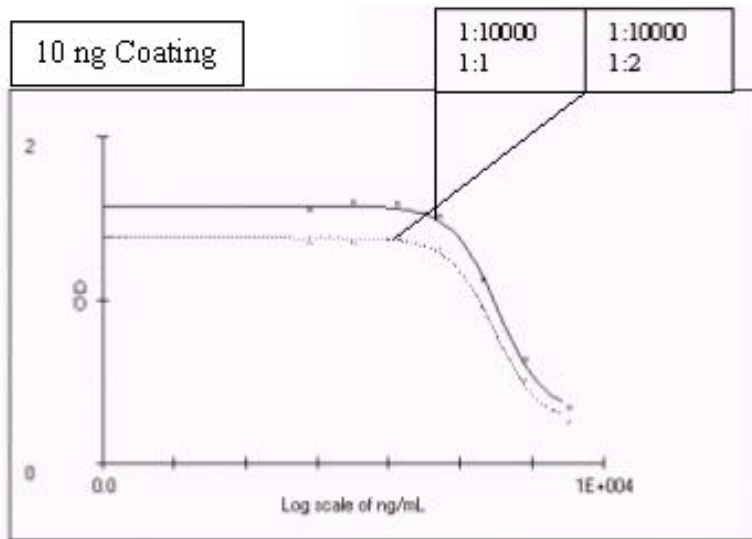
	Prøve	Lokalitet	Mod Lokalitet	Område	Kjønn	Alder	Lengde	Vekt	Levervekt	LSI	Kondisjon	Temp	Dato
1	272T1	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	44,3	757,3	26,8	3,5	0,87	7,4	22/11/02
2	272T2	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	43,6	625,3	9,5	1,5	0,75	7,4	22/11/02
3	272T3	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	3	36,0	427,3	13,2	3,1	0,92	7,4	22/11/02
4	272T4	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	38,0	410,5	6,9	1,7	0,75	7,4	22/11/02
5	272T5	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	34,3	323,3	4,8	1,5	0,80	7,4	22/11/02
6	272T6	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	35,5	386,5	5,9	1,5	0,86	7,4	22/11/02
7	294T1	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	31,5	245,0	3,9	1,6	0,78	7,4	22/11/02
8	294T2	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	2	32,3	253,9	3,8	1,5	0,75	7,4	22/11/02
9	294T3	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	37,7	426,5	12,0	2,8	0,80	7,4	22/11/02
10	294T4	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	31,5	287,3	7,4	2,6	0,92	7,4	22/11/02
11	294T5	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	37,2	424,3	9,6	2,3	0,82	7,4	22/11/02
12	294T6	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	3	36,3	425,3	8,7	2,0	0,89	7,4	22/11/02
13	295T1	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	3	39,1	537,1	12,5	2,3	0,90	7,4	22/11/02
14	295T2	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	42,5	581,8	9,1	1,6	0,76	7,4	22/11/02
15	295T3	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	30,5	237,1	4,5	1,9	0,84	7,4	22/11/02
16	295T4	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	37,1	488,9	16,8	3,4	0,96	7,4	22/11/02
17	295T5	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	2	31,6	282,4	8,6	3,0	0,89	7,4	22/11/02
18	295T6	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	2	38,8	527,9	9,9	1,9	0,90	7,4	22/11/02
19	296T1	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	34,0	362,0	13,5	3,7	0,92	7,4	22/11/02
20	296T2	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	32,5	326,3	8,1	2,5	0,95	7,4	22/11/02
21	296T3	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	35,6	386,9	9,4	2,4	0,86	7,4	22/11/02
22	296T4	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	2	36,5	370,4	20,9	5,6	0,76	7,4	22/11/02
23	296T5	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	2	41,0	486,8	3,6	0,7	0,71	7,4	22/11/02
24	296T6	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	36,8	431,3	14,3	3,3	0,87	7,4	22/11/02
25	400T1	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	38,2	487,5	18,0	3,7	0,87	7,4	22/11/02
26	400T2	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	39,8	560,6	19,3	3,4	0,89	7,4	22/11/02
27	400T3	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	3	29,0	227,6	5,4	2,4	0,93	7,4	22/11/02
28	400T4	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	32,7	346,2	10,6	3,1	0,99	7,4	22/11/02
29	400T5	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	1	1	29,5	216,5	3,5	1,6	0,84	7,4	22/11/02
30	400T6	Solbergstrand	Solbergstrand	Ytre fjord	2	1	33,2	279,9	5,8	2,1	0,76	7,4	22/11/02
31	297T1	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	2	39,5	481,6	5,2	1,1	0,78	7,9	06/11/02
32	297T2	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	4	43,8	750,0	21,0	2,8	0,89	7,9	06/11/02
33	297T3	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	2	35,2	342,6	3,7	1,1	0,79	7,9	06/11/02
34	297T4	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	2	34,7	374,2	6,0	1,6	0,90	7,9	06/11/02
35	297T5	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	3	43,1	745,0	8,5	1,1	0,93	7,9	06/11/02
36	297T6	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	4	44,5	861,5	22,2	2,6	0,98	7,9	06/11/02
37	298T1	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	3	44,5	801,5	13,8	1,7	0,91	7,9	06/11/02
38	298T2	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	2	34,4	309,6	3,4	1,1	0,76	7,9	06/11/02
39	298T3	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	6	48,5	1148,0	23,6	2,1	1,01	7,9	06/11/02
40	298T4	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	3	38,5	494,0	5,8	1,2	0,87	7,9	06/11/02
41	298T5	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	2	40,3	544,0	7,5	1,4	0,83	7,9	06/11/02
42	298T6	Steilene	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	2	37,2	445,0	5,5	1,2	0,86	7,9	06/11/02
43	299T1	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	1	5	44,5	768,0	29,0	3,8	0,87	7,9	06/11/02
44	299T2	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	4	39,5	561,0	15,3	2,7	0,91	7,9	06/11/02
45	299T3	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	1	7	56,0	1770,0	38,8	2,2	1,01	7,9	06/11/02
46	299T4	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	1	4	49,5	1058,0	24,9	2,4	0,87	7,9	06/11/02
47	299T5	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	3	36,9	430,8	6,6	1,5	0,86	7,9	06/11/02
48	299T6	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	6	48,4	1117,0	30,5	2,7	0,99	7,9	06/11/02
49	300T1	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	4	42,5	716,0	15,6	2,2	0,93	7,9	06/11/02
50	300T2	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	2	36,2	401,0	7,4	1,8	0,85	7,9	06/11/02
51	301T1	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	3	47,0	959,0	30,9	3,2	0,92	7,9	06/11/02
52	301T2	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	1	2	39,0	542,0	11,9	2,2	0,91	7,9	06/11/02
53	302T1	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	1	3	43,5	759,0	12,9	1,7	0,92	7,9	06/11/02
54	302T2	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	4	50,0	1187,0	17,3	1,5	0,95	7,9	06/11/02
55	303T1	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	2	37,9	465,2	9,3	2,0	0,85	7,9	06/11/02
56	303T2	Gråøyrenna	Gråøyrenna	Indre fjord	2	3	39,6	589,0	16,9	2,9	0,95	7,9	06/11/02
57	304T1	Killingen	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	5	54,0	1451,5	75,3	5,2	0,92	7,9	07/11/02
58	304T2	Killingen	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	4	55,5	1355,5	60,5	4,5	0,79	7,9	07/11/02
59	304T3	Killingen	Steilene og Killingen	Indre fjord	1	2	38,0	500,2	18,8	3,8	0,91	7,9	07/11/02
60	304T4	Killingen	Steilene og Killingen	Indre fjord	2	2	36,0	467,8	18,3	3,9	1,00	7,9	07/11/02

Kjønn: 1=hunnfisk, 2=hannfisk; Alder: år; Lengde: cm; Vekt: g; Levervekt: g; Temp: °C

Vedlegg 3. Innstilling av polarograf for MT analyse

DP-Differential Pulse	
SMDE	
Drop Size	4
Stirrer/RDE (rpm)	2000
Detection MT (V)	-1,5 ± 0,1
Cell volume (ml)	10,2
Addit. Purge time (s)	10
No. of replicates	3
Initial Purge time (s)	60
Equilibration time (s)	0
Start Potential (V)	-1,2
End Potential (V)	-1,65
Voltage Step (V)	0,005951
Pulse Amplitude (V)	0,05
Pulse time (s)	0,04
Voltage Step time (V)	0,4
Sweep rate (V/s)	0,0149
Smoothfactor	4
Min. Peak width (Vsteps)	5
Min. Peak height (A)	1e-010

Vedlegg 4. Optimalisering vitellogenin



Hver boks presenterer fortyning av primært antistoff deretter fortyning av TMB.

Vedlegg 5. Bearbejdede data for skrubbe

	Prøve	MT	ALA-D	CYP1A	EROD Lever	EROD Nyre	1-OH-fenantren	1-OH-pyren	3-OH-B[a]P	3-OH-B[a]P mod
1	300S1	10,1	17,7	0,676	0,4	0,0077		101,179		3,892
2	300S2	8,9		0,344	2,1	0,0022	11,815	130,370	7,741	7,741
3	301S1	12,6	37,2	1,076	1,0	0,0009	4,203	45,142		3,892
4	301S2	18,1	18,7	0,415	0,2	0,0006	9,059	84,118	3,559	3,559
5	302S10	11,1	16,2	0,271	0,3	0,0008		210,638		35,106
6	302S11	6,3	22,9	0,591	0,6	0,0008	20,862	161,207	8,819	8,819
7	302S12	12,3	14,9	0,386	1,7	0,0013	23,897	204,828	10,469	10,469
8	302S13	8,8	24,8	0,304	0,7	0,0009	6,976	147,561		6,707
9	302S14	12,6	36,4	0,347	0,5	0,0022	15,091	120,732		5,030
10	302S15	11,8	19,7	0,771	0,5	0,0007	12,048	129,643	9,167	9,167
11	302S16	8,4	24,2	0,773	2,8	0,0011	8,250	99,000		9,167
12	302S17	15,4	23,5	1,278	1,1	0,0008	4,365	40,452	5,535	5,535
13	302S18	12,5	30,6	0,413	1,2	0,0008	9,288	163,907	9,179	9,179
14	302S19	6,0	26,4	0,750	4,4	0,0028		92,400		11,000
15	302S1		25,2	0,361	0,1					
16	302S20	9,5	17,2	0,450	1,2	0,0009				
17	302S21	13,2	27,7	0,338	0,8	0,0008	14,587	131,522	15,065	15,065
18	302S22	9,0	21,5	0,371	1,0	0,0015	5,812	73,482	3,607	3,607
19	302S23	9,9	22,8	0,317	0,9	0,0006	19,324	222,973		7,432
20	302S24	10,5	28,6	0,341	0,5	0,0011	16,500	135,000		2,500
21	302S25	9,6	23,4	0,354	1,1	0,0009	9,500	127,500		12,500
22	302S2	8,4	26,8	0,257	2,9	0,0029	29,730	237,838		7,432
23	302S3	7,6		0,672	3,7	0,0011	4,052	58,132		2,936
24	302S4	8,1	21,7	0,841	4,8	0,0014	8,213	141,855		3,733
25	302S5	10,1	32,4	0,354	0,7	0,0059	34,286	364,286		10,714
26	302S6	9,0	31,5	0,795	0,7	0,0008	21,621	170,690		5,690
27	302S7	7,4	32,3	0,552	1,6	0,0005	3,596	66,987		3,526
28	302S8	9,7	14,9	0,863	0,9	0,0011	21,667	160,000	16,333	16,333
29	302S9	9,2	15,4	0,395	0,5	0,0012	17,430	302,113	19,289	19,289
30	272S1	7,8		0,560	4,0	0,0023	37,079	324,438	22,247	22,247
31	272S2	6,0	8,5	0,509	5,4	0,0029	16,685	179,213	5,500	5,500
32	272S3	9,8	16,4	0,714	4,1	0,0038	12,012	184,800	9,504	9,504
33	273S1	4,0	9,5	0,463	2,1	0,0077	22,306	275,000	20,778	20,778
34	294S1	4,3	9,8	0,612	1,8		10,257	75,811	6,689	6,689
35	294S2	5,4	7,6	0,919	3,6	0,0034	19,760	207,485	9,090	9,090
36	294S3	4,3	14,1	0,345	4,3	0,0072	14,982	198,405	16,601	16,601
37	295S1	8,8	17,0	0,427	1,7	0,0023	11,910	158,797	7,146	7,146
38	295S2	5,5	15,0	0,888	0,8	0,0068	15,000	166,667	15,000	15,000
39	295S3	8,6	13,9	0,811	3,4	0,0045	12,632	142,105	7,895	7,895
40	296S1	6,7	17,7	0,724	5,9	0,0034	4,908	78,974		2,821
41	296S2	8,6	24,5	0,827	1,2	0,0020	4,324	79,655	3,414	3,414
42	296S3	20,6	16,2	0,789	5,7	0,0049	15,968	171,505	6,505	6,505
43	296S4	9,9	21,4	0,797		0,0039	17,722	201,667	12,833	12,833
44	296S5	11,3	22,9	0,317	1,1	0,0057	113,321	740,943	47,943	47,943
45	296S6	7,5	38,5	0,492	2,4	0,0014	8,667	110,000	5,333	5,333
46	296S7	7,0	13,9	1,068	1,3	0,0007	22,811	220,507	15,207	15,207
47	296S8	6,3	32,7	0,769	5,2	0,0068	31,132	264,623	15,566	15,566
48	296S9	5,0	5,3	1,589	3,0	0,0011	41,250	381,944	24,444	24,444
49	298S1	6,7	12,2	0,561	2,7	0,0019	14,589	159,789	8,337	8,337
50	298S2	5,5	8,0	1,099	9,2	0,0034	18,857	179,143		7,857
51	298S3	6,6	13,2	0,483	1,7	0,0017	10,518	105,179	6,311	6,311
52	299S1	3,8	8,1	0,953	4,1	0,0035	25,667	247,500	12,833	12,833
53	299S2	8,0	13,9	0,814	2,2	0,0013				
54	299S3	6,4	7,0	0,834	16,1	0,0028	12,107	144,497	8,982	8,982
55	299S4	5,9	8,8	0,645	7,4	0,0048	41,250	422,321	32,411	32,411

MT: $\mu\text{g mg}^{-1}$; ALA-D: $\text{ng min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; CYP1A: OD_{450} ; EROD: $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; PAH: $\mu\text{g kg}^{-1} \text{OD}_{380}^{-1}$

Vedlegg 6. Bearbejdede data for torsk

	Prøve	Vitellogenin	MT	ALA-D	CYP1A	ERODLever	ERODNyre	1-OH-fenantren	1-OH-pyren	3-OH-B[a]P	3-OH-B[a]P mod
1	272T1	1276	7,3	28,7	0,035	1,4	0,0009	8,938	137,500	6,875	6,875
2	272T2	1547	7,2	38,7	0,054	11,1	0,0004				
3	272T3		6,0	42,3	0,044	16,1	0,0003	4,628	61,372		5,030
4	272T4	976	7,6	30,5	0,051	11,9	0,0006		41,027		4,459
5	272T5	1687	7,3	31,4	0,042	13,2	0,0002		57,750		5,156
6	272T6	1909	6,5	47,0	0,070	6,1	0,0053		84,857		23,571
7	294T1	923	8,3	35,5	0,039	1,1	0,0003	4,988	52,762		4,797
8	294T2	1078	6,7	49,7	0,030	2,5	0,0003	9,538	77,254	5,150	5,150
9	294T3	1983	7,0	54,9	0,049	5,8	0,0002	4,870	69,578		4,970
10	294T4	1473	5,1	39,6	0,041	3,3	0,0003	10,027	102,808	7,869	7,869
11	294T5	1009	8,6	24,8	0,041	2,2	0,0004				
12	294T6	1236	4,6	50,1	0,029	2,0	0,0007	5,042	87,083		7,639
13	295T1	2710	7,7	44,1	0,036	9,0	0,0003	5,328	61,875		8,594
14	295T2	1790	8,9	32,4	0,032	0,2	0,0004		72,303		9,270
15	295T3	1400	7,4	34,2	0,040	3,8	0,0003	6,600	77,000		11,000
16	295T4	1203	6,5	52,4	0,036	3,5	0,0001	2,447	30,000		1,974
17	295T5	2400	5,1	45,5	0,040	5,6	0,0012	3,482	42,321		2,679
18	295T6		3,4	26,6	0,022	0,2	0,0074	3,853	47,919	3,952	3,952
19	296T1	2954	6,6	41,1	0,032	20,4	0,0025		61,875		11,458
20	296T2	2591	4,8	43,4	0,031	6,7	0,0003		68,095		4,365
21	296T3	516	7,4	43,5	0,054	12,8	0,0006	4,740	49,227		4,558
22	296T4	2416	4,6	56,1	0,049	6,7	0,0003	7,522	63,088	6,309	6,309
23	296T5	1221	5,9	41,4	0,039	2,8	0,0015	3,046	27,560		3,626
24	296T6	1439	5,5	38,5	0,061	4,3	0,0002	13,063	82,500		8,594
25	400T1	2940	5,9	48,0	0,059	9,7	0,0016		57,200		11,000
26	400T2	2379	7,8	30,4	0,036	1,7	0,0003	7,875	91,875		9,375
27	400T3	1498	7,8	49,3	0,085	7,3	0,0003	5,447	75,291		8,010
28	400T4	1245	6,9	39,9	0,050	15,7	0,0008	7,104	87,083		11,458
29	400T5	1583	9,5	31,1	0,050	6,5	0,0002	5,066	58,618	5,717	5,717
30	400T6	1479	7,0	42,3	0,064	11,4	0,0002	6,165	77,967	5,440	5,440
31	297T1	1919	3,0	30,2	0,122	3,7	0,0045				
32	297T2	2902	3,5	33,3	0,072	17,6	0,0044	18,816	289,474	15,921	15,921
33	297T3	2169	3,5	41,4	0,067	13,8	0,0011	41,250	357,500	22,000	22,000
34	297T4	1762	6,1	19,5	0,140	2,8	0,0034	8,288	165,753	11,301	11,301
35	297T5	2793	3,8	14,3	0,493	3,7	0,0010	18,629	292,742	49,234	49,234
36	297T6	2266	7,2	17,6	0,196	5,2	0,0016		292,188	24,063	24,063
37	298T1	1241	5,4	8,3	0,883	1,0	0,0004	9,188	206,250	24,375	24,375
38	298T2	1200	7,0	16,6	0,236	7,1	0,0041	19,609	454,348	33,478	33,478
39	298T3	1803	3,5	24,1	0,150	12,1	0,0036	9,180	161,278	7,071	7,071
40	298T4	2367	5,5	13,6	0,073	8,2	0,0010	8,830	169,459	5,173	5,173
41	298T5	1871	5,0	12,0	0,309	4,8	0,0005				
42	298T6	1949	6,4	30,8	0,226	9,5	0,0001	8,319	235,714	12,063	12,063
43	299T1	3748963	5,7	30,1	0,182	5,5	0,0035	12,058	120,577		3,173
44	299T2	2266	2,4	16,0	0,522	19,3	0,0178	22,275	217,250	203,500	203,500
45	299T3	12600680	9,4	42,5	0,052	3,2	0,0004		55,000		11,000
46	299T4	1455480	5,4	16,9	0,261	6,4	0,0064		165,000	10,861	10,861
47	299T5	1387	4,7	31,6	0,181	11,5	0,0051	14,198	249,419	16,116	16,116
48	299T6		5,8	14,3	0,205	21,9	0,0040				
49	300T1	2422	4,6	12,3	0,137	5,3	0,0048	10,536	182,892	16,301	16,301
50	300T2	1725	5,4	17,1	0,122	5,8	0,0057	25,255	353,571	18,520	18,520
51	301T1	2816	3,9	17,8	0,167	8,2	0,0015	15,918	252,353	31,059	31,059
52	301T2	1167	8,2	17,8	0,171	11,3	0,0053	23,023	345,349	56,279	56,279
53	302T1	971	5,7	39,1	0,230	10,8	0,0051	11,710	283,871	19,516	19,516
54	302T2	1354	7,3	28,7	0,252	13,1	0,0028	10,065	94,050	14,355	14,355
55	303T1	3147	6,6	14,8	0,184	3,9	0,0013	10,638	217,105	13,461	13,461
56	303T2	3369	4,5	27,1	0,355	14,2	0,0070	22,611	296,389	29,028	29,028
57	304T1	1268032	4,4	25,2	0,124	6,8	0,0019	50,400	344,400		21,000
58	304T2	986597	5,0	41,2	0,210	7,0	0,0017	14,208	192,500	4,537	4,537
59	304T3	64877	4,7	30,1	0,076	26,7	0,0017	20,277	230,602	4,373	4,373
60	304T4	3793	5,2	22,3	0,122	9,4	0,0005	8,938	130,625	4,744	4,744

Vitellogenin: ng ml⁻¹; MT: µg mg⁻¹; ALA-D: ng min⁻¹ mg⁻¹; CYP1A: OD₄₅₀; EROD: pmol min⁻¹ mg⁻¹; PAH: µg kg⁻¹ OD₃₈₀⁻¹

Vedlegg 7. Kjemikalieliste

Kjemikalier	Produktnr	Leverandør
Albumin, Bovint	A9647	Sigma-Aldrich
Albumin, Bovint (Frysetørket)	86959	Bio-Rad
Ammoniakk-løsning	105432	Merck
Ammoniumklorid	101145	Merck
Anti-torsk Vg antiserum (Julia)	-	Gitt av Christer Silversand Universitetet i Göteborg
Aprotinin	A6279	Sigma-Aldrich
Coating/Standard Torsk Vitellogenin	-	Intern NIVA
δ -Aminolevulinsyre hydroklorid	A3785	Sigma-Aldrich
DC Protein Assay	500-0116	Bio-Rad
Ditiotreitol	D0632	Sigma-Aldrich
Eddiksyre	6001	J.T.Baker
Ehrlich's reagens	D8904	Sigma-Aldrich
Etanol rektifisert	-	A/S Vinmonoploet
Etoksyresorufin	E3763	Sigma-Aldrich
Geit anti-kanin IgG (H+L) Pepperrot peroksidase	172-1019	Bio-Rad
Geit anti-mus IgG (H+L) Pepperrot peroksidase	172-1011	Bio-Rad
Glycerol	G7893	Sigma-Aldrich
Heksaminkobolt(III)klorid	H7891	Sigma-Aldrich
Heparin	H3393	Sigma-Aldrich
Kanin anti-fisk CYP1A peptid polyklonalt antistoff CP-226	C02401201	Biosense Laboratories
Karbonat-bikarbonat bufferkapsler	C3041	Sigma-Aldrich
Kvikksølv	104403	Merck
Kvikksølv(II)-klorid (Sublimert)	104419	Merck
Metallotionein fra kaninlever	M7641	Sigma-Aldrich
Mus anti-torsk CYP1A monoklonalt antistoff NP-7	C02406101 (Cyp-01)	Biosense Laboratories
NADPH	N1511	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat Dibasisk	S9763	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat Monobasisk	S8282	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	106404	Merck
Perklorsyre	100519	Merck
Porfobilinogen	P1134	Sigma-Aldrich
Protein Assay Reagent A (alkalin kobbertartarat løsning)	500-0113	Bio-Rad
Protein Assay reagent B (fortynnet Folin reagens)	500-0114	Bio-Rad
Resorufin	R3257	Sigma-Aldrich
Svovelsyre	100731	Merck

Fortsettelse kjemikalieliste.

Kjemikalier	Produktnr	Leverandør
TMB PLUS	4390A	Kem-En-Tech Diagnostics A/S
Trikloriddiksyre	100807	Merck
Triton® X-100	X-100	Sigma-Aldrich
Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich
Trizma® Hydroklorid	T3253	Sigma-Aldrich
Tween®-20	P1379	Sigma-Aldrich

Øvrige kjemikalier var av analytisk kvalitet

Vedlegg 8. Utstyr

Eppendorf Centrifuge 5810 R	Brinkmann Instruments
RC5C kjølesentrifuge	Sorvall Instruments
Biofuge 28 RS	Heraeus sepatech
Sentrifuge for eppendorf	NIVA
SS-34 rotor	Sorvall Instruments
SM-24 rotor	Sorvall Instruments
Rotor #3740 eppendorf	Heraeus sepatech
Rotor #3744	Heraeus sepatech
MS1 minishaker	IKA
QBT2 varmeblokk	Grant
Pipetter	Biohit Proline
Sc2 mikrovækt	Sartorius
Potter-Elvehjem Teflon® homogeniseringssett	-
Microtest plate 96-brønner Flat bunn	Sarstedt
SOFTmax v2.32 1992	Molecular Devices Corp.
F96 Cert. Maxisorp Nunc-immuno plate	Tamro Medlab AS
Thermo max Microplate reader	Molecular Devices Corp.
SkannerWasher300	Skatron Instruments
757 VA Computrace v1.0	Metrohm Ion Analysis
Metrohm 663 VA Stand Polarograf	Metrohm
µAutolab typeII potentiostat/galvanostat	Eco Chemie B.V.
IME663 rører/bobler	Eco Chemie B.V.
Cytofluor 2300-Series System Versjon 2B2	Astroscan Ltd.
Cytofluor™2300 Fluorescence Measurement System	Millipore
Symmetry®C18 (3,9x150mm, 5µm) kolonne	Waters, Milford, MA, USA
Vydac 201TP5415 kolonne	-
Perkin-Elmer LS-4 detektor	Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK
Shimadzu RF-10A XL detektor	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kanyler og sprøyter	Terumo® Europe
Nunc kryorør	Tamro Medlab AS
eppendorfrør	Treff AG
Novaspec II spektrofotometer	Pharmacia LKB
Statistica® software, versjon 6.1	Statsoft

Vedlegg 9. Buffere og løsninger

Homogeniseringsbuffer	
(til lever og nyreprøvene)	
K-fosfatbuffer	(0,1 M)
KCl	(0,15M)
DTT	(1 mM)
Glyserol	(5%)
<i>pH 7,7</i>	

Resuspenderingsbuffer	
(til mitokondriefraksjonen)	
K-fosfatbuffer	(0,1 M)
KCl	(0,15M)
<i>pH 7,7</i>	

Resuspenderingsbuffer	
(til mikrosomalfraksjonen)	
K-fosfatbuffer	(0,1 M)
KCl	(0,15M)
EDTA	(1 mM)
Glyserol	(20%)
<i>pH 7,6</i>	

Fortynningsbuffer	
(til proteinanalysene)	
Tris-Buffer	(0,1M)
<i>pH 8,0</i>	

Fortynningsbuffer	
(til EROD lever)	
K-fosfatbuffer	(0,1M)
<i>pH 7,6</i>	

Fortynningsbuffer	
(til EROD nyre)	
Na-fosfatbuffer	(0,1M)
<i>pH 7,8</i>	

Fortynningsbuffer	
(til ALA-D)	
fosfatbuffer	(0,1M)
triton x-100	(2,5%)
<i>pH 7,0</i>	

Fellingsreagens	
(til ALA-D)	
Triklorreddiksyre	4,0 g
HgCl ₂	2,7 g
<i>til 100ml med dH₂O</i>	

Ehrlichs reagens	
(til ALA-D)	
HgCl ₂	0,35 g
Ehrlichs reagens	2,0 g
perklorsyre 70%	20 ml
eddiksyre	84 ml
dH ₂ O	6 ml

Fortynningsløsning	
(til MT)	
NaCl	(0,9%)

Elektrolytt	
(til MT)	
Heksaminkoboltklorid	0,321 g
Ammoniumklorid	53,4 g
Ammoniakk 25%	154 ml
<i>dH₂O til 1 liter</i>	

Coatingbuffer	
(til CYP1A)	
karbonat-bikarbonatbuffer (kapsel)	(0,05 M)
<i>pH 8,7</i>	

Coatingbuffer	
(til vitellogenin)	
karbonat-bikarbonatbuffer	(0,05 M)
<i>pH 9,6</i>	

TTBS	
Tris-Buffer	(20 mM)
NaCl	(0,5 M)
Tween-20	(0,0005%)
<i>pH 8,5</i>	

Blokkeringsløsning	
(til CYP1A og vitellogenin)	
TTBS	
Bovint serumalbumin	(1%)

Antistoffbuffer	
(til CYP1A og vitellogenin)	
TTBS	
Bovint serumalbumin	(0,1%)