

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord

Kristoffer G. Bergland



Masteroppgave i økotoxikologi

UNIVERSITETET I OSLO

september 2012

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord

© Kristoffer Glosli Bergland

2012

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord

Kristoffer Glosli Bergland

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg er meget takknemlig for at jeg har fått god veiledning og støtte under arbeidet med denne oppgaven. Det har tidvis vært mye å bite over, men ved kyndig hjelp har jeg kommet meg gjennom det. Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Ketil Hylland for å bistå med veiledning når jeg har trengt det, enten han var på kontoret eller via skype i utlandet. Jeg skylder og en stor takk til Tor Fredrik Holth for at han ikke har blitt synlig lei av mine behov for bistand både på lab, med statistikk og skriving selv om det har blitt mye forespørsler om hjelp. Merete Grung fortjener også en stor takk for god hjelp med analysearbeidet på NIVA. Takk også til mannskapet på Trygve Braarud for hjelp til innsamling av prøver.

Jeg er og takknemlig for muligheten til å delta i et langtidsovervåkningsprosjekt. Jeg valgte å studere økotoksikologi siden jeg ønsker å ha kunnskap som kan brukes praktisk hvilket jeg har fått muligheten til i denne oppgaven.

Jeg må og takke medstudenter for å ha gjort lange lettere, spesielt de som har lest oppgaven og gitt feedback. Sist men ikke minst ønsker jeg å takke venner og familie som har vist støtte og interesse for arbeidet mitt, mest av alt Camilla som har vært ubeskrivelig tålmodig og fantastisk støttende.

Sammendrag

Organismer som lever i Oslofjorden eksponeres for kjemikalier som kan ha negative effekter. I denne undersøkelsen ble biomarkører for effekter fra eksponering for miljøgifter og kondisjonsindekser nøkkelarten torsk (*Gadus morhua*) undersøkt som en del av langtidsovervåkingen av miljøtilstanden i indre Oslofjord. Torsk ble fanget i indre og ytre Oslofjord (referanseområde). Det ble benyttet biomarkører som kan gi et bilde av effekter fra nevrotoksiske stoffer, metaller generelt, bly, og ulike organiske stoffer som PCB og PAH-er, samt ekspresjon av effektrelaterte gener. Fysiologiske indekser som LSI, GSI og kondisjon ble brukt for å undersøke helsetilstand. Torsk fra indre Oslofjord hadde signifikant lavere LSI enn torsk fra ytre Oslofjord. Biomarkøranalyser viste torsk fra indre Oslofjord utsettes for høyere eksponering for PAH-er i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Torsk i indre Oslofjord også hadde høyere mengde CYP1A mRNA, CYP1A protein samt CYP1A aktivitet (EROD) enn torsk fra ytre Oslofjord. Det viser torsk i indre Oslofjord opplever jevn eksponering for stoffer som PAH-er og PCB-er som kan inducere CYP1A. En signifikant oppregulering av vitellogenin mRNA hos hanner i indre Oslofjord indikerer og at det kan være stoffer som forstyrrer hormoner blant hanner i indre Oslofjord. Det var ikke forskjeller i acetylkolinesterase hvilket viser at det enten er mindre effekter av pestisider enn tidligere år, eller at det er en jevnere eksponering mellom indre og ytre Oslofjord. Effekter fra blyeksponering var ikke forskjellig mellom indre og ytre Oslofjord, hvilket tyder på at det har vært en nedgang i effekter av bly. Undersøkelsen viste at det torsk har høyere eksponering for miljøgifter i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Oslofjorden	1
1.2	Torsk.....	2
1.3	Biomarkører.....	3
1.4	Mål og hypoteser	7
2	Materialer og metoder	9
2.1	Prøveinnsamling	9
2.2	Aldersbestemmelse	11
2.3	Indekser	11
2.4	Opparbeiding av lever, muskel og blod.....	12
2.5	Proteinanalyse.....	12
2.6	Acetylkolinesterase.....	13
2.7	Aminolevulinsyre dehydratase aktivitet (ALA-D) i røde blodceller.....	14
2.1	PAH metabolitter i galle	14
2.2	EROD aktivitet i lever	15
2.3	ELISA (CYP1A).....	16
2.4	Isolering av RNA, cDNAsyntese og rtPCR.....	17
2.4.1	RNA isolering	17
2.4.2	Bioanalyser.....	17
2.4.3	cDNA syntese.....	18
2.4.4	RT-qPCR.....	18
2.5	Statistikk	20
3	Resultater.....	21
3.1	Fysiologiske parametere	21
3.1.1	Kjønn, alder, vekt og lengde	21
	Alder.....	21
	Vekt og lengde	22
3.1.2	Lever-somatisk indeks (LSI), kondisjon og gonadosomatisk indeks (GSI).....	23
3.2	Acetylkolinesterase aktivitet i muskel.....	25
3.3	Aminolevulinsyre dehydratase aktivitet (ALA-D) i røde blodceller.....	26
3.4	PAH metabolitter	26

3.5	EROD (etoksyresorufin <i>O</i> -deetylase) aktivitet i lever	28
3.6	Mengde CYP1A protein i lever	29
3.7	Genekspresjon i lever	29
3.8	Korrelasjoner mellom kondisjon og biomarkørresponser	32
3.9	Korrelasjon mellom protein, enzymatisk aktivitet og genuttrykk	32
4	Diskusjon.....	34
4.1	Kondisjon og vevsindekser.....	34
4.2	Effekter av nevrotoksiske stoffer.....	36
4.3	Effekter av bly	38
4.4	PAH metabolitter	39
4.5	Effekter av plane organiske miljøgifter (påvirkning av cytokrom P4501A).....	40
4.5.1	Cytokrom P4501A aktivitet (EROD).....	40
4.5.2	CYP1A konsentrasjon	42
4.6	Genekspresjon	43
4.6.1	CYP1A	43
4.6.2	UDP glukuronosyltransferase (UDPGT)	44
4.6.3	Metallotionein (MT), varmesjokkprotein (HSP70) og hem oksygenase (HO-1) 44	
4.6.4	Vitellogenin (Vtg)	45
4.7	Sammenhenger	46
5	Konklusjoner	49
6	Videre arbeid	51
	Litteratur.....	52
	Vedlegg	63

1 Introduksjon

1.1 Oslofjorden

Oslofjorden er resipient for kjemikalier som kan gi negative effekter på organismer. Eksosnedfall, utslipp fra rensesanlegg, industriutslipp, avrenning fra urbane områder, forurenset grunn og deponier samt atmosfærisk nedfall er kilder til utslipp i Oslofjordområdet. Det medfører at vannmassene får en tilførsel av tungmetaller, polyaromatiske hydrokarboner (PAH) og polyklorinerte bifenyler (PCB), næringsalter og pesticider (Green et al. 2011; Ranneklev et al. 2011; Berge et al. 2011a). Studiet som er beskrevet her er et bidrag til en pågående overvåking av miljøtilstanden i indre Oslofjord. I dette studiet ble det analysert et spekter av biomarkører i torsk som kan indikere eksponering for ulike miljøgifter. Det ble benyttet biomarkører som kan gi et bilde av effekter fra PCB, dioksiner, PAH, noen plantevernmidler, metaller generelt og bly. Det overordnede målet var å undersøke eventuelle effekter av miljøgifter på torsk fra indre Oslofjord. Torsk fra ytre Oslofjord ble benyttet som en referansepopulasjon.

Oslofjorden strekker seg igjennom et befolket område fra Oslo til Færder fyr (Baalsrud et al. 2002). Den kan deles inn i indre og ytre Oslofjord. Grensen mellom indre og ytre Oslofjord går ved Drøbak. Utenfor Drøbak er det en terskel med maksimal dybde på 19,5 meter, noe som begrenser vannutskiftningen i indre Oslofjord (Andersen et al. 1970; Breivik et al. 2004). Det kan føre til at miljøgifter delvis stenges inne i indre Oslofjord som får høyere konsentrasjoner enn i ytre Oslofjord (Breivik et al. 2004). Bly (Pb), kvikksølv (Hg), kadmium (Cd) PAH, PCB, perfluoreerte organiske forbindelser (PFC), bromerte flammegemmere (BFH), Bisfenol-A, alkylfenoler er påvist i organismer, sedimenter og/eller vannmasser fra Oslofjorden (Ranneklev 2009; Green et al. 2011; Ranneklev et al. 2011; Berge et al. 2011a). Utslipp fra kloakkrensingsanlegg fra tett befolkede områder har vist seg å være en kilde til blant annet østrogen og antibiotika som kan påvirke organismer ved å forstyrre hormonregulering (Sumpter 1995). Konsentrasjonen av bly (Pb) i torskelever overskrider det man antar er høye bakgrunnsnivå og er moderat forurenset (klasse II). Det har vært en tendens til reduserte konsentrasjoner bly fra 2001 til 2010 (Green et al. 2011). Det har vært en tendens til økende konsentrasjoner av kvikksølv (Hg) i muskel fra torsk mellom 1984 og 2010, men det har ikke vært en trend mellom 2001 og 2010 (Green et al. 2011). Konsentrasjonen av Hg i muskel fra torsk tilsvarer moderat forurenset (klasse II). Det har vært økende konsentrasjon av kadmium

(Cd) i torskelever de siste tyve årene, men konsentrasjonen er innenfor bakgrunnsnivået (klasse I) (Green et al. 2011). Utslipp av polyaromatiske PAHer i Norge har blitt redusert med 64% siden 1995 (Sørensen 2011). Det har allikevel vært målt betraktelig høyere konsentrasjoner PAH-metabolitter i torsk fra indre sammenlignet med ytre Oslofjord (Berge et al. 2011a). Eksosnedfall fra marine fartøy i sammen med utslipp og avrenning fra landbasert industri og små forbrenningskilder er sannsynlige kilder til utslipp av pyrogene PAHer i Oslofjorden (Ariese et al. 2005; Pies et al. 2008; Beyer et al. 2010). Konsentrasjonene av polyklorinerte bifenyloler (PCB) i omløp har blitt redusert siden det ble lagt restriksjoner på bruk og produksjon på 80-tallet (Sørensen 2011). PCB i konstruksjoner og utstyr har fra 1980 til 2009 blitt redusert fra 1300 tonn til 135 tonn, men det anslås at det finnes omkring 70 tonn PCB som forurensere grunn og sedimenter ved ulike lokaliteter i Norge (Sørensen 2011). Områder med verft og høy skipstrafikk er spesielt utsatt og det er fortsatt PCB som forurensere grunnområder og akvatiske økosystem som Oslofjorden (Sørensen 2011). Konsentrasjoner av PCB i fisk fra Oslofjorden, har ledet til kostholdsråd for bruk av fisk som mat (Green et al. 2011). På grunn av PCB-innholdet er det i dag anbefalt å unngå å spise ål og lever fra annen fisk fanget innenfor Drøbak (Green et al. 2011). PCB i torskefilet fra indre Oslofjord har hatt en økende trend fra 2001 til 2010 og er moderat forurenset (klasse II) (Green et al. 2011). PCB i torskelever fra indre Oslofjord har ikke hatt noen tydelig trend mellom 2001 og 2010 og er markert forurenset (klasse III) (Green et al. 2011).

1.2 Torsk

Å bruke en indikatororganisme er hensiktsmessig i det at det gir en effektiv måte å overvåke miljøtilstanden (van der Oost et al. 2003). Å bruke en nøkkelart som er vanlig i mange havområder gir fordeler ved at det kan gi et sammenligningsgrunnlag med andre overvåkningsprogrammer og forsøk. Det gjelder spesielt dersom det er en organisme som brukes i flere studier. Overvåking av effekter fra miljøgifter på torsk i indre Oslofjord har blitt gjort tidligere i 2002, 2008 og 2009 (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011; Berge et al. 2011a). Torsk er en nøkkelart med relativt stasjonær livsstil som kan holde seg innen samme habitat over lengre perioder. Den er utbredt langs hele norskekysten og populasjoner finnes i de fleste fjorder i Norge (Hop et al. 1992). Torsk har en signifikant habitatsdifferensiering langs hele norskekysten hvilket indikerer at de deler seg inn i distinkte grupper (Knutsen et al. 2003). Av den grunn vil torsk som oppholder seg i et område være relevant som indikatorart for eventuell forurensingsbelastning i aktuelle område. Når de lever i områder forurenset av

miljøgifter vil torsk kunne ta opp slike stoffer både direkte fra vann og gjennom inntak av byttedyr (Hugula et al. 1995; Knutsen et al. 2003; Aarre 2008; Thoresen 2008; Grung et al. 2009). Torsk spiser en rekke ulike byttedyr som skalldyr, bløtdyr og fisk (Hop et al. 1992). Torsk i kommersielt fiske har vært og er fortsatt av stor betydning for mange kystsamfunn. Det ble i 2010 fisket 283 310 tonn med torsk til en verdi av 3 mrd kroner (Kystdepartementet 2011). Det gjør den til en betydningsfull art kommersielt i tillegg til økologisk (Kystdepartementet 2011). Å overvåke miljøgifttilstanden for torsk vil være viktig ettersom miljøgiftbelastning kan påvirke økologiske funksjoner, men også ha potensielle helseeffekter for mennesker som spiser den .

1.3 Biomarkører

En mulighet for å vurdere forurensing er å bruke kjemisk analytiske metoder til å kvantifisere nivåer av miljøgifter. En utfordring er at det ikke alltid er en klar sammenheng mellom nivåer av et kjemikalie og effekten det har og det er vanskelig å vurdere forurensing av et stoff hvis det ikke er en analysemetode eller hvis analysemetoden har for høy deteksjonsgrense (Thain et al. 2008). Siden det slippes ut over 100 000 ulike antropogene stoffer hvert år og vi ikke har metoder for alle vil det være en stor mulighet for at man ikke oppdager negative effekter (Thain et al. 2008). Dette gjelder spesielt dersom negativ effekt er et resultat av små konsentrasjoner fra mange forskjellige stoffer med additive, antagonistiske, potensierte eller synergiske effekter (Thain et al. 2008). Kjemisk analytisk kvantifisering alene sier noe om belastning uten nødvendigvis å gi noen indikasjon på at det skjer en biologisk respons i organismen. Risikovurdering på bakgrunn av dette må baseres på hva som antas å ha effekt snarere enn observasjoner av faktisk effekt. Å bruke biomarkører vil være en god strategi å benytte seg av for å undersøke om det er effekter av miljøgifter på organismer (van der Oost et al. 2003; Thain et al. 2008).

Biomarkører er biokjemiske, cellulære eller fysiologiske endringer i organismer som brukes for å undersøke kjemikaliers påvirkning. Biomarkører er en samlebetegnelse for metoder som benyttes for å kvantifisere biologiske effekter miljøgifter har på organismer og ikke tilstedeværelsen av miljøgifter alene (van der Oost et al. 2003). Biologiske effekter kan variere fra sub-cellulære biomarkører til responser for hele organismen som vekst og helsetilstand. Vurdering av biologiske effekter fra kjemikalier kan benyttes til å påvise tilstedeværelse av farlige stoffer eller redusert miljøkvalitet. Biomarkører kan benyttes for å undersøke effekter

på organismenivå som kan være relevante for populasjons eller økosystemnivå, men for å knytte responser på lavere nivå som cellulære eller vevseffekter til populasjons eller andre faktorer utelukkes som forklaringer (van der Oost et al. 2003; Thain et al. 2008). Biomarkører kan klassifiseres som spesifikke eller uspesifikke (Monserrat et al. 2003; van der Oost et al. 2003; Monserrat et al. 2007). En ulempe ved biologiske effektmarkører er at det kan være vanskelig å knytte effekten til et spesifikt stoff. Biologisk effektovervåking vil derfor ikke være en enkeltstående løsning, men en nødvendig metode for vurdering av eksponering for skadelige stoffer i et område. Det kan brukes til å vurdere om man bør undersøke kjemikalier og effekter i større grad, eventuelt hva slags tiltak som må iverksettes (van der Oost et al. 2003; Thain et al. 2008). En fordel med biomarkører er at de raskt kan påvise at en effekt tar sted selv om mange kjemikalier som fungerer i kombinasjon (van der Oost et al. 2003). Det gjør det mulig å se etter responser uten å kvantifisere spesifikke stoff og man kan benytte dem som et tidlig varselstegn på forurensing (van der Oost et al. 2003).

Fultons indeks (kondisjon), leversomatisk indeks (LSI) og gonadosomatisk indeks (GSI) ble benyttet for å vurdere helsetilstand. Kondisjon vil være et mål for hvor mye energi som er tilgjengelig for vekst (Koops et al. 2004). Kondisjon hos fisk kan kvantifiseres basert på fiskens størrelse og vekt, samt vekten sett i forhold til størrelse og vekt på gonader og lever. LSI og kondisjon er mål som brukes for å gi en indikator på kondisjon og vekst (Lambert et al. 1997 (b)). LSI kan gi informasjon om opplagsnæring fisken har tilgjengelig (Lambert et al. 1997 (b); Grant et al. 1999). Torsk med lav kondisjon kan ha vært utsatt for dårlige miljøforhold, dårlig mattilgang eller infeksjoner (Lambert et al. 1997 (b)). GSI gir informasjon om reprodutiv status. Gonader vokser frem til gytetid og kan medføre omdannelse av opplagsnæring (Eliassen et al. 1982). GSI ble også undersøkt for å kunne utelukke reprodutiv status som eventuell påvirkende faktor på biomarkør-responser.

Hemming av acetylcholinesterase (AChE) brukes som biomarkør hos fisk for eksponering av sprøytemidler som karbamater og organofosfater (OP) (van der Oost et al. 2003; Ferrari et al. 2007). AChEaktivitet inhiberes av sprøytemidler som karbamater og OP. Karbamater og OP brukes innen arbeid på jordbruk og ved avrenning fra land kan dette ende opp i akvatiske områder og organismer (Fulton et al. 2001; Gray et al. 2004). Hemming av AChE i muskelfibre kan føre til overstimulering ved at nevroreseptoren acetylcholin (ACh) opphopes i synapsene og signalisering fra nerveceller blir ikke stanset. Det kan lede til tetanus, paralysering og død, men også sub-letale effekter som endret svømmeatferd, redusert utholdenhet (Kirby et al. 2000; Fulton et al. 2001; van der Oost et al. 2003). Både hjernevev

og muskelvev kan brukes til å undersøke AChEhemming i fisk. Hos noen arter er muskelvev like sensitivt som hjernevev, mens i andre er muskelvev betydelig mindre sensitivt (Fulton et al. 2001). Muskler er allikevel mer egnet som biomarkør for effekt på mortalitet siden fisk kan overleve høy grad av kolinesteraseinhibering i hjernen, men om det foregår i muskulatur kan det lede til lammelse av gjellemuskulatur og kolinerigisk induisert bradikardy (Ferrari et al. 2007). Muskelvev er lett å dissekere ombord en båt og det er mye vev tilgjengelig hvilket gjør det egnet til feltstudier (Galgani et al. 1992; Sole et al. 2008).

Delta-aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) er et enzym i hemsyntesen som er viktig for dannelsen av hemgrupper. ALA-D hemmes av bly, og ble brukt som biomarkør for blyeksponering (Hodson et al. 1977; Hodson et al. 1984; Hylland 2004; Hylland et al. 2009). ALA-D i blod ble benyttet for å undersøke om det er effekter av bly i torsk fra indre Oslofjord. Blyeksponering kan føre til nevrotoksisitet, endring i bentetthet og misdannelser i benstruktur hos fisk (Dwyer et al. 1988; Schmitt et al. 2002).

For å undersøke eksponering for PAHer ble kvantifisering av PAHmetabolitter i torsk benyttet. PAHer akkumuleres ikke i særlig grad i vertebrater siden det metaboliseres effektivt i fase 1 biotransformasjon. Kjemisk analyse av vev vil derfor ikke være en god indikator på eksponering i fisk. Måling av PAH metabolitter ble derfor benyttet for å undersøke PAH eksponering for torsk i Oslofjorden (Aas et al. 2000; Aas et al. 2001; Ariese et al. 2005; Grung et al. 2009; Beyer et al. 2010). Skadeeffekter knyttet til PAH eksponering er effekter på immunforsvar, teratogenese, misdannelser i skjellett mutagenese neoplasmer og tumorer på fiskelever og redusert overlevelse (Aas et al. 2000; Myers et al. 2003; Hylland 2006; Shi et al. 2012). Skader kan i en viss grad knyttes til metabolisering. PAH kan føre til dannelse av reaktive metabolitter som kan lede til DNA addukter (Myers et al. 2003; Ariese et al. 2005; Beyer et al. 2010). PAHerer utbredt i akvatiske miljø og kan være skadelig for mikroalger, kopepoder, muslinger og fisk (Incardona et al. 2006; Okay et al. 2006; Petersen et al. 2008; Oliveir et al. 2012). Hos fiskeembryo kan PAH eksponering lede til misdannelser i morfogenesen av hjerte og kar systemet, men også via arylhydrokarbon-reseptor (AhR) mediert toksisitet (Incardona et al. 2004; Incardona et al. 2006; Zhang et al. 2012). Det er påvist at torsk kan få i seg PAH via både diett og vann i et dose-respons avhengig forhold hvilket gjør metoden egnet til å undersøke eksponering for PAHer hos torsk i Oslofjorden (Grung et al. 2009).

For å undersøke effekten av PAH og klororganiske miljøgifter på torsk fra indre Oslofjord ble CYP1A aktivitet, protein og mRNA mengde kvantifisert. CYP1A er en enzymfamilie i fase 1 biotransformasjon. Det er aktivt i detoksikering og ekskresjon av lipofile plane organiske miljøgifter som PCB, dioksiner, dibenzofuraner og PAH og er en tidlig kvantifiserbar effekt av organiske miljøgifter. Induksjon av CYP1A kan tyde på forurensning med PAH, PCB, dioksin og furaner (Goksøyr et al. 1992; Whyte et al. 2000; van der Oost et al. 2003). Indusering skjer ved binding av stoffer til aryl hydrokarbon reseptoren (Ah-reseptoren). Miljøgifter som PAH eller klororganiske stoffer som PCDDer, PCDFer og PCBer kan være agonister til Ah-reseptoren (Whyte et al. 2000; Di Giulio et al. 2008). CYP1A1 kan også bidra til å bioaktivere PAH og klorinerte aromatiske hydrokarboner og danne reaktive oksygenforbindelser som kan føre til oksidativt stress, DNA addukter og carcinogenese (Buhler et al. 1988; Schlezinger et al. 1999; Whyte et al. 2000; van der Oost et al. 2003). I denne undersøkelsen ble CYP1A aktivitet målt ved 7-ethoksyresorufin O-deetylase (EROD) i mikrosomer utvunnet fra lever. EROD er en biomarkør for eksponering, men det kan være at induseringen i seg selv kan være direkte relatert til skadelige effekter hos fisk (Whyte et al. 2000; Myers et al. 2003). Relativ mengde CYP1A protein ble analysert ved hjelp av ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Goksøyr 1991). Det kan være nyttig både for å gi et sammenligningsgrunnlag mellom protein og aktivitet, men også for å undersøke mulig hemming. Flere kjemikalier kan hemme CYP1A aktivitet, og måling av protein vil kunne være et nyttig verktøy for å se om det er stoffer som induserer CYP1A, selv om aktiviteten er hemmet (Goksøyr et al. 1992; Whyte et al. 2000). Veldig høye konsentrasjoner eller tilstedeværelse av flere forskjellige kjemikalier kan føre til inhibering av CYP1Aaktivitet fra stoffer som på egenhånd ville ledet til hemming (Monosson et al. 1991; Di Giulio et al. 1993; Whyte et al. 2000).

Endret genekspressjon kan være en tidlig, hurtig og sensitiv måte å måle stressresponser (Williams et al. 2003; Lie et al. 2009a). I dette studiet relativ genekspressjon i lever hos torsk undersøkt. Det relative uttrykket hos gener relatert til eksponering for miljøgifter ble analysert. Genuttrykk for CYP1A, MT, Metallothionein, Homooxygenase, Vtg HSP70 og UGT ble kvantifisert. Måling av CYP1A og UGT vil kunne ses i sammenheng med måling av PAH metabolitter, EROD og ELISA. En fordel med å bruke genekspressjon er at mye kan måles samtidig, en ulempe er at det gir et bilde fra en veldig begrenset tidsperiode.

CYP1A mRNA tas med for å gi en helhetlig vurdering av CYP1A1 påvirkning fra gen til protein til aktivitet. Økt mengde CYP1A mRNA kan gi en tidlig indikasjon på eksponering

for stoffer som PCB og PAH (Stagg et al. 2000; Arinc et al. 2001; Tom et al. 2005; Osorio-Yanez et al. 2012).

Varmesjokkproteiner (HSP) er en gruppe proteiner som bidrar å opprettholde protein homeostase og har en beskyttende effekt ved stressresponser (Basu et al. 2002). De kan induseres på grunn av patogener, temperaturøkning, UV stråling, høye konsentrasjoner av ioner, lave oksygennivåer, salinitetsrelatert stress, tungmetaller og fremmedstoffer (Williams et al. 1996; Feder et al. 1999; Basu et al. 2002; van der Oost et al. 2003).

Varmesjokkproteiner kan induseres av et bredt spekter av parametere og kan derfor vanskelig knyttes til en spesifikk eksponering eller effekt (Feder et al. 1999).

Uridin difosfat glykuronosyltransferase (UDPGT) er et fase 2 biotransformasjonsenzym. UDPGT er en viktig pathway i inaktivering og ekskresjon av endogene og xenobiotiske stoffer. Det kan detoksifisere en rekke stoffer, og induseres blant annet av PAH, PCB, OCP, PCDD og BKME. UDPGT kan også ha negative effekter, for eksempel å påvirke reproduktiv suksess ved å påvirke steroidproduksjon (Olsvik et al. 2009).

Metallotionein er et protein som binder metaller slik at de kan lagres i vev eller skilles ut (Roesijadi 1992; Olsson et al. 1995). Metallotionein er en indikator på effekter av metaller og induseres av blant annet Cd, Zn, Cu og Hg (Viarengo et al. 2000). Det er en viktig mekanisme i beskyttelse mot oksidativt stress fra metalleksponering, og er mest aktivt i organer som er involvert i opptak, lagring og ekskresjon (Olsson et al. 1995; Viarengo et al. 2000).

Konsentrasjonen av vitellogenin (Vtg) mRNA brukes i dette studiet som biomarkør for østrogeneffekter på torsk i Oslofjorden (Mellanen et al. 1999; Lattier et al. 2001; Metcalfe et al. 2001; Larkin et al. 2003; Scott et al. 2006). Vtg er forløperen til eggeplommeprotein, og opptrer primært i hunnfisk relatert til dannelsen av egg (Sumpter 1995; Mellanen et al. 1999). Det skal normalt kun uttrykkes i hunnfisk, men genet kan også uttrykkes hos hanner ved eksponering for østrogenlignende stoffer (Sumpter 1995). Det kan induseres ved eksponering for alkylfenoler, fytoøstrogener, syntetiske østrogener og noen pesticider (Larsson et al. 1999).

1.4 Mål og hypoteser

Det overordnede målet med studiet var å klargjøre om miljøgifter påvirker torsk (*Gadus morhua*) i indre Oslofjord. Ytre Oslofjord ble benyttet som referanseområde. Det var videre et mål å avklare om andre faktorer, som kjønn og alder, påvirket miljøgift-relaterte responser.

Arbeidshypotesene var:

-Det var ingen forskjell i kondisjon, leversomatisk indeks eller gonadeutvikling mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

-Det var ingen forskjeller i effekter av CYP1A-induserende miljøgifter mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

-Det var ingen forskjell i effekter av bly mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

-Det var ingen forskjell i effekter av nevrotoksiske stoffer mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

-Det var ingen forskjell i PAH-eksponering mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

-Det var ingen forskjell i ekspresjon av effekt-relaterte gener mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord.

2 Materialer og metoder

2.1 Prøveinnsamling

Torsk (*Gadus morhua*) ble samlet i indre og ytre Oslofjord ved tråling med forskningsfartøyet Trygve Braarud i perioden 22.11.10 til 25.11.10. Områder for tråling var Travbanen i ytre Oslofjord og Midtmeie i indre Oslofjord (Figur 2.1). Det ble innsamlet 40 torsk fra indre Oslofjord og 40 torsk fra ytre Oslofjord (tabell 2.1). Forsøksindividene ble holdt i vannkar med gjennomstrømning inntil prøvetaking. Tiden i karene ble begrenset til maksimalt 4 timer.



Figur 1: Kart over Oslofjorden med trålefelt vist med røde streker.

Tabell 2.1: Antall fisk av hvert kjønn ved indre og ytre Oslofjord med median alder, lengde og vekt.

Område	Kjønn	Alder (år)	Lengde (cm)	Vekt (g)	Antall
Indre Oslofjord	Hunn	3	45,75	798	22
Indre Oslofjord	Hann	4	44,75	773	18
Ytre Oslofjord	Hunn	3	48,25	1126	24
Ytre Oslofjord	Hann	3	50	1144	16

Ved prøvetaking ble individene avlivet med slag til hodet. Lengde og vekt ble deretter målt. Blodprøver ble tatt med en heparinisert 1 ml sprøyte. Heparineringen ble gjort for å hindre koagulering av blod. Blodceller ble separert fra plasma ved sentrifugering. Plasma ble så overført til kryorør med pasteurpipette og blodceller ble igjen i eppendorfrør. Begge prøvene ble fryst på flytende nitrogen. Eppendorfrørene fikk et hull på toppen for å hindre sprekking ved optining.

Gonader og involler ble dissekert ut og veid, og fisken ble igjen veid etter fjerning av de indre organer. Vekt av mage og tarm ble trukket fra kroppsvekt for å kunne beskrive somatisk kroppsvekt. Vekt av lever og gonader ble brukt til å bestemme en gonadosomatisk indeks (GSI) og leversomatisk indeks (LSI). Forholdet mellom kroppsvekt og levervekt kan brukes til å gi informasjon om helsetilstand og fultons kondisjonsfaktor (kondisjon) ble bestemt basert på forholdet mellom lengde og vekt uten innvoller. Det ble benyttet somatisk kroppsvekt for å unngå at mageinnhold skulle påvirke vekten. Gonadene ble undersøkt for å gi inntrykk av modning og kjønn. Mange av individene hadde stort mageinnhold og mye av mageinnholdet var ferskt.

Galleprøve ble tatt med en 2 ml sprøyte for å unngå søl på lever. Galleprøvene ble deretter lagret mørkt på -20 °C til ekstraksjon og analyse.

Leveren ble dissekert ut og veid. Fra hvert individ ble det tatt 3 replikate leverprøver til opparbeiding til enzym- og proteinmålinger, opparbeiding til RNA ekstraksjon og en reserveprøve. De ble fordelt på forskjellige kryorør. Leverprøvene ble tatt fra midtre del av leveren. Størrelsen på prøvene ble forsøkt holdt til ca 1 gram. Prøver av muskel ble skåret ut. Til slutt ble skallen åpnet slik at otolittene kunne tas ut. De ble lagret i 1,5 ml eppendorf rør med vann for å hindre uttørking (4 °C).

2.2 Aldersbestemmelse

Alder på torsken ble estimeres ved å å telle hyaline ringer på otolittene. Hyaline soner vokser til ved vinter hos torsk. Antallet ble benyttet for å bestemme alder. Otolittene ble knukket, filt, penslet i glycerol og brent med etanolbrenner. Antall ringer ble telt i lupe og notert. Metoden er beskrevet av Williams et al (Williams et al. 1974)

2.3 Indekser

Leversomatisk indeks og Fultons kondisjonsfaktor ble benyttet for å bestemme kondisjon. Fultons kondisjonsfaktor (K) og LSI ble her beregnet basert på somatisk kroppsvekt. Det innebærer kroppsvekt uten mageinnhold og gonader. Mageinnhold ble fjernet for at ikke fødeinntak skulle ha innvirkning på vekt og måling av kondisjon.

Leversomatisk indeks (LSI) gir levervekt som prosent av totalvekt hos fisken. Det tar utgangspunkt i at leveren vil bli større i forhold til vekt når den kan lagre opplagsnæring i form av fett.

$$\text{LSI} = (\text{levervekt/kroppsvekst}) * 100$$

Fultons kondisjonsfaktor (K) antar isometrisk vekst der fisken ikke endrer fasong når den vokser.

Fultons kondisjonsfaktor (K)

$$\text{K} = (\text{kroppsvekt/lengde}^3) * 100$$

2.4 Opparbeiding av lever, muskel og blod

Opparbeiding av mikrosomer fra lever til måling av CYP1A aktivitet (EROD) og kvantitet (ELISA) ble gjennomført basert på metode utviklet av Dignam (Dignam 1990). Leverprøver lagret på -80 °C ble tint på is. Prøvenes vekt ble notert, og i tilfeller der vekten overskred 1,3 gram ble deler skåret vekk slik at mengdene til vidre analyser skulle være så homogene som mulig. Prøvene ble overført til homogeniseringsrør og homogeniseringsbuffer (0.1M fosfat buffer (pH 7.8) med 0.15M KCl., 1mM DTT og 5% v/v glycerol) ble tilsatt inntil totalvolum utgjorde 5 ml. For prøver med vekt under 0,7 gram ble 2,5 ml brukt som totalvolum. Leverprøvene ble så homogenisert ved 1200 rpm med en Potter-Elvehjem homogenisator. Teflonpistillen ble beveget sakte opp og ned 10 ganger. Homogeniseringsrørene var på is under hele prosessen.

For å fjerne fett, cellerester og mitokondrier ble homogenatet overført til sentrifugerør for sentrifugering ved 10 000 x g ved 4°C i 30 minutter i en Multifuge 3 S-R (Heraeus). Supernatanten ble så overført til et nytt sentrifugesrør og sentrifugert ved 100 000 x g i 60 minutter ved 4°C i en Sorvall MTX 150 (Thermo Scientific).

Supernatant ble så overført til et nytt rør og distribuert i eppendorfrør for analyse, proteinmålinger og reserveprøver.

Pelleten ble overført til et nytt homogeniseringsrør med 0,5 ml mikrosomalbuffer (0.1 M fosfat buffer, pH 7,8 med 0.15 M KCl og glycerol (20% v/v)). Mikrosomene ble så homogenisert manuelt ved å rotere en glasspistill opp og ned i homogeniseringsrør 10 ganger. Rørene var i is under prosessen. Homogeniserte mikrosomer ble så fordelt på eppendorfrør til videre bruk. 100 µl ble benyttet til EROD, 50 µl til ELISA og 50 µl til protein analyse. Resten ble lagret som reserveprøver.

2.5 Proteinanalyse

Lowrys proteinanalyse ble benyttet for kvantifisering av konsentrasjon av protein (Lowry et al. 1951). Protein ble benyttet for å standardisere av biomarkørermålinger i leverprøver, blodprøver og muskelprøver.

Prøver ble tint på is og fortynnet i 0,1 M Trisbuffer pH 8.0. For å finne riktig fortynning ble 4 tilfeldige prøver testet ved ulike konsentrasjoner. Homogeniserte mikrosomer og

muskelp prøver ble fortynnet 20x for ikke å overgå mengden protein i bovint gamma globulin standardrekken. Blodprøver ble fortynnet 60x.

Standardrekkens besto av 0,125- 0,25- 0,5- 1 og 1,5 mg/ml protein som høyeste konsentrasjon, og 0,2 mg/ml som laveste konsentrasjon. Ti (10) µL av prøve, standard og blankprøver ble pipettert på en 96 brønners mikrotiterplate i tripletter. Det var lagt ved referanseprøver ved platene for å fange opp variasjon. Etter pipettering av prøvene ble 25 µL av Reagent A, og deretter 200 µL Reagent B. Etter 15 minutter inkubering ble absorbansen lest på 750 nm med SynergyMX (Biotek) plateleser med Gen5 software. Proteinmengde ble beregnet ved at absorbansen ble lest av mot standardkurven.

2.6 Acetylkolinesterase

For bestemmelse av acetylkolinesteraseinhibering ble det benyttet en metode basert på Ellman (Ellman et al. 1961) og videreutviklet av Herbert et al. (1995). Muskelprøver ble tint på is, veid, og 1 gram muskelp prøve ble overført til homogeniseringsrør med.

Kaliumfosfatbuffer (0,1 M, med pH 7,2) ble tilsatt inntil 5 ml totalvolum. Homogenisering av muskelvev ble gjennomført med en PRO 200 Ultra-Turrax-Homogenisator med 10 mm x 125 mm generator ved en hastighet på 25 000-35 000 rpm. Hver prøve ble homogenisert i 90 sekunder. Homogeniseringsrørene ble holdt på is.

Cellerester ble så fjernet ved sentrifugering i 5 min i 5000 x g. Supernatanten ble overført til nye rør og fortynnet 10 x i Tris buffer.

Fire replikater på 50 µL per prøve ble pipettert ut på en 96 brønns mikrotiterplate (Falcon) For blankmålinger ble 4 replikanter med kaliumfosfatbuffer benyttet. 250 µL AChE assay reagens (30 ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer, 0,2 ml 0,075 M Acetylthiokolinioidid (ATC) og 1,0 ml 0,01 M DTNB (DTNB; 3,96 mg/ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2 tilsatt 1,5 mg/ml natriumhydrogenfosfat)) ble tilsatt alle brønnene. Platene ble så lest av hvert andre minutt i 10 minutter i SynergyMX (Biotek) plateleser ved 414 nm med temperatur på 25°C.

Acetylkolinesteraseaktivitet ble så beregnet basert på økning i mOD/min.

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

ALA-D aktivitet ble analysert etter metode utviklet av Hodson (Hodson et al. 1977) modifisert av Hylland (Hylland 2004). Blod ble homogenisert tilsatt 500 µL iskald fortynningsbuffer (100 ml 0,1 M fosfatbuffer, pH 7,0, 1 ml triton X-100, dH₂O til 200 ml) ved hjelp av manuell homogenisering. Homogenatet ble så sentrifugert på 10 000 x g i 15 min ved 4°C. Supernatanten ble deretter overført til et nytt eppendorfrør og fortynnet 2x i fortynnings buffer.

100 µL ble lagret til proteinanalyse. 50 µL ble overført til et nytt rør og fortynnet ytterligere med 200 µL fortynningsbuffer i tre av rørene og 200 µL ALA-D reagens (33,5 mg δ-aminolevulinsyre i 50 ml fortynningsbuffer) i de gjenværende tre. Prøvene ble så inkubert ved 25°C i to timer. Etter inkubasjonen ble 300 µL presipiterings reagens (4,0 g trikloreddiksyre og 2,7 g HgCl₂ i 100 ml dH₂O) tilsatt hvert rør. Det ble så mikset og fikk stå i 5 minutter før sentrifugering ved 2500 x g ved romtemperatur i 5 min.

Standard ble laget ved en fortynningsserie (40 µg/ml PBG i fortynningsbuffer) der 20 µL, 40 µL, 80 µL, 160 µL, og 320 µL av standardløsning ble fortynnet til 400 µL i fortynningsbuffer.

Fargeutviklingen ble indusert ved overføring av 150 µL av supernatanten i duplikat til 96 brønners mikrotiterplate. 150 µL modifisert Ehrlichs reagens (0,35 g HgCl₂ i 6 ml dH₂O, 20 ml 70 % perkloreddiksyre, eddiksyre fylt opp til 200 ml og 2,0 g Ehrlichs reagens) ble overført til alle brønnene. Etter 15 minutter inkubasjon ved romtemperatur ble absorbansen lest ved 550 nm. ALA-D aktivitet ble deretter beregnet.

2.1 PAH metabolitter i galle

Analysen av PAHmetabolitter i galle ble utført basert på metode fra Krahn (Krahn et al. 1992) modifisert av Grung (Grung et al. 2009). Galleprøvene ble tint og 20 µL ble overført til eppendorfrørfør 50 µL destillert vann og 10 µL av internstandard trifenylamin fortynnet i destillert vann ble tilsatt med 20 µL β-glucuronidase/arylsulfatase og prøvene ble inkubert for hydrolyse 1 time ved 37°C. Etter hydrolysen ble 200 µL metanol tilsatt og prøvene ble deretter veid og sentrifugert i 10 min på 13 000 x g. Supernatanten ble så overført til HPLCrør og lagret på -20 °C før high performance liquid chromatography (HPLC) analyse.

PAH metabolitter ble målt på NIVA ved high performance liquid chromatography (HPLC) med fluorescensdetektor. Konsentrasjonen av 1-OH-fenantren, 1-OH-pyren og 3-OH-B[a]P ble bestemt. I tillegg til prøvene ble det brukt to blindprøver bestående av vann. To fortyninger av referanseprøve ble også analysert.

HPLC analysen ble utført av Merete Grung på norsk institutt for vannforskning (NIVA). Analysen ble gjennomført med en Waters 2695 Separations Module med 2475 fluorescensdetektor.

Fluorescensen ble målt ved hver komponents optimum .

Eksitasjon/emisjon for OH-naftalen var 290/335 nm. Deteksjonsgrensen var 1000 ng/g.

Eksitasjon/emisjon for OH-fenantren var 256/380 nm. Deteksjonsgrensen var 1 ng/g.

Eksitasjon/emisjon for OH-pyren var 346/384 nm. Deteksjonsgrensen var 1 ng/g.

Eksitasjon/emisjon for Internstandard (trifenylamin) var 300/360 nm. Deteksjonsgrensen var 1 ng/g.

Eksitasjon/emisjon for benzo(a)pyren var 350/430 nm. Deteksjonsgrensen var 1,8 ng/g.

2.2 EROD aktivitet i lever

EROD ble brukt for å detektere aktiviteten til enzymet CYP1A1. Metoden er basert på Burke og Mayer (Burke et al. 1974) og videreutviklet av Eggens (Eggens et al. 1992).

Prøver, 1 mM resorufin (235,2 g/l DMSO) og 0,2 mM 7-etoksyresorufin (48,4 g/l DMSO) ble tint på is. Prøvene ble fortynt i kaliumfosfatbuffer (0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 8,0) for å holde proteinmengden på 1-1,5 mg/ml i hver prøve. Resorufin ble kalibrert ved 572 nm og 7-etoksyresorufin på 450 nm. Arbeidet foregikk uten direkte lys ettersom resorufin og etoksyresorufin er lyssensitivt. I hver plate ble først resorufin standarder pipettert ut i duplikater med konsentrasjonene 0,05 - 0,01 - 0,02 - 0,04 - 0,08 - 0,16 - 0,32 - 0,64 μ M. 8 blankbrønner og seks replikater av hver prøve ble også pipettert ut. En av prøvene ble gjentatt på alle platene for å fungere som referanse. Tre av prøvereplikatene ble tilsatt x uL y mM resorufin (spike) for å korrigere for eventuelle Matrix effekter (quenching) 200 μ L reaksjonsblanding med 7-etoksyresorufin ble tilsatt i prøver og blankprøver. Til sist ble

NADPH (2,4 mM i kaliumfosfatbuffer) ble tint på is og 25 µL og tilsatt prøver og blankprøver. Avlesning av eksitasjon ble gjennomført ved 530 nm og emisjon ved 590 nm i 8 steg med 40 sekunder pause i mellom. SynergyMX (Biotek) plateleser ble brukt med Gen5 software. Det ble jobbet med så lite lys som mulig. For EROD ble de to første platene utelatt på grunn av feil under analysen. For statistisk analyse av EROD ble 23 individer fra indre og 25 individer fra ytre Oslofjordbenyttet.

2.3 ELISA (CYP1A)

Måling av CYP1A ble gjennomført basert på metode beskrevet av Goksøyr (Goksøyr 1991). Mikrosomprøvene ble fortynnet til 10 µg/ml med Coatingbuffer (karbonat-bikarbonatbuffer; 1 kapsel/100 ml). En samleprøve som inneholdt alle samples ble laget til å fungere som referanse på alle platene. Analysen ble gjort over en periode på tre dager med to inkubasjoner over natten.

100 µL coatingbuffer ble tilsatt som blankprøver, 100 µL referanseprøve ble pipettert til brønnene E12-H12. 100 µL prøve ble pipettert til gjenstående brønner. Platene ble deretter forseglet og inkubert over natten ved 4°C.

Prøver ble neste dag vasket 3 x med TTBS (20 mM Tris buffer, pH 8,5 ved 25 °C, 0,5 M NaCl og 0,5 ml/l Tween-20) i Scanwasher 300 (Skatron Instruments). 300 µL TTBS med 1 % BSA (Bovine serum albumin) ble tilsatt hver brønn. Platene ble så inkubert 30-60 min og vasket 3 x med TTBS og 100 µL av primært antistoff (antifisk (CP226)) ble tilsatt fortynnet i antistoff buffer (1000x fortynning i TTBS med 0,1 % BSA) og platen ble forseglet med tape og inkubert over natten ved 4 °C. Etter inkubering ble platene vasket 3 x med TTBS og 100 µL sekundær antistoff (goat anti-rabbit HRP (GAR-HRP) - 1:3000 i antistoff-buffer) ble pipettert ut i hver brønn. Platene ble forseglet på ny og inkubert i 6 timer ved 4 °C.

Etter inkubasjonen ble brønnene vasket 5 x med TTBS og 100 µL TMB ble tilsatt alle prøvene. Platene ble deretter inkubert i romtemperatur inntil farge var fremkalt, og tid det tok ble notert. Reaksjonen ble så stoppet ved å tilsette 50 µL 3N H₂SO₄ i alle brønnene og absorbansen ved 450 nm ble målt med Synergy MX (Biotek) plateleser.

2.4 Isolering av RNA, cDNAsyntese og rtPCR

2.4.1 RNA isolering

RNA ble ekstrahert fra leverprøver ved hjelp av GeneMole, et automatisk system for RNA utvinning og tilhørende kit for utvinning av RNA fra Mole Genetics. RNaseAWAY (Invitrogen) ble benyttet til å rense utstyr og arbeidsområde under bearbeidingen.

På grunn av tids og kostnadsbegrensninger samt problemer med å isolere nok RNA ble 19 torsk fra indre Oslofjord og 25 torsk fra ytre Oslofjord analysert. Det var 9 hunner og 10 hanner fra indre Oslofjord. Fra ytre Oslofjord var det 14 hunner og 11 hanner.

For opparbeiding av RNA ble leverprøver randomisert og tint på is. Det ble skåret ut og veid 10 mg vev til hver prøve. Prøvene ble overført til 2 ml homogeniseringsrør med zirconium beads (VWR) og 500 µL etanol (80% etanol, 20% Rnase Free water). De ble så homogenisert i Precellys 24 (Bertin Technologies) i 2 x 20 sekunder ved 6000 rpm og et minutt ved 10 000 rpm for å fjerne lipidinnholdet. Flytende nitrogen ble brukt for å kjøle ned apparatet. Etter homogenisering ble supernatanten, bestående av fett og alkohol, fjernet og prøvene ble satt i et avtrekksskap slik at gjenværende alkohol kunne fordampe. Prøvene ble så tilsatt 385 µL lysis buffer og ble homogenisert videre i precellys ved 2x15 sekunder at 6000 rpm. 350 µL supernatant ble så overført til Molestrips rør og 5 µL med 4% glycogen løst i RNase fritt vann ble tilsatt. Et program for RNA isolering med Dnase behandling ble så brukt på GeneMole (MoleGenetics) med Molestrips (MoleGenetics) med RNA tissue reagents.

Renhet og mengde RNA ble undersøkt ved absorbansmålinger med Synergy MX plateleser (BioTek) med Take 3 modul. 2 µL av hver prøve ble analysert. Kontaminering fra proteiner ble beregnet ut fra ratio mellom absorbansen ved 260 nm (RNA bølgelengde) og 290 nm (protein bølgelengde). Ratio mellom 260/230 ble også vurdert. Prøver med for små mengder (<40 ng) ble kastet og nye prøver ble tatt for å sikre høye nok mengder RNA for videre analyser. Prøver med ratio >1,8 ble ansett som rene nok for videre analyser.

2.4.2 Bioanalyser

RNAets kvalitet ble undersøkt med en 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) med RNA 6000 LabChip og RNA 6000 Nano kit. Fabrikantens intrukser ble fulgt og elektrodene ble rensert i isopropanol og destillert vann mellom hver analyse.

Bioanalyser kvantifiserer RNA fragmentering mellom å analysere 18S og 28S ribosomale subenheter ved gelelektroforese. Elektroferrogrammene og RNA integrity value (RIN) ble brukt til å analysere hvorvidt kvaliteten var høy nok for videre analyser. Prøver med RIN over 8 ble benyttet videre.

2.4.3 cDNA syntese

For å lage en standardserie ble en løsning med 400 ng/ μ L RNA fremstilt fra en mix av RNA isolert fra de 47 mest brukbare prøvene. Grunnen til at ikke alle 80 ble benyttet var for å begrense utgifter og tidsbrukt knyttet til det å isolere mange prøver på nytt. En fortyningsserie på 200, 100, 50 og 25 ng/ μ L ble laget.

Prøvene ble så fortynnet i RNase fritt vann til 20 ng/ μ L, og mengden RNA i prøver og standarder ble målt på SynergyMX (Biotek) plateleser for å sikre at riktige konsentrasjoner ble benyttet. En feil på 2 ng/ μ L ble brukt som akseptabel grense for avvik fra ønsket konsentrasjon.

For cDNA syntesen ble High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Det ble tilsatt 20 μ L med 200 ng RNA template, 1X RT buffer, 4mM dNTPs, 50 μ M av RT random primers, 2.5 μ M oligo-dT-primers og 50 enheter av MultiScribe reverse transcriptase sammen med prøvene. No enzyme control og no template control ble tatt for å ha kontroll på kontaminering av fremmed RNA. Prøver og reagenser ble pippetert ut i Axygen cDNA plater. De ble så forseglet og sentrifugert for å sikre at innholdet var i bunnen av brønnene.

cDNA syntese ble så gjennomført med en Thermal cycler (Eppendorf).

Inkubasjonsinnstillingene var 10 min ved 25°C, 120 min ved 37°C og 5 min ved 85°C for å stanse videredannelsen av cDNA. cDNAplaten ble så lagret på -20°C før videre bruk til RT-qPCR.

2.4.4 RT-qPCR

RT-qPCR ble brukt for å bestemme mengden mRNA i lever for utvalgte gener. Primerne som ble benyttet ble i samarbeid med Inger-Lise Nerland valgt ut basert på artikler relatert til genekspressjon av toksikologisk relevante gener (Tabell 2.2) (Olsvik et al. 2008; Lie et al. 2009a; Lie et al. 2009b; Olsvik et al. 2010; Søfteland et al. 2010; Nerland 2011).

Primere ble bestilt fra Invitrogen og lagret på -20°C. Av 8 gener utvalgt var to av dem referansegener for å kunne sammenligne bakgrunnsnivåer av gener som ikke påvirkes av de effektene som ble undersøkt. Proessen ble gjennomført ved bruk av «SYBR Green I Master mix» og ble kjørt i «Lightcycler 480» av Roche i henhold til fabrikantens instruksjer.

Det ble tilsatt 10 µL master mix, 6 µL PCR graded water, 1 µL forward primer og 1 µL reverse primer for utvalgte gener i hver brønn i tillegg til 2 µL cDNA. cDNA platene ble tint og gjenfrosset for hver runde. Etter at master mix, primere og cDNA var tilsatt ble platen forseglest og sentrifugert i 2 min ved 1500 x g før kjøring av RT-qPCR i en Lightcycler 480(Roche). Platene ble organisert identisk til cDNA platene. Crossing point (Cp) til fluoresenskurven kunne så analyseres.

Tabell 2.2: Utvalgte primere med gennavn, forkortelse, sekvens for forward og reverse primer, Acc.No: genbank nr og størrelse på amplicon i basepar.

Gen	Forkortelse	Forward (5'-3')	Reverse. (5'-3')	TM (°C)*	Acc. No.	Size (bp)
β-actin	ACTB	CACAGCCGA GCGTGAGAT T	ACGAGCTAG AAGCGGTTT GC	55.2	EX739174	95
Elongation factor 1A	EF1A	CCCTGTGGA AGTGGCTGA AG	CATCCAAGG GTCCGTATCT CTT	55.6	EX721840	93
Cytochrome P450 1A	CYPa	CCTTGACCTC TCGGAGAAA GAC	CGCCCCGCT AGCTATAGA CA	56.7	EX725014	145
Heat-shock protein 70	HSP70	CCCCTGTCCC TGGGTATTG	CACCAGGCT GGTTGTCTG AGT	58.7	BG933934	121
Metallothionein	MT	CCTTGCGACT GCACCAAGA	CAGTTTAGG CAGGTGCAT GATG	54.2	EX721491	68
Heme-oxygenase 1	HO-1	AGAGAACAC AGGGCTGAT GTTGA	CGGGTGGCT GCTGTTATTG T	56.1	EX738947	133
Vitellogenin A	VtgA	AGACTGGCC TGGTCGTCA AA	GCGAGGATA GAGGCAGGG AT	57.9	AF284035	121
Uridinediphosphate - glycuronosyltransferase	UDPGT	GTAAAAATA ATGAAGTGG CTACCTCAA A	GAACGCCGT GGCAGATG	50.8	EX722276	115

2.5 Statistikk

Statistiske analyser ble gjennomført med Microsoft Excel, Jmp 10.0 (SAS) og GraphPad Prism (GraphPad Software). Data ble sjekket for homogen varians og normalfordeling. Levenes test ble brukt til å vurdere varians og grensen for signifikans ble satt til P-verdi = < 0,05 (Zar 2010). Ved signifikant ikke-homogen varians ble dataene log transformert. Dette ble gjort for OH-pyren og CYP1A protein. Dataene ble så analysert med to-veis ANOVA med kjønn og område som faktorer der grensen for signifikans ble satt til p-verdi = < 0,05. For GSI som hadde ikke-homogen varians etter log transformering ble ikke-parametrisk Wilcoxon test benyttet. Korrelasjon mellom biomarkørresponser og fysiologi ble analysert med Spearmanns korrelasjonsanalyse (Zar 2010). Det er en ikke parametrisk test som undersøker forhold mellom variabler ved å rangere dem. Den gjør det mulig å se hvor sterkt to variabler er assosiert.

GeneNorm ble benyttet for å regne ut det geometriske gjennomsnitt til referansegenene (Vandesompele et al. 2002). Øvre grense for variasjon i referansegenene (M-verdi) ble satt til 0,7. Referansegenene gikk over grensen og hadde for mye variabilitet. Unormaliserte data ble brukt til å sammenligne genekspressjon i prøver av torsk fra de to områdene.

For RT-qPCR analysene ble relativt genuttrykk beregnet med programmet Relative Expression Software Tool (REST). Det kjører en randomisert parametrisk test uten krav om normalfordeling eller homogen varians (Pfaffl et al. 2002). Genuttrykket mellom indre og ytre Oslofjord ble sammenlignet. Indre Oslofjord ble betraktet som behandlet gruppe og ytre som ubehandlet gruppe.

3 Resultater

3.1 Fysiologiske parametere

3.1.1 Kjønn, alder, vekt og lengde

I indre Oslofjord ble det innsamlet 18 hanner og 22 hunner (Tabell 3.1). I ytre Oslofjord ble det innsamlet 16 hanner og 24 hunner (Tabell 3.2).

Tabell 3.1: Antall individer, gjennomsnittslengde og gjennomsnittsvekt for indre Oslofjord.

Alder	Antall individer	Gjennomsnittslengde (cm)	Somatisk vekt (g)
2	7	43,6	671
3	14	43,0	687
4	12	46,3	904,7
5	4	46,1	884,75
6	2	51,5	1193,6
8	1	58,0	1638,3
Totalt	40	48,1	996,7

Tabell 3.2: Antall individer, gjennomsnittslengde og gjennomsnittsvekt for ytre Oslofjord.

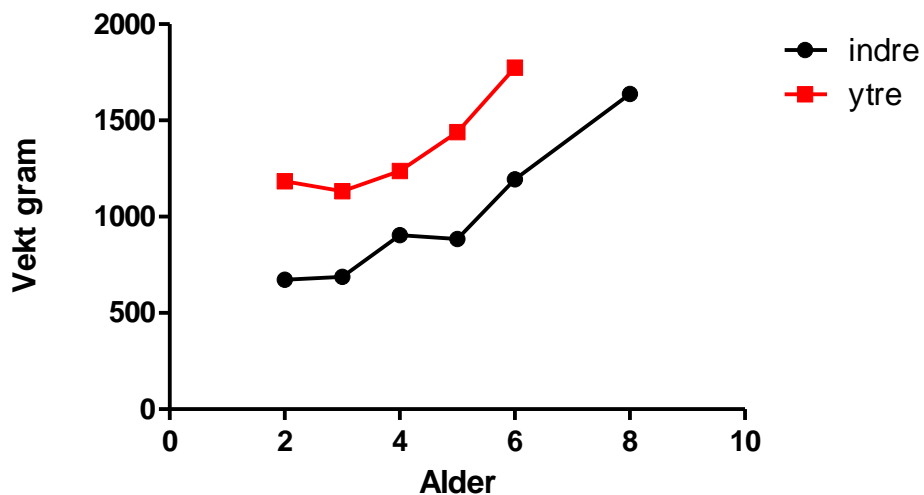
Alder	Antall individer	Gjennomsnittslengde (cm)	Somatisk vekt (g)
2	11	48,7	1183,8
3	18	48,4	1133
4	7	49,3	1237,1
5	3	51,7	1439,5
6	1	54,5	1773,5
Totalt	40	50,5	1638,3

Alder

Det var ikke signifikante forskjeller i alder for torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, p-verdi =0,07). Gjennomsnittet for indre Oslofjord var 3,6 år, mens det for ytre Oslofjord var 3,1. Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, p = 0,16) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA, p = 0,83) .

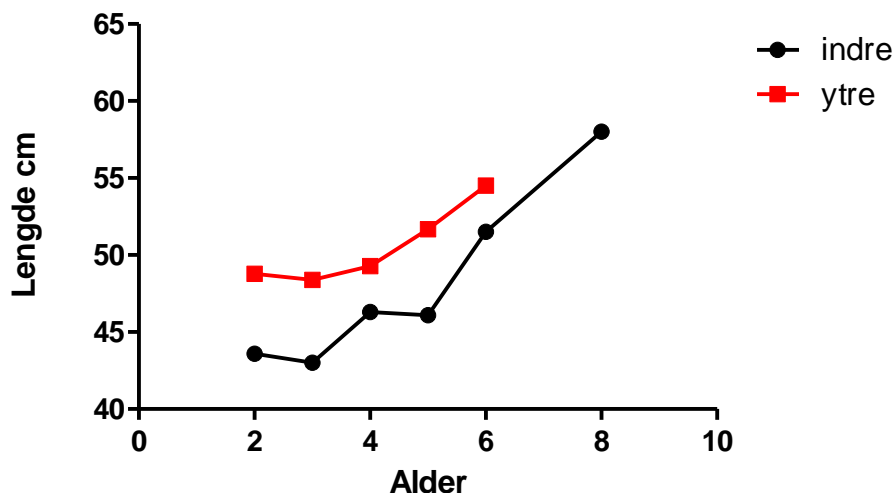
Vekt og lengde

Det var signifikante forskjeller i vekt mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord Oslofjord (to-veis ANOVA, p -verdi = 0,0001). Fisk fra ytre veide signifikant mer enn fisk fra indre (Figur 3.1). Fisk fra indre veide i gjennomsnitt 877 gram og fisk fra ytre veide i gjennomsnitt 1204 gram. Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, $p = 0,98$) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA, $p = 0,29$).



Figur 3.1: Gjennomsnittlig vekt for for torsk fra indre og ytre Oslofjord.

Det var signifikant forskjell i lengde mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p = 0,0001$). Torsk fra indre Oslofjord var i gjennomsnitt kortere en torsk fra ytre Oslofjord (Figur 3.2). Gjennomsnittlig lengde i indre var 45,2 cm. Gjennomsnittslengden for torsk fra ytre oslofjord var 49,1 cm. Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, $p = 0,54$) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, $p = 0,16$).

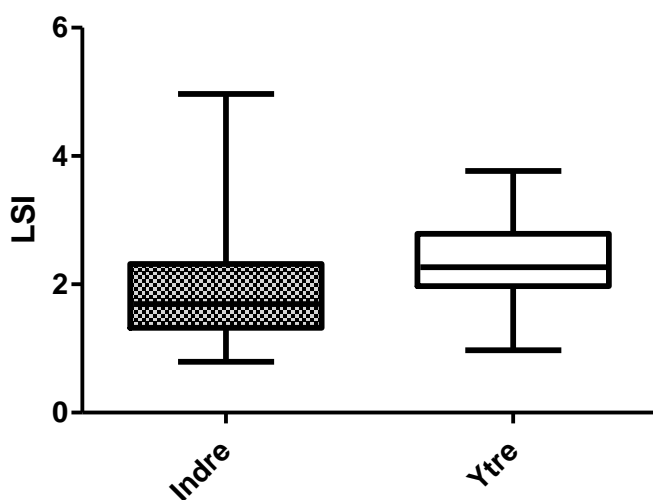


Figur 3.2: Lengde for torsk fra indre og ytre Oslofjord.

3.1.2 Lever-somatisk indeks (LSI), kondisjon og gonadosomatisk indeks (GSI)

LSI

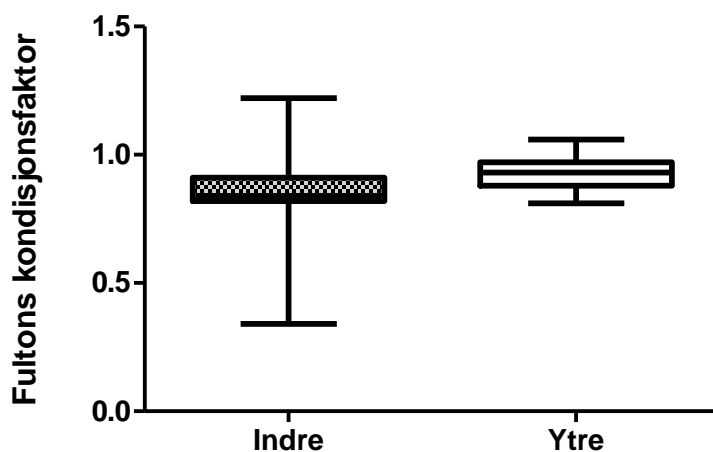
Det var signifikante forskjeller i LSI for torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p=0,04$) (Figur 3.3). Gjennomsnittlig LSI var 1,96 for indre Oslofjord og 2,33 for ytre Oslofjord. Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, $p =0,24$) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA, $p =0,68$).



Figur 3.3: LSI verdier for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

Kondisjon

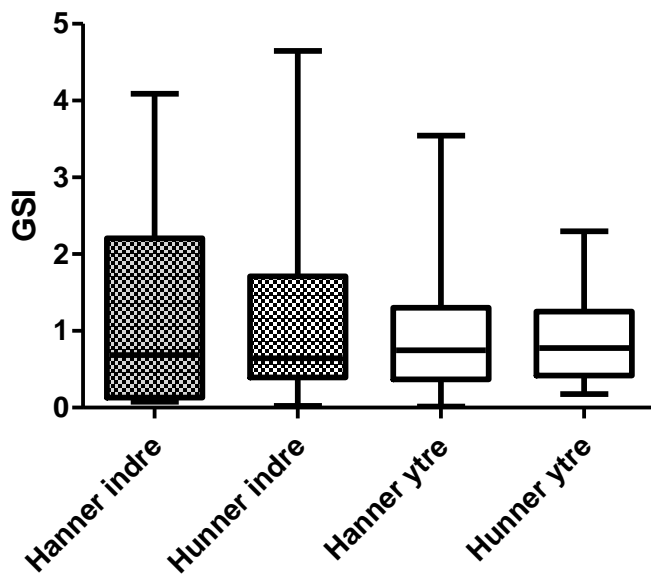
Det var ikke signifikante forskjeller i kondisjon mellom torsk fra indre Oslofjord og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p = 0,13$) (Figur 3.4). Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, $p = 0,09$) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, $p = 0,68$).



Figur 3.4: Fultons kondisjonsfaktor K for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

Gonadosomatisk indeks (GSI)

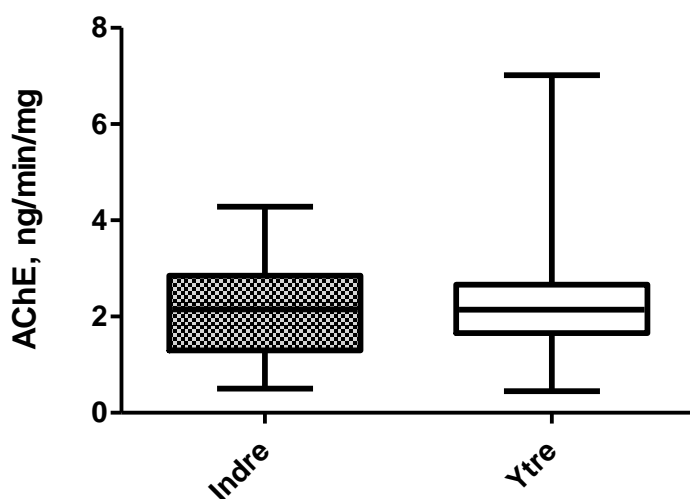
Det var ikke signifikante forskjeller for torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (Figur 3.5). Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (Wilcoxon, $p = 0,78$) eller sted (Wilcoxon, $p = 0,82$).



Figur 3.5 : GSI for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.2 Acetylkolinesterase aktivitet i muskel

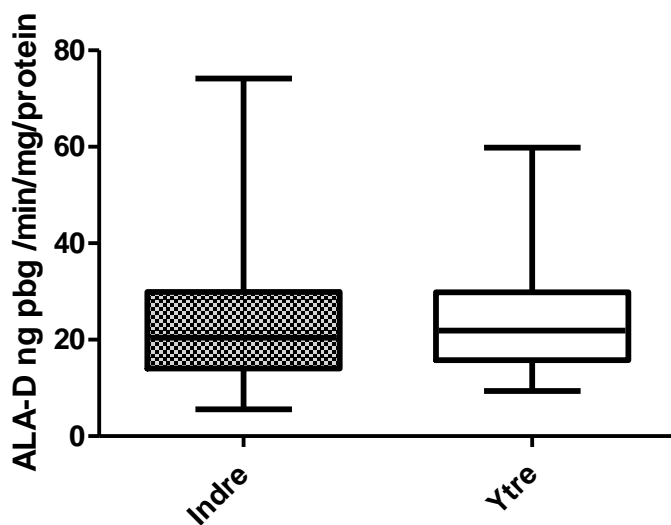
Det var ingen signifikante forskjeller i acetylkolinesterase aktivitet mellom AChE i muskel fra torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord ((to-veis ANOVA, p-verdi =0,80) (Figur 3.8). Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,21) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,97).



Figur 3.8: AChE aktivitet i muskel torsk fra indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

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

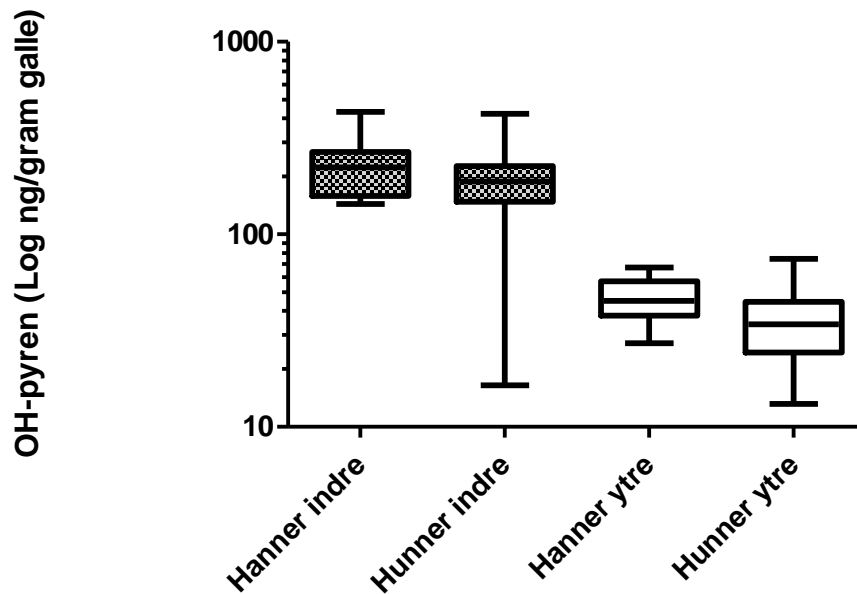
Det var ikke signifikante forskjeller i aminolevulinsyre dehydratase aktivitet for torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, p-verdi = 0,8012) (Figur 3.9). Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,65) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,45).



Figur 3.9: Aminolevulinsyre dehydrataseverdier for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.4 PAH metabolitter

Det var signifikante forskjeller i OH-pyren i galle for torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, på logtransformerte verdier, $p < 0,0001$) (Figur 3.6). Medianen for torsk i indre Oslofjord var på 196 ng/gram galle og medianen i ytre Oslofjord var 38 ng/gram galle (to-veis ANOVA, på logtransformerte verdier p-verdi= 0,0014). Det var signifikante interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA, på logtransformerte verdier p-verdi= 0,045). Effektsummen av kjønn og interaksjon var så små i forhold til område at de har lite å si. Sum of square for kjønn var 0,31, sum of squares for interaksjon var 0,12 og sum of square for område var 10.



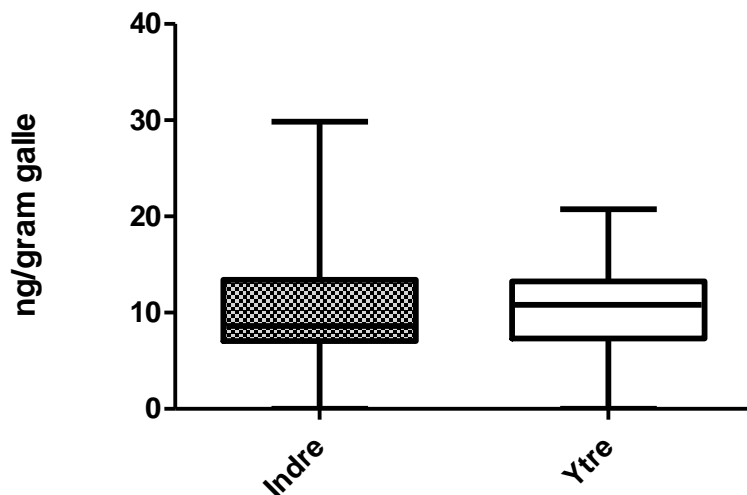
Figur 3.6: OH-pyren i galle (ng/g) for hunn og hann torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

Det ble ikke gjennomført statistiske tester for metabolitter for benzo(a)pyren ettersom for mange av prøvene var under deteksjonsgrensen som var satt til 1,8 ng/g (Tabell 3.3). Det var flere over deteksjonsgrensen i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord.

Tabell 3.3: Antall prøver benzo-a-pyren som var over deteksjonsgrensen på 1,8 ng/g.

	Antall individer over deteksjonsgrense indre	Prosent individer over deteksjonsgrense indre	Antall individer over 1,8 ng/g ytre	Prosent individer over 1,8 ng/g ytre	Totalt antall individer over 1,8 ng/g	Prosent individer totalt over 1,8 ng/g
hanner	9	50 %	2	13 %	12	35 %
hunner	8	36 %	7	29 %	15	33 %
totalt	16	43 %	9	23 %	25	33 %

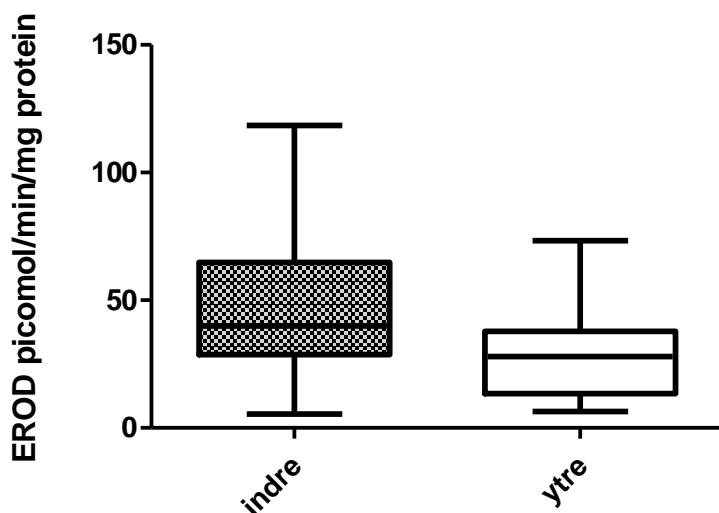
Det var ikke signifikante forskjeller i konsentrasjonen av OH-fenantren i galle fra torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p = 0,67$) (Figur 3.7). Det var ikke signifikante kjønnsforskjeller (to-veis ANOVA, p -verdi= 0,57) eller interaksjonseffekter (to-veis ANOVA, p -verdi= 0,87). 8 prøver var under deteksjonsgrensen på 1 ng/g galle.



Figur 3.7 : OH-fenantren oppgitt i ng/gram galle for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.5 EROD (etoksyresorufin O-deetylase) aktivitet i lever

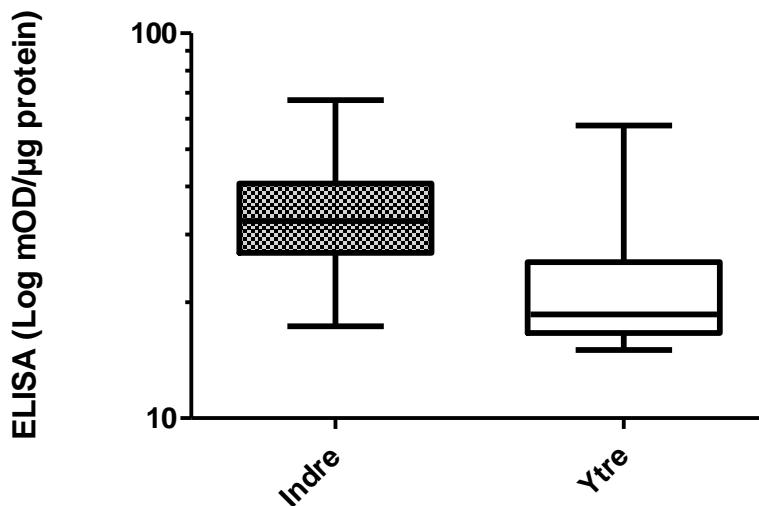
Det var signifikante forskjeller i EROD aktivitet i lever hos torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, p-verdi = 0,009) (Figur 3.10). Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,37). eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, p-verdi= 0,36).



Figur 3.10: EROD i lever hos torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.6 Mengde CYP1A protein i lever

Det var signifikante forskjeller i konsentrasjonen av CYP1A protein i lever hos torsk fra indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p < 0,0001$) (Figur 3.11). Torsk fra indre oslofjord hadde høyere CYP1A1 konsentrasjon enn de fra ytre oslofjord. Det var ikke signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, p -verdi= 0,4) eller interaksjonseffekter mellom kjønn og sted (to-veis ANOVA, p -verdi= 0,83).



Figur 3.11: ELISA (Log mOD/ μ g protein) for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.7 Genekspresjon i lever

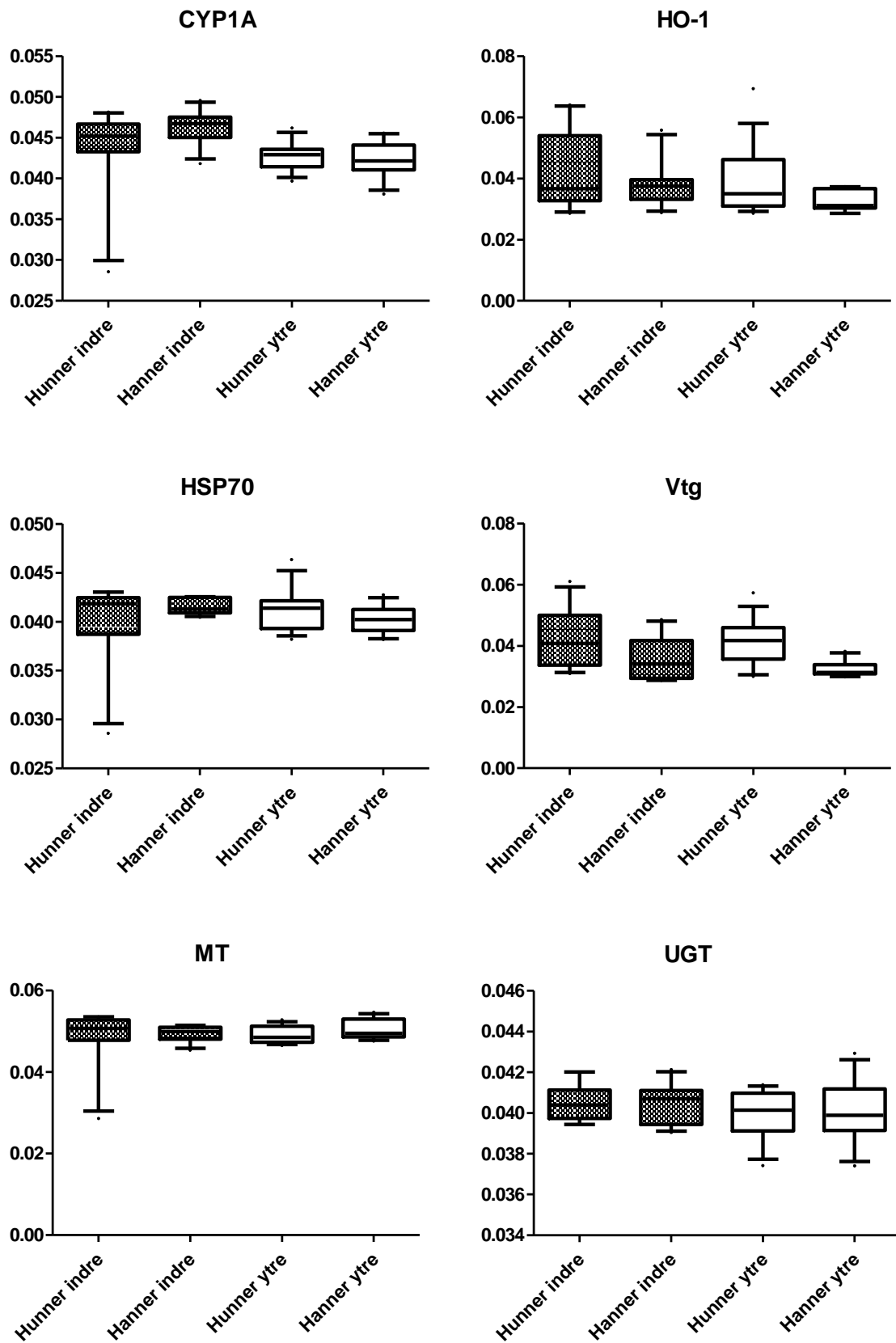
For hunner var mengden CYP1A mRNA signifikant oppregulert i indre Oslofjord (Tabell 3.4). Det var signifikant oppregulert ekspresjon av cytokrom P450 1A (CYP1A), vitellogenin (Vtg) og varmesjokk protein 70 (HSP70) hos hanner innsamlet i indre Oslofjord (Tabell 3.5). Det var stor variasjon i uttrykk av CYP1A blant hunner i indre Oslofjord (Figur 3.12).

Tabell 3.4: Relativ genekspressjon for hunner med indre Oslofjord som behandlet område og ytre Oslofjord som ubehandlet område. merket «UP» betyr at genet er oppregulert i indre Oslofjord.

Gen	Ekspresjonsfaktor	95 % Konfidensintervall	p-verdi	Resultat
CYP1A	2,764	0,405 - 17,270	0,005	UP
HO-1	1,946	0,029 - 72,925	0,282	
HSP70	1,132	0,016 - 25,329	0,864	
Vtg	9,055	0,000 - 620 456,295	0,283	
MT	1,649	0,259 - 7,276	0,101	
UGT	1,335	0,417 - 6,331	0,246	

Tabell 3.5 : Relativ genekspressjon for hanner med indre Oslofjord som behandlet område og ytre Oslofjord som ubehandlet område. . Resultat merket «UP» betyr at genet er oppregulert i indre Oslofjord.

Gen	Ekspresjonsfaktor	95 % Konfidensintervall	p-verdi	Resultat
CYP1A	4,635	0,431 - 51,983	0,001	UP
HO-1	1,117	0,062 - 27,942	0,818	
HSP70	3,058	0,334 - 29,909	0,006	UP
Vtg	30,213	0,013 - 127 458,933	0,018	UP
MT	1,351	0,378 - 8,528	0,297	
UGT	0,769	0,165 - 4,099	0,33	



Figur 3.12: Relativt uttrykt geneksprøsjonsverdier for torsk fra indre og ytre Oslofjord med median, kvartiler, maksimumsverdier og minimumsverdier.

3.8 Korrelasjoner mellom kondisjon og biomarkørresponser

Det var flere biomarkører i indre Oslofjord som hadde signifikant korrelasjon ved spearmanns korrelasjonsanalyse (Tabell 3.6). I ytre Oslofjord var det kun kondisjonsmålene som var signifikant korrelert (Tabell 3.7). Alder, lengde vekt LSI, k, GSI, OH-pyren, ELISA, EROD, AChE og ALA-D ble tatt med i analysen. Kun parametere med sammenhenger mellom biomarkører der enten hunn, hann eller begge hadde signifikante funn er tatt med i tabellen. Signifikant korrelasjon er markert med *.

Tabell 3.6: Spearmann korrelasjonsanalyse for indre Oslofjord.

		Hunner		Hanner	
Variabel	Variabel	Spearman rho	p-verdi	Spearman rho	p-verdi
EROD	CYP1A protein	0,47	0,01*	0,81	0,004*
CYP1A protein	OH-pyren ng/gram galle	0,37	0,01*	-0,13	0,60
Kondisjon	LSI	0,364	0,01*	0,34	0,046*
EROD	GSI	-0,46	0,01*	-0,09	0,802
OH-pyren ng/gram galle	LSI	-0,31	0,03*	0,26	0,32
OH-pyren ng/gram galle	Kondisjon	-0,30	0,04*	0,14	0,59
LSI	GSI	0,50	0,0005*	0,22	0,22

Tabell 3.7: Spearmann korrelasjonsanalyse for ytre Oslofjord.

		Hunner		Hanner	
Variabel	Variabel	Spearman rho	p-verdi	Spearman rho	p-verdi
GSI	LSI	0,50	0,0005*	0,28	0,21
Kondisjon	LSI	0,36	0,01*	0,21	0,33

3.9 Korrelasjon mellom protein, enzymatisk aktivitet og genuttrykk

For Spearmann korrelasjonsanalyse for CYP1A mRNA, CYP1A protein og CYP1A aktivitet (EROD) var det signifikant korrelasjon for CYP1A mRNA og CYP1A protein for hunner i

indre Oslofjord (Tabell 3.8). For ytre Oslofjord var CYP1A mRNA signifikant korrelert med CYP1A protein (Tabell 3.9). Signifikant korrelasjon er markert med *.

Tabell 3.8: Spearmann korrelasjonsanalyse for CYP1A mRNA og CYP1A protein samt CYP1A mRNA og EROD for indre Oslofjord.

		Hunner		Hanner	
Variabel	Variabel	Spearman rho	P	Spearman rho	p
CYP1A mRNA1	CYP1A protein	0,72	0,0001*	0,6018	0,07
CYP1A mRNA1	EROD	-0,07	0,81	0,9	0,04*

Tabell 3.9 : Spearmann korrelasjonsanalyse mellom CYP1A mRNA og CYP1A protein samt CYP1A mRNA og EROD for ytre Oslofjord.

		Hunner		Hanner	
Variabel	Variabel	Spearman rho	P	Spearman rho	p
CYP1A mRNA1	CYP1A protein	0,69	0,0065*	0,4091	0,21
CYP1A mRNA1	EROD	-0,10	0,78	0,11	0,78

4 Diskusjon

Målet i dette studiet var å avklare om miljøgifter påvirker torsk fra indre Oslofjord. For å undersøke dette ble biomarkører og markører for helse (kondisjon, vekst, kjønnsmodning) sammenlignet mellom indre og ytre Oslofjord med ytre Oslofjord som referansepopulasjon.

4.1 Kondisjon og vevsindekser

Torsk i indre Oslofjord er kortere og veier mindre enn torsk i ytre av samme alder. Dette kan være forårsaket av påvirkning fra miljøgifter, men det er også mulig at det er ulik fødetilgang i de to områdene eller at det er genetiske forskjeller mellom populasjonene.

At torsken fra indre Oslofjord er mindre enn torsken fra ytre Oslofjord er noe man også har funnet i tidligere undersøkelser (Imrik 2010; Nerland 2011). I undersøkelsen fra 2002 var torsk i indre Oslofjord signifikant større enn i ytre, men den var også signifikant eldre. Forskjellene i størrelse var antagelig på grunn av ulike aldersklasser med signifikant eldre torsk fra indre (Holth 2004). Det har tidligere vært observert at torsk har ulik vekst ved forskjellige områder. Ved Skagerakskysten har man sett at torsk lenger ut i Risørfjorden vokser raskere enn torsk lenger inn (Gjøsæter et al. 2011). Vekst hos torsk er i stor grad avhengig av temperatur og fødeinntak (Rätz et al. 2003). Det er ingen enkel sammenheng mellom temperatur og vekst siden variasjoner mellom populasjoner, livsstadium og andre områdeforhold kan ha (Rätz et al. 2003; Dutil et al. 2008; Morgan et al. 2010). Om det er ulike temperaturer i forskjellige deler av fjorden kan det gi forskjeller mellom områdene (Gjøsæter et al. 2011).

Kondisjon påvirkes av både fysiologiske faktorer og miljøbetingelser (Wootton 1998; Sherwood et al. 2007; Pardoe et al. 2008; Morgan et al. 2010). LSI er et mål på opptak av føde og er følsom for endringer i leverens fettlagre (Lambert et al. 1997 (b)). Torsk anses for å være en mager fisk der muskulaturen har lite fettinnhold mens leveren har høyt fettinnhold (Kjesbu et al. 1991; Yaragina et al. 2000). Rundt 1% av lipidene til torsken lagres i muskulatur mens lipider kan utgjøre over 50 % av levervekten (Lambert et al. 1997 (b); Yaragina et al. 2000). Dersom det er gode forhold for torsken vil den lagre overskuddsenergi, og dersom det er ugunstige forhold vil reservene tæres på. Ved dårlige forhold vil fisken tære på sine reserver i leveren først, og om reservene der brukes opp vil energi fra proteiner i muskulatur mobiliseres (Grant et al. 1999). Det var i dette studiet signifikante forskjeller i

LSI, med lavere verdier hos torsk fra indre Oslofjord, noe som indikerer at torsk fra indre har mindre fettreserver i leveren enn de fra ytre Oslofjord. I 2002 hadde torsk fra indre Oslofjord lavere kondisjon enn torsk fra ytre Oslofjord, men det var ingen forskjell i LSI (Holth 2004). I 2008 og 2009 var det ingen signifikante forskjeller i kondisjon eller LSI (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011). Lav LSI hos torsk fra indre Oslofjord kan gi negativt utslag for overlevelse og reproduksjon ettersom de har mindre opplagret energi tilgjengelig (Lambert et al. 2000b). LSI mellom 2 og 6 regnes som normalt for viltlevende torsk (Jobling 1988; Nanton et al. 2001). Medianen for LSI var 1,68 for torsk i indre og 2,31 for torsk i ytre. At det er mange fisk med en LSI under 2 kan ses som at det ikke bare er signifikant lavere for torsk i indre Oslofjord sammenlignet med torsk i ytre Oslofjord, men også at mange av dem har dårlig kondisjon. Det kan være at torsk fra indre Oslofjord i denne undersøkelsen hadde lavere LSI som et resultat av faktorer som ikke testet i denne undersøkelsen. Leverkondisjon er blant annet avhengig av fødetype (Pardoe et al. 2008; Pardoe et al. 2009; Morgan et al. 2010). For torsk har en diett bestående i hovedsak av pelagiske arter vist å gi høyere somatisk kondisjon, LSI og gyting enn en diett med mer bentiske arter (Sherwood et al. 2007). LSI har hos torsk i andre studier vært knyttet til variasjon i temperatur og fødetilgang (Yaragina et al. 2000; Mello et al. 2005). Det er en tendens til at torsk i varme områder har noe høyere kondisjonsfaktorer, men fødevalg og tilgang på byttedyr er viktigst (Rätz et al. 2003; Sherwood et al. 2007). Fødevalg ble ikke undersøkt.

Kondisjon var lik mellom områdene. (Rätz et al. 2003). Det kan tyde på at torsk fra indre Oslofjord hadde lik relativ vekst og kondisjon sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord. Dårlig kondisjon kan påvirke en populasjon mindre produktiv retning ved å føre til mindre energi tilgjengelig til gonadevekst, overlevelse og reproduksjon (Dutil et al. 2000a; Dutil et al. 2003; Mello et al. 2005). Kondisjon kan synliggjøre hvor mye av næringen som er tilgjengelig til vekst, evt hvor mye som må tæres på. En kondisjonsverdi på 1 regnes som god kondisjon. Kondisjonsverdier under 0,6 gir økt risiko for mortalitet (Dutil et al. 2000a). Kondisjonen til fisk i både indre og ytre Oslofjord var godt over det og har neppe en kondisjon som er så dårlig at det går utover overlevelsen.. Medianen for kondisjon lå i indre Oslofjord lå på 0,84 og 0,9 for ytre. Det var ikke stor variasjon innad i gruppene. Resultatene indikerer at individene hadde kondisjon som var noe lavere enn det som kalles for god, men at populasjonen som helhet hadde god kondisjon. Det var kun ett individ med kondisjon under 0,6. Kondisjon hos torsk har også vært knyttet til dybde, hvorav torsk i dypere vann har bedre kondisjon enn de på grunnere områder (Pardoe et al. 2008). Det kan forklares gjennom at

både temperturforskjeller og fødetilgang kan være ulik på ulike dybder. Individene ble her samlet inn ved samme temperatur og dyp så det antas å ikke være påvirkende faktorer.

Både kondisjon og LSI har vært vist å variere i andre torskepopulasjoner mellom høyest verdier på høsten og lavest på våren (Lambert et al. 1997 (b); Mello et al. 2005).

Populasjonene har vist seg å ha best kondisjon på høsten mellom september og desember før den synker (Lambert et al. 1997 (a); Yaragina et al. 2000; Fagerli 2006). Lav kondisjon på våren kan knyttes til gytetid (Lambert et al. 1997 (b); Yaragina et al. 2000; Rätz et al. 2003). Det har i Oslofjorden blitt observert variasjoner i kondisjonsparametere med høyest verdier i desember og lavest i mars (Fagerli 2006). Det kan tyde på at individene i denne undersøkelsen ble samlet inn i en periode der deres kondisjon var i nærheten av sitt høyeste. Kondisjon kan ha betydning for produktivitet og reprodusert potensiale i en fiskepopulasjon (Pardoe et al. 2008). Fekunditet er lavere hos hunner med dårlig kondisjon (Lambert et al. 2000b). De opplever også et større tap i somatisk masse og energi enn hunner med god kondisjon (Lambert et al. 2000b). En lavere LSI hos torsk fra indre Oslofjord kan tolkes som at de har mindre energi tilgjengelig, og derfor kan tenkes å ha lavere fekunditet enn torsk fra ytre Oslofjord. Dårlige energireserver har vært koblet til redusert reprodusert suksess hos fisk gjennom redusert fekunditet, overlevelse og kvalitet på egg og larver (Marshall et al. 1999; Lambert et al. 2000b; Rätz et al. 2003).

Gonadosomatisk indeks (GSI) var ikke signifikant forskjellig mellom indre og ytre Oslofjord, noe som viser at de to populasjonene hadde tilnærmet lik reprodusert status. Det kan antyde de kan sammenlignes uten at reprodusert påvirker resultatene.

4.2 Effekter av nevrotoksiske stoffer

Det var ikke signifikante forskjeller i AChE aktivitet i muskel fra torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk innsamlet i ytre Oslofjord. Tidligere år har det blitt observert lavere AChE aktivitet i torsk fra ytre Oslofjord enn i torsk fra indre Oslofjord (Imrik 2010; Nerland 2011). Årsaken til forskjellene i 2008 og 2009 antas å være inhibering fra organofosfater og karbamater i ytre Oslofjord. At det har endret seg til å ikke være signifikante forskjeller kan bety eksponering for AChE inhibitorer har blitt redusert i ytre Oslofjord. Det kan også bety eksponering har tiltatt i indre og at forskjeller dermed er utjevnet. Observasjonene kan være forårsaket av endring av utslipp som inducerer aktivitet.

Det var en nedgang i omsetning av skadedyrsmidler i 2010, hvilket muligens kan bidra til å forklare manglende forskjell på indre og ytre Oslofjord (Mattilsynet 2012).

En ulempe ved OP og karbamater er at de ikke er spesifikke for skadedyr og kan skade vertebrater og evertebrater utilsiktet (Fulton et al. 2001). Oljeforbindelser kan også ha en hemmende effekt på AChE aktivitet (Galgani et al. 1992). Utslipp fra tre- og papirindustri kan videre redusere AChE aktivitet (Payne et al. 1996). Tilstedeværelsen av slik aktivitet i Oslofjorden kunne vært en kilde til inhibering i tillegg til pestisider fra jordbruk. OP og karbamater har relativt kort halveringstid (Bocquené et al. 1995; Fulton et al. 2001). De kan derfor karakteriseres som ikke persistente og brytes relativt raskt ned. Fisk har evnen til å reetablere AChE aktivitet etter inhibering. Hvor lang tid det tar fra eksponering til vanlig aktivitet gjenopprettes avhenger av grad av eksponering. OP regnes til en viss grad for å ha irreversibel binding (Ferrari et al. 2007). Gjenopprettelse av normalverdier er antagelig et resultat av nydannelse av enzymer (Fulton et al. 2001). Det kan være at fisk fra ytre Oslofjord er generelt mer utsatt for AChE-inhibering i perioder med sprøyting i jordbruk, men at de har klart å reetablere enzymaktivitet.

Fisk med forskjellige levemåter har forskjellige nivåer av AChE uttrykt (Sole et al. 2008). Naturlige faktorer kan spille inn på AChE aktivitet hos abbor (*Morone Saxatilis*) (Durieux et al. 2011). Det er påvist at salinitet og temperatur kan ha stor innvirkning på AChEaktivitet i blåskjell og flerbørstemark (Scaps et al. 2000; Pfeifer et al. 2005), da muligens som et resultat av poikiloterm livsstrategi. Man har også funnet effekter av salinitet på AChE-inhibering hos medaka (*Oryzias latipes*) (El-Alfy et al. 2001). Det er ikke funnet lignende funn angående torsk i litteraturen, men det er sannsynlig at naturlige faktorer også her kan spille inn. Det vil være interessant å i større grad se på salinitet og andre abiotiske forskjeller som mulige påvirkere for effekter på biomarkører mellom indre og ytre Oslofjord. Andre stoffer som metallene Hg, Pb og Cd har vist seg å hemme AChE i fisk ved høye konsentrasjoner (Payne et al. 1996).

Sesongvariasjoner i AChE aktivitet kan være et resultat av sesongvariert bruk av pestisider (Kreuger 1998). Det kan stemme med intensitet i bruk av pesticider som er ganske lav på vinterstid. Prøvene ble hentet inn i november og det kan være at det var lite pestisider som ble tilført ved avrenning i den perioden.

4.3 Effekter av bly

Det var ikke signifikante forskjeller i ALA-D aktivitet i blod fra torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk innsamlet i ytre Oslofjord. Bakgrunnsverdier for ALA-D hos torsk ligger et sted mellom 10-20 ng PBG/min/mg protein. Noen av prøvene hadde høyere aktivitet enn dette. Det har vært foreslått å vurdere fisk med verdier under 15 ng PBG/min/mg protein som påvirket av bly (OSPAR 2007). Noen torsk fra begge områder hadde verdier under 15 ng PBG/min/mg protein. Det kan tolkes som at det er forskjeller i sensitivitet eller eksponering innad i områdene, men det er ikke eksponering nok til at det er signifikant for populasjonen. Ettersom det var et fåtall som hadde såpass lave ALA-D verdier kan det tyde på at det ikke er effekt av bly på torsk i Oslofjorden. En annen mulig forklaring er tilstedeværelse av stoff som begrenser effekten bly har på ALA-D. Sink (Zn) kan redusere effekter av bly (Schmitt et al. 1993). Nivåene av sink i torskelever er under bakgrunnsnivåer (Green et al. 2011) og har derfor antagelig ikke effekt på ALA-D. Sink kan inducere metallothionein (MT) og det har ikke vært signifikante forskjeller i de områdene i undersøkelsene i 2008 og 2009 (Imrik 2010; Nerland 2011).

Resultatene for ALA-D likner funn fra 2009 (Nerland 2011). Det har tidligere vært signifikante forskjeller i ALA-D aktivitet mellom indre og ytre Oslofjord der aktiviteten har vært hemmet hos torsk innsamlet i indre Oslofjord (Holth 2004; Green 2010; Imrik 2010). Siden det har vært signifikante forskjeller tidligere men ikke de siste årene kan resultatene tyde på at det er en nedgående trend i blybelastningen i indre Oslofjord. Dette kan stemme med nedgang i utslipp av bly etter at man innførte internasjonale regler for utslipp hvilket resulterte blant annet i bruk av blyfri bensin. Kilder til blyutslipp i dag er i hovedsak fra blyammunisjon og redskaper fra fiske. Det er og noe tilførsel fra luft og forurensede jordmasser (Aas et al. 2012). De totale utslippene av bly har blitt redusert drastisk siden tiltak ble innført (Sørensen 2011; Aas et al. 2012). Man kan også observere økte nivåer i ALA-D de siste årene hvilket kan tyde på mindre hemming (Green et al. 2011).

Man kan også se synkende målinger av mg Pb/kg i torsk fra indre Oslofjord siden 90-tallet, men det har vært målt økninger rundt 2001 og 2008 for så å synke igjen i 2010 (Green et al. 2011; Berge et al. 2011a). Konsentrasjonene som er målt viser målinger av bly som skal være klasse II, tilstand god. Det er over bakgrunnsverdier, men ikke så høyt at det skal gi negativ effekt. Det kan stemme med målinger som ble gjort i denne undersøkelsen. Det tilsier at det ikke skal være effekter av bly på torsk fra indre Oslofjord, men det har tidligere vært

observert effekter på ALA-D selv om måling av bly har vært under deteksjonsgrensen (Hylland et al. 2009). Dette kan tolkes som at det enten ikke er nok bly til at det medfører toksisk effekt, eller at noe annet demper effekten.

4.4 PAH metabolitter

Torsk fra indre Oslofjord hadde signifikant høyere konsentrasjoner av OH-pyren i gallen enn torsk fra ytre Oslofjord. Gjennomsnittskonsentrasjon for OH-pyren i indre Oslofjord var 214 ng/g galle og medianen var 196 ng/g galle. Gjennomsnittskonsentrasjon for OH-pyren i ytre Oslofjord var 42 ng/g galle og medianen var 38 ng/g galle. Undersøkelser i 2002, 2008 og 2009 viser også signifikant høyere konsentrasjoner av OH-pyren i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011).

Pyren er biotilgjengelig for akvatiske organismer og finnes i mange sedimenter, kan gi dioksinliknende toksisitet gjennom å indukere CYP1A via Ah-reseptoren og er knyttet til flere negative effekter (Aas et al. 2000; Incardona et al. 2004; Incardona et al. 2006). Ved hypoksiske forhold kan antagonistiske eller synergistiske effekter oppstå. Hypoksi kan beskytte mot effekter av pyren, men BaP og komplekse blandinger kan få forverret effekt (Fleming et al. 2011). Det ble ikke undersøkt for DNASKade i denne undersøkelsen, men tidligere undersøkelser har vist høyere grad av DNA skade i områder med høyere grad av OH-pyren metabolitter (Schnell et al. 2008; Imrik 2010). Siden PAH forekommer i kombinasjon mellom forskjellige stoffer er det mulig at man ikke bare bør ta hensyn til effekten av enkeltstoffene, siden additive eller synergistiske effekter kan spille inn. OH-pyren er en fremtredende metabolitt i galle hos fisk eksponert for pyrogene PAHer (Aas et al. 2001; Ariese et al. 2005). Det er påvist sammenheng mellom konsentrasjon av OH-pyren i galle og konsentrasjon av PAH i sediment og det brukes som en biomarkør for å undersøke eksponering for PAH (Aas et al. 2001; Hosnedl et al. 2003). Invertebrater som flerbørstemark og skalldyr biotransformerer PAHer mindre effektivt enn vertebrater. Det kan akkumulere i invertebrater med mindre effektiv metabolisme og biotransformasjon og kan fungere som kilder til PAHer for torsk (Livingstone 1998; Aas et al. 2000; Hylland 2006; Ikenaka et al. 2006; Jørgensen et al. 2008). Enn høyere tilstedeværelse av PAHer i byttet til torsk fra indre Oslofjord kan være årsak til forskjellene mellom indre og ytre Oslofjord.

Konstentrasjonen av OH-fenantren var ikke signifikant forskjellig mellom områdene i dette studiet, men forekom i like mengder i indre og ytre Oslofjord. Det var høyere konsentrasjoner

OH-fenantren i ytre Oslofjord sammenlignet indre Oslofjord i 2002, men resultatene fra 2008 og 2009 viste ingen signifikante forskjeller mellom områdene (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011).

Gallemetabolitter har generelt en halveringstid på dager og sier kun noe om eksponeringen den siste uken, selv om dette vil avhenge av fødetilgang (van der Oost et al. 2003; Beyer et al. 2010). Fødestatus til fisken har betydning for både tetthet og volum til gallen (Metcalf et al. 2001). Høye konsentrasjoner kan indikere at det i den seneste tid var stor eksponering, men det er i utgangspunktet vanskelig si så mye om langtidseksponeringen. Siden funnene i denne undersøkelsen likner tidligere funn kan det tyde på at eksponering for PAHer holder seg jevnt høyere i indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011).

4.5 Effekter av plane organiske miljøgifter (påvirkning av cytokrom P4501A)

Det var signifikante forskjeller i CYP1A mRNA, proteinmengde og enzymaktivitet mellom indre og ytre Oslofjord i lever fra torsk. Det kan indikere at det er en større effekt av CYP1A induserende stoffer i indre Oslofjord enn i ytre (Goksøyr et al. 1992; Hylland et al. 1998). CYP1A induseres ved binding av kjemikalier som PAHer, dioksiner og PCB til cytosolisk aryl hydrokarbon receptor (AhR). Induseringen av AhR kan knyttes til flere negative effekter som produksjon av elektrofile metabolitter, oksygenradikaler, redusert kapasitet for metabolisering av fremmedstoffer og endring i metabolismen av endogene stoffer (Whyte et al. 2000).

4.5.1 Cytokrom P4501A aktivitet (EROD)

Det var signifikante forskjeller i CYP1A enzymaktivitet fra torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk innsamlet i ytre Oslofjord. Det kan indikere at det er en større belastning av CYP1A induserende stoffer i indre Oslofjord enn i ytre (Goksøyr et al. 1992; Hylland et al. 1998). EROD målingene kan sammenlignes med tidligere år. Høyere verdier av EROD i indre Oslofjord ble også funnet i 2002 og 2008 (Holth 2004; Imrik 2010).

Oslofjorden er forurenset av PCB og PAH som kan gi forhøyet EROD, hvilket kan forklare resultatene (Green et al. 2011). Høy eksponering for CYP1A induserende miljøgifter gir høye verdier av EROD. Sammenheng mellom EROD verdier og organisme eller populasjonseffekter er ikke like klart definert. Noen av organismeeffektene er dannelse av

DNA addukter, hepatiske neoplasmer, reproduksjonseffekter. Man kan korrelere EROD aktivitet med dioksinliknende effekter, men man anser forhøyet EROD mest som en indikator for eksponering (Whyte et al. 2000). Negative effekter knyttet til EROD induksjon er dannelselse av dna addukter og carcinogenese, reproduktive effekter, økt LSI og mortalitet (Whyte et al. 2000). Man kan forvente at fisk som har blitt eksponert for PCB lenge vil ha høyere målinger av EROD enn de med kortere eksponering på grunn av enzymadaptering (Wu et al. 2005). Forhøyet EROD har vært koblet til økt LSI, antagelig som et resultat av hepatisk hyperplasi eller hypertrofi hos hepatocytter (Slooff et al. 1983; Whyte et al. 2000). Det har også vært gjort undersøkelser som tyder på lave LSI verdier i områder med høy EROD (Forlin et al. 1995). Upåvirket LSI ved eksponering har også vært påvist (da Costa et al. 1995). Siden LSI kan påvirkes av mange forskjellige faktorer som sesong, diett og reproduktiv status har det vært anbefalt å se på LSI og EROD som parallelle indikatorer for eksponering snarere enn å ha en entydig sammenheng ved forurensing (Whyte et al. 2000).

Basalnivåene for EROD regnes å være mellom 9-95 pmol/min/mg protein (OSPAR 2007). Kun tre prøver i denne undersøkelsen overskrider disse verdiene, men det var signifikant høyere verdier i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Medianen for indre Oslofjord var 34,7 pmol/min/mg protein, mens medianen for ytre Oslofjord var 25,7 pmol/min/mg protein. Det er kan antyde det er relativt lave nivåer av kjemikalier som induserer EROD, men at det er signifikant mer i indre enn i ytre Oslofjord. Overvåking av Oslofjorden indikerer at indre Oslofjord hadde moderat forurensing av PCB (klasse II) i 2010 (Green et al. 2011). Høyere konsentrasjon av PAH metabolitter i denne undersøkelsen indikerer at det var større eksponering for PAH i indre Oslofjord som kan ha induisert CYP1A (Aas et al. 2000; Incardona et al. 2006).

Hypoksiske forhold kan nedregulere CYP1A aktivitet (Fleming et al. 2011; Rahman et al. 2012). CYP1A mRNA kan også nedreguleres av hypoksiske forhold (Olsvik et al. 2006). Dersom individene i undersøkelsen har oppholdt seg i områder med lave oksygenkonsentrasjoner kan det ha påvirket EROD. Det vil i så fall være sannsynlig at det hadde skjedd i indre Oslofjord ettersom det på grunn av eutrofiering er dårlige oksygenforhold, spesielt i Bærumsbassenget (Berge et al. 2011a).

Sesong, temperatur, og salinitet kan påvirke EROD aktivitet. Både høye og lave temperaturer har vist å gi endring i EROD aktivitet (Sleiderink et al. 1995; Lange et al. 1999). Alle prøvene i dette studiet ble hentet inn over 4 dager så forskjeller sesong og temperatur påvirket ikke

resultatene. CTD ble også målt. Dersom prøvetakingen hadde vært over en lengre tidsperiode er det mulig at temperaturforskjeller kunne hatt en påvirkning. Matinntak og diett kan påvirke EROD aktivitet (Ankley et al. 1988). Fødevalg kan også tenkes å kunne ha innvirkning ettersom mat kan være kilde til stoffer som induserer CYP1A, men også fordi sult kan nedregulere EROD (Whyte et al. 2000). Populasjonene i indre og ytre Oslofjord lever i forskjellige områder, men mageinnhold ble ikke undersøkt. Det kan tenkes at fødevalg eller fødetilgang har påvirkning på deres EROD aktivitet (Whyte et al. 2000).

CYP1A aktivitet kan hemmes av organotinn, lavmolekylære PAH-er og alkylfenoler (AP) (Whyte et al. 2000; Sturve et al. 2006; Holth et al. 2008). Eksponering for komplekse sammensetninger kan og hemme EROD. Inhibering av katalytisk aktivitet gjør at man kan underestimere effekter av eksponering. Katalytisk aktivitet kan også reduseres av denaturering etter sub-optimal håndtering under innsamling eller lagring. Det kan også påvirke toksisitet gjennom potensiering eller antagonisme. Det har vært målt lav EROD aktivitet i høyt forurensede områder, muligens som et resultat av EROD inhibering (Whyte et al. 2000). Måling av CYP1A protein og CYP1A genekspresjon gav et mer helhetlig estimat av eksponeringeffekt (Goksøyr 1991; Goksøyr et al. 1992; Whyte et al. 2000).

4.5.2 CYP1A konsentrasjon

Det var signifikante forskjeller i CYP1A protein fra lever i torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk innsamlet i ytre Oslofjord. Det bekrefter forhøyet EROD og viser en større belastning av CYP1A induserende stoffer i indre Oslofjord enn i ytre (Goksøyr et al. 1992; Hylland et al. 1998). Man har tidligere observert god korrelasjon mellom CYP1A og EROD, men det kan variere (Goksøyr et al. 1992).

Det viser at det er signifikant høyere mengde av CYP1A protein i torsk fra indre. Det er i samsvar med funn fra tidligere år (Holth 2004; Imrik 2010). Det viser på at det er høyere eksponering for organiske miljøgifter som PAH og PCB i indre Oslofjord.

Liknende resultater ble funnet i 2008 (Imrik 2010) der både EROD og CYP1A var signifikant høyere i torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk innsamlet i ytre Oslofjord. I 2002 og 2009 var det ikke signifikante forskjeller mellom indre og ytre Oslofjord i EROD (Holth 2004; Nerland 2011). I 2002 var det signifikante forskjeller i CYP1A protein og forhøyet EROD i nyre så det er mulig at EROD i lever var inhibert det året. Det kan være at

andre faktorer som påvirker EROD har ført til variasjonene enten det er knyttet til eksponering for hemmende stoffer, lavere eksponering for induserende stoffer eller andre faktorer som temperatur. Det er både høyere aktivitet og relativ mengde av CYP1A. Høyere EROD ble observert i 2002 og 2008, men ikke 2009 (Holth 2004; Imrik 2010; Nerland 2011). Resultatene for CYP1A målt med ELISA er relative og verdiene kan derfor ikke sammenlignes direkte med tidligere undersøkelser. Det er allikevel interessant å se at det er observert høyere mengder i indre sammenlignet med ytre tidligere.

4.6 Genekspresjon

4.6.1 CYP1A

CYP1A var signifikant oppregulert i indre Oslofjord for både hunner og hanner. Det ble påvist høyere verdier for EROD, ELISA og CYP1A mRNA i dette studiet. Resultatene for genekspresjon av CYP1A stemte overens med signifikante forskjeller i måling av EROD og CYP1A. PCB og PAHer kan bidra til induksjon av CYP1A slik at både CYP1A og aktivitet øker (Beyer et al. 1996; Osorio-Yanez et al. 2012). Resultatene i denne undersøkelsen har vist at fisk i indre Oslofjord eksponeres for PAHer. Torsk i indre Oslofjord er også eksponert for forhøyde nivåer av PCB (Green et al. 2011).

Oppregulering av CYP1A mRNA i indre Oslofjord passer godt med at CYP1A enzymaktivitet (EROD) og CYP1A proteinmengde (ELISA) også var høyere i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Resultatene viser tydelig at det var effekter fra CYP1A induserende kjemikalier på torsk fra indre Oslofjord. Transkripsjonsnivåer og proteinnivåer av CYP1A er ofte knyttet til hverandre selv om de har ulik tidshorisont. Høyere uttrykk av CYP1A mRNA aktivitet relateres til høyere CYP1A protein og CYP1A aktivitet (Stagg et al. 2000; Arinc et al. 2001). Det finnes også forsøk der man ikke har funnet noen direkte sammenheng mellom mRNA og protein eller aktivitet til CYP1A. Man har blant annet observert at oppregulering av mRNA ikke nødvendigvis medfølges av høyere EROD aktivitet (George et al. 2004; Kammann et al. 2008). Det er generelt kortere halveringstid for mRNA (timer) enn protein (dager, uker), noe som åpenbart vil påvirke den relative responsen. Det har vært gjennomført undersøkelser der proteinmengde og katalytisk aktivitet for CYP1A gikk ned, men mRNA forble uforandret (Tom et al. 2003). Der man ikke har oppdaget sammenheng kan det være et resultat av inhibering av aktivitet, eller det kan være mRNA

aktiviteten er et forvarsel til hva som er i ferd med å skje på proteinnivå. Det kan i slike tilfeller være at inhibering har begrenset aktivitet eller at enzymets katalytiske aktivitet henger etter genuttrykket. En svakhet ved å kun bruke genekspressjon som biomarkør for eksponering er at mRNA er en veldig kortvarig effekt. Det gir et øyeblikksbilde av eksponeringen, men sier ikke noe om langtidseffekt. Det finnes eksempler på at fisk kan oppregulere mRNA når de beveger seg innom et forurenset område, men at CYP1A aktivitet ikke induseres (Stagg et al. 2000; Arinc et al. 2001). Det er derfor gunstig benytte CYP1A mRNA uttrykt i kombinasjon for andre biomarkører for å unngå å danne et feilbilde på grunn av begrenset tidsaspekt, inhibering, eller situasjoner som kan endre eksponering. Værforhold, strøm, pulsutslipp, migrering og komplekse blandingseffekter er parametre som kan tenkes å endre eksponering.

Det er i noen studier vist seg å være forskjeller mellom kjønn, og CYP1A kan være noe upålitelig som biomarkør for hunnfisk ettersom øye østrogen kan ha en hemmende effekt på CYP1A, men det er årstidsavhengig og har ikke effekt i denne undersøkelsen (Hasselberg et al. 2005; Lie et al. 2009a; Grans et al. 2010).

4.6.2 UDP glukuronosyltransferase (UDPGT)

Det var ingen forskjeller i uttrykk av genet for UDPGT. Man har tidligere sett sammenheng mellom oppregulert UDPGT og områder forurenset med PAH og tributyltinn (TBT)(Mortensen et al. 2007). Torsk fra indre Oslofjord har større eksponering for PAH enn ytre, men det ga ikke utslag i oppregulering av UDPGT. UDPGT genuttrykk kan reduseres av PBDE-47, hvilket er påvist i Oslofjorden (Olsvik et al. 2009; Green et al. 2011). Det er derfor en mulighet for UGT hemmes og derfor ikke oppreguleres. Det ville vært interessant å måle protein for å undersøke eventuelt samsvar, eller hvorvidt innsamling kan ha vært gjort på et tidspunkt der mRNA var lavt men protein var tilstede.

4.6.3 Metallotionein (MT), varmesjokkprotein (HSP70) og hem oksygenase (HO-1)

Det var kun signifikante forskjeller i HSP70 mellom indre og ytre Oslofjord for hanner, med oppregulering i indre Oslofjord. Det kan tyde på en stressrelatert induksjon for hannfisk i indre. MT, HSP70 og HO-1 har vært observert å være oppregulert i områder utsatt for tungmetaller og kan ses som en indikator på metallindusert stress (Williams et al. 1996;

Viarengo et al. 1999). HSP70 og HO-1 kan induseres av stressreaksjoner fra temperatur eller oksidativt stress. Hg eksponering har vist å gi oppregulert mRNA for HSP70 og HO-1 i gjeller hos juvenil torsk, og oppregulering av HO-1 i lever (Olsvik et al. 2011). Det finnes indikasjoner for felles regulering for HO-1 og HSP70 (Koizumi et al. 2007). Kun HSP70 var oppregulert i dette studiet, og da kun hanner. Det kan være både hunn og hannfisk opplever en stressrespons, men at det er kjønnsforskjeller som gjør at kun HSP70 i hovedsak ble induisert hos hanner. Det bør bemerkes at det var veldig høy effektivitet i reaksjonen til HSP70 i denne undersøkelsen hvilket kan bety at primerne ikke var optimale.

Det har tidligere vært funnet signifikante forskjeller i metallothionein (MT) mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord, som kan være indikasjon på eksponering for metaller som Cd, Cu og Hg (Holth 2004; Imrik 2010). I 2010 ble både protein og mRNA målt (Nerland 2011). I 2002 var det lavere mengder MT i indre Oslofjord med høyest verdier i hunner mens det i 2008 var ingen signifikante forskjeller mellom områdene men signifikant høyere mengde i hanner (Holth 2004; Imrik 2010). I 2009 var det ikke signifikante forskjeller mellom indre og ytre Oslofjord i MT verken for genekspressjon eller protein (Nerland 2011). Det har vært en stigende trend i kvikksølvverdier fra torskefilet fra 2004 til 2010 (Berge et al. 2011a).

4.6.4 Vitellogenin (Vtg)

Vitellogenin (Vtg) var signifikant oppregulert hos hanner i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Resultatene kan indikere at det er en større belastning av syntetiske eller naturlige østrogen i indre Oslofjord enn i ytre (Scott et al. 2006). Vtg er biomarkør for påvirkning fra syntetiske eller naturlige østrogen (Mellanen et al. 1999; Lattier et al. 2001). Flere kjemikalier som frigis til miljø kan forstyrre normal endokrin funksjon. Utslipp fra avfallsanlegg og avrenning fra husdyrhold kan forstyrre endokrine systemer i akvatiske organismer (Larsson et al. 1999). Negative konsekvenser knyttet til hormonforstyrrelse inkluderer redusert fertilitet, klekking og overlevelse blant avkom samt endret hormonaktivitet, intersexgonader, feminiserte hanner og endret seksuell atferd hos marine organismer (Scott et al. 2006). Oslofjorden har utslipp fra urbane renseanlegg. Utslipp fra renseanlegg og papirindustri kan utgjøre en kilde til syntetiske og naturlige østrogen som kan forstyrre fisk sine endokrine funksjoner (Sumpter 1995; Mellanen et al. 1999; Larkin et al. 2003). Vtg er et eggeplommeprotein som normalt ikke skal uttrykkes hos hannfisk. Det er en sensitiv biomarkør for eksponering for hormonforstyrrelse. Oppregulering av Vtg i indre Oslofjord kan indikere at det er signifikant påvirkning fra østrogenliknende stoffer som kan

indusere feminiserende effekter på hannfisk. Dersom det er østrogenener som gir effekten kan det tenkes å også påvirke CYP1A ettersom det har vist å induseres av eksponering for dette (Hasselberg et al. 2004). Det har tidligere blitt funnet forhøyede Vtg nivåer i plasma hos hanner i indre Oslofjord (Scott et al. 2006). Ved proteinmålinger gjennomført i 2002 ble det ikke funnet tegn til økte nivåer Vtg (Holth 2004). Det var ikke signifikante forskjeller i genekspressjon av Vtg i studiet som ble gjennomført i 2009 (Nerland 2011). Det kan tenkes at proteinverdier burde vært undersøkt samtidig ettersom mRNA gir et veldig tidsbegrenset inntrykk av effekt på organismene. Forskjellen mellom målingene av Vtg mRNA i 2009 og i denne undersøkelsen kan være på grunn av at genet ikke ble signifikant uttrykt på tidspunktet prøvene ble tatt. Vtg mRNA har en levetid på få timer mens Vtg protein kan vare i uker (Schultz et al. 2001; Hemmer et al. 2002). Det har vært observert at mengden av både naturlige og syntetiske østrogenener i utslipp kan variere over tid (Rodgers-Gray et al. 2000).

Vitellogeninresponsen vil også være dose- og tidsavhengig, hvilket kan gjøre det vanskelig å si noe sikkert om eventuelle langtidseffekter (Rodgers-Gray et al. 2000). Denne undersøkelsen karakteriserer kun hvorvidt det er forskjeller mellom områdene. For å avgjøre om det er store nok effekter til at det kan få betydning for individer eller populasjoner må Vtg nivåer undersøkes nøyere. Mangelen på forskjeller i GSI mellom hanner fra indre og ytre Oslofjord for kan indikere at selv om det er indusert Vtg i indre Oslofjord, så er det ikke nok til å påvirke gonader. Det var store variasjoner i ekspressjon av Vtg i dette studiet. Enkelte individer hadde veldig lavt Vtg genuttrykk og noen hadde veldig høyt. Det kan bety at det er store variasjoner i eksponering. Å studere forskjeller i genekspressjon mellom individer og populasjoner i ville bestander kan være problematisk. Mange faktorer som størrelse, modning, kjønn og naturlig genetisk drift kan ha innvirkning på variasjon i transkripsjon (Lie et al. 2009a). Man har også tidligere sett tegn til at referansegeneet beta-actin har fått endret sin aktivitet som et resultat av eksponering for estrogeneksponering (Larkin et al. 2003).

4.7 Sammenhenger

LSI og kondisjon var signifikant positivt korrelert for begge kjønn i indre Oslofjord. I ytre Oslofjord var det kun signifikant korrelasjon for hunner. Det kan bety at de henger sammen med fødestatus. GSI er antakelig et mål på hvor nært fisk er gyting (Morgan et al. 2010). LSI og GSI var signifikant korrelert for hunner i både indre og ytre Oslofjord. Reproductiv status kan påvirkes av næringstilgang.

I dette studiet var EROD positivt korrelert med CYP1A for hanner og hunner i indre Oslofjord. Torsk med høy EROD hadde også høy CYP1A. Korrelasjon mellom EROD og CYP1A protein har blitt observert tidligere (Goksøyr et al. 1992). For CYP1A mRNA var det signifikant positiv korrelasjon med CYP1A protein for hunner i indre Oslofjord og EROD for hanner i indre Oslofjord. Det kan tyde på at det er en mer eller mindre kontinuerlig eksponering for stoffer som induserer CYP1A. For hunner i ytre Oslofjord CYP1A mRNA var positivt korrelert med CYP1A protein. Mangelen på korrelasjon mellom CYP1A mRNA for hunner i indre Oslofjord kan bety det er noe inhibering av katalytisk aktivitet for CYP1A.

EROD var signifikant negativt korrelert med kondisjon for hanner i indre Oslofjord. Det kan tyde på at stoffer som induserer EROD også kan påvirke kondisjon hos torsk. Selv om det ikke er signifikante forskjeller i kondisjon mellom indre og ytre Oslofjord kan det hende at kondisjonen til torsk fra indre Oslofjord påvirkes negativt av miljøgifter. Det kan være at fysiologiske forskjeller mellom kjønn ledet til ulikheten i korrelasjon. Kjønn og modning kan påvirke EROD aktivitet (Whyte et al. 2000). Hunnlige kjønnshormoner kan virke hemmende på CYP1A i kjønnsmoden fisk (Elskus et al. 1992). For hunner i ytre Oslofjord var EROD signifikant negativt korrelert med GSI. Det kan forekomme høye østrogennivåer under gonadeutvikling og hvilket kan være på grunn av CYP1A hemming via reseptor "cross-talk" (Hasselberg et al. 2005; Grans et al. 2010). Hunner kan derfor ha lavere CYP1A protein og EROD aktivitet, spesielt rundt gyttetid (Larsen et al. 1992; Arukwe et al. 1997a; Whyte et al. 2000). Eksponering for østrogen eller nonylfenoler kan også hemme CYP1A (Arukwe et al. 1997b). Prøvene i denne undersøkelsen ble tatt i november. Det er utenom gyttetid, og det var ikke signifikant forskjell i GSI mellom indre og ytre Oslofjord. Det kan tenkes at hunner med høyere GSI hadde mer østrogen som påvirket EROD.

Ettersom torsk fra Oslofjorden betegnes som stasjonær vil det innebære at man kan forvente at eldre fisk hadde høyere EROD verdier enn yngre fisk ettersom de vil ha hatt mer tid til å oppholde seg i et kontaminert område (Knutsen et al. 2003; Wu et al. 2005). Det ble ikke observert noen sammenheng mellom alder og EROD i korrelasjonsanalysen. Det er mulig det var for få fra forskjellige aldersgrupper til at det kunne gi et klart bilde av hvorvidt alder hadde betydning for EROD. Forhold mellom EROD og alder kan maskeres av blanding av stoffer eventuelt av negative effekter som påvirker klekking og dødsrate (Hugula et al. 1995; Whyte et al. 2000).

Den signifikante negative korrelasjonen mellom OH-pyren og både LSI og kondisjon for hunner i indre Oslofjord kan tyde på negative helseeffekter fra blant annet PAH eksponering. Ved eksponering for pyrogene PAH-er har det blitt observert redusert LSI (Aas et al. 2001). Det har blitt observert at PAH kan føre til vedvarende lavere LSI verdier i kombinasjon med nitritt (NO₂⁻) etter avsluttet eksponeringen (Shailaja et al. 2006). Renseanlegg rundt Oslofjorden har gitt en sterk reduksjon i fosfor og nitrogen siden 1970-tallet. Det er allikevel en antropogen tilførsel fra land som gir økt primærproduksjon og vekst enn naturlig (Berge et al. 2011a). Dette kan muligens i kombinasjon med PAH gi negative effekter på kondisjon og LSI hos torsk i indre Oslofjord.

5 Konklusjoner

Det var signifikante forskjeller i lengde og vekt for torsk av samme alder fra indre og ytre Oslofjord. Torsk fra indre Oslofjord var både kortere og veide mindre ved samme alder. Torsk fra indre Oslofjord hadde også signifikant lavere LSI enn torsk fra ytre Oslofjord, men det var ikke forskjeller i kondisjon for torsk innsamlet i de to områdene.

AChE var ikke signifikant forskjellig mellom områdene hvilket tyder på at det ikke er påvirkning av organofosfater, karbamater eller andre stoffer som kan gi nevrotoksisitet på torsk i indre Oslofjord.

ALA-D var ikke signifikant forskjellig mellom indre og ytre Oslofjord, hvilket tyder på at det ikke er sterke effekter av bly hos torsk fra indre Oslofjord.

Det var signifikant mer av PAH metabolitten OH-pyren i galle fra torsk innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord. Dette viser at torsk fra indre Oslofjord er eksponert for forhøyde nivåer av PAHer.

For CYP1A ble det observert signifikante forskjeller på mRNA, protein og aktivitetsnivå. Det var høyere verdier for samtlige i indre Oslofjord. Det tyder på at det er høyere eksponering for CYP1A induserende stoffer som non-orto og mono-orto PCBer, dioksiner og PAHer i indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord.

Det var signifikant oppregulering av HSP70 mRNA i torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord for hanner. Vtg var også oppregulert hos hanntorsk fra indre Oslofjord sammenlignet med hanntorsk fra ytre Oslofjord, hvilket kan tyde på eksponering for østrogener i indre fjord.

Resultatene viser at torsk fra indre Oslofjord var mer eksponert for PAH og andre organiske miljøgifter enn torsk fra ytre Oslofjord. Det er imidlertid ikke entydig om det er eksponering for skadelige stoffer som fører til forskjeller i vekst og LSI mellom torsk i indre Oslofjord og ytre Oslofjord. Ulike økologiske forhold som fødetilgang og habitatsforskjeller mellom områder kan og gi ulike forutsetninger for kondisjon, vekst og reproduksjon (Sherwood et al. 2007; Morgan et al. 2010). At LSI også var signifikant lavere i indre Oslofjord i tillegg til høyere indusering av CYP1A og eksponering for PAHer kan tyde på at det er effekt av

miljøgifter. Korrelasjonen mellom OH-pyren og LSI tyder på at miljøgiftbelastningen i indre Oslofjord har negative effekter for torsk som lever der.

6 Videre arbeid

Det ville vært interessant å få avklart hvorvidt forskjellene i vekst hos torsk i de to områdene kan forklares med andre forhold enn miljøgifter. Å kvantifisere effekter av relativt nye miljøgifter som fluorerte og bromerte hydrokarboner ville kunne være interessant å se i forhold til effekten av de som allerede blir undersøkt.

En gransking av fødevalg og mageinnhold sett i forhold til effekter fra miljøgifter ville vært nyttig for å se om noen typer føde er fungerende som kilde til miljøgifter dersom man kan se korrelasjon mellom fødevalg og effekt. Mageinnhold kan gi en viss indikasjon på hva som er spist nylig, men sier ikke nødvendigvis mye om langtidsdiett. Noen typer føde er også lettere nedbrutt enn andre og kan være vanskelige å kvantifisere. En mulig løsning ville vært kvantifisering av stabile isotoper for å identifisere opphavet til føden.

Det ville vært interessant å se hvordan kondisjon varierer gjennom året relativt til eventuelle variasjoner i effekter fra miljøgifter ettersom prøvene ble tatt på den årstiden der kondisjonen er høyest (Mello et al. 2005; Fagerli 2006). Det å ta prøver ved flere sesonger ville gjort det mulig å se om det er sesongforskjeller i effekter fra miljøgifter på torsk fra Oslofjorden.

Litteratur

- Aarre, I. (2008). Opptak og effekter på torsk av miljøgifter fra sediment. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Aas, E., T. Baussant, L. Balk, B. Liewenborg og O. K. Andersen (2000). "PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod." Aquatic Toxicology **51**(2): 241-258.
- Aas, E., J. Beyer, G. Jonsson, W. L. Reichert og O. K. Andersen (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.
- Aas, W., S. Solberg, S. Mano og K. E. Ytri (2012). Overvåking av langtransportert forurenset luft og nedbør. Atmosfæriske tilførsler, 2011: 206 sider.
- Andersen, T., F. Beyer, E. Föyn og I. C. f. t. E. o. t. Sea (1970). Hydrography of the Oslofjord: report on the Study Course in Chemical Oceanography arranged in 1969 by ICES with support of UNESCO, International Council for the Exploration of the Sea.
- Ankley, G. T. og V. S. Blazer (1988). "Effects of Diet on PCB-Induced Changes in Xenobiotic Metabolism in the Liver of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)."
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **45**(1): 132-137.
- Ariese, F., J. Beyer, G. Jonsson, C. Porte Visa og M. M. Krahn (2005). "Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile." ICES Techniques in Marine Environmental Sciences **39**: i.
- Arinc, E., S. Kocabiyik og E. Su (2001). "Induced CYP1A mRNA, protein and catalytic activity in the liver of feral fish, leaping mullet, *Liza saliens*." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **128**(2): 281-290.
- Arukwe, A., L. Förllin og A. Goksøy (1997b). "Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(12): 2576-2583.
- Arukwe, A. og A. Goksøy (1997a). "Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)." Journal of Experimental Zoology **277**(4): 313-325.
- Baalsrud, K. og J. Magnusson (2002). Indre Oslofjord, Natur og Miljø.
- Basu, N., A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Schulte og G. K. Iwama (2002). "Heat shock protein genes and their functional significance in fish." Gene **295**(2): 173-183.
- Berge, J. A., R. Amundsen, B. Bjerkeng, G. Borgersen, E. Bjerknes, J. K. Gitmark, J. Gjørseter, M. Grung, H. Gundersen, T. F. Holth, K. Hylland, T. Johnsen, T. Knutsen, A. B. Ledang, E. R. Lømsland, J. Magnusson, I. L. Nerland, E. M. Olsen, Ø. Paulsen, T. Rohrlack, K. Sørensen og M. Walday (2011a). Overvåking av forurensningssituasjonen i Indre Oslofjord 2010.
- Beyer, J., G. Jonsson, C. Porte, M. M. Krahn og F. Ariese (2010). "Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review." Environmental Toxicology and Pharmacology **30**(3): 224-244.
- Beyer, J., M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J. U. Skare og A. Goksoyr (1996). "Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys*

- flesus L) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway." *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): 75-98.
- Bocquené, G., C. Bellanger, Y. Cadiou og F. Galgani (1995). "Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species." *Ecotoxicology* **4**(4): 266-279.
- Breivik, K., B. Bjerkeng, F. Wania, A. Helland og J. Magnusson (2004). "Modeling the fate of polychlorinated biphenyls in the inner Oslofjord, Norway." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(10): 2386-2395.
- Buhler, D. R. og D. E. Williams (1988). "The role of biotransformation in the toxicity of chemicals." *Aquatic Toxicology* **11**(1-2): 19-28.
- Burke, M. D. og R. T. Mayer (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.
- da Costa, E. G. og L. R. Curtis (1995). "Bioaccumulation of dietary 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and induction of hepatic arylhydrocarbon hydroxylase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(10): 1711-1717.
- Di Giulio, R. T., C. Habig og E. P. Gallagher (1993). "Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish." *Aquatic Toxicology* **26**(1-2): 1-22.
- Di Giulio, R. T. og D. E. Hinton (2008). *The Toxicology of fishes*. Boca Raton, CRC Press.
- Dignam, J. D. (1990). "Preparation of extracts from higher eukaryotes." *Methods in Enzymology* **182**: 194-203.
- Durieux, E. H., T. Farver, P. Fitzgerald, K. Eder og D. Ostrach (2011). "Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*)." *Fish Physiology and Biochemistry* **37**(1): 21-29.
- Dutil, J.-D., C. Jabouin, R. Larocque, G. Desrosiers og P. U. Blier (2008). "Atlantic cod (*Gadus morhua*) from cold and warm environments differ in their maximum growth capacity at low temperatures." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **65**(12): 2579-2591.
- Dutil, J. D. og Y. Lambert (2000a). "Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**(4): 826-836.
- Dutil, J. D., Y. Lambert og D. Chabot (2003). "Winter and spring changes in condition factor and energy reserves of wild cod compared with changes observed during food-deprivation in the laboratory." *Ices Journal of Marine Science* **60**(4): 780-786.
- Dwyer, F. J., C. J. Schmitt, S. E. Finger og P. M. Mehrle (1988). "Biochemical changes in longear sunfish, *Lepomis megalotis*, associated with lead, cadmium and zinc from mine tailings." *Journal of Fish Biology* **33**(2): 307-317.
- Eggens, M. L. og F. Galgani (1992). "Ethoxyresorufin-o-deethylase (erod) activity in flatfish - fast determination with a fluorescence plate-reader." *Marine Environmental Research* **33**(3): 213-221.
- El-Alfy, A. T., S. Grisle og D. Schlenk (2001). "Characterization of salinity-enhanced toxicity of aldicarb to Japanese medaka: Sexual and developmental differences." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(9): 2093-2098.
- Eliassen, J.-E. og O. Vahl (1982). "Seasonal variations in biochemical composition and energy content of liver, gonad and muscle of mature and immature cod, *Gadus morhua* (L.) from Balsfjorden, northern Norway." *Journal of Fish Biology* **20**(6): 707-716.

- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres og R. M. Featherstone (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88.
- Elskus, A. A., R. Pruell og J. J. Stegeman (1992). "Endogenously-mediated, pretranslational suppression of cytochrome P4501A in PCB-contaminated flounder." Marine Environmental Research **34**(1-4): 97-101.
- Fagerli, C. W. (2006). "Biologien til torsk (*Gadus morhua*) i Oslofjorden, med hovedvekt på kondisjon og vekst", Universitet i Oslo.
- Feder, M. E. og G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology." Annual Review of Physiology **61**(1): 243-282.
- Ferrari, A., A. Venturino og A. M. Pechén de D'Angelo (2007). "Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." Comparative biochemistry and physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **146**(3): 308-313.
- Fleming, C. R. og R. T. Di Giulio (2011). "The role of CYP1A inhibition in the embryotoxic interactions between hypoxia and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH mixtures in zebrafish (*Danio rerio*)." Ecotoxicology **20**(6): 1300-1314.
- Forlin, L., T. Andersson, L. Balk og A. Larsson (1995). "Biochemical and physiological effects in fish exposed to bleached kraft mill effluents." Ecotoxicological Environmental Safety **30**(2): 164-170.
- Fulton, M. H. og P. B. Key (2001). "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(1): 37-45.
- Galgani, F., G. Bocquene og Y. Cadiou (1992). "Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the north-sea." Marine Ecology-Progress Series **91**(1-3): 77-82.
- George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh, W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott og J. Thain (2004). "A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution." Marine Environmental Research **58**(2-5): 571-575.
- Gjørseter, J. og D. S. Danielssen (2011). "Age, growth and otolith annulus formation of cod (*Gadus morhua*) in the Risør area on the Norwegian Skagerrak coast during 1986–1996." Marine Biology Research **7**(3): 281-288.
- Goksøyr, A. (1991). "A semi-quantitative cytochrome P450IA1 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. og L. Forlin (1992). "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." Aquatic Toxicology **22**(4): 287-312.
- Grans, J., B. Wassmur og M. C. Celander (2010). "One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes." Aquatic Toxicology **100**(3): 263-270.
- Grant, S. M. og J. A. Brown (1999). "Variation in condition of coastal Newfoundland 0-group Atlantic cod (*Gadus morhua*): field and laboratory studies using simple condition indices." Marine Biology **133**(4): 611-620.
- Gray, M. A., C. J. Smith, B. J. Park, V. P. Palace og K. A. Kidd (2004). "Depression of brain acetylcholinesterase (AChE) in fish collected downstream of agricultural activities." Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences **2562**: 13.
- Green, N. W., M. Schøyen, S. Øxnevad, A. Ruus, T. Høgåsen, B. Beylich, H. Jarle, Å. K. G. Rogne og L. Tveiten (2011). Hazardous substances in fjords and coastal waters - 2010.

- Levels, trends and effects. Long-term monitoring of environmental quality in Norwegian coastal waters: 252 sider.
- Green, N. W. S., Merete; Øksnevad, Sigurd; Ruus, Anders; Høgåsen, Tore; Håvardstun, Jarle; Rogne, Åse K. Gudmundson; Tveiten, Lise (2010). Hazardous substances in fjords and coastal waters-2009. Levels, trends and effects. Long-term monitoring of environmental quality in Norwegian coastal waters. **1062/2010**: 287 sider.
- Grung, M., T. F. Holth, M. R. Jacobsen og K. Hylland (2009). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Metabolites in Atlantic Cod Exposed via Water or Diet to a Synthetic Produced Water." Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **72**(3-4): 254-265.
- Hasselberg, L., B. E. Grosvik, A. Goksoyr og M. C. Celander (2005). "Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Comparative Hepatology **4**(1): 2.
- Hasselberg, L., S. Meier, A. Svardal, T. Hegelund og M. C. Celander (2004). "Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **67**(4): 303-313.
- Hemmer, M. J., C. J. Bowman, B. L. Hemmer, S. D. Friedman, D. Marcovich, K. J. Kroll og N. D. Denslow (2002). "Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 β -estradiol and p-nonylphenol." Aquatic Toxicology **58**(1-2): 99-112.
- Hodson, P. V., B. R. Blunt, D. J. Spry og K. Austen (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., B. R. Blunt og D. M. Whittle (1984). "Monitoring lead exposure of fish." Advances in Environmental Science and Technology **16**: 87-98.
- Holth, T. F. (2004). Effekter av miljøgifter på torsk og skrubbe fra indre Oslofjord. Cand. Scient., Universitetet i Oslo.
- Holth, T. F., R. Nourizadeh-Lillabadi, M. Blaesbjerg, M. Grung, H. Holbeck, G. I. Petersen, P. Alestrom og K. Hylland (2008). "Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components." Aquatic Toxicology **90**(4): 277-291.
- Hop, H., J. Gjosaeter og D. S. Danielssen (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., J. Hajšlová, V. Kocourek, M. Tomaniová og K. Volka (2003). "1-Hydroxypyrene as a Biomarker for Fish Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **71**(3): 465-472.
- Hugula, J. L., J. C. Philippart, P. Kremers, G. Goffinet og J. P. Thome (1995). "PCB contamination of the common barbel; *Barbus barbus* (pisces, cyprinidae), in the River Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change." Aquatic Ecology **29**(1): 135-145.
- Hylland, K. (2004). "Biological effects of contaminants: quantification of delta -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood." ICES Techniques in Marine Environmental Sciences **34**: i, 1-9.
- Hylland, K. (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." Journal of Toxicological Environmental Health **69**(1-2): 109-123.
- Hylland, K., T. Nissen-Lie, P. G. Christensen og M. Sandvik (1998). "Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L." Marine Environmental Research **46**(1-5): 51-55.

- Hylland, K., A. Ruus, M. Grung og N. Green (2009). "Relationships Between Physiology, Tissue Contaminants, and Biomarker Responses in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.)." Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **72**(3-4): 226-233.
- Ikenaka, Y., H. Eun, M. Ishizaka og Y. Miyabara (2006). "Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, *Daphnia magna*." Aquatic Toxicology **80**(2): 158-165.
- Imrik, E. C. R. (2010). Effekter av miljøgifter på torsk fra Indre Oslofjord. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Incardona, J. P., T. K. Collier og N. L. Scholz (2004). "Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Toxicology and Applied Pharmacology **196**(2): 191-205.
- Incardona, J. P., H. L. Day, T. K. Collier og N. L. Scholz (2006). "Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism." Toxicology and Applied Pharmacology **217**(3): 308-321.
- Jobling, M. (1988). "A review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua* L., with particular reference to growth under farmed conditions." Aquaculture **70**(1-2): 1-19.
- Jørgensen, A., A. M. B. Giessing, L. J. Rasmussen og O. Andersen (2008). "Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes." Marine Environmental Research **65**(2): 171-186.
- Kammann, U., T. Lang, A.-J. Berkau og M. Klempt (2008). "Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A1 or EROD—a comparison." Environmental Science and Pollution Research **15**(7): 600-605.
- Kirby, M. F., S. Morris, M. Hurst, S. J. Kirby, P. Neall, T. Tylor og A. Fagg (2000). "The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries." Marine Pollution Bulletin **40**(9): 780-791.
- Kjesbu, O. S., J. Klungsøyr, H. Kryvi, P. R. Witthames og M. G. Walker (1991). "Fecundity, Atresia, and Egg Size of Captive Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Relation to Proximate Body Composition." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **48**(12): 2333-2343.
- Knutsen, H., P. E. Jorde, C. Andre og N. C. Stenseth (2003). "Fine-scaled geographic population structuring in a highly mobile marine species: The Atlantic cod." American Fisheries Society Annual Meeting **133**: 52-53.
- Koops, M. A., J. A. Hutchings og T. M. McIntyre (2004). "Testing hypotheses about fecundity, body size and maternal condition in fishes." Fish and Fisheries **5**(2): 120-130.
- Krahn, M. M., D. G. Burrows, G. M. Ylitalo, D. W. Brown, C. A. Wigren, T. K. Collier, S. L. Chan og U. Varanasi (1992). "Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill." Environmental Science & Technology **26**(1): 116-126.
- Kreuger, J. (1998). "Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996." Science of The Total Environment **216**(3): 227-251.
- Kystdepartementet, F. o. (2011). Fakta om fiskeri og havbruk 2011. F. o. Kystdepartementet: 32 sider.
- Lambert, Y. og J. D. Dutil (1997 (a)). "Condition and energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) during the collapse of the northern Gulf of St. Lawrence stock." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **54**(10): 2388-2400.

- Lambert, Y. og J. D. Dutil (1997 (b)). "Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)?" Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **54**: 104-112.
- Lambert, Y. og J. D. Dutil (2000b). "Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **57**(4): 815-825.
- Lange, U., A. Goksøyr, D. Siebers og L. Karbe (1999). "Cytochrome P450 1A-dependent enzyme activities in the liver of dab (*Limanda limanda*): kinetics, seasonal changes and detection limits." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **123**(4): 361-371.
- Larkin, P., I. Knoebl og N. D. Denslow (2003). "Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **136**(2): 149-161.
- Larsen, H. E., M. Celander og A. Goksøyr (1992). "The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle." Fish Physiology and Biochemistry **10**(4): 291-301.
- Larsson, D. G. J., M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A. H. Berg, P. E. Olsson og L. Förlin (1999). "Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive?" Aquatic Toxicology **45**(2-3): 91-97.
- Lattier, D. L., D. A. Gordon, D. J. Burks og G. P. Toth (2001). "Vitellogenin gene transcription: A relative quantitative exposure indicator of environmental estrogens." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(9): 1979-1985.
- Lie, K. K., A. Lanzen, H. Breilid og P. A. Olsvik (2009a). "Gene expression profiling in atlantic cod (*Gadus Morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(8): 1711-1721.
- Lie, K. K., S. Meier og P. A. Olsvik (2009b). "Effects of environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production on Atlantic cod (*Gadus morhua*)."
Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **150**(2): 141-149.
- Livingstone, D. R. (1998). "The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish." Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology **120**(1): 43-49.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr og R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." Journal of Biological Chemistry **193**(1): 265-275.
- Marshall, C. T., N. A. Yaragina, Y. Lambert og O. S. Kjesbu (1999). "Total lipid energy as a proxy for total egg production by fish stocks." Nature **402**(6759): 288-290.
- Mattilsynet (2012). Omsetningsstatistikk for plantevernmidler 2007-2011: 11 sider.
- Mellanen, P., M. Soimasuo, B. Holmbom, A. Oikari og R. Santti (1999). "Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l) exposed to effluents from pulp and paper mills." Ecotoxicological Environmental Safety **43**(2): 133-137.
- Mello, L. G. S. og G. A. Rose (2005). "Seasonal cycles in weight and condition in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in relation to fisheries." Ices Journal of Marine Science **62**(5): 1006-1015.
- Metcalfe, C. D., T. L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B. G. Koenig, C. Khan, R. J. Hughes, T. R. Croley, R. E. March og T. Potter (2001). "Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*)."
Environmental Toxicological Chemistry **20**(2): 297-308.

- Monosson, E. og J. J. Stegeman (1991). "Cytochrome P450E (P450IA) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: Comparison of response in fish from georges bank and narragansett bay." Environmental Toxicology and Chemistry **10**(6): 765-774.
- Monserrat, J. M., L. A. Geracitano og A. Bianchini (2003). "Current and Future Perspectives Using Biomarkers to Assess Pollution in Aquatic Ecosystems." Comments on Toxicology **9**(5-6): 255-269.
- Monserrat, J. M., P. E. Martinez, L. A. Geracitano, L. L. Amado, C. M. G. Martins, G. L. L. Pinho, I. S. Chaves, M. Ferreira-Cravo, J. Ventura-Lima og A. Bianchini (2007). "Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **146**(1-2): 221-234.
- Morgan, M. J., R. M. Rideout og E. B. Colbourne (2010). "Impact of environmental temperature on Atlantic cod *Gadus morhua* energy allocation to growth, condition and reproduction." Marine Ecology-Progress Series **404**: 185-195.
- Mortensen, A. S. og A. Arukwe (2007). "Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **145**(3): 431-441.
- Myers, M. S., L. L. Johnson og T. K. Collier (2003). "Establishing the Causal Relationship between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Hepatic Neoplasms and Neoplasia-Related Liver Lesions in English Sole (*Pleuronectes vetulus*)." Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal **9**(1): 67-94.
- Nanton, D. A., S. P. Lall og M. A. McNiven (2001). "Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L." Aquaculture Research **32**: 225-234.
- Nerland, I. L. (2011). Effects of environmental toxicants in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Inner Oslofjord. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Okay, O. S., L. Tolun, V. Tufekci, F. Telli-Karakoc og P. Donkin (2006). "Effects of pyrene on mussels in different experimental conditions." Environment International **32**(4): 538-544.
- Oliveir, M., C. Gravato og L. Guilhermino (2012). "Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance." Ecological Indicators **19**: 206-214.
- Olsson, P. E., P. Kling, L. J. Erkel og P. Kille (1995). "Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene." European Journal of Biochemistry **230**(1): 344-349.
- Olsvik, P., L. Softeland og K. Lie (2008). "Selection of reference genes for qRT-PCR examination of wild populations of Atlantic cod *Gadus morhua*." BMC Research Notes **1**(1): 47.
- Olsvik, P. A., M. Brattås, K. K. Lie og A. Goksøyr (2011). "Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway." Chemosphere **83**(4): 552-563.
- Olsvik, P. A., T. Kristensen, R. Waagbo, K. E. Tollefsen, B. O. Rosseland og H. Toften (2006). "Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*." Journal of Experimental Biology **209**(Pt 15): 2893-2901.

- Olsvik, P. A., F. Kroglund, B. Finstad og T. Kristensen (2010). "Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) smolt." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(8): 1852-1861.
- Olsvik, P. A., K. K. Lie, J. Sturve, L. Hasselberg og O. K. Andersen (2009). "Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Chemosphere **75**(3): 360-367.
- Osorio-Yanez, C., J. L. Garcia-Tavera, M. T. Perez-Nunez, I. Poblete-Naredo, B. Munoz, B. S. Barron-Vivanco, S. J. Rothenberg, O. Zapata-Perez og A. Albores (2012). "Benzo(a)pyrene induces hepatic AKR1A1 mRNA expression in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*)." Toxicology Mechanisms and Methods **22**(6): 438-444.
- OSPAR (2007). Background document on biological effects monitoring techniques: 122 sider.
- Pardoe, H., G. Thordarson og G. Marteinsdottir (2008). "Spatial and temporal trends in condition of Atlantic cod *Gadus morhua* on the Icelandic shelf." Marine Ecology-Progress Series **362**: 261-277.
- Pardoe, H., A. Vainikka, G. Thordarson, G. Marteinsdottir og M. Heino (2009). "Temporal trends in probabilistic maturation reaction norms and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) on the Icelandic shelf." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **66**(10): 1719-1733.
- Payne, J. F., A. Mathieu, W. Melvin og L. L. Fancey (1996). "Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland." Marine Pollution Bulletin **32**(2): 225-231.
- Petersen, D. G., F. Reichenberg og I. Dahllöf (2008). "Phototoxicity of Pyrene Affects Benthic Algae and Bacteria from the Arctic." Environmental Science & Technology **42**(4): 1371-1376.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan og L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): 36.
- Pfeifer, S., D. Schiedek og J. W. Dippner (2005). "Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **320**(1): 93-103.
- Pies, C., T. Ternes og T. Hofmann (2008). "Identifying sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils: distinguishing point and non-point sources using an extended PAH spectrum and *n*-alkanes." Journal of Soils and Sediments **8**(5): 312-322.
- Rahman, M. S. og P. Thomas (2012). "Effects of Hypoxia Exposure on Hepatic Cytochrome P450 1A (CYP1A) Expression in Atlantic Croaker: Molecular Mechanisms of CYP1A Down-Regulation." PLoS ONE **7**(7): 16.
- Ranneklev, S. B. (2009). Kartlegging av miljøgifter i Alna og Akerselva: 114 sider.
- Ranneklev, S. B., I. J. Allan og T. Tjomsland (2011). Kartlegging av miljøgifter som tilføres Bærumsbassenget og indre Oslofjord fra overvann og Sandviksvassdraget: 69 sider.
- Rodgers-Gray, T. P., S. Jobling, S. Morris, C. Kelly, S. Kirby, A. Janbakhsh, J. E. Harries, M. J. Waldock, J. P. Sumpter og C. R. Tyler (2000). "Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish." Environmental Science & Technology **34**(8): 1521-1528.
- Roesijadi, G. (1992). "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals." Aquatic Toxicology **22**(2): 81-113.

- Rätz, H.-J. og J. Lloret (2003). "Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications." Fisheries Research **60**(2-3): 369-380.
- Scaps, P. og O. Borot (2000). "Acetylcholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor*: effects of temperature and salinity." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **125**(3): 377-383.
- Schlezinger, J. J., R. D. White og J. J. Stegeman (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., C. A. Caldwell, B. Olsen, D. Serdar og M. Coffey (2002). "Inhibition of Erythrocyte δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Activity in Fish from Waters Affected by Lead Smelters." Environmental Monitoring and Assessment **77**(1): 99-119.
- Schmitt, C. J., M. L. Wildhaber, J. B. Hunn, T. Nash, M. N. Tieger og B. L. Steadman (1993). "Biomonitoring of lead-contaminated Missouri streams with an assay for erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in fish blood." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **25**(4): 464-475.
- Schnell, S., D. Schiedek, R. Schneider, L. Balk, P. J. Vuorinen, H. Karvinen og T. Lang (2008). "Biological indications of contaminant exposure in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic Sea." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **65**(6): 1122-1134.
- Schultz, I. R., G. Orner, J. L. Merdink og A. Skillman (2001). "Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17α -ethynylestradiol." Aquatic Toxicology **51**(3): 305-318.
- Scott, A. P., I. Katsiadaki, P. R. Witthames, K. Hylland, I. M. Davies, A. D. McIntosh og J. Thain (2006). "Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea?" Marine Environmental Research **61**(2): 149-170.
- Shailaja, M. S., R. Rajamanickam og S. Wahidulla (2006). "Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite." Environmental Pollution **143**(1): 174-177.
- Sherwood, G. D., R. M. Rideout, S. B. Fudge og G. A. Rose (2007). "Influence of diet on growth, condition and reproductive capacity in Newfoundland and Labrador cod (*Gadus morhua*): Insights from stable carbon isotopes ($\delta(13)C$)." Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography **54**(23-26): 2794-2809.
- Shi, X., C. He, Z. Zuo, R. Li, D. Chen, R. Chen og C. Wang (2012). "Pyrene exposure influences the craniofacial cartilage development of *Sebastiscus marmoratus* embryos." Marine Environmental Research **77**(0): 30-34.
- Sleiderink, H. M., J. Beyer, J. M. Everaarts og J. P. Boon (1995). "Influence of temperature on cytochrome P450 1A in dab (*Limanda limanda*) from the Southern North Sea: Results from field surveys and a laboratory study." Marine Environmental Research **39**(1-4): 67-71.
- Slooff, W., C. F. Van Kreijl og A. J. Baars (1983). "Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands." Aquatic Toxicology **4**(1): 1-14.
- Sole, M., G. Lobera, B. Aljinovic, J. Rios, L. M. G. de la Parra, F. Maynou og J. E. Cartes (2008). "Cholinesterases activities and lipid peroxidation levels in muscle from shelf and slope dwelling fish from the NW Mediterranean: Its potential use in pollution monitoring." Science of The Total Environment **402**(2-3): 306-317.

- Stagg, R. M., J. Rusin, M. E. McPhail, A. D. McIntosh, C. F. Moffat og J. A. Craft (2000). "Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(11): 2797-2805.
- Sturve, J., L. Hasselberg, H. Fälth, M. Celander og L. Förlin (2006). "Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic Toxicology **78, Supplement**(0): S73-S78.
- Sumpter, J. P. (1995). "Feminized responses in fish to environmental estrogens." Toxicology Letters **82–83**(0): 737-742.
- Søfteland, L., E. Holen og P. A. Olsvik (2010). "Toxicological application of primary hepatocyte cell cultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - Effects of BNF, PCDD and Cd." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **151**(4): 401-411.
- Sørensen, P. (2011). Prioriterte miljøgifter: Nasjonale utslipp – status 2009: 120 sider.
- Thain, J. E., A. D. Vethaak og K. Hylland (2008). "Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques." ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil **65**(8): 1508-1514.
- Thoresen, A. G. (2008). Acoustic tracking of juvenile cod (*Gadus morhua*) in Skagerrak: effects of body size on short-term movement patterns in nearshore habitats. Masteroppgave, University of Oslo.
- Tom, M. og M. Auslander (2005). "Transcript and protein environmental biomarkers in fish—a review." Chemosphere **59**(2): 155-162.
- Tom, M., M. Shmul, E. Shefer, N. Chen, H. Slor, B. Rinkevich og B. Herut (2003). "Quantitative evaluation of hepatic cytochrome P4501A transcript, protein, and catalytic activity in the striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*)." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(9): 2088-2092.
- van der Oost, R., J. Beyer og N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology **13**(2): 57-149.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe og F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): 18.
- Viarengo, A., B. Burlando, N. Ceratto og I. Panfoli (2000). "Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview." Cellular and Molecular Biology **46**(2): 407-417.
- Viarengo, A., B. Burlando, F. Dondero, A. Marro og R. Fabbri (1999). "Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes." Biomarkers **4**(6): 455-466.
- Whyte, J. J., R. E. Jung, C. J. Schmitt og D. E. Tillitt (2000). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure." Critical Reviews in Toxicology **30**(4): 347-570.
- Williams, J. H., N. S. Petersen, P. A. Young, M. A. Stansbury, A. M. Farag og H. L. Bergman (1996). "Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(8): 1324-1328.
- Williams, T. D. og B. C. Bedford (1974). The use of otoliths for age determination. University of Reading.
- Williams, T. D., K. Gensberg, S. D. Minchin og J. K. Chipman (2003). "A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*)." Aquatic Toxicology **65**(2): 141-157.
- Wootton, R. J. (1998). Ecology of teleost fishes. Dordrecht, Kluwer.

- Wu, R. S. S., W. H. L. Siu og P. K. S. Shin (2005). "Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring." Marine Pollution Bulletin **51**(8–12): 623-634.
- Yaragina, N. A. og C. T. Marshall (2000). "Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*)." ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil **57**(1): 42-55.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical analysis. Upper Saddle River, N.J., Pearson Education.
- Zhang, Y., C. Wang, L. Huang, R. Chen, Y. Chen og Z. Zuo (2012). "Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Aquatic Toxicology **114–115**(0): 119-124.

Vedlegg

Vedlegg 1: Fysiologiske data for torsk fra indre Oslofjord.

Sted	Kjønn	Fisk nr	Alder	Lengde	Vekt	Lever	Gonader	LSI	Kondisjon	GSI
Indre	F	IF 1	2	48,5	1039	8,2	3,6	0,79	0,91	0,35
Indre	M	IF 2	3	43,0	669	15,5	5,9	2,32	0,84	0,88
Indre	F	IF 3	4	44,5	691	8,8	3,0	1,27	0,78	0,43
Indre	F	IF 4	2	48,0	955	18,9	4,5	1,98	0,86	0,47
Indre	F	IF 5	2	41,0	575	7,6	2,3	1,32	0,83	0,40
Indre	F	IF 6	2	39,0	575	19,1	9,6	3,32	0,97	1,67
Indre	F	IF 7	3	45,5	774	6,6	2,5	0,85	0,82	0,32
Indre	M	IF 8	3	45,0	766	7,5	16,3	0,98	0,84	2,13
Indre	M	IF 9	4	45,5	780	12,6	0,6	1,61	0,83	0,08
Indre	M	IF 10	5	46,0	793	18,5	6,0	2,33	0,81	0,76
Indre	M	IF 11	3	43,0	574	9,1	0,8	1,59	0,72	0,14
Indre	F	IF 12	3	52,0	1182	12,9	4,5	1,09	0,84	0,38
Indre	F	IF 13	3	47,0	782	11,9	3,2	1,52	0,75	0,41
Indre	F	IF 14	8	58,0	1638	35,9	34,1	2,19	0,84	2,08
Indre	M	IF 15	4	48,0	1354	29,8	33,2	2,20	1,22	2,45
Indre	M	IF 16	4	46,5	842	15,9	6,6	1,89	0,84	0,78
Indre	F	IF 17	3	47,5	880	20,4	8,3	2,32	0,82	0,94
Indre	M	IF 18	5	43,0	722	23,0	2,1	3,19	0,91	0,29
Indre	M	IF 19	4	46,0	810	18,1	0,9	2,23	0,83	0,11
Indre	F	IF 20	6	50,0	1207	33,1	12,3	2,74	0,97	1,02
Indre	F	IF 21	3	38,0	474	5,3	1,6	1,12	0,86	0,34
Indre	F	IF 22	3	42,5	697	9,3	5,0	1,33	0,91	0,72
Indre	M	IF 23	3	37,0	448	6,7	16,8	1,50	0,88	3,75
Indre	F	IF 24	4	45,5	906	40,1	9,8	4,43	0,96	1,08
Indre	M	IF 25	3	35,0	346	5,3	0,7	1,53	0,81	0,20
Indre	M	IF 26	3	42,0	655	11,0	0,5	1,68	0,88	0,08
Indre	F	IF 27	2	41,0	612	10,0	3,5	1,63	0,89	0,57
Indre	M	IF 28	3	40,0	538	7,5	22,0	1,39	0,84	4,09
Indre	M	IF 29	4	41,0	638	11,9	3,9	1,86	0,93	0,61
Indre	F	IF 30	4	46,0	814	13,9	0,2	1,71	0,84	0,02
Indre	F	IF 31	4	49,0	1044	18,3	23,5	1,75	0,89	2,25
Indre	F	IF 32	2	45,0	308	15,3	14,3	4,97	0,34	4,65
Indre	M	IF 33	5	45,5	877	28,1	18,1	3,21	0,93	2,06
Indre	F	IF 34	2	43,0	639	6,5	3,6	1,02	0,80	0,56
Indre	F	IF 35	4	50,5	1127	16,7	8,8	1,48	0,88	0,78
Indre	M	IF 36	4	51,0	1290	12,4	1,0	0,96	0,97	0,08
Indre	F	IF 37	4	42,0	558	6,9	10,4	1,24	0,75	1,86
Indre	M	IF 38	6	53,0	1180	23,7	6,7	2,01	0,79	0,57
Indre	F	IF 39	5	50,0	1148	26,5	21,0	2,31	0,92	1,83
Indre	M	IF 40	3	44,5	835	32,1	25,6	3,85	0,95	3,07

hunn; F, hann; M, lengde; gram, vekt; gram

Vedlegg 2: Fysiologiske data fra torsk i ytre Oslofjord.

Sted	Kjønn	Fisk nr	Alder	Lengde	Vekt	Lever	Gonader	LSI	Kondisjon	GSI
Ytre	M	YF 1	5	52,0	1307	42,1	2,6	3,22	0,93	0,20
Ytre	F	YF 2	4	48,5	1118	19,2	4,3	1,72	0,98	0,38
Ytre	F	YF 3	5	51,0	1363	26,9	4,4	1,97	1,03	0,32
Ytre	F	YF 4	2	48,0	1070	22,4	8,3	2,09	0,97	0,78
Ytre	F	YF 5	4	47,0	867	8,8	2,6	1,01	0,84	0,30
Ytre	F	YF 6	3	52,0	1279	25,4	12,5	1,99	0,91	0,98
Ytre	M	YF 7	3	49,0	1189	23,6	9,7	1,99	1,01	0,82
Ytre	M	YF 8	6	54,5	1649	62,1	15,9	3,77	1,02	0,96
Ytre	M	YF 9	3	45,0	951	21,2	33,7	2,23	1,04	3,54
Ytre	F	YF 10	3	46,5	881	9,9	4,3	1,12	0,88	0,49
Ytre	F	YF 11	3	50,0	1149	32,1	6,3	2,79	0,92	0,55
Ytre	F	YF 12	3	47,0	838	12,5	2,0	1,49	0,81	0,24
Ytre	M	YF 13	2	45,0	858	16,7	5,2	1,95	0,94	0,61
Ytre	F	YF 14	2	48,0	974	23,6	5,6	2,42	0,88	0,57
Ytre	M	YF 15	3	46,0	854	15,3	4,8	1,79	0,88	0,56
Ytre	M	YF 16	3	49,0	1116	35,0	3,4	3,14	0,95	0,30
Ytre	F	YF 17	3	48,0	1126	24,0	2,0	2,13	1,02	0,18
Ytre	M	YF 18	4	50,0	1164	30,0	8,9	2,58	0,93	0,76
Ytre	F	YF 19	3	51,0	1237	25,0	23,7	2,02	0,93	1,92
Ytre	F	YF 20	4	48,5	1209	37,2	25,5	3,08	1,06	2,11
Ytre	F	YF 21	4	55,0	1555	57,8	18,8	3,72	0,93	1,21
Ytre	M	YF 22	4	53,0	1419	32,1	3,0	2,26	0,95	0,21
Ytre	F	YF 23	2	57,0	1494	30,8	6,7	2,06	0,81	0,45
Ytre	F	YF 24	2	39,0	479	14,4	2,0	3,01	0,81	0,42
Ytre	M	YF 25	3	44,0	780	14,1	0,1	1,81	0,92	0,01
Ytre	F	YF 26	4	43,0		5,6	4,8		0,00	
Ytre	F	YF 27	2	46,0	885	20,9	16,7	2,36	0,91	1,89
Ytre	F	YF 28	3	50,0	1136	11,0	18,4	0,97	0,91	1,62
Ytre	M	YF 29	3	45,5	915	23,4	5,3	2,56	0,97	0,58
Ytre	M	YF 30	5	52,0	1313	34,5	9,6	2,63	0,93	0,73
Ytre	M	YF 31	3	50,5	1116	36,4	15,4	3,26	0,87	1,38
Ytre	F	YF 32	2	46,0	833	9,2	7,4	1,10	0,86	0,89
Ytre	F	YF 33	3	50,0	1149	31,0	14,4	2,70	0,92	1,25
Ytre	F	YF 34	3	47,0	976	35,1	7,0	3,60	0,94	0,72
Ytre	F	YF 35	2	51,0	1287	25,8	12,4	2,00	0,97	0,96
Ytre	F	YF 36	3	54,0	1309	34,3	10,7	2,62	0,83	0,82
Ytre	F	YF 37	3	46,5	870	20,8	20,0	2,39	0,87	2,30
Ytre	M	YF 38	2	50,0	1124	27,5	34,0	2,45	0,90	3,03
Ytre	M	YF 39	2	52,0	1380	31,3	14,8	2,27	0,98	1,07
Ytre	M	YF 40	2	54,5	1363	39,2	20,4	2,88	0,84	1,50

hunn; F, hann; M, lengde; gram, vekt; gram

Vedlegg 3: Biomarkørdata fra torsk i indre Oslofjord.

Sted	Kjønn	Fisk nr	OH-pyren	BaP	OH-fenantren	EROD	AChE	ALA-D	CYP1A
Indre	F	IF 1	227	1,12	7,863		2,54	15,54	49
Indre	M	IF 2	365	3,97	19,086		1,15	5,54	26
Indre	F	IF 3	139	0,00	4,298		2,78		48
Indre	F	IF 4	188	1,40	10,436		2,46	27,95	42
Indre	F	IF 5	137	1,28	6,671	118,43	3,70	10,50	67
Indre	F	IF 6	160	1,24	7,002			12,17	35
Indre	F	IF 7	315	1,85	13,605		1,08	15,25	23
Indre	M	IF 8	148	0,00	5,341	68,14	1,39	52,55	41
Indre	M	IF 9					2,87		31
Indre	M	IF 10	201	0,00	10,792	111,22	3,67	43,31	50
Indre	M	IF 11	181	2,77	14,978	71,01	1,27	28,89	37
Indre	F	IF 12	133	2,32	6,726	36,74	2,22	9,89	32
Indre	F	IF 13	194	1,72	9,905	76,84	2,18		
Indre	F	IF 14	209	1,59	17,249	14,91	0,61		17
Indre	M	IF 15	244	2,10	11,257		1,54	8,10	35
Indre	M	IF 16	162	1,84	8,617	64,87	1,04	33,22	36
Indre	F	IF 17	178	0,00	6,867		3,17	15,21	27
Indre	M	IF 18	247	1,81	11,307	35,95	1,31	36,40	22
Indre	M	IF 19	144	0,00	9,797	36,65		5,87	24
Indre	F	IF 20	170	1,40	7,156	44,34	2,19	51,42	33
Indre	F	IF 21	196	1,30	8,46		2,78	10,38	33
Indre	F	IF 22	143	2,33	7,186	41,98	1,23	12,71	28
Indre	M	IF 23	159	1,43	7,094	48,68	1,75	11,13	35
Indre	F	IF 24	200	0,00	6,804		1,91	16,42	27
Indre	M	IF 25	216		9,423		2,12		60
Indre	M	IF 26	158	2,76	7,514		4,05	33,60	39
Indre	F	IF 27	226	2,29	18,127	12,68		8,81	20
Indre	M	IF 28	432	3,47	27,13	5,42		11,51	28
Indre	M	IF 29	154	0,00	7,187		4,03	29,65	28
Indre	F	IF 30	148	1,53	7,353	30,29	2,50	20,28	42
Indre	F	IF 31	186	0,00	8,175	24,36	4,28	12,55	25
Indre	F	IF 32	148	2,15	6,572		2,03	19,17	28
Indre	M	IF 33	275	5,03	3,863		2,42	25,64	35
Indre	F	IF 34	201		10,13	46,67	3,24	22,00	27
Indre	F	IF 35	237	1,62	13,247	30,57	3,58	18,26	60
Indre	M	IF 36	247	1,29	11,037		1,32	23,64	39
Indre	F	IF 37	422	9,76	29,838	18,46	1,93	74,16	20
Indre	M	IF 38	311	1,90	13,944	39,91	0,98	32,83	28
Indre	F	IF 39	284	2,27	15,186	28,74	0,50	33,89	28
Indre	M	IF 40	247	1,27	10,032	47,12	1,29	24,73	42

AChE; nmol/min/mg protein ALA-D; ng PBG/min/ mg protein, OH-pyren; ng/g, BaP; ng/g OH-fenantren; ng/g EROD; pmol/min/mg protein, CYP1A; mOD/μg protein/min,

Vedlegg 4: Biomarkørdata fra torsk i ytre Oslofjord.

Sted	Kjønn	Fisk nr	OH-pyren	BaP	OH-fenantren	EROD	AChE	ALA-D	CYP1A
Ytre	M	YF 1	186	0,00	6,325		2,28		
Ytre	F	YF 2	16	0,00	0		2,07	11,24	11
Ytre	F	YF 3	26		2,056	33,85	1,76	28,95	29
Ytre	F	YF 4	15	3,73	47,499	19,95	2,21	9,37	9
Ytre	F	YF 5	44	1,60	13,18	19,50		20,53	21
Ytre	F	YF 6	45	2,96	15,734		1,50	9,59	10
Ytre	M	YF 7	38	0,00	10,392	16,79	2,64	31,61	32
Ytre	M	YF 8	37	1,78	10,814		2,19	30,12	30
Ytre	M	YF 9	67	1,92	16,59	24,59	1,77		
Ytre	F	YF 10	44	0,00	20,764	55,47	1,66	23,08	23
Ytre	F	YF 11	27	0,00	0			12,44	12
Ytre	F	YF 12	75	1,91	18,331		4,21	40,96	41
Ytre	M	YF 13	42	1,98	8,535	6,46	4,25	27,08	27
Ytre	F	YF 14	13	0,00	0	27,91	1,69	18,16	18
Ytre	M	YF 15	38	0,00	6,499	30,00	2,34	18,18	18
Ytre	M	YF 16	47	0,00	8,724	39,23	1,66	16,04	16
Ytre	F	YF 17		0,00	0	38,89	2,41	55,15	55
Ytre	M	YF 18	39	0,00	9,202	34,79		19,45	19
Ytre	F	YF 19	33	2,16	10,824	14,00	2,68	29,66	30
Ytre	F	YF 20	18	0,00	6,061	15,52	1,66	18,78	19
Ytre	F	YF 21	68	1,96	0	8,31	1,78	24,42	24
Ytre	M	YF 22	46	0,00	11,74		2,62	14,17	14
Ytre	F	YF 23	23	0,00	0	12,99	1,44	18,38	18
Ytre	F	YF 24	27	0,00	8,444	73,36	0,45		
Ytre	M	YF 25	27	0,00	8,126	36,72	2,94	30,00	30
Ytre	F	YF 26	41	2,09	12,359		3,10	22,62	23
Ytre	F	YF 27	34	0,00	9,616	12,25	2,14	15,46	15
Ytre	F	YF 28	33	1,66	12,041	45,92	2,75	24,95	25
Ytre	M	YF 29	36	0,00	9,234		0,75	14,78	15
Ytre	M	YF 30	48	1,88	15,31	48,55	1,81	17,28	17
Ytre	M	YF 31	63	1,66	19,331	12,05	1,28	49,23	49
Ytre	F	YF 32	26	2,06	8,938	9,40	2,61	27,77	28
Ytre	F	YF 33	52	0,00	12,31	32,91	7,02	21,91	22
Ytre	F	YF 34	16	0,00	0		3,49	18,65	19
Ytre	F	YF 35	44	1,45	13,33		1,23	30,67	31
Ytre	F	YF 36	34	2,13	11,599		2,92	26,28	26
Ytre	F	YF 37	20	0,00	2,87		2,09	59,82	60
Ytre	M	YF 38	61	0,00	0		1,09	13,95	14
Ytre	M	YF 39	56	0,00	17,1		2,20	38,97	39
Ytre	M	YF 40	45	0,00	12,164	29,46	1,50	11,58	12

AChE; nmol/min/mg protein ALA-D; ng PBG/min/ mg protein, OH-pyren; ng/g, BaP; ng/g OH-fenantren; ng/g EROD; pmol/min/mg protein, CYP1A; mOD/μg protein/min,

Vedlegg 5: Crossingpointverdier fra torsk i ytre Oslofjord.

Område	Kjønn	Fisk nr	CYP1a	MT	HSP70	HO-1	Vtg	UGT
Indre	F	IF 1	21,26	18,70	23,30	20,78	30,72	24,64
Indre	F	IF 3	20,78	21,18	25,79	26,18	30,55	24,37
Indre	F	IF 4	21,48	19,69	23,97	22,74	27,36	24,75
Indre	F	IF 7	21,50	19,46	23,72	20,79	29,20	24,27
Indre	M	IF 9	20,62	19,44	23,71	22,07	26,71	23,73
Indre	M	IF 11	21,78	22,06	23,54	23,59	27,24	24,93
Indre	F	IF 13	35,00	35,00	35,00	0,00	35,00	0,00
Indre	F	IF 14	22,84	18,77	23,24	21,87	15,63	25,05
Indre	M	IF 15	21,98	19,46	24,44	22,29	20,69	25,39
Indre	M	IF 16	21,30	19,98	24,21	21,53	25,86	24,33
Indre	M	IF 19	22,34	20,97	23,59	23,21	17,94	24,57
Indre	M	IF 23	22,22	20,23	23,53	24,25	34,66	24,45
Indre	M	IF 26	21,10	20,66	24,23	22,90	30,15	25,61
Indre	M	IF 28	23,92	19,63	24,44	23,15	32,08	25,35
Indre	M	IF 29	21,41	20,06	24,73	21,72	28,44	25,08
Indre	F	IF 31	21,98	20,47	23,84	26,06	19,34	23,80
Indre	F	IF 35	22,93	20,88	25,92	22,45	27,15	24,87
Indre	M	IF 36	20,19	19,81	23,50	19,48	25,28	24,05
Indre	F	IF 37	23,68	19,02	23,64	22,03	21,49	25,35
Indre	F	IF 39	22,28	19,79	24,75	22,04	16,47	25,28
Indre	M	IF 40	21,05	20,82	24,24	23,94	26,09	24,55
Ytre	F	YF 3	23,08	21,06	25,62	23,31	33,51	24,73
Ytre	F	YF 4	21,65	21,24	24,20	23,96	21,43	24,47
Ytre	M	YF 7	22,82	18,31	24,23	20,27	29,12	24,19
Ytre	M	YF 8	22,69	20,23	24,43	22,51	27,05	24,98
Ytre	F	YF 10	23,22	21,29	24,12	24,09	35,00	24,16
Ytre	F	YF 12	23,33	21,11	24,83	23,22	27,55	25,41
Ytre	M	YF 13	24,27	19,32	25,57	23,87	35,00	25,97
Ytre	M	YF 15	21,95	20,58	23,40	23,93	26,82	23,29
Ytre	F	YF 17	23,14	20,70	25,22	23,94	29,77	24,52
Ytre	M	YF 18	24,36	18,89	24,89	20,06	33,03	25,54
Ytre	F	YF 19	23,41	19,43	22,68	23,28	14,42	25,34
Ytre	F	YF 21	22,18	20,62	25,71	24,53	32,37	26,29
Ytre	F	YF 23	24,36	21,52	26,17	24,51	31,79	25,37
Ytre	F	YF 24	25,21	19,78	25,40	19,93	32,30	26,00
Ytre	M	YF 25	22,13	20,14	24,78	24,59	32,63	25,07
Ytre	F	YF 26	22,57	19,34	21,58	23,54	30,62	24,23
Ytre	M	YF 30	24,67	21,05	25,02	23,66	32,15	25,15
Ytre	M	YF 31	26,26	18,89	26,19	20,88	35,00	26,74
Ytre	F	YF 32	24,67	20,62	23,84	27,68	21,64	26,72
Ytre	F	YF 33	23,28	19,58	23,44	20,78	21,65	24,24
Ytre	F	YF 34	24,06	20,55	23,97	24,61	23,67	24,46
Ytre	F	YF 36	23,57	18,94	23,91	23,70	22,57	25,10
Ytre	M	YF 38	24,25	20,59	24,87	24,53	27,23	25,55

Ytre	M	YF 39	22,83	20,34	24,24	23,04	32,00	24,28
Ytre	M	YF 40	23,73	20,55	25,95	22,40	32,93	24,95

Vedlegg 6: Instrumentliste

Instrumenter/Software	Leverandør
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Gen5	BioTek
Potter-Elverhjem homogenisator	
SKAN Washer 300	Skaton Instruments
Genemole	MoleGenetics
SynergyMX	BioTek
Ultraturax, PRO 200	PRO Scientific Inc.
Precellys 24	Bertin Technologies
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Thermal Cycler	Eppendorf
Lightcycler 480	Roche
Relative Expression Software Tool (REST)	
Sorvall MTX 150	Thermo Scientific
Waters 2695 Separations Module	Waters
Relative expression software tool	REST©

Vedlegg 7: Buffere og løsninger

Fortynningsbuffer til homogenisering av muskel for AChE	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
pH 7,2	

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

Modifisert Ehrlichs reagens til ALA-D	
Kvikksølv(II)klorid	0,35g i 6ml dH ₂ O
70% perklorisyre	20ml
Eddiksyre	til totalt 110ml
Ehrlichs reagens	2g

Fellingsløsning for ALA-D	
Triklorediksyre	40,0g/l
Kvikksølv(II)klorid	27,0g/l

ALA-reagens for ALA-D	
δ-aminolevulin syre	33,5mg
Fortynningsbuffer	50ml

Fortynningsbuffer til proteinanalyse	
Tris-buffer	0,1M
pH 8,0 ved 40C	

Homogeniseringsbuffer for opparbeiding av lever	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
KCl	0,15M
DTT	1mM
Glyserol	0,05
pH 7,8	

Mikrosomalbuffer	
Kaliumfosfatbuffer	0,1 M
KCl	0,15M
EDTA	1 mM
Glyserol	20 %
pH 7,6	1mM

Fortynningsbuffer til EROD	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
pH 8,0	

Fortynningsbuffer for opparbeiding av muskel, til AChE	
Kaliumfosfatbuffer	0,1M
pH 7,2	

Coatingbuffer til CYP1A	
Karbonat-bikarbonatbuffer	1 kapsler/100 ml

TTBS CYP1A	
Tris-buffer ved pH 8,5	20mM
NaCl	0,5M
Tween-20	0,000005

Blokkeringsløsning CYP1A	
TTBS	
BSA	0,01

Antistoffbuffer til CYP1A	
TTBS	
BSA	0,001

Vedlegg 8:Kjemikalier

Kjemikalieliste	Produkt nr	Produsent
Acetylthiokoline iodid	A5751	Sigma-aldrich
Albumin fra bovint serum	A7906	Sigma-aldrich
Alkalin kobber tartrat	500-0113	BioRad
Bovine Serum Albumin	A2153	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxide	472310	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenfosfat	1,0658	MERCK
Di-kalium hydrogen trifosfat	P5379	Sigma-Aldrich
Dikalium trifosfat	22,131-7	Sigma Aldrich
Dithiobisnitrobenzo syre	D8130	Sigma-aldrich
Dithiotreitol	MB1015	Melford lab
Eddiksyre	33209	Sigma-Aldrich
Etylen diamin tetra eddiksyre	ED2SS	
Etylen diamintetrasyre dinatrium	E7889	Sigma-Aldrich
Folin reagens	500-0114	BioRad
Geit anti-kanin IgG konjugert med HRP, GAR-HRP		Biosense Laboratories
Kanin-anti-fisk antistoff CYP1A, CP226	C02401201-100	
Kalium dihydrogenfosfat	1,04873	MERCK
Kalium dihydrogenfosfat	P-5379	Sigma-aldrich
Porphobilinogen	P-1134	Sigma-aldrich
Resorufinetyl	E 3763	Sigma-aldrich
Resorufin	R 3257	Sigma-aldrich
Triklor syre	1,00807	MERCK
Triton X-100	T8787	Sigma-aldrich
Trizma base	T-1503	Sigma-aldrich
Trizma hydroklorid	T3253	Sigma-aldrich
Tween-20	P1379	Sigma-aldrich
β -glucoronidase/arylsulfatase	1,04114	MERCK
δ -aminolevulinsyre hydrogen klorid	A3785	Sigma-Aldrich
ρ -dimetylamino benzaldehyd (Ehrlichs reagens)	D2004	Sigma-Aldrich
Di-natrium hydrogen fosfat	30412	Sigma-Aldrich
Natrium dihydrogenfosfat	71504	Sigma-Aldrich
β -NADP redusert tetranatrium salt	N1630	Sigma-Aldrich

Vedlegg 9: Forkortelser

ACh	Acetylkolin
AChE	acetylkolinesterase
Ah-reseptor	Aryl hydrocarbon reseptor
ALA-D	aminolevulin acid dehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
ATC	acetylthiokoline iodid
BaP	Benzo(a)pyrene
BSA	Bovint serum albumin
cDNA	Complementary DNA
Cp	Crossing point
CYP1a	Cytochrome P4501A
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesyre
DTT	Dithiothreitol
EF1A	Elongation Faktor 1-Alpha
EROD	7-ethoxy-resorufin-O-deethylase
Exp.factor	Expression factor
GSI	Gonadosomatisk indeks
HO-1	Heme-oxygenase-1
HPLC	High-performance liquid chromatography
hsp70	Heat shock protein 70
KLIF	Klima og forurensings direktoratet
NIVA	Norsk institutt fr vannforskning
LSI	Liversomatisk indeks
mRNA	Messenger RNA
MT	Metallothionein
NaCl	Natriumklorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEC	No enzyme control
NIVA	Norsk institutt for vannforskning
NTC	No template control
OP	organofosfater
PAH	polyaromatiske hydrokarboner
PCB	Polyklorerte bifenyler