



**Immunfunksjon og biotransformasjon hos piggvar  
(*Scophthalmus maximus*) eksponert for den vannløselige  
fraksjonen av Ekofisk råolje**

av Audun Storset

Masteroppgave i økotoksikologi

Oslo, juni 2014

Seksjon for akvatisk biologi og toksikologi

Institutt for biovitenskap (IBV)

© Audun Storset 2014

Immunfunksjon og biotransformasjon hos piggvar (*Scophthalmus maximus*)  
eksponert for den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje

Audun Storset

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført på Sandgerði Marine Centre i Sandgerði (Island) og Universitetet i Oslo august 2012 til juni 2014. Arbeidet har blitt veiledet av hovedveileder Ketil Hylland og internveileder Tor Fredrik Holth. Først av alt; takk til dere to for gode råd, god oppfølging og inspirerende veiledning på veien.

Jeg vil også takke min kompanjong og medsammensvorne Anne Luise Ribeiro for bra samarbeid og for at du har bidratt med topp stemning på de turene vi har vært på. Takk til Halldór for all hjelp med eksponeringsforsøket og for at du viste oss alt det fantastiske Island har å by på. Takk til Ásdís for ditt gode humør og for å du alltid stilte med en hjelpende hånd når det stod på som verst. Takk til Conchi og Cristóbal for all opplæring og hjelp i Spania. Takk til Merete Grung som bistod med HPLC-analyse på NIVA. Takk til pappa og Onkel Hans for å lese korrektur med påfølgende konstruktive innspill. Takk til Tage for godt samarbeid og kameratskap.

Sist men slettes ikke minst vil jeg takke min kjære Marit for dine gode råd, samt for all støtte og oppmuntring du har kommet med når "masterangsten" har røynet på som verst. Du er best!

Oslo, juni 2014

Audun Storset

## Sammendrag

Piggvar (*Scophthalmus maximus*) ble eksponert for den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje i et gjennomstrømmingssystem i 16 dager. Delvis nedbrutt olje ble fordelt på grus i kolonner med konsentrasjoner på 6, 12 og 24 g olje kg<sup>-1</sup> grus. Fisken ble prøvetatt etter 0, 2, 8 og 16 dagers eksponering. Galle ble analysert for metabolittene 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren ved hjelp av HPLC med fluorescensdeteksjon. Endringer av cytokrom P450A i lever ble analysert med ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) og som EROD (ethoxyresorufin *O*-deethylase). I tillegg ble det kvantifisert DNA-skade i hvite blodceller fra helblod og hodenyre med comet-metoden, samt oksidativ burst i hvite blodceller for å avklare om oljeeksponeringen hadde noen innvirkning på immunfunksjon. Etter 8 dagers eksponering ble de 2 gjenværende fiskene i hvert kar injisert; én med og én uten lipopolysakkarider (LPS). Dette ble gjort for å avklare om aktivering av immunforsvaret påvirker immunfunksjon hos fisk som blir eksponert for olje.

Det ble observert en signifikant oppgang i konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle hos oljeeksponert fisk de åtte første dagene. 1-hydroksypyren viste seg derimot å være en mindre sensitiv indikator på oljeeksponeringen. Samtidig var det en signifikant 3 til 5 ganger høyere EROD-aktivitet hos samtlige oljeeksponerte grupper etter 2 dager, men ingen signifikant forskjell etter 8 og 16 dager. Dette kan tyde på at det var en maksimal induksjon mellom 1 og 8 dagers eksponering. Det ble ikke observert signifikante endringer i verken mengde CYP1A, DNA-skade eller oksidativ burst i løpet av eksperimentet. Det ble heller ikke observert tydelige effekter av LPS-injeksjon på fisken. I dette eksperimentet har biomarkører knyttet til biotransformasjon vist seg å være mer sensitive i å detektere effekter av vannbåren Ekofisk råolje på piggvar enn biomarkører knyttet til DNA-skade og immunfunksjon.

# Innholdsfortegnelse

<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
1.1 OLJEUTSLIPP .....	1
1.2 POLYSYKLISKE AROMATISKE HYDROKARBONER (PAH) .....	2
1.3 BIOMARKØRER .....	4
1.4 BIOTRANSFORMASJON.....	4
1.5 DNA-SKADE .....	6
1.6 IMMUNKOMPETANSE.....	6
1.7 FØRSØKSORGANISME.....	8
1.11 MÅL OG DELMÅL .....	9
<b>2 MATERIALE OG METODER</b> .....	<b>11</b>
2.1 OLJE OG FORBEHANDLINGER .....	11
2.2 EKSPONERINGSOPPSETT .....	11
2.3 PRØVETAKING.....	13
2.4 INJEKSJON AV IMMUNSTIMULANT (LPS).....	13
2.5 ISOLERING AV HVITE BLODCELLER .....	14
2.6 CELLETELLING .....	14
2.7 PAH-METABOLITTER I GALLE .....	15
2.8 OPPARBEIDING AV LEVER.....	15
2.9 PROTEINANALYSE .....	16
2.10 CYP1A-AKTIVITET I LEVER (EROD).....	16
2.11 CYP1A-KONSENTRASJON I LEVER (ELISA) .....	18
2.12 DNA-SKADE I LEUKOCYTTER.....	19
2.13 OKSIDATIV BURST .....	20
2.14 STATISTISKE METODER .....	21
<b>3 RESULTATER</b> .....	<b>23</b>
3.1 PAH-METABOLITTER I GALLE .....	23
3.2 CYP1A-AKTIVITET I LEVER (EROD) .....	26
3.3 CYP1A-KONSENTRASJON I LEVER (ELISA).....	27
3.4 DNA-SKADE I LEUKOCYTTER.....	28
3.5 OKSIDATIV BURST .....	31
3.6 SAMMENHENGER MELLOM BIOMARKØRER .....	32
<b>4 DISKUSJON</b> .....	<b>34</b>
4.1 PAH-METABOLITTER I GALLE .....	34
4.2 FASE-1 METABOLISME.....	38
4.3 DNA-SKADE .....	42
4.4 MODULERING AV IMMUNRESPONS.....	43
<b>5 KONKLUSJONER</b> .....	<b>46</b>
<b>6 REFERANSER</b> .....	<b>48</b>
<b>VEDLEGG</b> .....	<b>57</b>

## Liste over forkortelser

AhR	Aryl hydrokarbon reseptor
ANOVA	Variansanalyse
B[a]P	Benzo[ <i>a</i> ]pyren
BSA	Bovin serum albumin
CKM	Cellekulturmedium
CYP1A	Cytokrom P4501A
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EDTA	Ethylenediammetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Etoksyresorufin
EROD	Etoksyreorufin <i>O</i> -deetylase
K <sub>ow</sub>	Oktanol/vann koeffisient
LPS	Lipopolysakkarider
NADPH	Nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat
PAH	Polyaromatiske hydrokarboner
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ppb	Parts per billion
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
SD	Standardavvik
TTBS	Trisbufret saltvann med Tween

# 1 Innledning

## 1.1 Oljeutslipp

Utnyttelse av petroleumsressurser har hatt stor betydning for utviklingen av det moderne samfunnet. Samtidig som dette har ført til en omfattende materiell og industriell vekst, har det også hatt betydelige negative konsekvenser for miljøet som omgir oss. Blant annet er det velkjent at oljeutslipp i havet kan ha miljømessige ringvirkninger, både når det skjer ved plutselige og store utslipp og ved mer langvarige eksponeringer (Haensly *et al.* 1982; Penela-Arenaz *et al.* 2009; Peterson *et al.* 2003).

I 2011 fantes det 741 små og større offshoreinstallasjoner med petroleumsrelaterte utslipp til hav eller luft i Nordøst-Atlanteren, hvorav 103 installasjoner tilhørte norsk sokkel (OSPAR 2011). Disse olje- og gassinstallasjonene bidrar til et visst oljeutslipp i seg selv i form av produsert vann, noe som blant annet har gitt utslag i effekter på torsk som har blitt plassert i bur i nærheten av utslippskildene (Sundt *et al.* 2012) og trolig i hyse i områder med høy oljeproduksjon (Balk *et al.* 2011). Selv om konsentrasjonene av lavmolekylære PAH og alkylfenoler er under nivåer som tidligere har vist seg å gi subletale effekter, vil de biologiske og økologiske langtidseffektene være mer uvisse (Harman *et al.* 2009). I tillegg til de kontinuerlige utslippene fra offshoreinstallasjoner har det også blitt rettet søkelys mot ulykkene som kan skje i forbindelse med boring og transport av oljen. Disse ulykkene er gjerne karakterisert av store mengder olje på kort tid, og resulterer ofte i umiddelbare effekter på det lokale miljøet. Utslippene kan variere i alvorlighetsgrad, og mengde olje i et utslipp behøver ikke nødvendigvis å være avgjørende for skadeomfanget. Det finnes i tillegg en rekke biotiske og abiotiske faktorer som spiller inn, som klimatiske forhold, lokale vindforhold, hvor nærme land utslippet pågår, substrattype og bunntopografi ved utslippsstedet, samt antall og type organismer som befinner seg i det affiserte området (Bakke *et al.* 1998; Mackay & McAuliffe 1989; Peterson *et al.* 2003). Med andre ord vil fotodegradering, mikrobiell nedbrytning, temperatur og sjøgang ha mye å si for hvor fort oljen forvitrer, og utslippet kan ha enda større konsekvenser hvis det befinner seg mange og sårbare organismer innenfor utslippets rekkevidde. I tillegg vil skadeomfanget være avhengig av hvilken type olje som lekker ut (Radović *et al.* 2012; Wang *et al.* 1998). Summen av alle disse

komponentene gjør at det alltid vil være vanskelig å predikere det eksakte skadeomfanget av et oljeutslipp.

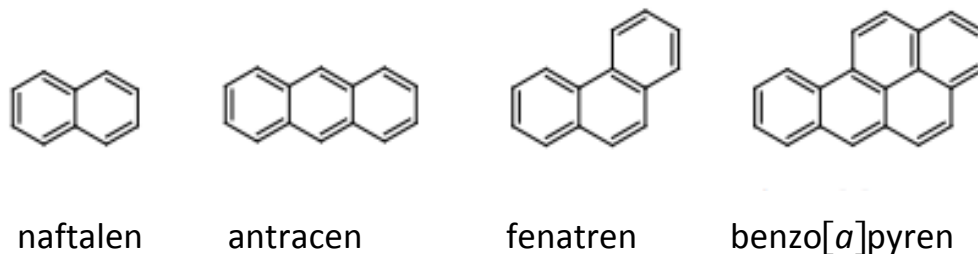
Hypptigheten og mengde av utslipp fra oljetankere har blitt betydelig redusert de siste 20 årene (ITOPF 2012). Som følge av isfrie havområder åpne for skipsfart og potensiell utnyttelse av ubenyttede oljereservoarer (Gautier *et al.* 2009; IPCC 2007; Peters *et al.* 2011) vil det likevel være viktig å opparbeide seg mer kunnskap om effekter av marin oljeforurensning på organisme- og populasjonsnivå.

## 1.2 Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH)

Råolje er en kompleks blanding av en rekke forskjellige stoffer, hvorav hydrokarboner utgjør den største bestanddelen. Blant disse stoffene er det særlig polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) som har vist seg å ha mest alvorlige effekter i miljøet (Hargis Jr *et al.* 1984; Myers *et al.* 2003; Peterson 2001). PAH er en stor og variert gruppe med lite vannløselige forbindelser som består av to eller flere benzenringer (Figur 1.1). Selv om PAH kan være et produkt av naturlige prosesser, stammer de fleste forbindelsene som utgjør en risiko for det marine miljøet fra antropogene kilder som ufullstendige forbrenningsprosesser eller oljeutslipp (OSPAR 2009). Disse to grupperingene blir ofte omtalt som henholdsvis pyrogent og petrogent PAH, og opphavet kan til en viss grad karakteriseres ut fra sammensetningen av PAH (Soclo *et al.* 2000). Mens petrogent PAH er dominert av lette og alkylerte molekyler, vil pyrogent PAH i hovedsak bestå av fire, fem og seks-ringede molekyler uten alkylgrupper (Neff 2002). Giftigheten til PAH er sterkt avhengig av molekylstrukturen, og isomerer med like mange ringer kan variere fra harmløse til svært toksiske basert på den steriske konfigurasjonen til benzenringene (Arcos & Argus 1968). Seks spesifikke PAH blir nevnt som prioriterte farlige stoffer i EUs vanddirektiv (EU 2008). Av disse stoffene har særlig det fem-ringede molekylet benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) blitt mye benyttet i systematiske studier, blant annet med påviste effekter i form av DNA-skade og leverkreft i fisk (Hawkins *et al.* 1990; Hendricks *et al.* 1985; Peters *et al.* 1997; Stein *et al.* 1993). Andre effekter som har blitt sett hos fisk som følge av PAH-eksponering er utviklingsanomalier (Carls *et al.* 1999; Incardona *et al.* 2004), forstyrrelser i den endokrine reguleringen



(Nicolas 1999; Thomas & Budiantara 1995), økt oksidativt stress (Di Giulio *et al.* 1993; Yin *et al.* 2007), samt modulering av immunforsvaret (Faisal & Huggett 1993; Kennedy & Farrell 2008). I tillegg har det blitt observert indirekte effekter i form av økologiske kaskadeeffekter etter oljeutslipp (Peterson *et al.* 2003).



**Figur 1.1:** Noen PAHer

Biotilgjengeligheten til et stoff sier noe om hvor lett en forbindelse har for å bli absorbert eller adsorbert av en levende organisme som et resultat av aktive (biologiske) eller passive (fysiske eller kjemiske) prosesser (Neff & Anderson 1981).

Biotilgjengeligheten til PAH er i stor grad assosiert med oktanol/vann koeffisienten ( $K_{ow}$ ), som igjen er sterkt korrelert med molekylvekten (Eastcott *et al.* 1988). Lette to- og tre-ringede PAH vil være mer vannløselige enn PAH med høy molekylvekt, og vil derfor generelt være mer biotilgjengelige og akutt giftige i marine miljøer (Neff & Anderson 1981). Blant disse stoffene finner man særlig de dominerende PAH med petrogen opprinnelse, som naftalen, fenantren og deres alkylerte homologer. Tyngre PAH-molekyler vil derimot være mer hydrofobe og ha en større tendens til å adsorbere til organiske og uorganiske partikler (Hellou *et al.* 1994; Meador *et al.* 1995).

Fisk kan ta opp PAH enten direkte fra vannet eller via inntak av føde/partikulært materiale (Costa *et al.* 2011; Grung *et al.* 2009). Opptak kun igjennom vannet minus metabolisme og eliminering blir kalt biokonsentrering (van der Oost *et al.* 2003). Opptak kan skje over gjeller og kroppsoverflate, hvorav gjellene har vist seg å være den viktigste eksponeringsveien i postlarvale stadier (Lee *et al.* 1972; Namdari & Law 1996). Biokonsentrering av PAH vil derfor i stor grad avhenge av diffusjonshastighet over gjellemembranen. I tillegg vil biologiske prosesser som metabolisme og elimineringshastighet variere vesentlig ved forskjellig fettløselighet av PAH, og kan

dermed ha innvirkning på grad av biokonsentrering (Baussant *et al.* 2001; Jonsson *et al.* 2004; Spacie *et al.* 1983).

### 1.3 Biomarkører

I tillegg til å måle nivåer av PAH og andre miljøgifter i vann, sedimenter og organismer kan det måles endringer i kroppsvæsker, celler eller vev (van der Oost *et al.* 2003). Disse biologiske endringene kalles gjerne biomarkører, og kan gi en tidlig varslings som kan benyttes for å forebygge mer alvorlige effekter på organisme- og økosystemnivå som følge av antropogene utslipp (Goksøyr *et al.* 1994; Martinez-Gomez *et al.* 2010; Sundt *et al.* 2012).

Det fins en rekke standardiserte metoder som kan benyttes for å finne grad av petroleumsrelatert eksponering og de eventuelle effektene denne eksponeringen påfører den enkelte organisme (Martinez-Gomez *et al.* 2010). I denne oppgaven har følgende biomarkører blitt benyttet:

- CYP1A-aktivitet i lever (EROD)
- relativ konsentrasjon av CYP1A i lever
- konsentrasjon av utvalgte PAH-metabolitter i galle
- oksidativ burst i leukocytter
- DNA-skade i leukocytter

### 1.4 Biotransformasjon

Eliminasjon av fettløselige eksogene forbindelser avhenger ofte av at de blir omdannet av enzymer til mer vannløselige metabolitter i en prosess som kalles biotransformasjon (Parkinson 2001). Det første steget (fase I) i metabolismen av PAH blir blant annet katalysert av en underfamilie enzymer som kalles cytokrom P4501A (CYP1A). Dette enzymet metaboliserer også andre planare fremmedstoffer som blant andre noen PCBer, dioksiner og dibenzofuraner (Goksøyr & Förlin 1992). CYP1A har tidligere blant annet vist seg å være aktiv i biotransformasjon i lever, gjeller, nyrer og tarmepitel i fisk (Costa *et al.* 2013; Ortiz-Delgado *et al.* 2008), og leveren blir ansett for å være det viktigste

avgiftningsorganet (Hinton *et al.* 2008). CYP1A kan i tillegg bli induisert av de samme stoffene ved binding til den cytosoliske aryl hydrokarbon-reseptoren (AhR) (Payne & Penrose 1975). Ligand/AhR-komplekset vil da translokalisere til cellekjernen, dimerisere med Arnt (AhR nuclear translocator), og induere transkripsjon av CYP1A ved binding til spesifikke xenobiotiske responselementer (XRE) i DNA (Whitlock 1993). Induksjon av CYP1A i form av endret aktivitet, proteinmengde eller mRNA-transkripsjon har derfor vært en hyppig benyttet biomarkør for å detektere eksponering for PAH og en del andre planare miljøgifter hos fisk. I tillegg er det også kjent at en del planare molekyler, metaller og andre stoffer kan hemme CYP1A-aktivitet (George & Young 1986; Whyte *et al.* 2000). I dette eksperimentet ble det målt CYP1A-aktivitet i lever ved å kvantifisere omdanning av substratet 7-etoksyresorufin til resorufin ved hjelp av etoksyresorufin *O*-deetylase (EROD-aktivitet) (Whyte *et al.* 2000). Relativ konsentrasjon hepatisk CYP1A-proteiner ble målt med ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Goksøyr 1991a). Disse to metodene blir ofte kombinert - både for å få et mer helhetlig inntrykk av grad av CYP1A-induksjon, samt for å se om det kan ha vært en hemming av CYP1A-aktivitet (Collier *et al.* 1992; Goksøyr *et al.* 1991b; Scholz *et al.* 1997).

Etter at PAH har blitt biotransformert i leveren vil mesteparten av stoffene bli utskilt som konjugerte forbindelser i gallen. På grunn av en generelt effektiv PAH-metabolisme i fisk (Baussant *et al.* 2001; Diamond & Clark 1970; Neff & Burns 1996) vil deteksjon av gallemetabolitter være en mer sensitiv metode for å måle pågående og nylig PAH-eksponering enn deteksjon av nivåer av PAH i muskelvev (Varanasi *et al.* 1985). Dette er også en metode som viser spesifikk eksponering for PAH, i motsetning til målinger av CYP1A-mengde og aktivitet, som kan bli induert av flere andre stoffer. Særlig har 1-hydroksypyren vært en mye målt metabolitt i galle, og dette kan ses i sammenheng med generelt høye pyrennivåer i sedimenter og at pyren er biotilgjengelig for marine organismer (Ariese *et al.* 1993; van der Oost *et al.* 2003). I tillegg har det i tidligere studier blant annet blitt funnet signifikante korrelasjoner mellom mengde B[a]P-metabolitter og leverkreft hos fisk (Krahn *et al.* 1986). Etter fødeinntak blir gallen tømt ut i fordøyelseskanalen for å bidra i nedbrytning av lipider og andre næringsstoffer. Ernæringsstatusen til en organisme kan derfor ha betydning for konsentrasjonen av gallemetabolitter og ikke minst mengden galle (Brumley *et al.* 1998; Richardson *et al.*

2004). I denne studien ble nivåer av 1-hydroksypyren og 1-hydroksyfenantren målt for å kvantifisere den generelle PAH-belastningen.

### 1.5 DNA-skade

Når PAH blir metabolisert av CYP1A kan det enten bli generert uskadelige metabolitter, eller substratet kan bli bioaktivert til mutagene og/eller karsinogene stoffer. Disse mutagene stoffene er elektrofile molekyler med diol- og epoksidgrupper som kan binde seg kovalent til nukleinsyrer og danne DNA-addukter (Baird *et al.* 2005). Gjennom ufullstendige reparasjonsprosesser kan det bli introdusert DNA-trådbrudd, noe som antas å være en stor del av årsaken til DNA-skade forårsaket av PAH (Speit & Hartmann 1995). I tillegg vil det under CYP1A-mediert metabolisme bli generert reaktive oksygenforbindelser (ROS) som også kan skade DNA ved å initiere enkel- og dobbeltrådsbrudd, purin-, pyrimidin- eller deoksyribosemodifikasjoner og DNA-kryssbindinger (Schlezingen *et al.* 1999; Valko *et al.* 2006). DNA-skade i fisk kan være indikasjon på en kumulativ eksponering av gentoksiske stoffer over en lengre tidsperiode (Varanasi *et al.* 1989), og kan finne sted i flere forskjellige celletyper (Cotelle & Ferard 1999). Deteksjon av enkel- og dobbeltrådsbrudd i DNA fra lyserte celler ved hjelp av elektroforese (comet-metoden) har vist seg å være en meget robust metode for å måle gentoksisitet i enkeltceller fra PAH-eksponert fisk (Le Dû-Lacoste *et al.* 2013; Nahrgang *et al.* 2010). I dette eksperimentet ble det kvantifisert enkel- og dobbeltrådsbrudd i leukocytter fra helblod og hodenyre ved hjelp av denne analysen. Hvite blodceller ble valgt som målceller fordi dette ville være et relevant endepunkt med tanke på immunfunksjon.

### 1.6 Immunkompetanse

Det er begrensede kunnskaper om hvordan motstandsdyktighet mot sykdom hos fisk påvirkes av oljeutslipp, noe som kan være avgjørende for opprettholdelse av levedyktige populasjoner i utsatte områder. Det har tidligere vist seg at PAH kan påvirke immunsystemet både i eksponeringsforsøk *in vivo* (Bado-Nilles *et al.* 2009; Kennedy & Farrell 2008), og i feltstudier (Faisal & Huggett 1993; Weeks & Warinner 1986). I tillegg er det observert økte forekomster av infeksjoner hos sjøfugl som har blitt rehabilitert

etter oljesøl, noe som mistenkes å være knyttet til den direkte toksiske virkningen av oljen, så vel som til immunsuppressive effekter relatert til stress (Briggs *et al.* 1997).

Immunforsvaret til beinfisk er likt immunforsvaret til andre vertebrater, og blir delt opp i en medfødt og en adaptiv komponent (sammenfattet av Uribe *et al.* 2011). Det cellulære immunsystemet består av fagocytiske celler som tilsvare makrofager, neutrofiler, naturlige drepeceller (NK-celler), i tillegg til T- og B-lymfocytter. Fisk har også, i likhet med andre vertebrater, en rekke humorale komponenter som lysozymer, cytokiner, kjemokiner, antistoff og komplementproteiner, for å nevne noen. En vesentlig forskjell fra de fleste andre vertebrater er at fisk har et velutviklet medfødt immunsystem allerede tidlig i embryonegensen (Magnadóttir 2006).

Under påvirkning av visse immunologiske stimuli vil fagocytiske celler (granulocytter og makrofager) øke opptaket av oksygen betraktelig. Denne prosessen kalles oksidativ burst, og resulterer i produksjon av superoksid ( $O_2^-$ ) og hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ), katalysert av enzymet NADPH oksidase (Babior 1984). Disse molekylene er mellomprodukter som videre kan bli omdannet til reaktive oksygenforbindelser (ROS) som hypokloritt ( $OCl^-$ ) og hydroksylradikaler ( $OH^\bullet$ ), som er viktige i forsvaret mot patogene mikrober (Babior 1984; Neumann *et al.* 2001). ROS som blir generert under oksidativ burst kan også være skadelig for DNA (Babior 1984; Valko *et al.* 2006). Man har observert både økt og redusert evne til oksidativ burst fra stimulerte leukocytter fra PAH-eksponert fisk (Hutchinson *et al.* 2003; Reynaud *et al.* 2001), men dette har vist seg å være avhengig av PAH-konsentrasjonen og varigheten av eksponeringen (Kennedy & Farrell 2008). Reynaud *et al.* (2002) viste blant annet at måling av oksidativ burst var en vel så sensitiv biomarkør som måling av tradisjonelle parametere relatert til biotransformasjon av PAH. Det har også blitt påvist effekter av miljøgifter på oksidativ burst *in situ* (Rice *et al.* 1996). I denne studien ble oksidativ burst målt ved å avklare i hvilken grad immunstimulanten phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) bidro til økt  $H_2O_2$ -produksjon fra isolerte leukocytter fra helblod. Dette kan da være en indikator på tilstanden til den generelle immunfunksjonen hos fisk om har blitt eksponert for PAH.

Det fins en rekke stoffer som er stand til å initiere immunresponser hos fisk (Sakai 1999). Disse forbindelsene blir gjerne kalt immunstimulanter og inkluderer alt fra molekyler som cytokiner, vitaminer og hormoner til bestanddeler i mikrober. Lipopolysakkarider (LPS) er en type immunstimulant som er fraværende i eukaryote cellemembraner, men som er en naturlig bestanddel i yttermembranen hos gram-negative bakterier. LPS og andre konserverte patogenassosierte molekylmønstre (PAMP) kan bli gjenkjent av spesifikke reseptorer som blant andre den Toll-like reseptoren (TLR) på membranen til noen typer leukocytter (Boltaña *et al.* 2011). Etter binding vil intracellulære signaltransduksjonsveier bli initiert, og dette resulterer i ekspresjon av inflammatoriske cytokiner og kjemokiner, samt andre ko-stimulatoriske molekyler som aktiverer den adaptive immunresponsen (Raetz & Whitfield 2002). I dette eksperimentet ble LPS injisert intraperitonealt for å måle immunrespons i form av oksidativ burst hos oljeeksponert fisk som har fått aktivert immunforsvaret. LPS har blant annet tidligere vist seg å stimulere økt mitogenese hos B-lymfocytter fra *Leiostomus xanthurus* som var eksponert for PAH-kontaminerte sedimenter (Faisal *et al.* 1991). Reynaud og Deschaux (2005) observerte derimot at LPS-stimulerte lymfocytter fra karpe (*Cyprinus carpio*) som hadde blitt injisert med 3-metylkolantren hadde redusert proliferasjon. Det har også blitt sett at LPS kan føre til økt oksidativ burst hos isolerte leukocytter fra Atlantisk laks *in vitro* (Solem *et al.* 1995).

## 1.7 Forsøksorganisme

I et eksponeringsforsøk vil det være fordelaktig å benytte en organisme der bruk av biomarkører er veldokumentert, og som har en geografisk relevant utbredelse med hensyn til stoffet som blir testet for. I dette eksperimentet ble det benyttet juvenil piggvar (*Scophthalmus maximus*) som forsøksorganisme. Piggvar er en høyt verdsatt matfisk som lever på sedimentene på bunnen, og vil derfor potensielt være i nærkontakt med PAH og andre miljøgifter. Den er vidt utbredt i store deler av Nordøst-Atlanteren, et havområde som er direkte berørt av PAH-relaterte utslipp som følge av omfattede petroleumsvirksomhet og annen menneskelig aktivitet. Det har tidligere blitt observert flere forskjellige effekter av PAH-forurensning og andre miljøgifter på piggvar *in vivo*

(Goanvec *et al.* 2008; Gunawickrama *et al.* 2008; Hutchinson *et al.* 1999; Peters *et al.* 1997), og *in situ* (Kerambrun *et al.* 2011; Kilemade *et al.* 2009).

### 1.11 Mål og delmål

Hovedmålet med denne oppgaven var å kvantifisere eventuelle effekter på piggvar som følge av eksponering for delvis nedbrutt råolje fra Ekofisk.

Hovedmålet kan deles opp i følgende problemstillinger:

- Er det økning av PAH-metabolitter i galle fra juvenil piggvar som har blitt eksponert for ulike konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk?
- Er det endringer i CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet i lever fra juvenil piggvar etter eksponering for ulike konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk?
- Er det endring i DNA-skade hos leukocytter fra juvenil piggvar som har blitt eksponert for ulike konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk?
- Er det endring i funksjonen til leukocytter (i form av oksidativ burst) fra juvenil piggvar som har blitt eksponert for ulike konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk?
- Påvirker aktivering av immunforsvaret funksjonen til leukocytter i juvenil piggvar som har blitt eksponert for ulike konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk?
- Er det sammenheng mellom eksponering (målt som PAH metabolitter) og effekter på immunceller hos juvenil piggvar?

Denne oppgaven ble gjennomført sammen med masterprosjektene til Anne Luise Ribeiro og Ásdis Ólafsdóttir, som undersøkte effekter av vannløselig fraksjon av Ekofisk råolje på henholdsvis torsk (*Gadus morhua*) og blåskjell (*Mytilus edulis*). Fiskene ble

eksponert i de samme akvariene og de samme biomarkørene ble kvantifisert hos torsk som hos piggvar, noe som gir grunnlag for en direkte artssammenlikning. Et tilleggsmål var derfor å sammenlikne responser hos de to artene.



## 2 Materiale og Metoder

### 2.1 Olje og forbehandlinger

I dette eksperimentet ble det benyttet et gjennomstrømmingssystem med den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje. Ekofisk råolje er en relativt lett olje bestående av 66,2 % alkaner, 13,5 % aromatiske hydrokarboner, 18,9 % resiner og 1,4 % asfaltener (referert til som North Sea Oil - Radović *et al.* 2012). Oljen ble utsatt for forvitring i forkant av eksponeringen etter metode av Smith *et al.* (2005) med modifikasjoner.

Oljen ble blandet med sjøvann i 24 timer i forholdet 1:1 (v/v) med magnetrører i romtemperatur (ca 25 °C), slik at de mest vannløselige og akutt giftige bestanddelene fordampet. Etter at magnetblanderen ble slått av stod blandingen i ro i én time slik at olje- og vannfasen skilte seg. Deretter ble oljefasen blandet med løsemiddelet diklormetan til hver av de 3 ønskede oljekonsentrasjonene med høyeste konsentrasjon 24 g olje kg<sup>-1</sup> grus, medium konsentrasjon 12 g olje kg<sup>-1</sup> grus, og laveste konsentrasjon 6 g olje kg<sup>-1</sup> grus. Alle oljekonsentrasjoner ble blandet ut med 24 g diklormetan, mens kontrollbehandlingene bestod av grus som kun fikk tilført 24 g av løsemiddelet. De forskjellige olje/løsemiddel-blandingene ble så fordelt homogent i akvariegrus med diameter 3-6 mm, og deretter distribuert i et tynt lag utover isolasjonsplast i romtemperatur (ca 25 °C) over natten, slik at alt løsemiddelet skulle fordampe. Hver kolonne (75x350 mm) ble tilsatt én kilo av den forhandlede grusen.

### 2.2 Eksponeringsoppsett

Eksponeringsforsøket ble utført på Sandgerði Marine Centre i Sandgerði på Island 14. januar – 1. februar 2013, og piggvaren ble hentet fra Experimental Laboratory in Mariculture, Marine Research Institute, Stadur, Grindavík. Det ble benyttet 24 akvarier med 4 piggvar (gjennomsnitt ± SD: lengde: 20,9 ± 1,8 cm; vekt 171,9 ± 45,6 g; alder ca 12 mnd), 4 torsk (lengde 15,6 ± 1,8 cm; vekt 30,8 ± 11,8 g alder ca 8 mnd) og 6 blåskjell i hvert. Akvariene rommet 20 L vann (volum 230x360x260 mm) og var utstyrt med lokk. For å begrense visuelle forstyrrelser ble samtlige kar tildekket med sort plast.

Rent saltvann ble pumpet opp fra et borehull som går 20 meter under bakken og boblet med luft før det nådde akvariene. Dette saltvannet er sjøvann som har blitt naturlig filtrert av porøs lavastein, og som befinner seg i deponier i grunnen. Det ble tilført totalt ca 250 mL min<sup>-1</sup> saltvann til hvert akvarium, hvorav ca 50 mL min<sup>-1</sup> gikk igjennom den forbehandlede grusen i kolonnene. Vannet ble pumpet av peristaltiske pumper (Watson-Marlow 520S) fra en hovedtank hvor vannet gikk via silikonslanger til kolonnene, og derfra til akvariene i teflonslanger. Total vanntilførsel til hvert akvarium ble målt og registrert på eksperimentets første dag, samt rett før 8 og 16 dagers prøvetaking. Temperatur, salinitet og oksygennivå ble målt på eksperimentets første dag i samtlige kar (gjennomsnitt ± SD: temperatur 9,7 ± 0,4 °C; salinitet 31,1 ± 0,1 ‰ S; 63,8 ± 5,9 % O<sub>2</sub>).

Forsøksfisken ble delt inn i 4 behandlingsgrupper, hvorav 3 av gruppene ble eksponert for de vannløselige fraksjonene av olje i lav, middels og høy konsentrasjon, mens kontrollgruppen ble eksponert for grus som kun var forbehandlet med løsemiddelet. Disse fire eksponeringsgruppene ble fordelt på de 24 akvariene slik at man fikk 6 separate akvarier for hver behandlingsgruppe. De forskjellige akvariene med de ulike behandlingsgruppene ble plassert tilfeldig i rommet. Det ble prøvetatt seks replikater fra hver behandling (fra ulike akvarier) etter 2 og 8 dagers eksponering (Tabell 1). I tillegg ble åtte ueksponerte "0"-fisk prøvetatt på eksperimentets første dag fra et separat kar. Etter 8 dagers eksponering fikk de to gjenværende fiskene i karene injeksjon; én med og én uten lipopolysakkarider (LPS). Av disse ble det prøvetatt fire replikater av begge de injiserte gruppene (med og uten LPS) fra lav, medium og høy oljekonsentrasjon etter 16 dager. For å få et større datamateriale for kontrollfisken ble det prøvetatt fem replikater som fikk injeksjon med LPS, og fem som fikk injeksjon uten LPS. All fisken som inngikk i eksperimentet ble overført fra et større kar til de mindre akvariene 2 dager før eksponeringsstart. Forsøksorganismene ble holdt i 12 timer lys/12 timer mørke fotoperiode, og ble matet med små, oppskårede biter av kokte reker 2 ganger ukentlig, senest 2 dager før hver prøvetaking.

Eksponeringen ble startet i akvarium 1-8 den 14. januar, i akvarium 9-16 den 15. januar, og i akvarium 17-24 den 16. januar.

**Tabell 1.** Antall replikater som ble prøvetatt fra hver behandling på hvert prøvetakingstidspunkt.

	0 dager	2 dager	8 dager	16 dager	
				Med LPS	Uten LPS
<b>0-fisk</b>	8	-	-	-	-
<b>Kontroll</b>	-	6	6	5	5
<b>Lav</b>	-	6	6	4	4
<b>Medium</b>	-	6	6	4	4
<b>Høy</b>	-	6	6	4	4

### 2.3 Prøvetaking

Piggvaren ble hentet tilfeldig ut av de respektive akvariene og ble deretter avlivet kontant med et slag mot hodet før vekt og lengde ble registrert. Helblod (0,2 mL) ble tappet forsiktig fra kaudalvenen med en heparinbehandlet sprøyte (kanylediameter 0,6 mm), og blandet med 1,8 mL L-15 osmoalitätsregulert cellekulturmedium (CKM) (380 mOsm; 36 mM NaCl; 10 U/mL heparin; 10 µL/mL antibiotika), før det ble oppbevart på is. Buken til fisken ble så snittet opp med skalpell, galle ble tappet med sprøyte (kanylediameter 0,5 mm) i eppendorfrør som ble umiddelbart tildekket med aluminiumsfolie og plassert på is før de ble fryst ned på -20 °C. En bit av leveren (cirka 0,5 g våtvekt) ble skjært av i området rundt portalvenen, for så å bli frosset ned i kryorør på flytende nitrogen. Til slutt ble ca 0,2 g hodenyrevev dissekert ut ved hjelp av skalpell og forsiktig filtrert igjennom 100 µm filter ved hjelp av 1 mL iskaldt CKM, før det ble tilført ytterligere 4 mL CKM. Disse cellene ble så oppbevart på is. Alle fiskene ble registrert med tallkoder, og redskapene var også merket med tallkoder beregnet på hver av sine respektive behandlingsgrupper. På denne måten ble de påfølgende analysene gjennomført slik at det ikke skulle være forutsetning for å vite hvilken eksponering de forskjellige fiskene hadde blitt utsatt for. Alle redskaper ble grundig rensset i 70 % etanol mellom innsamling av hver vevstype og mellom prøvetaking av hver fisk.

### 2.4 Injeksjon av immunstimulant (LPS)

Etter 8 dagers eksponering ble de to gjenværende piggvarene i hvert akvarium injisert

intraperitonalt; én med lipopolysakkarider (LPS) fra *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich) ( 10 mg kg<sup>-1</sup> kroppsvekt) oppløst i fosfatbufret saltvann (8,5 g NaCl; 0,85g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,54 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4), mens den andre ble injisert kun med fosfatbufret saltvann. Fisken ble veid og registrert ved injisering, og dermed gjenkjent ut fra dette når type injeksjon skulle fastslås ved prøvetaking. Om vekten var tilnærmet lik mellom de to injiserte individene ble den LPS-behandlede fisken merket med et lite klipp bakerst på gattfinnen.

## 2.5 Isolering av hvite blodceller

Leukocytt-isoleringen ble gjort etter metode av Pettersen *et al.* (1995) med modifikasjoner. Cellemediet med leukocytter fra hodenyre og helblod ble forsiktig distribuert i 15 mL reagensrør (Sarstedt) i et fint lag på toppen over to konsentrasjoner av Percoll (GE healthcare); 2,5 mL 1,070 g/L (0,490 ml Percoll; 0,1 mL 1,5M NaCl; 0,410 mL dH<sub>2</sub>O/per mL totalvolum) nederst, og 2,0 mL 1,050 g/L (0,337 ml Percoll; 0,1 mL 1,5M NaCl; 0,563 mL dH<sub>2</sub>O/per mL totalvolum) øverst. Rørene ble så sentrifugert (MSE Super-Minor Centrifuge) i 40 minutter på 400 x g på cirka 9 °C (temperatur i våtlab), slik at man fikk isolert leukocytene i sjiktet mellom de to Percoll-konsentrasjonene. Disse leukocyttkulturene ble etter endt sentrifugering forsiktig sugd ut med en Pasteur pipette og fortynnet 2x med CKM i 0,5 mL eppendorfrør. Rørene ble deretter sentrifugert (Labnet Spectrafuge) i 10 minutter på 400 x g, slik at det ble dannet en pellet med hvite blodceller på bunnen. Denne pelleten ble så resuspendert i 2,0 mL iskaldt CKM. Alle leukocyttkulturene ble under hele prosessen holdt på is.

## 2.6 Celletelling

15 µL av cellekulturmediet ble blandet med 15 µL trypanblå og 10 µL av denne blandingen ble igjen overført til et hemocytometer. Deretter ble celleantall og -viabilitet estimert og notert, enten manuelt ved hjelp av et Bürker-Türk tellekammer og et lysmikroskop (Leitz Diaplan) med 25x objektiv, eller automatisk ved hjelp av Countess Automated Cell Counter. Celleantallet ble så justert til 1,0x10<sup>6</sup> celler/mL ved å fortynne ytterligere med CKM. Om celleantallet i utgangspunktet var mindre enn det ønskede antallet lot vi konsentrasjonen forbli uforandret.

## 2.7 PAH-metabolitter i galle

Analyse av gallemetabolitter ble basert på metode Krahn *et al.* (1992) av modifisert av Grung *et al.* (2009). De frosne galleprøvene ble tint opp på is uten direkte lyseksponering. Internstandarden som ble benyttet inneholdt 80 % metanol med 1 % askorbinsyre og 16 µg/ml trifenylamin. Internstandarden med trifenylaminen ble plassert i ultralydbad til den var helt oppløst. Ved innveing ble 50 µL dH<sub>2</sub>O først tilsatt et 0,5 mL eppendorfrør før vekten ble nullstilt. Deretter ble 20 µL prøve, 10 µL internstand og 20 µL β-glukuronidase/aryl sulfatase tilsatt i det samme eppendorfrøret, og nøyaktig vekt for hver av de forskjellige løsningene ble notert. For hver femtiende prøve ble det inkludert 2 referanseprøver med kjent metabolittkonsentrasjon. Deretter ble innholdet blandet godt, før det ble inkubert én time i varmeskap (37 °C). Etter endt varmebehandling ble reaksjonen stoppet ved at det ble tilført 200 µL metanol. Prøvene ble deretter avkjølt på is, før de ble sentrifugert på 4000 x *g* ved 4 °C i 10 minutter (Heareus Multifuge 3 S-R). Supernatanten ble til slutt overført til HPLC-rør og oppbevart ved -20 °C inntil analyse.

Videre analyse ble gjennomført på Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA) av Merete Grung med high performance liquid chromatography (HPLC) med fluorescensdetektor. Konsentrasjoner av 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren ble kvantifisert ved å integrere arealet av toppene i kromatogrammene.

## 2.8 Opparbeiding av lever

Lever ble homogenisert etter metode Dignam (1990) av med modifikasjoner. Leverprøvene ble tint opp på is før en liten bit (<0,5 g) ble skjært av med skalpell på en avkjølt kuldeblokk (ca 4°) med aluminiumsfolie. Disse bitene ble så overført til 1,5 ml cryorør på is med cirka 20 keramiske kuler (Precellys 24 soft tissue homogenizing 1,4 mm ceramic beads; Bertin Technologies), før det ble tilført 4 °C kald homogeniseringsbuffer (0,1 M natriumfosfatbuffer; 0,15 M KCl; 1 mM dithiotreitol; 5 % glycerol; pH 7,8) opp til 1,5 mL-merket. En Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisator ble benyttet for å få homogenisert leveren (program 6000 rpm, 3x10 sekunder intervaller med 5 sekunder pause imellom). Denne var tilkoblet en Cryolys (Bertin Technologies) nedkjøler som dusjet prøvene med luft kjølt ned med flytende

nitrogen for å holde temperaturen tilnærmet 4 °C under prosessen. Homogenatet ble sugd opp med Pasteur pipette og overført til eppendorfrør som ble sentrifugert på 10 000 x *g* i 30 min på 4 °C (Heareus Multifuge 3 S-R). Supernatanten ble overført til nye homogeniseringsrør, uten å få med det overliggende fettlaget eller pelleten (mitokondrier). Disse rørene ble sentrifugert i 60 minutter på 100 000 x *g* og 4 °C (Thermo Scientific Sorvall mTX150 Micro-Ultrasentrifuge) for å få isolert mikrosomene. Etter endt sentrifugering ble pelleten resuspendert til ett nytt eppendorfrør med 200 µL iskald mikrosomalbuffer (0,1 M natriumfosfatbuffer; 20 % v/v glycerol; pH 7,8). I dette røret ble proteinet homogenisert i minimum 5 sekunder i mikrosomalbufferen ved hjelp av motorisert plastpistill for eppendorfrør (VWR Disposable Pellet Mixer). Dette homogenatet ble så redistribuert i mindre volum til andre eppendorfrør som ble fryst ned på -80 °C. Alle prøvene ble homogenisert gruppevis på tvers av behandlinger og prøvetakingstidspunkt for å unngå eventuelle blokkeffekter.

## 2.9 Proteinanalyse

Proteinkonsentrasjonen ble estimert etter metode av Lowry *et al.* (1951) med modifikasjoner. En 4-steps standardrekke med Bovin Serum Albumin (BSA) i 1,0 - 0,5 - 0,25 - 0,125 mg/mL ble laget. Prøvene ble tint på is, og deretter fortynnet 20 x med nedkjølt (4 °C) 0,1 M trisbuffer (pH 8 ved 4 °C). Prøvene ble så distribuert ut på 96-brønns mikrotiterplater (Nunclon Delta) i triplikater. I tillegg ble det benyttet fire replikater med blank (kun tris-buffer), og en referanseprøve som ble brukt ved alle gjennomkjøringer. Samtlige brønner ble tilsatt 25 µL romtemperert reagens A (alkalisk kobber tartarløsning) og 200 µl romtemperert reagens B (fortynnet Folin's reagens), før platen ble inkubert 15 minutter i romtemperatur. Absorbans ble avlest ved 750 nm med en SynergyMx (Biotek) plateleser med Gen5 programvare. Alle prøver ble randomisert på tvers av platene for å utlikne eventuelle blokkeffekter. Proteinverdiene ble beregnet ut fra standarkurven med BSA.

## 2.10 CYP1A-aktivitet i lever (EROD)

Måling av CYP1A-aktivitet i lever ble gjort etter metode av Burke og Mayer (1974), modifisert til bruk av plateleser av Eggens og Galgani (1992), ved å kvantifisere omdanning av substratet 7-etoksyresorufin (ER) til resorufin (EROD-aktivitet). Før

analysen ble stamløsningene kalibrert ved måling av absorbans i kyvette med 1 cm lysvei. Absorbansen av en 100x fortykning av stamløsninga av ER (0,5 mM ER i DMSO) i kaliumfosfatbuffer (0,1 M; pH 8) ble målt ved 482 nm. En 100x fortykning av stamløsninga av resorufin (1 mM i DMSO) i kaliumfosfatbuffer ble målt ved 572 nm, mens en 100x fortykning i kaliumfosfatbuffer av stamløsninga av  $\beta$ -NADPH redusert tetranatriumsalt (50 mM i kaliumfosfatbuffer) ble målt ved 380 nm. Dette skal ideelt sett gi verdier på ca 0,113 ved måling av 0,005 mM ER i kaliumfosfatbuffer, ca 0,74 ved måling av 0,01 mM resorufin i kaliumfosfatbuffer, og ca 0,68 ved måling av 0,5 mM NADPH i kaliumfosfatbuffer. Den eksakte absorbansen av resorufin ble benyttet til korrigering av standardrekkas konsentrasjon ved å bruke ekstinksjonskoeffisienten  $73,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Klotz *et al.* 1984).

De opparbeidede levermikrosomene, 0,5 mM 7-etoksyresorufin i DMSO og 1 mM resorufin i DMSO ble tint opp på is. Samtlige prøver ble fortynnet med kald 0,1 M kaliumfosfatbuffer (4 °C; pH 8,0) til 1 mg/mL på is. Etter dette ble det laget en reaksjonsblanding som bestod av 180  $\mu\text{L}$  7-etoksyresorufin blandet med 30 mL kaliumfosfatbuffer. En 2-trinns fortynningsrekke med resorufin-standarder ble laget ved først å fortynne stamløsningen med resorufin 100x til 10  $\mu\text{M}$  resorufin i kaliumfosfatbuffer. Denne resorufinløsninga ble deretter fortynnet videre til standardrekka 0,64 - 0,32 - 0,16 - 0,08 - 0,04 - 0,02 - 0,01 og 0,00  $\mu\text{M}$  resorufin i reaksjonsblanding. Disse standardkonsentrasjonene ble så distribuert ut i duplikater på sorte Nunclon 96-brønns mikrotiterplater før 8 replikater med 50  $\mu\text{L}$  blank (kun kaliumfosfatbuffer) ble tilsatt platen. Etter dette ble det distribuert ut 50  $\mu\text{L}$  i seks brønner for hver av prøvene, i tillegg til 50  $\mu\text{L}$  i seks brønner av en referanseprøve som gikk igjen på samtlige plater. Alle pipetteringene foregikk fram til dette på is. Platen ble så plassert på benken i romtemperatur, og tre av replikatene med prøver ble korrigert for "quench" ved å tilsette 10  $\mu\text{L}$  0,32  $\mu\text{M}$  resorufin-standard. 200  $\mu\text{L}$  av den romtempererte reaksjonsblandingen ble til slutt tilsatt alle brønner med prøver og blank, før 25  $\mu\text{L}$  2,4  $\mu\text{M}$  fersk tillaget NADPH i kaliumfosfatbuffer ble tilsatt de samme brønnene for å starte reaksjonen. Avlesning av reaksjonen ble foretatt med en SynergyMX (Biotek) plateleser med Gen5 programvare umiddelbart etter tilførsel av NADPH i 8 steg med 39 sekunders intervaller i løpet av 5 min, 530 nm eksitasjon og 590 nm emisjon, spalteåpning 20 nm, og et ristesteg (medium intensitet) på 10 sekunder før

første intervall.

Hele analysen ble gjennomført under dempet belysning. Alle prøver ble randomisert på tvers av platene for å utlikne eventuelle blokkeffekter som kan oppstå innenfor en plate. I tillegg var det 2 prøver av "0"-fiskene, 2 prøver fra 2-dagers prøvetaking, 3 prøver fra 8-dagers prøvetaking, og 6 prøver fra 16-dagers prøvetaking som hadde EROD-verdier som lå under kvantifiseringsgrensen (gjennomsnittet av stigningstallet til blank + 3 standardavvik av dette stigningstallet). Disse prøvene ble allikevel inkludert i den statistiske analysen for å beholde et tilstrekkelig stort datamateriale.

### 2.11 CYP1A-konsentrasjon i lever (ELISA)

For å måle relativ konsentrasjon CYP1A i lever ble ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) benyttet etter metode av Goksøyr (1991a). Mikrosomer ble tint opp på is og fortynnet til 10 µg/mL protein i coating buffer (karbonat-bikarbonat buffer; 0,005 M, pH 9,6) på is, i tillegg til én referanseprøve som gikk igjen på samtlige plater. Alle prøver ble pipettert ut i 4 replikater (100 µL) i 96-brønns plater (NUNC Maxisorp). Samtlige prøver ble randomisert på tvers av platene for å utlikne eventuelle blokkeffekter som kan oppstå innen en plate. Blank (kun coatingbuffer) ble pipettert ut i 100 µL per brønn, 8 brønner per plate. Platene ble så inkubert over natten ved 4 °C med forseglings tape over for å få proteinene til å feste seg til brønnene.

Den påfølgende dagen ble startet med 3 x vask (2 x 30 sek + 1 min) i TTBS-buffer (20 mM Tris-buffer pH 8,5; 0,5 M NaCl; 5 mL Tween-20) med en automatisk platevasker (Skanwasher 300, Skatron Instruments). Det ble tilsatt 300 µL blokkeringsbuffer (TTBS med 1 % v/v BSA) til alle brønnene med tilnærmet samme inkubasjonstid på alle plater (gjennomsnitt ± SD: 40 min og 18 sek ± 22 sek). Dette ble etterfulgt av 3 x vask før 100 µL antistoffbuffer (TTBS med 0,1 % v/v BSA) med 1:1000 primært antistoff (kanin anti-fisk CYP1A antistoff, Biosense Laboratories AS) ble tilført alle prøvereplikater, mens kun antistoffbuffer ble tilført halvparten av brønnene med blank. Platene ble så inkubert over natten ved 4 °C med forseglings tape over.

Den siste og tredje dagen startet med 3 x vask av platene med TTBS før 100 µL



sekundærantistoff (geit anti-kanin IgG konjugert med HRP (GAR-HRP), Sigma-Aldrich) fortynnet 1:3000 i antistoffbuffer ble tilført samtlige brønner. Platene ble så forseglet og inkubert ved 4 °C i 6 timer og 35 min ± 13 min (gjennomsnitt ± SD). Deretter ble platene vasket 5 ganger med TTBS (4 x 30 sek + 1,5 min) før 100 µl av det romtempererte fargesubstratet TMB plus2 (Kem-En-Tech) ble tilført alle brønner ved romtemperatur i dempet belysning. Tiden ble nøyaktig notert for fargeutvikling på alle plater (20 min og 42 sek), og reaksjonen ble stoppet ved tilførsel av 50 µl 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbansen ble så målt ved 450 nm med en SynergyMX (Biotek) plateleser med programvaren Gen5. Pipettering av alle prøver, antistoffløsninger og fargesubstrat forgikk fra bunnen og opp med minst mulig skraping mot bunnen, og med minst mulig søl på kantene av brønnene. Alle platene ble normalisert ut fra snittet av referanseprøvene for å korrigere for eventuelle ulikheter.

## 2.12 DNA-skade i leukocytter

Comet-analysen ble gjort etter metode av Singh *et al.* (1988) med modifikasjoner. Agarose (0,75 %) ble løst opp i 10 % fosfatbufret saltvann + EDTA (0,85 g L<sup>-1</sup> NaCl; 0,085 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,054 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM EDTA; pH 7,4) ved hjelp av mikrobølgeovn, slik at gelen ble gjennomsiktig og ikke inneholdt noen krystaller. Deretter ble den fordelt i eppendorfrør, 90 µL i hvert, og temperaturen ble stabilisert til 37 °C ved hjelp av en varmeblokk. 10 µL av cellekulturene med hvite blodceller ble tilført til hvert sitt agaroserør, og forsiktig mikset inn. 30 µL av hvert rør ble så pipettert langsomt ut på filmene (9,5 x 6,7 cm) på en forhåndsavkjølt aluminiumsblokk (ca 4° C). Hver film ble merket med dato, prøvetakingsnummer og om det var leukocytter fra helblod eller hodenyre med en diamantpenn. Etter at gelen hadde tørket ble filmene lagret mørkt og kjølig (4°C) fullstendig tildekket i lysisbuffer (2,5 M NaCl; 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM Tris; 1% Triton x-100; pH 10) i mellom og 13 og 33 dager.

Elektroforese ble kjørt i en avkjølt (ca 4°C) og nylaget elektroforesebuffer (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH ~ 13.2). Filmene ble først rensert i elektroforesebuffer (4°C) i et eget kar før de ble lagt i elektroforesekammeret i 20 minutter i en ny elektroforesebuffer. Horisontal elektroforese ble så kjørt i denne bufferen i 20 minutter (25V) i et sirkulasjonssystem. Etter endt elektroforese ble filmene rensert kjapt i

nøytraliseringsbuffer (0,4 M Tris, pH 7,5) før de ble lagt 15 minutter i et nytt kar med nøytraliseringsbuffer. Etter dette fulgte en kort rens i dH<sub>2</sub>O og deretter en kort rens i 96 % etanol. Til slutt ble filmene fiksert (>1,5 time) i 96 % etanol, og deretter lufttørket. Alle prosedyrene ble utført i dempet belysning.

Filmene ble farget i 20 min under dempet belysning i en plastboks med 50 mL Tris-EDTA-buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) med 40 µL SybrGold (Invitrogen) (tidligere fortynnet 10 x i DMSO fra stamløsning) med et vippebord (Labnet Enduro Minimix). Etter farging ble de oppbevart over natten i en fuktig boks med lokk i 4°C. Før scoring ble filmene lagt på et pleksiglass og dekket med dekkglass (7,5 x 10 cm), og festet til begge flatene ved hjelp av dH<sub>2</sub>O uten å få med luftbobler. Scoringen ble utført med et kamera som var festet til et Zeiss Axio Scope A1 fluorescensmikroskop (eksitasjon/emisjon 520/610) med 20 x objektiv. DNA-skade ble målt i % haleintensitet, noe som tilsvarer mengde DNA som er i "comet-halen" relativt til DNA som er i "hodet". Helst 50 celler (med et minimum på 30) ble scoret per prøve og medianen av disse verdiene ble benyttet i den statistiske analysen. Programvaren som ble benyttet var Comet Assay IV (Perceptive Instruments). Celler som befant seg i kanten av gelene ble unngått da disse kan ha relativt mer DNA-skade enn resten av celleutvalget (Tice *et al.* 2000). Alle cellene ble scoret vilkårlig, og det var ingen kunnskap om hvilken behandling de enkelte prøvene hadde sitt opphav fra.

### 2.13 Oksidativ burst

Kvantifisering av oksidativ burst ble foretatt etter en modifisert oppskrift av Invitrogen Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen 2009). Amplex Red ble benyttet i kombinasjon med pepperrotperoksidase for å detektere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon fra leukocytter fra helblod. Amplex Red kan da reagere med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for så å danne det fluorescerende produktet resorufin. En standardserie med 10 - 5 - 1,25 - 0,75 - 0,375 - 0,1875 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i natriumfosfatbuffer (0,05 M; pH 7,4) ble benyttet for å beregne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjonen i cellekulturene. En arbeidsløsning bestående av 0,1 U mL<sup>-1</sup> pepperrotperoksidase i Krebs-Ringer fosfatbuffer (145 mM NaCl; 5,7 mM natriumfosfat; 4,86 mM KCl; 0,54 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,22 mM MgSO<sub>4</sub> 5,5 mM glukose; pH 7,35) ble tilsatt brønn A1-A3 i en 96-brønns mikrotiterplate. Triplikater for hver konsentrasjon av

standardserien (20  $\mu\text{L}$  per brønn) ble tilsatt brønnene C1-H3, mens 20  $\mu\text{L}$  blank (natriumfosfatbuffer; 0,05 M; pH 7,4) ble tilsatt brønn B1 til B3. 20  $\mu\text{L}$  av cellekulturene ( $1 \cdot 10^6$  leukocytter  $\text{mL}^{-1}$  i CKM) ble distribuert ut i to triplikater til brønn A4-H12. I tillegg ble 20  $\mu\text{L}$  av en tilfeldig cellekultur tilført brønnene med arbeidsløsning (brønn A1-A3) for å se om det ble noen reaksjon når Amplex Red ikke var tilsatt. En reaksjonsløsning ble laget med 50  $\mu\text{M}$  Amplex Red i arbeidsløsning, og denne ble distribuert til brønnene B1 til H3, samt radene B, D F og H, i volum på 100  $\mu\text{L}$  til hver brønn. Reaksjonsløsningen ble igjen benyttet til å lage reaksjonsløsningen med 0,12  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$  phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), og denne ble tilført radene A,C, E og G i kolonne 4-12. Reaksjonen ble avlest umiddelbart med en plateleser (BioTek Synergy MX) med eksitasjon/emisjon 530/590 nm i 8 steg med 60 sekunders intervaller. Reaksjonsløsningene med og uten PMA ble underveis tildekket med aluminiumsfolie for å unngå lyseksponering. I tillegg ble alle cellekulturer holdt på is under prosessen, mens reaksjonen ble satt i gang med romtemperert reaksjonsløsning.

I denne analysen ble samtlige prøver fra 2-dagers prøvetakning, samt én plate (8 prøver; 2P17-2P24) fra 8-dagers prøvetaking utelatt av den statistiske analysen på grunn av at mer enn 25 % av  $\text{H}_2\text{O}_2$ -nivåene innen hver plate var lavere enn blankverdien. Stimuleringsindeks ble estimert som mengde  $\text{H}_2\text{O}_2$  fra PMA-stimulerte leukocytter/mengde  $\text{H}_2\text{O}_2$  fra ikke-stimulerte leukocytter.

## 2.14 Statistiske metoder

All data ble testet for homogen varians med Levenes test (Levene 1960). Ved signifikant ulik varians mellom de forskjellige behandlingsgruppene ble dataene  $\log_{10}$ -transformert. De fleste dataene ble  $\log_{10}$ -transformert på grunn av ikke-homogen varians. I tilfeller med homogen varians ble det gjennomført en enveis variansanalyse (ANOVA) innen hvert prøvetakingstidspunkt med "oljebehandling" som uavhengig variabel. Når en signifikant behandlingseffekt ble funnet, ble en post hoc Dunnet's test benyttet for å teste for forskjeller mellom den oljeeksponerte fisken og kontrollgruppen. I test av "0"-fisk mot kontrollfisk ble det gjennomført en enveis ANOVA med "0"-fisk og kontrollfisken fra samtlige prøvetakingstidspunkt. Hvis det ble detektert en signifikant forskjell, ble en post hoc Dunnet's test benyttet med "0"-fisken som kontroll. For å teste

ulikheter mellom prøvetakingstidspunkt ble det først gjennomført en enveis ANOVA for hver enkelt behandlingsgruppe på tvers av alle prøvetakingstidspunktene. Ved en signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt ble det ettertestet med posthoc Tukey's HSD for å finne hvilke grupper som var signifikant ulike hverandre. Om variansen fortsatt var ulik mellom behandlingene etter log-transformering ble det foretatt en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis test på dataene. Ved en signifikant effekt av oljebehandling med Kruskal-Wallis ble det foretatt en post hoc Dunn's test for å teste hvilke grupper som var ulike hverandre. For å etterteste effekter av PMA på oksidativ burst ble det foretatt en toveis ANOVA med oljebehandling og PMA som uavhengige variabler. For å etterteste effekter av LPS på oksidativ burst ble det foretatt en to-veis ANOVA med "oljebehandling" og "LPS" som uavhengige variabler, samt et interaksjonsledd med oljebehandling\*LPS. For test av behandlingsforskjeller av olje etter 16 dager ble kun fisk som hadde fått injeksjon uten LPS inkludert i alle analyser bortsett fra oksidativ burst.

Spearman's rangkorrelasjon (Spearman 1904) ble benyttet for å teste sammenhenger mellom variablene. Det ble kun sett på sammenhenger innen hvert prøvetakingstidspunkt, og kun kontrollfiskene og de eksponerte gruppene ble inkludert i analysen.

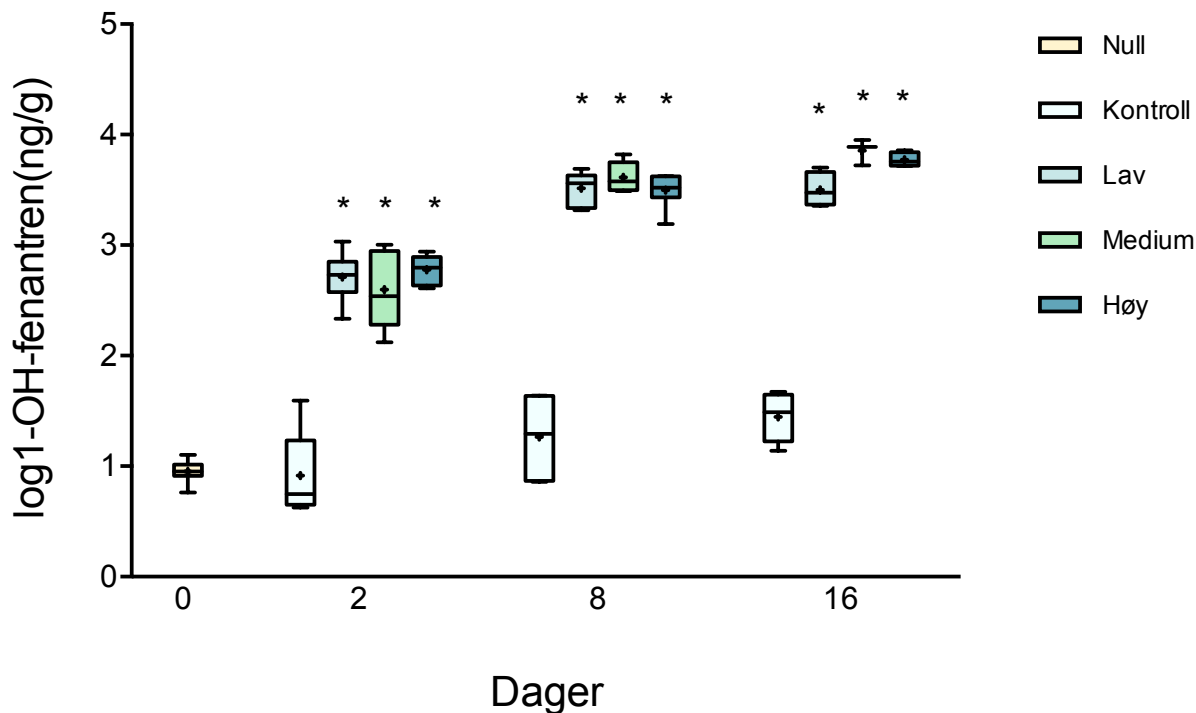
Signifikansnivå på samtlige tester ble satt til  $p \leq 0.05$ . Alle statistiske analyser ble gjort med JMP 11 (SAS Institute Inc.), mens grafiske fremstillinger ble gjort med GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

## 3 Resultater

### 3.1 PAH-metabolitter i galle

Det var en signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt i konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren blant kontrollgruppene og "0"-fisken (Kruskal-Wallis,  $p=0,03$ ) (Figur 3.1). Ved ettertesting med Dunn's test ble det derimot ikke detektert noen signifikante forskjeller mellom gruppene ( $p=1,0$ ;  $0,6$  og  $0,06$  for henholdsvis 2, 8 og 16 dager med kontrollgruppene mot "0"-fisken). Det var en signifikant effekt av oljebehandling på konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i galle etter 2 dagers eksponering (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0001$ ). Det var en signifikant effekt av lav, medium og høy konsentrasjon av olje sammenliknet med kontrollbehandlingen (Dunnet's,  $p=0,0001$  for alle). Det var en signifikant effekt av oljebehandling på konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren etter 8 dager (Kruskal-Wallis,  $p=0,004$ ). Det var signifikante effekter av lav, medium og høy oljekonsentrasjon sammenliknet med kontrollbehandlingen (Dunn's,  $p=0,004$ ,  $p=0,02$  og  $p=0,02$ ). Det var signifikante effekter av oljebehandling på konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren etter 16 dager (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0001$ ). Det var signifikante effekter av oljekonsentrasjon på lav, medium og høy konsentrasjon sammenliknet med kontrollbehandlingen (Dunnet's,  $p=0,0001$  for alle).

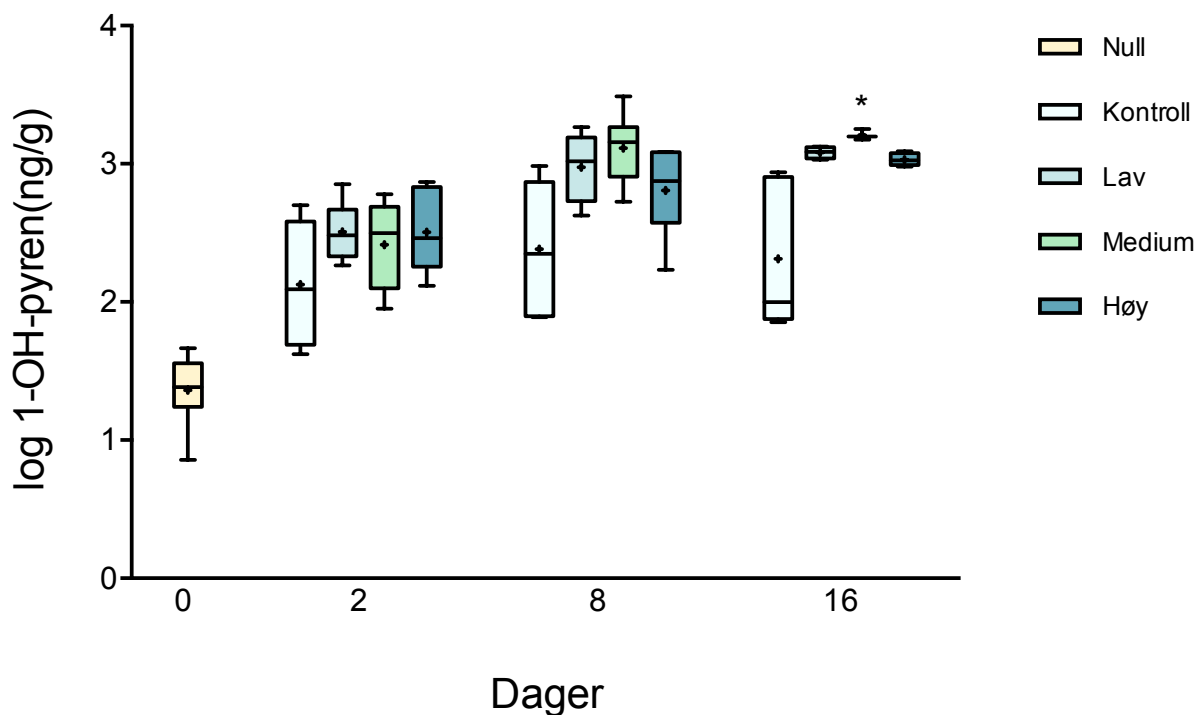
Det var en signifikant endring over tid i konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i galle hos piggvar som hadde vært eksponert for lav oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0001$ ). Ved ettertesting med Tukey ble det funnet en signifikant økning i konsentrasjoner av 1-hydroksyfenantren i galle mellom 2 og 8 dager, og 2 og 16 dager ( $p=0,001$  for begge). Det var også en signifikant endring over tid i konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i galle hos piggvar som hadde blitt eksponert for medium oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0001$ ). Det var signifikant økning i konsentrasjon mellom 2 og 8 dager og 2 og 16 dager (Tukey,  $p=0,001$  for begge). Det var en signifikant endring over tid i konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i galle hos piggvar som hadde vært eksponert høy oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0001$ ). Med Tukey ble det funnet en signifikant økning i konsentrasjon mellom 2 og 8 dager ( $p=0,001$ ), 2 og 16 dager ( $0,001$ ), samt mellom 8 og 16 dager ( $0,02$ ).



**Figur 3.1** 1-hydroksyfenantren i galle fra piggvar eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=3-8). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). \* signifikant forskjellig fra kontrollgruppe for det aktuelle tidspunkt ( $p \leq 0,05$ ).

Det var en signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt i konsentrasjon av 1-hydroksypyren blant kontrollgruppene og "0"-fisken ( $p=0,001$ ) (Figur 3.2). Ved ettertesting med Dunn's test ble det detektert signifikant forskjeller mellom "0"-fisken og kontrollfisken etter 2, 8 og 16 dager med henholdsvis  $p=0,03$ ,  $p=0,003$  og  $p=0,006$ . Det var ingen signifikant effekt av oljebehandling på konsentrasjon av 1-hydroksypyren i galle etter 2 dagers behandling (enveis ANOVA på log-tranformert data,  $p=0,2$ ). Det var ingen signifikant effekt av oljebehandling konsentrasjon av 1-hydroksypyren i galle etter 8 dager (Kruskal-Wallis,  $p=0,06$ ). Det var en signifikant behandlingseffekt av olje etter 16 dager (Kruskal-Wallis,  $p=0,004$ ). Det var en signifikant effekt av oljebehandling på fisk som hadde blitt eksponert for medium oljekonsentrasjon sammenliknet med kontrollfisken (Dunn's,  $p=0,002$ ).

Det var en signifikant endring over tid i 1-hydroksypyren i galle mellom fisk som hadde blitt eksponert for lav oljekonsentrasjon fra de ulike prøvetakingstidspunktene (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,001$ ). Med Tukey ble det funnet en signifikant forskjell mellom fisk fra 2 og 8 dagers behandling ( $p=0,004$ ) og mellom fisk fra 2 og 16 dagers behandling ( $0,002$ ). Det var en signifikant endring over tid i konsentrasjon av 1-hydroksypyren i galle fra fisk som hadde blitt eksponert for medium oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,001$ ). Ved ettertesting med Tukey ble det funnet en signifikant forskjell mellom fisk fra 2 og 8 dager ( $p=0,003$ ), og 2 og 16 dager ( $p=0,004$ ). Det var en signifikant endring over tid i konsentrasjon av 1-hydroksypyren i galle hos piggvar som hadde vært eksponert for høy oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,05$ ). Ved ettertesting med Dunn's test ble det ikke detektert noen signifikante forskjeller mellom gruppene.



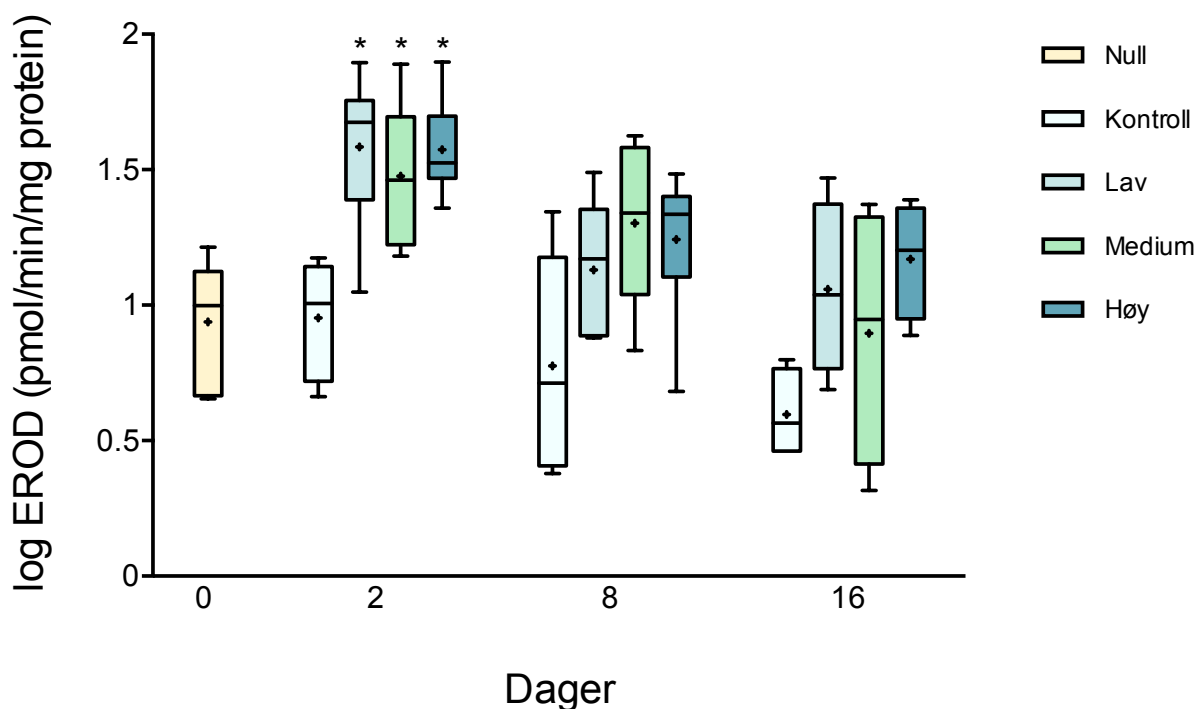
**Figur 3.2** 1-hydroksypyren i galle fra piggvar eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=3-8). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). \* signifikant forskjellig fra kontrollgruppe for det aktuelle tidspunkt ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2 CYP1A-aktivitet i lever (EROD)

Det var ingen signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt i EROD-aktivitet blant kontrollgruppene og "0"-fisken (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,2$ ) (Figur 3.3). Det var en signifikant effekt av oljebehandling på EROD-aktivitet etter 2 dagers eksponering (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,0004$ ). Det var signifikante effekter av lav, medium og høy konsentrasjon sammenliknet med kontrollbehandlingen etter 2 dager med henholdsvis  $p=0,0006$ ,  $p=0,0005$  og  $p=0,003$  (Dunnet's). Det var ingen signifikant effekt av oljebehandling på EROD-aktivitet etter 8 dager (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,06$ ). Det var heller ingen signifikant effekt av oljekonsentrasjon på EROD-aktivitet etter 16 dager (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,1$ ).

Det var en signifikant endring over tid i EROD-aktivitet hos fisken som hadde blitt eksponert for lav oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,02$ ). Det var en signifikant reduksjon i EROD-aktivitet mellom 2 og 16 dager (Tukey,  $p=0,04$ ). Det var ingen signifikant endring over tid i EROD-aktivitet hos piggvar som var eksponert for medium oljekonsentrasjon ( $p=0,06$ ). Det var en signifikant endring over tid i EROD-aktivitet hos fisken som hadde blitt eksponert for høy oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,03$ ). Det var en signifikant reduksjon i EROD-aktivitet for denne gruppen mellom 2 og 16 dager (Tukey,  $p=0,04$ ).



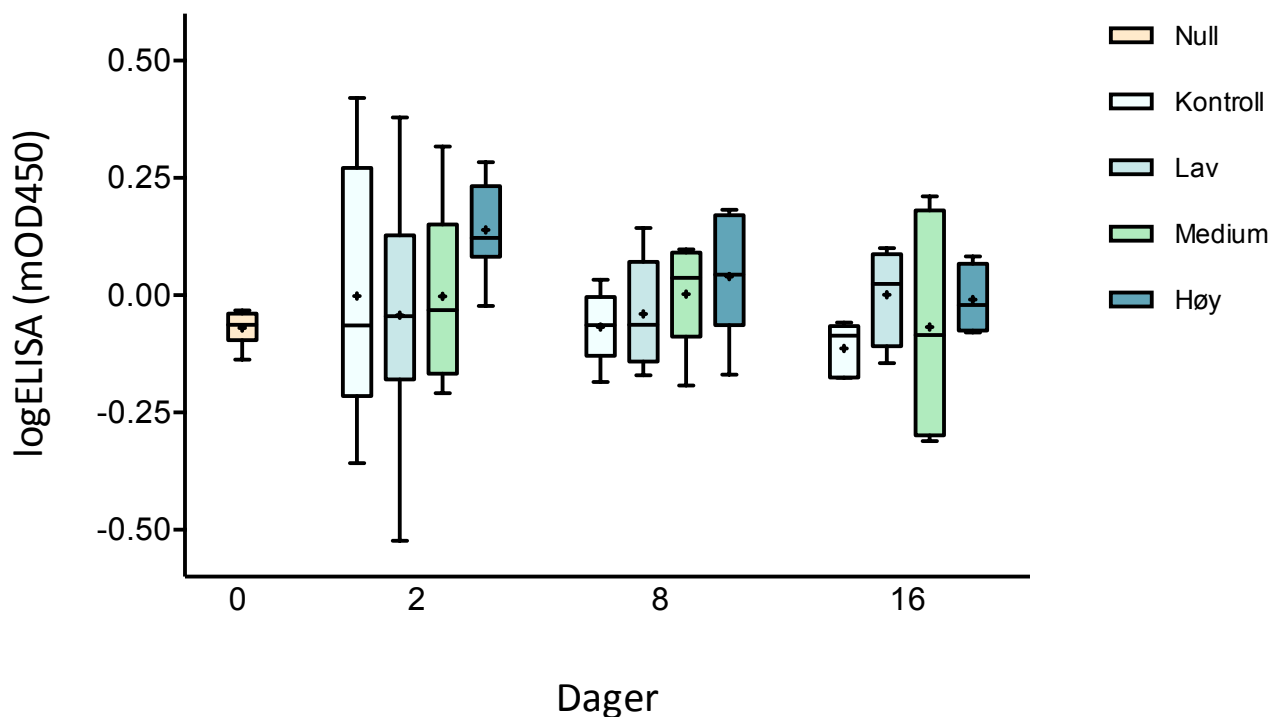


**Figur 3.3** EROD-aktivitet i lever fra piggyback eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=4-6). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). \* signifikant forskjellig fra kontrollgruppe for det aktuelle tidspunkt ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3 CYP1A-konsentrasjon i lever (ELISA)

Det var ingen signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt i CYP1A-konsentrasjon mellom kontrollgruppene og "0"-fisken (Kruskal-Wallis  $p=0,6$ ) (Figur 3.4). Det var ingen signifikant effekt av oljebehandling etter 2 dager (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,6$ ). Det var ingen signifikant behandlingseffekt av olje etter 8 dager (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,4$ ). Det var heller ingen signifikant effekt av oljebehandling etter 16 dager (Kruskal-Wallis,  $p=0,4$ ).

Det var ingen signifikant endring over tid i CYP1A-konsentrasjon hos piggyback som var eksponert for lav oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,9$ ). Det var heller ingen signifikant endring over tid i CYP1A-konsentrasjon hos piggyback som var eksponert for medium oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,8$ ). Det var heller ingen signifikante endringer over tid i CYP1A-konsentrasjon hos piggyback som var eksponert for høy oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,1$ ).



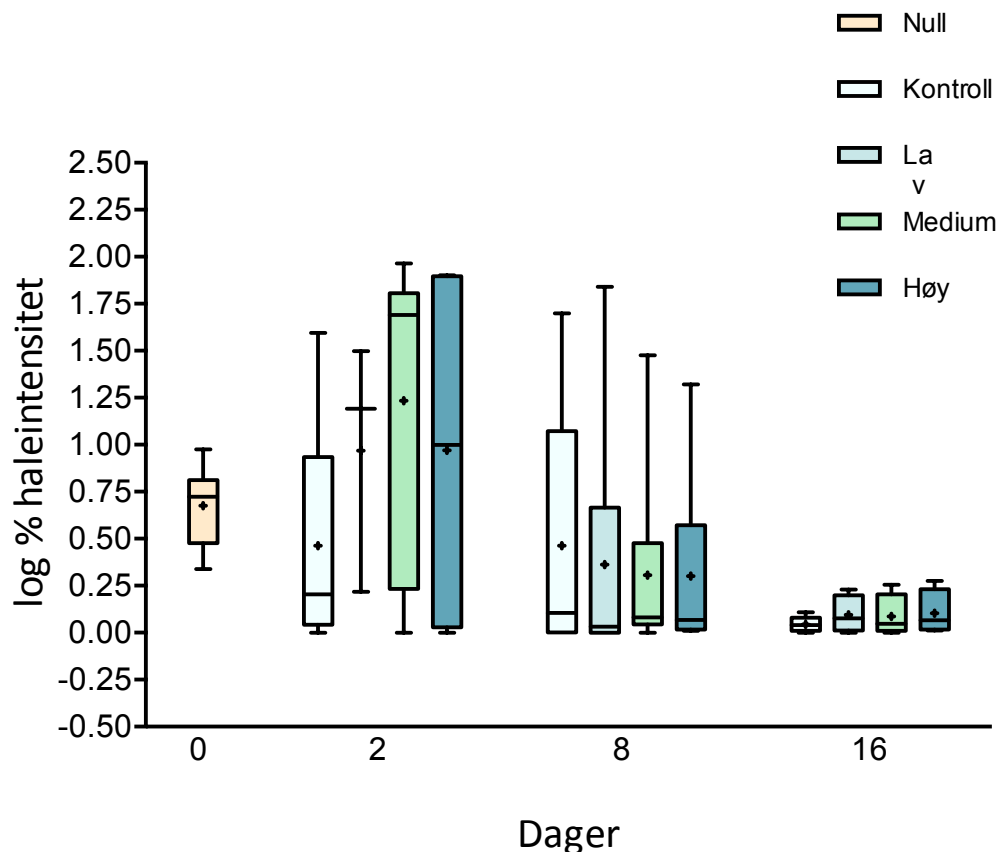
**Figur 3.4** CYP1A-konsentrasjon i lever fra piggvar eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=4-6). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer).

### 3.4 DNA-skade i leukocytter

Det var stor variasjon i DNA-skade etter 2 og 8 dagers eksponering både for leukocytter fra både helblod og hodenyre (henholdsvis Figur 3.5 og 3.6). Det var ingen ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra helblod i kontrollfisk sammenliknet med "0"-fisk (Kruskal-Wallis  $p=0,08$ ). Det var heller ingen signifikant behandlingseffekt av olje på DNA-skade i leukocytter fra helblod etter 2 dagers behandling (Kruskal-Wallis,  $p=0,5$ ). Det var ingen signifikant effekt av oljebehandling på DNA-skade i leukocytter fra helblod etter 8 dagers behandling (enveis ANOVA,  $p=0,9$ ). Det var heller ingen signifikant behandlingseffekt av olje på DNA-skade i leukocytter fra helblod etter 16 dager (enveis ANOVA,  $p=0,6$ ).

Det var ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra helblod hos piggvar som var eksponert for lav oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,5$ ).

Det var heller ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra helblod hos piggvar som var eksponert for medium oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,2$ ). Det var heller ingen signifikante endringer over tid i DNA-skade i leukocytter fra helblod hos piggvar som var eksponert for høy oljekonsentrasjon (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p= 0,5$ ).

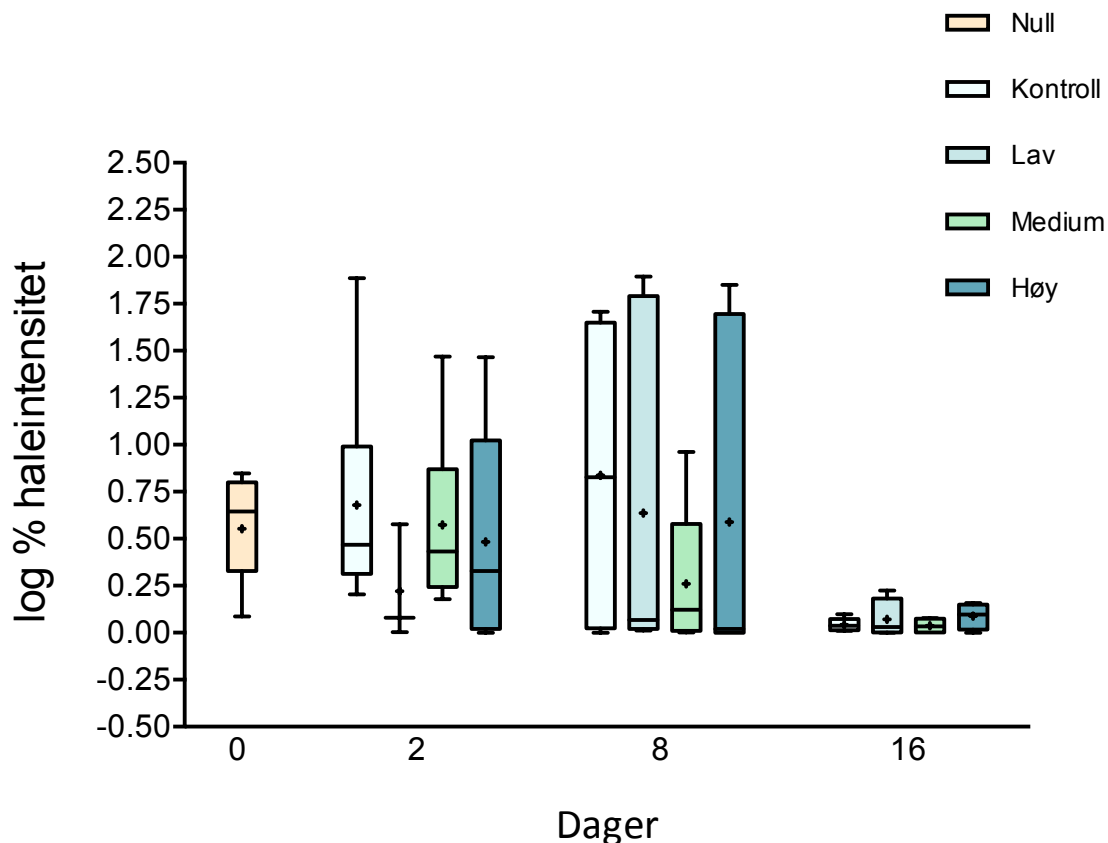


**Figur3.5** DNA-skade i isolerte leukocytter fra helblod i piggvar eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=3-8). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). All rådata ble lagt til +1 før logtransformering for å få visualisert alle verdier.

Det var ingen ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra hodenyre i kontrollfisk sammenliknet med "0"-fisk (Kruskal-Wallis  $p=0,06$ ) Det var ikke signifikant behandlingseffekt av olje på DNA-skade i leukocytter fra hodenyre etter 2 dagers behandling (enveis ANOVA,  $p=0,6$ ). Det var ingen signifikant behandlingseffekt av olje på DNA-skade i leukocytter fra hodenyre etter 8 dagers behandling (Kruskal

Wallis,  $p=0,6$ ). Det var heller ikke noen signifikant effekt av oljebehandling på DNA-skade i leukocytter fra hodenyre etter 16 dager (Kruskal-Wallis,  $p=0,2$ ).

Det var ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra hodenyre fra fisk som var eksponert for lav oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,5$ ). Det var derimot en signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra hodenyre fra fisk som var eksponert for medium oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,03$ ). Med Tukey ble det funnet en signifikant forskjell mellom fisk fra 2 og 16 dager ( $p=0,04$ ). Det var ingen signifikant endring over tid i DNA-skade i leukocytter fra hodenyre fra fisk som var eksponert for lav oljekonsentrasjon (Kruskal-Wallis,  $p=0,8$ ).



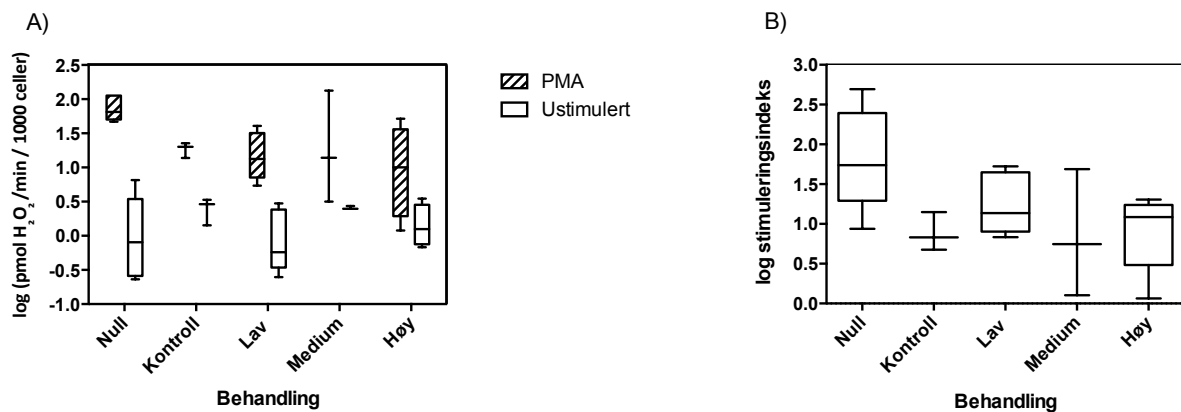
**Figur**

**3.6 DNA-skade i isolerte leukocytter fra hodenyre i piggvar eksponert for forskjellige konsentrasjoner av råolje fra Ekofisk (n=3-7). Oppgitt med median (tverrlinje), gjennomsnitt (+), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). All rådata ble lagt til +1 før logtransformering for å få visualisert alle verdier.**

### 3.5 Oksidativ burst

Det var en signifikant effekt av prøvetakingstidspunkt på stimuleringsindeks blant "0"-fisken og kontrollgruppene fra samtlige prøvetakingstidspunkt (Kruskal-Wallis,  $p=0,001$ ) (Figur 3.7 og 3.8). Ved ettertesting med Dunn's test ble det detektert signifikante forskjeller mellom "0"-fisken og kontrollfisken etter 16 dager med og uten LPS-injeksjon med henholdsvis  $p=0,0007$  og  $p=0,02$ .

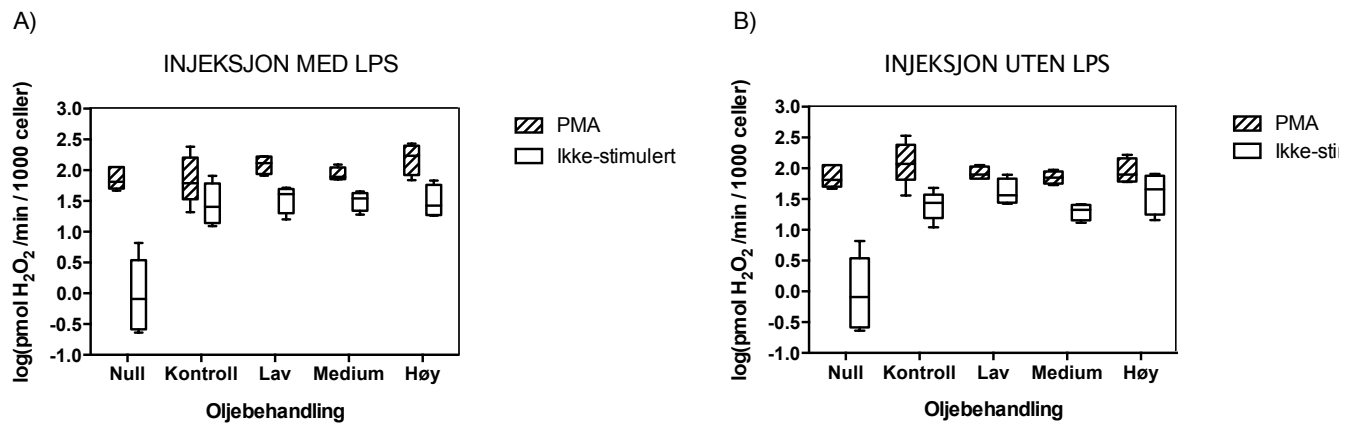
Det var en signifikant effekt av PMA-stimulering på  $H_2O_2$ -produksjon etter 8 dager (toveis ANOVA på log-transformert data,  $p<0,0001$ ) (figur 3.7 A og B). Det var derimot ingen effekt av oljebehandling på stimuleringsindeks etter 8 dagers eksponering (enveis ANOVA på log-transformert data,  $p=0,6$ ) (figur 3.7 B).



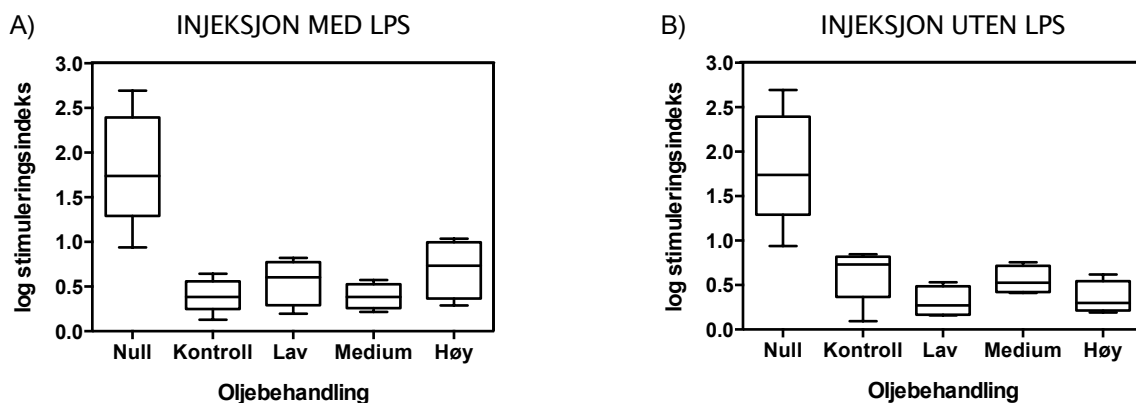
**Figur 3.7** A)  $H_2O_2$ -produksjon fra leukocytter fra helblod etter 8 dagers behandling ( $n=3-6$ ) inkludert "0"-fisk (Null). Oppgitt med median, 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). B) Log(stimuleringsindeks) for "0"-fisk (Null) og de øvrige behandlingene etter 8 dagers eksponering. ( $n=3-6$ ) Oppgitt med median (tverrlinje), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer).

Det var en signifikant effekt på  $H_2O_2$ -produksjon av PMA-stimulering på leukocytter etter 16 dagers eksponering, både på LPS-injisert fisk og fisk som hadde fått injeksjon uten LPS (toveis ANOVA på log-transformert data,  $p<0,0001$  for både LPS-injisert og fisk som hadde fått injeksjon uten LPS) (Figur 3.8 A og B, Figur 3.9 A og B). Det var ingen effekter av oljebehandling på stimuleringsindeks, verken på leukocytter fra de LPS-injiserte fiskene eller fra de som hadde fått injeksjon uten LPS (enveis ANOVA på log-transformert data, henholdsvis  $p=0,3$  og  $p=0,2$ ) (Figur 3.9 A og B). Med toveis ANOVA på

log-transformert data ble det funnet en svak signifikant interaksjonseffekt mellom oljebehandling og type injeksjon på stimuleringsindeks etter 16 dager ( $p=0,04$ ), men ikke på type injeksjon isolert sett ( $p=0,4$ ) (Figur 3.10).



**Figur 3.8** A) Endring etter 16 dagers eksponering i  $H_2O_2$ -produksjon fra isolerte leukocytter fra helblod i piggvar injisert med LPS, PMA-stimulert eller ikke-stimulert ( $n=4-6$ ). Også inkludert "0"-fisk (Null). Oppgitt med median (tverrlinje), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). B) Endring etter 16 dagers eksponering i  $H_2O_2$ -produksjon fra isolerte leukocytter fra helblod i piggvar injisert uten LPS, PMA-stimulert eller ikke-stimulert ( $n=4-6$ ). Også inkludert "0"-fisk (Null). Oppgitt med median (tverrlinje), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer).



**Figur 3.9** A) Stimuleringsindeks for "0"-fisk (Null) og de LPS-injiserte fiskene etter 16 dagers eksponering ( $n=4-6$ ). Oppgitt med median (tverrlinje), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer). B) Stimuleringsindeks for "0"-fisk (Null) og fisk som fikk injeksjon uten LPS etter 16 dagers eksponering ( $n=4-6$ ). Oppgitt med median (tverrlinje), 25%-75% kvartiler (bokser) og 10%-90% prosentiler (vertikale linjer).

### 3.6 Sammenhenger mellom biomarkører

Det var ingen signifikant korrelasjon mellom nivåer av gallemetabolitter (1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren) og stimuleringsindeks i  $H_2O_2$ -produksjon,

verken etter 2, 8 eller 16 dager. Konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i galle var signifikant positivt korrelert med EROD-aktivitet på alle prøvetakingstidspunktene, mens mengde CYP1A-proteiner var signifikant positivt korrelert med 1-hydroksyfenantren etter 8 dagers oljeeksponering (Tabell 2). 1-hydroksyfenantren var signifikant positivt korrelert med 1-hydroksypyren etter 8 og 16 dagers eksponering, EROD-aktivitet og mengde CYP1A var også signifikant positivt korrelerte etter 8 og 16 dager.

**Tabell 2.** Spearmans korrelasjonsanalyse mellom biomarkører etter 2, 8 og 16 dager der det er signifikant korrelasjon for minst et av prøvetakingstidspunktene.  $\rho$  = Spearmans korrelasjonskoeffisient.

		2 dager		8 dager		16 dager	
Variabel	Variabel	$\rho$	p-verdi	$\rho$	p-verdi	$\rho$	p-verdi
<b>1-OH-fenantren</b>	<b>EROD</b>	0,7	0,0002*	0,6	0,005*	0,6	0,02*
<b>1-OH-fenantren</b>	<b>ELISA</b>	0,1	0,5	0,5	0,01*	0,4	0,2
<b>1-OH-fenantren</b>	<b>1-OH-pyren</b>	0,3	0,2	0,6	0,002*	0,7	0,002*
<b>EROD</b>	<b>ELISA</b>	0,4	0,06	0,7	0,001*	0,8	0,001*

\* angir p-verdi under signifikansnivå ( $p \leq 0,05$ )

## 4 Diskusjon

### 4.1 PAH-metabolitter i galle

Konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren i galle ble benyttet som indikatorer på den generelle PAH-belastningen. Det ble observert signifikant høyere konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren i piggvar fra alle eksponerte grupper fra samtlige prøvetakingstidspunkt sammenliknet med kontrollgruppene med mer enn hundre ganger så høy konsentrasjon i noen av de oljeeksponerte gruppene. Dette er en klar indikasjon på at en eksponering fant sted, og at PAH var biotilgjengelig for fisken. Det var mindre tydelige effekter av behandling på konsentrasjoner av 1-hydroksypyren, hvor det kun var signifikant forhøyede metabolittkonsentrasjoner hos fisk som hadde blitt eksponert for medium oljebehandling etter 16 dager. På samme vis ga konsentrasjon av 1-hydroksyfenantren en mer tydelig indikasjon på oljeeksponering enn 1-hydroksypyren i torsk (Figur 4.1). Det ble ikke tatt vannprøver av de forskjellige karene under forsøket, så det er uvisst om konsentrasjonen av gallemetabolitter reflekterer det reelle forholdet mellom fenantren og pyren i vannet. I et eksperiment hvor *Paralichthys olivaceus* og *Pagrus major* ble eksponert for en PAH-blanding med fenantren, pyren og chrysen i like store deler observerte Cheikyula *et al.* (2008) at akkumuleringen av fenantren etter hvert utgjorde over 90 % av totalt PAH i muskel og lever. I tillegg har det også blitt rapportert om relativt høye konsentrasjoner av fenantrenrelaterte metabolitter i feltstudier (Krahn *et al.* 1992; Pointet & Milliet 2000). Dette kan tyde på fenantren er relativt biotilgjengelig i akvatiske miljøer, og at det biokonsentreres i stor grad av en rekke arter. Fenantren er et 3-ringet PAH som blant annet har vist seg å være i stand til å indusere DNA-skade, samt øke EROD-aktiviteten signifikant i lever hos gullmulle (*Liza aurata*) (Oliveira *et al.* 2007). Krahn *et al.* (1992) foreslo ut fra sitt feltstudie like etter utslippet fra Exxon Valdez at ratioen mellom fenantren/naftalen- og B[a]P-relaterte metabolitter kunne benyttes for å fastslå opphavet til PAH i et individ. Dette kommer av at lette PAH som fenantren og naftalen er relativt vanligere i forbindelser fra petroleumskilder enn fire- og fem-ringede molekyler, som er mer dominerende i PAH som stammer fra ufullstendige forbrenningsprosesser.

Det ble sett økning i konsentrasjonene av både 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren mellom 2 og 8 dager, samt 2 og 16 dager. Dette er det motsatte av det

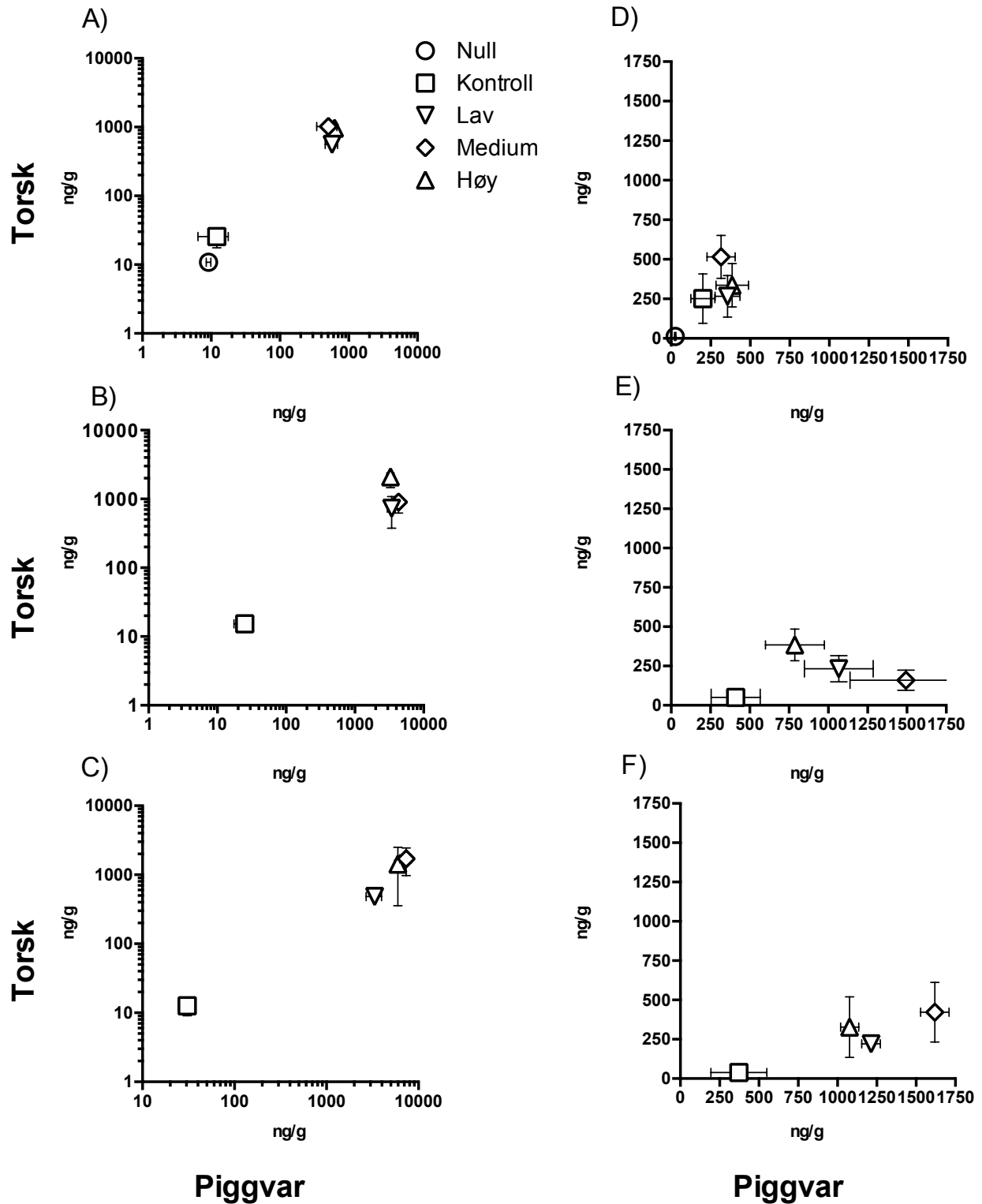


mønsteret som ble observert i EROD-aktivitet, der nivåene var høyest sammenliknet med kontrollfisken etter 2 dagers eksponering, for så å være lavere etter 16 dager. Det var også signifikant høyere konsentrasjon av 1-hydroksypyren i kontrollfisken på alle tidspunkter sammenliknet med "0"-fisken. Dette kan tyde på at det var et visst bakgrunnsnivå av pyren i karene med kontrollfisk. Denne opphopningen av 1-hydroksypyren i kontrollfisken ble derimot ikke sett i torsk. I et 30 dagers eksperiment med juvenil piggvar som ble eksponert for vannbåren B[a]P observerte Boleas *et al.* (1998) en liknende opphopning av gallemetabolitter i kontrollfisken og forklarte dette med at fisken ikke tok til seg føde under eksperimentet. Det er kjent at gallen blir tømt ut i fordøyelseskanalen for å bidra i nedbrytning av lipider og andre næringsstoffer etter inntak av føde. Ernæringsstatus kan derfor ha stor innvirkning på konsentrasjon av metabolitter (Brumley *et al.* 1998; Pointet & Milliet 2000). Det ble ikke sett at piggvaren tok til seg føde under dette eksperimentet i motsetning til torsken, og dette kan være en del av forklaringen på at det ble sett en større konsentrasjon av 1-hydroksypyren i kontrollgruppen med piggvar enn i kontrollgruppen med torsk. I tillegg er det kjent at ulike arter kan ha forskjellig grad av opptak, metabolisme og eliminering av PAH (Cheikyula *et al.* 2008). Etter 8 og 16 dager ble det jevnt over sett høyere konsentrasjoner av særlig 1-hydroksypyren i gallen til de oljeeksponerte gruppene med piggvar enn i de oljeeksponerte gruppene med torsk (Figur 4.1 E og F). Det er mulig at artsspesifikke karakteristikk knyttet til opptak, metabolisme og eliminering også kan ha bidratt til forskjeller i metabolittkonsentrasjoner mellom artene i dette eksperimentet.

Det var ingen tydelige behandlingsavhengige mønstre på konsentrasjon av gallemetabolitter, verken hos piggvar eller hos torsk. En årsak til dette kan være at råoljen var lite oppløst i vannet, eller at den var adsorbent til grusen, kolonnene og/eller slangene som følge av mettede konsentrasjoner, og at dette igjen førte til redusert biotilgjengelighet.

Det var signifikant korrelasjon mellom konsentrasjonene av 1-hydroksyfentantren og EROD-aktivitet etter 2, 8 og 16 dager. EROD-aktivitet og 1-hydroksyfentantren-metabolitter var også de to biomarkørene som viste seg å være mest sensitive for oljeeksponeringen. Det var også en signifikant korrelasjon mellom 1-

hydroksyfentantren og 1-hydroksypyren etter 8 og 16 dager, men ikke etter 2 dagers eksponering. Dette kan tyde på at det var forskjeller i opptaksmønster av de to stoffene i starten av eksperimentet.



**Figur 4.1** Konsentrasjon av 1-hydroksofenantren for piggyback (X-akse) og torsk (Y-akse) etter A) 2 dager, B) 8 dager og C) 16 dager, og konsentrasjon av 1-hydroksopyren piggyback (X-akse) og torsk (Y-akse) etter D) 2 dager, E) 8 dager og F) 16 dager. n=3-8. Oppgitt med gjennomsnitt og standardfeil (linjer). "0"-fisken er inkludert i diagrammene med fisken som ble prøvetatt etter 2 dagers oljebehandling (A og D).

## 4.2 Fase-1 metabolisme

Det ble observert en signifikant tre til fem-gangers økning i EROD-aktivitet i piggvar fra samtlige oljebehandlinger sammenliknet med kontroll-fisken etter 2 dager, mens det ikke var signifikant forskjell mellom kontroll og de øvrige behandlingene etter 8 og 16 dager. Det var også en signifikant nedgang i EROD-aktivitet i piggvar som ble eksponert for lav og høy konsentrasjon mellom 2 og 16 dager. Dette kan tyde på at maksimal EROD-aktivitet i piggvar ble nådd mellom 1 og 8 dagers eksponering, og at den minsket utover i eksperimentet. Det har tidligere blitt foreslått at induksjon av CYP1A blir bremsset opp og nedregulert så snart tilstrekkelig med enzymer er indusert og i stand til å metabolisere kjemikalet, og at det deretter vil bli en nedgang i enzymkonsentrasjon til det oppstår en likevekt mellom enzym og substrat (Munkittrick *et al.* 1995). I et eksperiment der piggvar ble eksponert for den oppløste fraksjonen av semidiesel ble maksimal EROD-aktivitet registrert først etter at fisken hadde blitt holdt 3 dager i rent sjøvann etter en 5-dagers eksponeringsperiode (Goanvec *et al.* 2008). Maksimal EROD-aktivitet har vist seg å variere i stor grad ut fra hvilken eksponeringsvei og hvilket eksponeringsoppsett som har blitt benyttet (Levine *et al.* 1994). I studier med injeksjon av PAH-forbindelser har det vanligvis blitt observert et toppnivå innen én uke etter injeksjon, men hvor kjapt dette nås er avhengig av art, dose, og hvilken type PAH-forbindelse som har blitt injisert (Beyer *et al.* 1997; Celander *et al.* 1994; Goanvec *et al.* 2004). I et eksponeringsforsøk med vannbårent PAH vil derimot faktorer som biotilgjengelighet og eliminering av stoffet fra gjeller og annet epitel spille mer inn, i tillegg til persistensen og de fysiske-kjemiske egenskapene til PAH-forbindelsene i vannet.

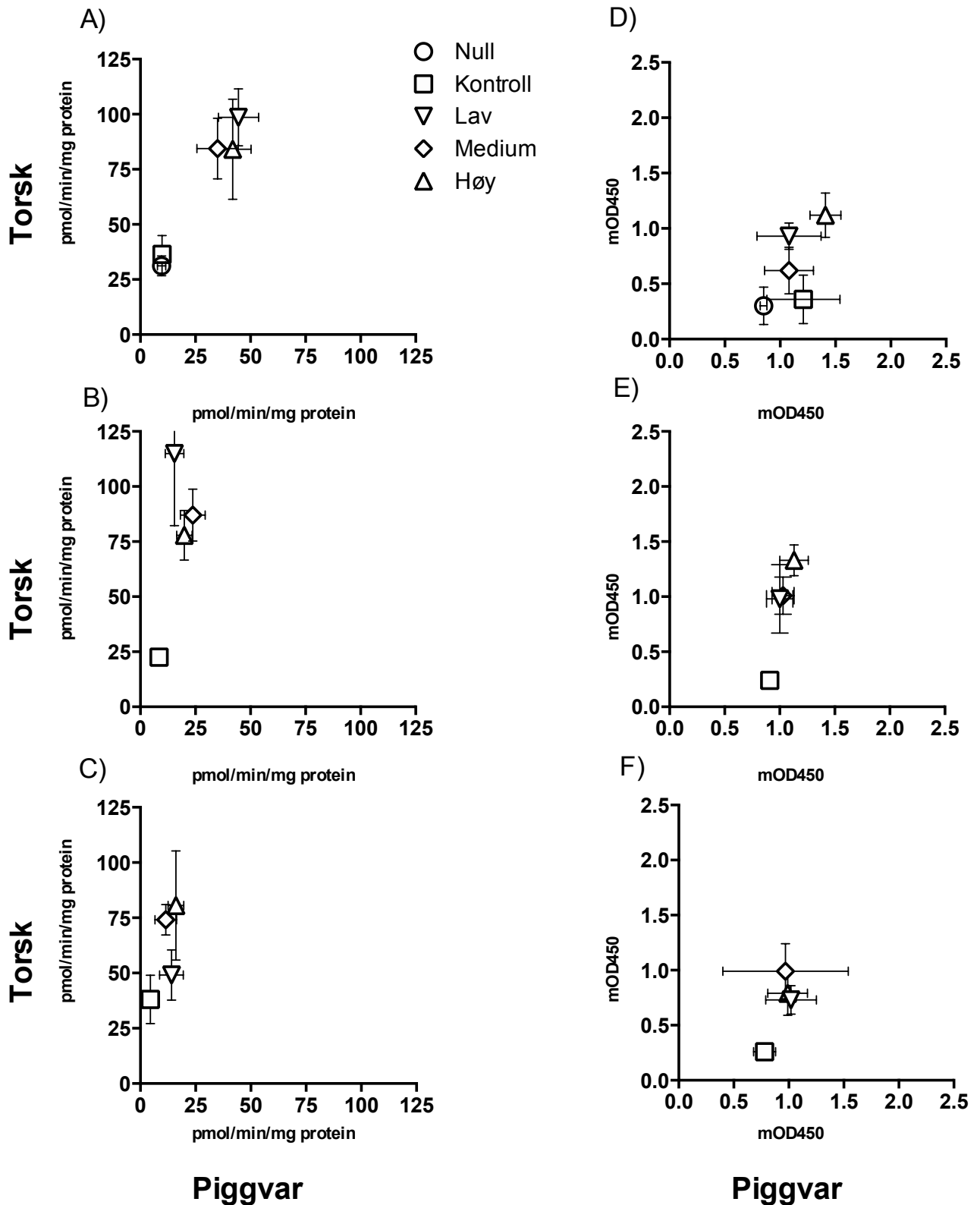
Hos torsken som inngikk i dette eksperimentet var EROD-aktiviteten signifikant forhøyet hos alle oljebhandlede grupper sammenliknet med kontrollfisken først etter 8 dagers eksponering, selv om det også ble sett en signifikant oppregulering hos fisk fra den lave konsentrasjonen etter 2 dager (Figur 4.2). Dette kan indikere en mer persistent og/eller forsinket oppregulering av EROD-aktivitet hos torsk enn hos piggvar. Det er kjent at torsk har en svært fettrik lever (Dey *et al.* 1983). I et feltstudie med gapeflyndre (*Hippoglossoides platessoides*) og *Limanda ferruginea* observerte Hellou og Warren (1997) at akkumulering av særlig alkylerte polyaromatiske forbindelser var positivt

korrelert med et økende lipidinnhold i leveren. Det har tidligere blitt observert store artsforskjeller både i omfang og utvikling av EROD-aktivitet over tid hos fisk (Beyer *et al.* 1996; Malmström *et al.* 2004; Ploch *et al.* 1998). Dette ble også reflektert ved et høyere induert nivå, samt større aktivitet hos "0"-fisken (median, 25%-75% kvartil; 37,8; 18,8-40,4 pmol/min/mg) blant torsk enn hos piggvar. Hos piggvar var EROD-aktiviteten til "0"-fisken 10,0; 4,6 – 13,4 pmol/min/mg protein, noe som er forenelig med basalnivåene i Peters og Livingstone (1995) sin undersøkelse av EROD-aktivitet i piggvar i ulike livsstadier.

Det var heller ikke noen entydige konsentrasjonsavhengige effekter på EROD-aktivitet, verken hos piggvar eller hos torsk. Dette støtter opp om de liknende observasjonene som ble gjort av gallemetabolitter. På samme vis observerte Ortiz-Delgado *et al.* (2008) at EROD-aktiviteten i lever ikke samsvarte med konsentrasjonene av vannbårent B[a]P i sitt eksperiment med havkaruss (*Spondyliosoma cantharus*). Det har blitt foreslått at tilstrekkelig store konsentrasjoner av et induserende stoff kan føre til histopatologiske endringer i de mest belastede organene, noe som igjen kan resultere i lavere EROD-aktivitet (Holdway *et al.* 1994; Köhler & Pluta 1995). Selv om disse vevsendringene som oftest er subletale effekter knyttet til lengre tids eksponering observerte Ortiz-Delgado *et al.* (2007) dette mønsteret i gjellene hos havkaruss (*Spondyliosoma cantharus*) som ble eksponert for de høyeste konsentrasjonene på 300 og 500 µg L<sup>-1</sup> B[a]P etter bare 20 dagers eksponering. Det er også kjent at enzymesystemer kan bli mettet ved tilstrekkelig store mengder av et substrat (Michaelis & Menten 1913). Dette ble foreslått som en forklaring av Emborski *et al.* (2012) da det ikke ble sett noen signifikant forskjell i EROD-aktivitet og CYP1A-mengde i lever fra *Siganus spinus* som hadde fått injisert medium og høy dose med β-naphthoflavone.

For å kvantifisere konsentrasjon av CYP1A-proteiner i lever ble ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) benyttet. Det var ingen signifikante effekter av oljebehandling på mengde CYP1A-proteiner i piggvar på noen av prøvetakingstidspunktene, selv om det var tendenser til oppregulering på noen av behandlingene. Dette var ikke sammenfallende med resultatene for torsk, hvor ELISA viste seg å være en vel så robust metode for deteksjon av oljeeffekter som EROD (figur 4.2). I likhet med denne studien

var det mangel på samsvar mellom signifikante effekter i EROD-aktivitet og konsentrasjon CYP1A-proteiner i Peters *et al.* (1997) og Boleas *et al.* (1998) sine eksponeringsforsøk med juvenil piggvar. I det førstnevnte eksperimentet mislyktes man i å detektere konsentrasjonsavhengige CYP1A-mengder med Western blot etter 24 timers eksponering til vannbårent 25 ppb B[a]P, til tross for en signifikant forhøyet EROD-aktivitet. I det andre eksperimentet ble det observert en signifikant økning i EROD-aktivitet i 3 dager etter intraperitoneal injeksjon av 2,5 mg kg<sup>-1</sup> B[a]P, men ikke en signifikant økning i CYP1A-konsentrasjon. Arukwe og Goksøyr (1997) så derimot en signifikant økning i konsentrasjon av CYP1A hos kjønnsmoden piggvar som ble injisert intraperitonealt med 75 mg kg<sup>-1</sup> β-naftoflavon. Det er mulig at det skal relativt høye konsentrasjoner til av et induserende stoff for å få en signifikant kvantifiserbar oppregulering av CYP1A-konsentrasjon i lever hos piggvar. Det har tidligere vist seg å være artsvariasjoner i korrelasjon mellom EROD-aktivitet og konsentrasjon av CYP1A i fisk. I en studie av Collier *et al.* (1992) ble det sett et tydelig artsavhengig mønster i korrelasjon mellom CYP1A-konsentrasjon og EROD-aktivitet i leveren fra 11 ulike arter som ble prøvetatt i Prince William Sound og Puget Sound, med en korrelasjon som rangerte fra en signifikant og sterk korrelasjon på 0,77 i *Parophrys vetulus* til en fullstendig mangel på sammenheng hos stillehavskveite (*Hippoglossus stenolepis*). Til tross for at de målte CYP1A-konsentrasjon ikke støttet opp om de effektene som ble observert etter 2 dagers eksponering i EROD-aktivitet hos piggvar i dette eksperimentet, var det en signifikant moderat til sterk korrelasjon mellom mengde CYP1A-proteiner og EROD-aktivitet etter både 8 og 16 dagers behandling. Dette tyder på at primærantistoffet som ble brukt i dette eksperimentet har en relativt bra spesifitet for CYP1A i piggvar.



**Figur 4.2** EROD-aktivitet for piggyvar (X-akse) og torsk (Y-akse) etter A) 2 dager, B) 8 dager og C) 16 dager, og CYP1A proteinmengde piggyvar (X-akse) og torsk (Y-akse) etter D) 2 dager, E) 8 dager og F) 16 dager oppgitt i henholdsvis pmol/min/mg protein og mOD450. n=4-8. Oppgitt med gjennomsnitt (figurer) og standardfeil (linjer). "0"-fisken er inkludert i diagrammene med fisken som ble prøvetatt etter 2 dagers oljebehandling (A og D).

### 4.3 DNA-skade

Det var stor variasjon i DNA-skade mellom de ulike individene i de forskjellige eksponeringsgruppene både i hvite blodceller fra helblod og hodenyre etter 2 og 8 dager. Som følge av dette var det ingen signifikant forskjell mellom kontrollfisken og de ulike oljeeksponerte gruppene. Det samme inkonsistente mønsteret ble også observert i torsk. Det fins en rekke studier der det har blitt målt økninger i DNA-skade som følge av PAH-eksponering i piggvar. I en studie detekterte Peters *et al.* (1997) en seksdobling i formasjon av DNA-addukter allerede etter 16 timers eksponering med 25 ppb vannbåren B[a]P. Dû-Lacoste *et al.* (2013) observerte derimot en signifikant økning i DNA-skade i blodceller med comet-analyse først etter 4 dagers eksponering i den samme arten.

I vårt eksperiment ble det målt DNA-skade i leukocytter fordi dette ville være et interessant endepunkt i en immuntoksikologisk kontekst. Det er begrenset med studier hvor det tidligere har blitt målt DNA-skade i denne type isolerte cellekulturer i fisk. Malmström *et al.* (2000) observerte en signifikant effekt av intraperitoneal injeksjon av B[a]P på dannelse av DNA-addukter i leukocytter i skrubbe (*Platichthys flesus*). På samme vis så Fredriksen (2013) at det var signifikant mer DNA-skade i hvite blodceller fra torsk fra indre Oslofjord enn i torsk fra ytre Oslofjord. Variasjonen i DNA-skade som ble observert både i kontrollgruppen og den oljeeksponerte fisken i vårt eksperiment etter 2 og 8 dager, avviker fra de to nevnte studiene med leukocytter. Det er mulig at heterogenitet i en cellekultur kan ha innvirkning på grad av DNA-skade som blir detektert med comet-metoden (Lee & Steinert 2003). Ulike celletyper kan ha ulike bakgrunnsnivåer som følge av forskjeller i reparasjonsmekanismer, metabolsk aktivitet og antioksidantforsvar. Blant annet så Betti og Nigro (1996) én "sensitiv" og én "resistent" lymfocyttype etter at disse cellene ble behandlet med metylkvikksølv *in vitro*. Det er uvisst i hvilken grad dette kan ha hatt innvirkning på resultatene våre da vi ikke karakteriserte leukocytene vi isolerte. I tillegg har det i tidligere studier blitt observert individuelle variasjoner med hensyn til reparasjonsmekanismer av DNA (Collins *et al.* 2001; Gaivão *et al.* 2009). Dette kan ha hatt innvirkning på grad av reparasjon mens cellene befant seg i blodbanen, så vel som i cellekulturene. Årsaken til at det var høy skade også i noen av de kontrolleksponerte individene er uvisst. Det har



tidligere blitt observert at ulike former for stress kan føre til økt oksidativt stress i celler og plasma (Gümüslü *et al.* 2002; Liu *et al.* 1994). Selv om det er uvisst om det er sett direkte korrelasjoner mellom stress og DNA-skade, vet man at oksidativt stress kan skade DNA. Det er mulig at stress i tillegg til oljeeksponering kan ha bidratt til økt DNA-skade i dette eksperimentet.

Etter 16 dagers eksponering hadde fisk fra samtlige behandlinger lite DNA-skade, både i helblod og hodenyre. Det har i tidligere blitt sett at piggvar har relativt effektive reparasjonsmekanismer etter eksponering for PAH. Peters *et al.* (1997) observerte en 50% reduksjon i maksimal DNA-skade allerede etter 48 timers eksponering for 25 bbp B[a]P. Dette ble forklart med at det enten kunne være en reduksjon av biotilgjengelig B[a]P i det eksperimentelle systemet, eller som følge av en økt kapasitet til metabolisering via fase 1 og/eller fase 2 konjugeringsprosesser. Dû-Lacoste *et al.* (2013) så en slik reduksjon i piggvar etter 6 dager i rent vann etter en 4 dagers eksponering, men dette så ut til å avhenge av hvilken type PAH-eksponering fisken hadde vært utsatt for.

#### 4.4 Modulering av immunrespons

Effekter av oljebehandling på immunfunksjon ble målt i form av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon fra isolerte leukocytter fra helblod. Det var ingen effekter av oljebehandling på mengde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon fra piggvar verken etter 8 eller 16 dagers behandling, selv om man kunne se en signifikant effekt av PMA-stimulering på samtlige behandlinger. Det ble heller ikke observert PAH-avhengige effekter i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon fra leukocytter fra torsken som inngikk i eksperimentet. Oksidativ burst har i flere tilfeller vist seg å bli påvirket av PAH-eksponering, både etter injeksjon av PAH og som følge av ytre eksponering fra vann eller sedimenter (Reynaud *et al.* 2002; Rice *et al.* 1996). I flere av eksperimentene har det måttet blitt gitt relativt store doser for å få en merkbar effekt. Dette ble blant annet illustrert i en studie med medaka (*Oryzias latipes*) der Carlson *et al.* (2002) så en signifikant reduksjon av superoksid-produksjon (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) fra PMA-stimulerte leukocytter først etter en intraperitoneal injeksjon med 200 mg kg<sup>-1</sup> B[a]P. Det var derimot ingen signifikant effekt på PMA-stimulering av 2 og 20 mg kg<sup>-1</sup>. På samme vis

viste Hart *et al.* (1998) at det måtte injiseres  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  7,12-dimetylbenzo[*a*]antracen for å få en signifikant redusert respons i  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produksjon i tilapia (*Oreochromis niloticus*), en dose som var stor nok til å påføre andre og synlige effekter på fisken som redusert aktivitet, økt pigmentering og større dødelighet. Kennedy og Farrell (2008) observerte derimot i sitt langtidsstudie med juvenil sild (*Clupea harengus*) at den høyeste konsentrasjonen på 127 ppb WSF førte til en signifikant økt produksjon av  $\text{H}_2\text{O}_2$  de første 4 dagene, før responsen ble drastisk redusert til nivåer langt under kontroll og de øvrige behandlingene utover i eksperimentet. Denne overkompensasjonen i  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produksjon kunne også relateres til et umiddelbart sterkere forsvar mot bakterien *Listonella anguillarum* før det gradvis kollapset, og dødeligheten ble større i den høyeksponerte gruppen. Det kan se ut til at en kompleks interaksjon mellom faktorer som oljekonsentrasjon, eksponeringsforhold og artsforskjeller påvirker grad av oksidativ burst i fisk.

Til tross for at det ikke ble observert noen behandlingsforskjeller mellom gruppene fra de ulike prøvetakingstidspunktene kunne man se en signifikant forskjell i stimuleringsindeks mellom "0"-fisken og kontrollfisken etter 16 dagers oljebehandling. Det var også signifikante forskjeller i basalnivå av  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produksjon mellom "0"-fisken og kontrollfisken etter 16 dager, både fra den LPS-injiserte gruppen og piggvaren som fikk injeksjon uten LPS. "0"-fisken hadde også en signifikant større respons på PMA-stimulering enn fisken etter 8- og 16-dagers eksponering, samtidig som fisken fra 16-dagers behandlingen hadde en høy basalproduksjon av  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Det er kjent at stress kan påvirke immunfunksjon hos fisk (Costas *et al.* 2011; Demers & Bayne 1997; Magnadóttir 2006). Under et eksperiment som dette vil det være sannsynlig at fisken opplever stress fra tid til annen. Selv om det ble forsøkt å redusere denne faktoren så mye som mulig kan det ikke utelukkes at dette spilte inn på  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produksjon. Blant annet var tettheten av fisk stor i starten av eksperimentet, selv om denne ble mindre utover i eksperimentet. Fisken ble også utsatt for håndteringsstress i forbindelse med injeksjonen etter 8 dager. Det har tidligere blitt vist at både grad og varigheten av et stress-stimuli er avgjørende for immunresponsen. Blant annet observerte Yin *et al.* (1995) i et 30 dagers eksperiment med karpe (*Cyprinus carpio*) at vedvarende tetthetssavhengig stress blant annet senket lysozym- og komplementaktiviteten signifikant i plasma fra dag én og ut eksperimentet, samtidig som kjemiluminescensresponsen til fagocytene ble

signifikant redusert fra dag syv og utover. Demers og Bayne (1997) så derimot at kortvarige stresspåføringer i form av lufteksponering og håndteringsstress førte til en signifikant økt lyzozymaktivitet hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*).

For å se hvordan den oljeksponerte fisken responderte på immunstimuli ble halvparten av den gjenværende fisken injisert intraperitonealt med LPS fra *Pseudomonas aeruginosa* etter 8 dager, mens den andre halvparten ble injisert med fosfatbufret saltvann uten LPS. Det var en svak signifikant interaksjonseffekt mellom oljebehandling og type injeksjon på H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon, men akkurat hvordan denne effekten ga utslag er vanskelig å tolke. LPS har vist seg å gi mildere immunresponser, samt å virke igjennom andre signalveier i fisk enn i pattedyr (Sepulcre *et al.* 2009). Det er også sett at forskjellige typer LPS varierer i hvor sterk immunrespons de er i stand til å initiere. Blant annet observerte Novoa *et al.* (2009) at sebrafisklarver (*Danio rerio*) var langt mer sensitive overfor vannbåren LPS fra *P. aeruginosa* enn overfor LPS fra *Escherichia coli*. I et eksperiment med atlantisk laks (*Salmo salar*) så Paulsen *et al.* (2003) at en intraperitoneal injeksjon med 30 mg kg<sup>-1</sup> LPS fra *E. coli* økte lyzozymaktiviteten i plasma signifikant allerede etter 2 dager, med en kontinuerlig økning helt til forsøket slutt etter 21 dager. Det er mulig at det kunne ha blitt observert mer markante effekter av LPS på andre immunologiske endepunkter enn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon også i vårt eksperiment. I tillegg så Dalmo *et al.* (1998) en stor variasjon mellom individer fra samme art i opptaks- og distribusjonsmønster av injisert LPS, og stilte spørsmål om dette begrenset LPS sin nytteverdi som immunstimulant hos fisk. Hvorvidt dette har hatt betydning for resultatene i vårt eksperiment er uvisst.

## 5 Konklusjoner

Det var en signifikant økning av metabolitter av 1-hydrokysfentantren i galle fra fisk fra alle oljeeksponerte behandlinger sammenliknet med kontrollbehandlingen. Dette er en klar indikasjon på at en eksponering fant sted, og at PAH var biotilgjengelig for fisken. PAH-belastningen var mer tydelig for 1-hydroksyfenantren enn for 1-hydroksypyren, som kun var signifikant forhøyet i en av de oljebehandlede gruppene. Dette kan enten tyde på at det var høyere nivåer av fenantren enn pyren i vannet eller at fenantren var mer biotilgjengelig for fisken. Det ble ikke sett behandlingsforskjeller mellom de oljeeksponerte gruppene, noe som heller ikke ble observert i form av EROD-aktivitet. Dette kan komme av det allerede ved lav oljekonsentrasjon var en metning av hvor mye olje som var biotilgjengelig i systemet.

Det var signifikant høyere EROD-aktivitet i lever i fisk fra alle oljeeksponerte grupper sammenliknet med kontrollfisk etter 2 dager, mens det ikke var noen signifikant økning etter 8 og 16 dager. Dette kan tyde på en at det var en maksimal EROD-aktivitet mellom 1 og 8 dager, med en påfølgende nedregulering av CYP1A-aktivitet etter dette på grunn av adaptering til oljeeksponeringen og/eller lavere PAH-konsentrasjoner i vannet. Det var ingen signifikante behandlingseffekter av olje på relativ mengde CYP1A i lever.

Det var ingen effekter av eksponeringene på DNA-skade i leukocytter fra helblod eller hodenyre i piggvar og det var stor variasjon i DNA-skade etter 2 og 8 dager. Etter 16 dager var det lite DNA-skade i samtlige behandlinger.

Det var ingen endringer i immunfunksjon hos leukocytter målt i  $H_2O_2$ -produksjon fra fisk som hadde blitt eksponert for forskjellige konsentrasjoner av Ekofisk råolje, og følgelig var det ingen sammenheng mellom eksponering (målt i PAH-metabolitter) og immunfunksjon. Det ble derimot observert en signifikant forskjell i basalnivå av  $H_2O_2$ -produksjon og stimuleringsindeks mellom "0"-fisk og kontrollfisk etter 8 og 16 dager. Dette kan være et utslag av andre faktorer som kan ha innvirkning på immunfunksjon, som for eksempel stress relatert til fisketetthet og håndtering.

Det var en signifikant interaksjonseffekt mellom injeksjon av LPS og oljebehandling på oksidativ burst etter 16 dagers eksponering, men akkurat hvordan denne effekten ga utslag er vanskelig å tolke. Det var derimot ingen signifikante effekter av LPS-injeksjon på H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon isolert sett.

I dette eksperimentet har biomarkører knyttet til biotransformasjon generelt vist seg å være mer sensitive i å detektere effekter av vannbåren Ekofisk råolje i piggvar enn endringer i DNA-skade og immunfunksjon. Det er til dags dato liten kunnskap om hvordan PAH og andre miljøgifter påvirker immunfunksjon hos fisk. Framover kunne det vært interessant å se hvordan økologisk relevante konsentrasjoner med PAH påvirker immunfunksjon i de tidligste livsstadiene hos fisk, da fiskelarver har vist seg å være særlig sårbare overfor oljeforurensning.

## 6 Referanser

- Arcos, J. C., & Argus, M. F. (1968). Molecular geometry and carcinogenic activity of aromatic compounds. New perspectives. *Advances in cancer research*, **11**, 305-471.
- Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., & Hofstraat, J. W. (1993). Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology*, **26**(3-4), 273-286.
- Arukwe, A., & Goksøyr, A. (1997). Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Experimental Zoology*, **277**(4), 313-325.
- Babor, B. M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, **73**(3), 599.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Thomas-Guyon, H., & Le Floch, S. (2009). Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne). *Toxicology In Vitro*, **23**(2), 235-241.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., & Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **45**(2-3), 106-114.
- Bakke, T., Hameedi, J., Kimstach, V., Mac-donald, R., Melnikov, S., Robertson, A., Shearer, R., & Thomas, D. (1998). AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues - Chapter 10: Petroleum. In A. Robertson (Ed.), (pp. 601-701).
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M. H., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B. E., & Børseth, J. F. (2011). Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil production. *PloS one*, **6**(5), e19735.
- Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., & Børseth, J. F. (2001). Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(6), 1175-1184.
- Betti, C., & Nigro, M. (1996). The Comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in cetaceans: Preliminary results on the genotoxic effects of methyl-mercury on the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) lymphocytes in vitro. *Mar Pollut Bull*, **32**(7), 545-548.
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skåre, J. U., & Goksøyr, A. (1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, **36**(1-2), 75-98.
- Beyer, J., Sandvik, M., Skare, J. U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbø, R., & Goksøyr, A. (1997). Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4', 5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers*, **2**(1), 35-44.
- Boleas, S., Fernandez, C., Beyer, J., Tarazona, J. V., & Goksøyr, A. (1998). Accumulation and effects of benzo(a)pyrene on cytochrome P450 1A in waterborne exposed and intraperitoneal injected juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Environmental Research*, **46**(1), 17-20.
- Boltaña, S., Roher, N., Goetz, F. W., & MacKenzie, S. A. (2011). PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**(12), 1195-1203.
- Briggs, K. T., Gershwin, M. E., & Anderson, D. W. (1997). Consequences of petrochemical ingestion and stress on the immune system of seabirds. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, **54**(4), 718-725.
- Brumley, C. M., Haritos, V. S., Ahokas, J. T., & Holdway, D. A. (1998). The Effects of Exposure Duration and Feeding Status on Fish Bile Metabolites: Implications for Biomonitoring. *Ecotoxicol Environ Saf*, **39**(2), 147-153.

- Burke, M. D., & Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, **2**(6), 583-588.
- Carls, M. G., Rice, S. D., & Hose, J. E. (1999). Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(3), 481-493.
- Carlson, E. A., Li, Y., & Zelikoff, J. T. (2002). Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology*, **56**(4), 289-301.
- Celander, M., Nät, C., Broman, D., & Förlin, L. (1994). Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P450 1A and conjugating enzymes in the viviparous blenny (*Zoarces viviparus*) treated with petroleum hydrocarbons. *Aquatic Toxicology*, **29**(3-4), 183-196.
- Cheikyula, J. O., Koyama, J., & Uno, S. (2008). Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the Japanese flounder, red sea bream, and Java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental toxicology*, **23**(3), 354-362.
- Collier, T. K., Connor, S. D., Eberhart, B.-T. L., Anulacion, B. F., Goksøyr, A., & Varanasi, U. (1992). Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: initial results from regional and national surveys. *Marine Environmental Research*, **34**(1), 195-199.
- Collins, A. R., Dušinská, M., Horváthová, E., Munro, E., Savio, M., & Štětina, R. (2001). Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*, **16**(4), 297-301.
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., & Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, **84**(10), 1452-1460.
- Costa, J., Reis-Henriques, M. A., Wilson, J. M., & Ferreira, M. (2013). P-glycoprotein and CYP1A protein expression patterns in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) tissues after waterborne exposure to benzo(a)pyrene (BaP). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **36**(2), 611-625.
- Costas, B., Conceição, L. E. C., Aragão, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., & Afonso, A. (2011). Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, **316**(1-4), 68-76.
- Cotelle, S., & Ferard, J. F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **34**(4), 246-255.
- Dalmo, R. A., Seternes, T., Arnesen, S. M., Joergensen, T. O., & Børgwald, J. (1998). Tissue distribution and cellular uptake of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) in some marine fish species. *Journal of Fish Diseases*, **21**(5), 321-334.
- Demers, N. E., & Bayne, C. J. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, **21**(4), 363-373.
- Dey, A. C., Kiceniuk, J. W., Williams, U. P., Khan, R. A., & Payne, J. F. (1983). Long term exposure of marine fish to crude petroleum—I. studies on liver lipids and fatty acids in cod (*Gadus morhua*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **75**(1), 93-101.
- Di Giulio, R. T., Habig, C., & Gallagher, E. P. (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.
- Diamond, L., & Clark, H. F. (1970). Comparative studies on the interaction of benzo[a]pyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I. Metabolism of benzo[a]pyrene. *Journal of the National Cancer Institute*, **45**(5), 1005-1012.

- Dignam, J. D. (1990). Preparation of Extracts from Higher Eukaryotes. *Methods in Enzymology*, **182**, 194-203.
- Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Dévier, M.-H., Morin, B., Burgeot, T., & Budzinski, H. (2013). Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**(2), 690-707.
- Eastcott, L., Shiu, W. Y., & Mackay, D. (1988). Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: A review of data and development of simple correlations. *Oil and Chemical Pollution*, **4**(3), 191-216.
- Eggens, M. L., & Galgani, F. (1992). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research*, **33**(3), 213-221.
- Emborski, C., Reyes, A., & Biggs, J. S. (2012). Effect of  $\beta$ -naphthoflavone on hepatic cytochrome P4501A activity in the scribbled rabbitfish (*Siganus spinus*) from tropical Indo-Pacific coral reefs. *Ecotoxicology*, **21**(8), 2153-2162.
- EU (2008). Priority Substances and Certain Other Pollutants according to Annex II of Directive 2008/105/EC. Hentet 13.05.2014. fra [http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority\\_substances.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_substances.htm)
- Faisal, M., & Huggett, R. J. (1993). Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Lymphocyte Mitogenic Responses in Spot, *Leiostomus xanthurus*. *Marine Environmental Research*, **35**, 121-124.
- Faisal, M., Marzouk, M. S. M., Smith, C. L., & Huggett, R. J. (1991). Mitogen induced proliferative responses of lymphocytes from spot (*Leiostomus xanthurus*) exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environments. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **13**(3), 311-327.
- Fredriksen, L. (2013). *Effects of environmental contaminants on Atlantic cod (Gadus morhua) from the inner Oslofjord*. . (Masteroppgave), Universitetet i Oslo.
- Gaivão, I., Piasek, A., Brevik, A., Shaposhnikov, S., & Collins, A. R. (2009). Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter-and intra-individual variation. *Cell biology and toxicology*, **25**(1), 45-52.
- Gautier, D. L., Bird, K. J., Charpentier, R. R., Grantz, A., Houseknecht, D. W., Klett, T. R., Moore, T. E., Pitman, J. K., Schenk, C. J., Schuenemeyer, J. H., Sørensen, K., Tennyson, M. E., Valin, Z. C., & Wandrey, C. J. (2009). Assessment of Undiscovered Oil and Gas in the Arctic. *Science*, **324**(5931), 1175-1179.
- George, S. G., & Young, P. (1986). The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **83**(1), 37-44.
- Goanvec, C., Theron, M., Lacoue-Labarthe, T., Poirier, E., Guyomarch, J., Le-Floch, S., Laroche, J., Nonnotte, L., & Nonnotte, G. (2008). Flow cytometry for the evaluation of chromosomal damage in turbot *Psetta maxima* (L.) exposed to the dissolved fraction of heavy fuel oil in sea water: a comparison with classical biomarkers. *Journal of Fish Biology*, **73**(2), 395-413.
- Goanvec, C., Theron, M., Poirier, E., Le Floch, S., Laroche, J., Nonnotte, L., & Nonnotte, G. (2004). Evaluation of chromosomal damage by flow cytometry in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to fuel oil. *Biomarkers*, **9**(6), 435-446.
- Goksøy, A. (1991a). 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.
- Goksøy, A., Beyer, J., Husøy, A.-M., Larsen, H. E., Westrheim, K., Wilhelmssen, S., & Klungsøy, J. (1994). Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). *Aquatic Toxicology*, **29**(1-2), 21-35.



- Goksøyr, A., & Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, **22**(4), 287-311.
- Goksøyr, A., Larsen, H. E., & Husøy, A.-M. (1991b). Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **100**(1-2), 157-160.
- Grung, M., Holth, T. F., Jacobsen, M. R., & Hylland, K. (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*, **72**(3-4), 254-265.
- Gunawickrama, S. H. N. P., Aarsæther, N., Orbea, A., Cajaraville, M. P., & Goksøyr, A. (2008). PCB77 (3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl) co-exposure prolongs CYP1A induction, and sustains oxidative stress in B(a)P-exposed turbot, *Scophthalmus maximus*, in a long-term study. *Aquatic Toxicology*, **89**(2), 65-74.
- Gümüslü, S., Bilmen Sarikçioğlu, S., Sahin, E., Yargıçoğ'lu, P., & Agar, A. (2002). Influences of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Free radical research*, **36**(12), 1277-1282.
- Haensly, W. E., Neff, J. M., Sharp, J. R., Morris, A. C., Bedgood, M. F., & Boem, P. D. (1982). Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *Journal of Fish Diseases*, **5**(5), 365-391.
- Hargis Jr, W. J., Roberts Jr, M. H., & Zwerner, D. E. (1984). Effects of contaminated sediments and sediment-exposed effluent water on an estuarine fish: Acute toxicity. *Marine Environmental Research*, **14**(1-4), 337-354.
- Harman, C., Thomas, K. V., Tollefsen, K. E., Meier, S., Bøyum, O., & Grung, M. (2009). Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and alkylphenols (AP) around a Norwegian oil platform by holistic passive sampling. *Mar Pollut Bull*, **58**(11), 1671-1679.
- Hart, L. J., Smith, S. A., Smith, B. J., Robertson, J., Besteman, E. G., & Holladay, S. D. (1998). Subacute immunotoxic effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) on spleen and pronephros leukocytic cell counts and phagocytic cell activity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, **41**(1-2), 17-29.
- Hawkins, W. E., Walker, W. W., Overstreet, R. M., Lytle, J. S., & Lytle, T. F. (1990). Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures. *Science of The Total Environment*, **94**(1-2), 155-167.
- Hellou, J., Payne, J. F., Upshall, C., Fancey, L. L., & Hamilton, C. (1994). Bioaccumulation of aromatic hydrocarbons from sediments: A dose-response study with flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **27**(4), 477-485.
- Hellou, J., & Warren, W. G. (1997). Polycyclic aromatic compounds and saturated hydrocarbons in tissues of flatfish: Insight on environmental exposure. *Marine Environmental Research*, **43**(1-2), 11-25.
- Hendricks, J. D., Meyers, T. R., Shelton, D. W., Casteel, J. L., & Bailey, G. S. (1985). Hepatocarcinogenicity of benzo [a] pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *Journal of the National Cancer Institute*, **74**(4), 839-851.
- Hinton, D. E., Segner, H., Au, D. W. T., Kullman, S. W., & Hardman, R. C. (2008). Liver toxicity. *The toxicology of fishes*, 327-400.
- Holdway, D. A., Brennan, S. E., & Ahokas, J. T. (1994). Use of hepatic MFO and blood enzyme biomarkers in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) as indicators of pollution in Port Phillip Bay, Australia. *Mar Pollut Bull*, **28**(11), 683-695.
- Hutchinson, T. H., Field, M. D. R., & Manning, M. J. (1999). Evaluation of immune function in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (L.) exposed to sediments contaminated with polychlorinated biphenyls. *Fish Shellfish Immunol*, **9**(6), 457-472.

- Hutchinson, T. H., Field, M. D. R., & Manning, M. J. (2003). Evaluation of non-specific immune functions in dab, *Limanda limanda* L., following short-term exposure to sediments contaminated with polyaromatic hydrocarbons and/or polychlorinated biphenyls. *Marine Environmental Research*, **55**(3), 193-202.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **196**(2), 191-205.
- Invitrogen (2009). Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit. Hentet 05.06.2014. fra <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp22188.pdf>
- IPCC (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report; An Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Hentet 02.04.2014. fra [http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4\\_syr.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr.pdf)
- ITOPF (2012). Oil Tanker Spill Statistics 2012. Hentet 02.04.2014. fra <http://www.itopf.com/news-and-events/documents/StatsPack.pdf>
- Jonsson, G., Bechmann, R. K., Bamber, S. D., & Baussant, T. (2004). Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(6), 1538-1548.
- Kennedy, C. J., & Farrell, A. P. (2008). Immunological alterations in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to aqueous hydrocarbons derived from crude oil. *Environ Pollut*, **153**(3), 638-648.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., & Amara, R. (2011). Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **154**(3), 187-195.
- Kilemade, M., Hartl, M. G. J., O'Halloran, J., O'Brien, N. M., Sheehan, D., Mothersill, C., & van Pelt, F. N. A. M. (2009). Effects of contaminated sediment from Cork Harbour, Ireland on the cytochrome P450 system of turbot. *Ecotoxicol Environ Saf*, **72**(3), 747-755.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J., & Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin*o*-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical Biochemistry*, **140**(1), 138-145.
- Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S. L., & Varanasi, U. (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.
- Krahn, M. M., Rhodes, L. D., Myers, M. S., Moore, L. K., MacLeod Jr., W. D., & Malins, D. C. (1986). Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **15**(1), 61-67.
- Köhler, A., & Pluta, H. J. (1995). Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Marine Environmental Research*, **39**(1-4), 255-260.
- Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Dévier, M.-H., Morin, B., Burgeot, T., & Budzinski, H. (2013). Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**(2), 690-707.
- Lee, R. F., Sauerheber, R., & Dobbs, G. H. (1972). Uptake, metabolism and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Marine Biology*, **17**(3), 201-208.
- Lee, R. F., & Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **544**(1), 43-64.

- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling*, **2**, 278.
- Levine, S. L., Oris, J. T., & Wissing, T. E. (1994). Comparison of P-4501A1 monooxygenase induction in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following intraperitoneal injection or continuous waterborne-exposure with benzo[a]pyrene: Temporal and dose-dependent studies. *Aquatic Toxicology*, **30**(1), 61-75.
- Liu, J., Wang, X., & Mori, A. (1994). Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: Effect of treatment with reduced glutathione. *International Journal of Biochemistry*, **26**(4), 511-517.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**(1), 265-275.
- Mackay, D., & McAuliffe, C. D. (1989). Fate of hydrocarbons discharged at sea. *Oil and Chemical Pollution*, **5**(1), 1-20.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, **20**(2), 137-151.
- Malmström, C. M., Koponen, K., Lindström-Seppä, P., & Bylund, G. (2004). Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf*, **58**(3), 365-372.
- Malmström, C. M., Miettinen, S., & Bylund, G. (2000). DNA adducts in liver and leukocytes of flounder (*Platichthys flesus*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*, **48**(2), 177-184.
- Martinez-Gomez, C., Vethaak, A. D., Hylland, K., Burgeot, T., Köhler, A., Lyons, B. P., Thain, J., Gubbins, M. J., & Davies, I. M. (2010). A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *ICES Journal of Marine Science*, **67**(6), 1105-1118.
- Meador, J. P., Casillas, E., Sloan, C., & Varanasi, U. (1995). Comparative bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by two infaunal invertebrates. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, **123**(1), 107-124.
- Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z*, **49**(333-369), 352.
- Munkittrick, K. R., Blunt, B. R., Leggett, M., Huestis, S., & McCarthy, L. H. (1995). Development of a sediment bioassay to determine bioavailability of PAHs to fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **4**(3), 169-181.
- Myers, M. S., Johnson, L. L., & Collier, T. K. (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*, **9**(1), 67-94.
- Nahrgang, J., Camus, L., Carls, M. G., Gonzalez, P., Jönsson, M., Taban, I. C., Bechmann, R. K., Christiansen, J. S., & Hop, H. (2010). Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Aquatic Toxicology*, **97**(3), 234-242.
- Namdari, R., & Law, F. C. P. (1996). Toxicokinetics of waterborne pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following branchial or dermal exposure. *Aquatic Toxicology*, **35**(3-4), 221-235.
- Neff, J. M. (2002). *Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water*. Amsterdam, Nederland: Elsevier, 241-318.
- Neff, J. M., & Anderson, J. W. (1981). *Response of marine animals to petroleum and specific petroleum hydrocarbons*. London, England: Applied Science.
- Neff, J. M., & Burns, W. A. (1996). Estimation of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in the water column based on tissue residues in mussels and salmon: An equilibrium partitioning approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**(12), 2240-2253.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., & Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology*, **25**(8-9), 807-825.

- Nicolas, J.-M. (1999). Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology*, **45**(2–3), 77-90.
- Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L., & Figueras, A. (2009). LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol*, **26**(2), 326-331.
- Oliveira, M., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2007). Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. *Chemosphere*, **66**(7), 1284-1291.
- Ortiz-Delgado, J. B., Behrens, A., Segner, H., & Sarasquete, C. (2008). Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B(a)P and TCDD. *Ecotoxicol Environ Saf*, **69**(1), 80-88.
- Ortiz-Delgado, J. B., Segner, H., Arellano, J. M., & Sarasquete, C. (2007). Histopathological alterations, EROD activity, CYP1A protein and biliary metabolites in gilthead seabream *Sparus aurata* exposed to Benzo(a)pyrene.
- OSPAR (2009). Background Document on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Hentet 10.04.2014. fra [http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00399/p00399\\_pahs\\_update.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00399/p00399_pahs_update.pdf)
- OSPAR (2011). OSPAR report on discharges, spills and emissions from offshore oil and gas installations in 2011. Hentet 10.04.2014. fra [http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00603/p00603\\_offshore\\_discharges\\_report\\_2011.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00603/p00603_offshore_discharges_report_2011.pdf)
- Parkinson, A. (2001). *Biotransformation of xenobiotics*: McGraw-Hill New York.
- Paulsen, S. M., Lunde, H., Engstad, R. E., & Robertsen, B. (2003). In vivo effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol*, **14**(1), 39-54.
- Payne, J. F., & Penrose, W. R. (1975). Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **14**(1), 112-116.
- Penela-Arenaz, M., Bellas, J., & Vázquez, E. (2009). Chapter Five: Effects of the Prestige Oil Spill on the Biota of NW Spain: 5 Years of Learning. In W. S. David (Ed.), *Advances in Marine Biology* (Vol. Volume 56, pp. 365-396): Academic Press.
- Peters, G. P., Nilssen, T. B., Lindholt, L., Eide, M. S., Glomsrød, S., Eide, L. I., & Fuglestedt, J. S. (2011). Future emissions from shipping and petroleum activities in the Arctic. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **11**(11), 5305-5320.
- Peters, L. D., & Livingstone, D. R. (1995). Studies on cytochrome P4501A in early and adult life stages of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Marine Environmental Research*, **39**(1), 5-9.
- Peters, L. D., Morse, H. R., Waters, R., & Livingstone, D. R. (1997). Responses of hepatic cytochrome P450 1A and formation of DNA-adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to water-borne benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*, **38**(1), 67-82.
- Peterson, C. H. (2001). The "Exxon Valdez" oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem *Advances in Marine Biology* (Vol. Volume 39, pp. 1-103): Academic Press.
- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E., & Irons, D. B. (2003). Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, **302**(5653), 2082-2086.
- Petterson, F. E., Fyllingen, I., Kavlie, A., Maaseide, N. P., Glette, J., Endresen, C., & Wergeland, H. I. (1995). Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*L.). *Fish Shellfish Immunol*, **5**(4), 275-287.
- Ploch, S. A., King, L. C., Kohan, M. J., & Di Giulio, R. T. (1998). Comparative in Vitro and in Vivo Benzo[a]pyrene–DNA Adduct Formation and Its Relationship to CYP1A Activity in Two Species of Ictalurid Catfish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **149**(1), 90-98.
- Pointet, K., & Milliet, A. (2000). PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere*, **40**(3), 293-299.

- Radović, J. R., Domínguez, C., Laffont, K., Díez, S., Readman, J. W., Albaigés, J., & Bayona, J. M. (2012). Compositional properties characterizing commonly transported oils and controlling their fate in the marine environment. *Journal of Environmental Monitoring*, **14**(12), 3220-3229.
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, **71**, 635.
- Reynaud, S., & Deschaux, P. (2005). The effects of 3-methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicology*, **211**(1–2), 156-164.
- Reynaud, S., Duchiron, C., & Deschaux, P. (2001). 3-Methylcholanthrene Increases Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-Induced Respiratory Burst Activity and Intracellular Calcium Levels in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **175**(1), 1-9.
- Reynaud, S., Marionnet, D., Taysse, L., Duchiron, C., & Deschaux, P. (2002). The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*, **12**(1), 17-34.
- Rice, C. D., Kergosien, D. H., & Adams, S. M. (1996). Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. *Ecotoxicol Environ Saf*, **33**(2), 186-192.
- Richardson, D. M., Gubbins, M. J., Davies, I. M., Moffat, C. F., & Pollard, P. M. (2004). Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **17**(2), 79-85.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, **172**(1–2), 63-92.
- Schleizinger, J. J., White, R. D., & Stegeman, J. J. (1999). Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Molecular pharmacology*, **56**(3), 588-597.
- Scholz, S., Behn, I., Honeck, H., Hauck, C., Braunbeck, T., & Segner, H. (1997). Development of a monoclonal antibody for ELISA of CYP1A in primary cultures of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes. *Biomarkers*, **2**(5), 287-294.
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., & Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-κB activation. *The Journal of Immunology*, **182**(4), 1836-1845.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**(1), 184-191.
- Smith, E. L., Rowland, S. J., Scarlett, A., Canty, M. N., & Galloway, T. S. (2005). Potential ecological effects of chemically dispersed and biodegraded oils. *Report RP*, **480**.
- Soclo, H. H., Garrigues, P., & Ewald, M. (2000). Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Mar Pollut Bull*, **40**(5), 387-396.
- Solem, S. T., Jørgensen, J. B., & Robertsen, B. (1995). Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, **5**(7), 475-491.
- Spacie, A., Landrum, P. F., & Laversee, G. J. (1983). Uptake, depuration, and biotransformation of anthracene and benzo [a] pyrene in bluegill sunfish. *Ecotoxicol Environ Saf*, **7**(3), 330-341.
- Spearman, C. (1904). The proof and measurement of association between two things. *American journal of Psychology*, **15**(1), 72-101.
- Speit, G., & Hartmann, A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, **10**(6), 555-560.
- Stein, J. E., Reichert, W. L., French, B., & Varanasi, U. (1993). 32P-Postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to benzo[a]pyrene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole. *Chemico-Biological Interactions*, **88**(1), 55-69.
- Sundt, R. C., Ruus, A., Jonsson, H., Skarphéðinsdóttir, H., Meier, S., Grung, M., Beyer, J., & Pampanin, D. M. (2012). Biomarker responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced

- water from a North Sea oil field: Laboratory and field assessments. *Mar Pollut Bull*, **64**(1), 144-152.
- Thomas, P., & Budiantara, L. (1995). Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker. *Marine Environmental Research*, **39**(1-4), 147-150.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**(3), 206-221.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish; a review.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**(1), 1-40.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**, 57-149.
- Varanasi, U., Reichert, W. L., Le Eberhart, B.-T., & Stein, J. E. (1989). Formation and persistence of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chemico-Biological Interactions*, **69**(2-3), 203-216.
- Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., & Sanborn, H. R. (1985). Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environmental Science & Technology*, **19**(9), 836-841.
- Wang, Z., Fingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., Foght, J., Semple, K., & Westlake, D. W. S. (1998). Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A*, **809**(1), 89-107.
- Weeks, B. A., & Warinner, J. E. (1986). Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **12**(1-4), 313-320.
- Whitlock, J. P. (1993). Mechanistic aspects of dioxin action. *Chemical Research in Toxicology*, **6**(6), 754-763.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(4), 347-570.
- Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2007). Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **145**(2), 288-293.
- Yin, Z., Lam, T. J., & Sin, Y. M. (1995). The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*, **5**(7), 519-529.

## Vedlegg Vedlegg 1: Vekt, lengde og bearbejdede biomarkørdata

Kode	Vekt	Lengde	Oljebehandling	Dager	Injeksjon	1-OH fenantren	1-OH pyren	EROD-aktivitet	CYP1A-konsentrasjon	% haleinsitet helblod	% haleinsitet hodnyre	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -produksjon ikke-stimulerte	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -produksjon PMA-stimulerte	Stimulering sindeks
OP1	252	24,5	Null	0	-	10,6	29,2	-	-	1,6	1,5	1,05	46,76	44,5
OP2	234	24	Null	0	-	5,8	7,2	4,68	0,73	3,4	4,9	0,23	112,40	493,1
OP3	248	23,5	Null	0	-	8,7	38,7	16,37	0,85	4,2	3,4	0,62	112,74	182,1
OP4	212	22	Null	0	-	9,2	21,2	4,51	0,83	8,5	5,3	2,78	51,76	18,6
OP5	228	22,5	Null	0	-	8,7	26,7	10,73	0,91	4,4	0,2	-	-	-
OP6	236	24	Null	0	-	9,6	16,3	12,43	0,88	4,6	1,1	-	-	-
OP7	205	23	Null	0	-	12,7	21,8	9,25	0,93	1,2	-	0,27	74,17	274,1
OP8	249	24	Null	0	-	8,0	46,4	-	-	5,8	6,0	6,56	56,83	8,7
1P1	243	23	Medium	2	-	344,8	89,8	28,22	2,07	55,7	3,7	-	-	-
1P2	229	22	Lav	2	-	538,9	405,5	47,27	0,94	-	-	-	-	-
1P3	221	22,5	Høy	2	-	872,5	248,7	32,00	0,95	78,9	28,2	-	-	-
1P4	139	19	Medium	2	-	-	-	17,25	0,62	-	1,7	-	-	-
1P5	151	19,5	Høy	2	-	691,9	200,9	78,90	1,34	-	0	-	-	-
1P6	190	21,5	Lav	2	-	538,1	713,0	31,81	0,87	14,6	-	-	-	-
1P7	159	20,5	Lav	2	-	451,1	183,9	11,17	0,30	-	0,009	-	-	-
1P8	146	19	Høy	2	-	756,2	662,3	33,26	1,31	9,0	0,1	-	-	-
1P9	128	18,5	Kontroll	2	-	4,2	51,7	10,68	1,67	0	76,1	-	-	-
1P10	145	20	Lav	2	-	215,1	356,9	47,42	0,86	0	-	-	-	-
1P11	167	20,5	Høy	2	-	438,7	130,6	33,77	1,92	0,001	2,8	-	-	-
1P12	320	24,5	Høy	2	-	568,3	737,1	22,81	1,31	0,1	-	-	-	-
1P13	158	21	Medium	2	-	1009,3	315,5	77,43	1,25	0	28,4	-	-	-
1P14	190	21	Kontroll	2	-	4,6	163,2	13,52	0,68	0,1	3,9	-	-	-
1P15	127	19,5	Lav	2	-	616,4	224,7	51,07	2,39	30,5	0,2	-	-	-
1P16	187	21,5	Kontroll	2	-	39,3	502,5	5,46	0,70	11,1	1,5	-	-	-
1P17	106	17,5	Lav	2	-	1074,8	258,7	78,53	1,11	2,7	2,8	-	-	-
1P18	180	21	Medium	2	-	277,2	393,9	42,78	0,94	1,0	0,5	-	-	-
1P19	166	21	Kontroll	2	-	5,3	41,9	9,66	1,06	38,3	1,2	-	-	-
1P20	172	21,5	Kontroll	2	-	12,9	348,8	14,95	2,63	4,2	2,5	-	-	-
1P21	129	19	Medium	2	-	775,6	176,1	29,59	0,70	41,9	0,8	-	-	-
1P22	131	19,5	Høy	2	-	407,9	338,7	50,99	1,64	76,5	1,1	-	-	-
1P23	185	22	Kontroll	2	-	5,9	93,2	4,60	0,44	0,2	0,6	2,5	13,9	5,6
1P24	165	21,5	Medium	2	-	131,9	603,4	15,18	0,92	91,1	1,7	2,0	13,3	6,8
2P1	104	18,4	Medium	8	-	3167,7	530,7	25,75	1,00	0,2	0,6	1,5	12,3	8,0

Kode	Vekt	Lengde	Oljebehand- ling	Dager	Injeksjon	1-OH fenantren	1-OH pyren	EROD- aktivitet	CYP1A- konsentr- asjon	% haleinsitet helblod	% haleinsitet hodnyre	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - produksjon ikke-stimulerte	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - produksjon PMA-stimulerte	Stimulering sindeks
2P2	147	20	Lav	8	-	2197,3	1138,7	7,84	0,84	0,09	0,1	2,5	3,2	1,3
2P3	131	18,5	Høy	8	-	3352,1	489,7	17,56	1,52	0,3	0	1,0	21,3	20,3
2P4	109	18	Medium	8	-	4404,1	1554,2	42,12	1,23	0,2	0,3	0,5	25,1	52,9
2P5	170	21	Høy	8	-	3246,3	486,1	22,26	0,94	0,04	0	0,2	9,3	37,5
2P6	164	21,5	Lav	8	-	3788,4	1463,5	30,88	1,39	0	0,05	1,0	1,2	1,2
2P7	213	22,5	Lav	8	-	2072,2	421,8	-	0,67	0	0,03	1,4	20,1	14,1
2P8	125	19	Høy	8	-	4230,5	1222,7	30,49	1,47	0,02	0,05	0,6	5,4	9,5
2P9	243	24	Kontroll	8	-	10,0	77,7	-	0,65	0,5	36,4	0,7	8,3	12,2
2P10	204	21,5	Lav	8	-	4088,5	1843,3	14,80	0,74	0,06	55,9	3,5	51,8	14,8
2P11	205	21,5	Høy	8	-	1548,5	170,5	23,63	1,25	19,9	69,9	2,7	133,5	49,0
2P12	234	22,5	Høy	8	-	3258,6	1147,0	4,81	0,68	1,1	43,0	3,4	22,7	6,8
2P13	192	21,5	Medium	8	-	6634,3	925,3	18,54	1,25	29,0	8,1	3,0	40,7	13,7
2P14	151	19,5	Kontroll	8	-	38,4	581,7	5,16	0,96	6,3	50,0	2,9	13,8	4,8
2P15	144	20,5	Lav	8	-	3488,0	580,9	7,58	0,89	68,4	77,5	-	-	-
2P16	130	19	Kontroll	8	-	43,0	964,8	10,21	0,86	48,8	41,7	-	-	-
2P17	135	19	Lav	8	-	4907,9	952,2	16,47	1,11	0,9	0,2	-	-	-
2P18	176	22	Medium	8	-	5317,6	1475,4	36,95	1,18	0,2	0,005	-	-	-
2P19	206	21,5	Kontroll	8	-	7,2	85,4	2,39	0,77	0,09	0	-	-	-
2P20	199	21,5	Kontroll	8	-	43,6	674,3	22,09	0,86	0,003	0,08	-	-	-
2P21	243	24	Medium	8	-	3080,8	3080,8	12,84	0,88	0	0,04	-	-	-
2P22	190	22,5	Høy	8	-	4190,2	1207,2	21,10	0,98	0,05	0,04	-	-	-
2P23	228	22,5	Kontroll	8	-	7,4	79,1	2,72	1,08	0,005	0,2	-	-	-
2P24	186	22	Medium	8	-	3235,3	1397,1	6,80	0,64	0,4	0	-	-	-
3P1-0	151	20,5	Medium	16	÷ LPS	7763,6	1495,1	5,11	0,49	0,8	0,2	25,9	66,6	2,6
3P1-i	127	19,5	Medium	16	LPS	-	-	-	-	-	-	33,7	81,8	2,4
3P5-0	128	19	Høy	16	÷ LPS	7209,8	1072,9	13,64	0,83	0,9	0,3	62,2	96,5	1,6
3P5-i	185	22	Høy	16	LPS	-	-	-	-	-	-	35,4	68,8	1,9
3P6-0	140	20,5	Lav	16	÷ LPS	2513,5	1334,5	12,05	1,00	0,3	0,1	43,3	67,6	1,6
3P6-i	176	21,5	Lav	16	LPS	-	-	-	-	-	-	15,9	105,7	6,6
3P7-0	104	17,5	Lav	16	÷ LPS	5030,1	1282,5	9,90	1,12	0,7	0,7	78,5	113,0	1,4
3P7-i	114	19	Lav	16	LPS	-	-	-	-	-	-	52,0	81,6	1,6
3P8-0	225	23	Høy	16	÷ LPS	5204,4	1233,9	18,59	1,05	0,03	0	80,8	165,5	2,0
3P8-i	166	20,5	Høy	16	LPS	-	-	-	-	-	-	67,9	269,3	4,0
3P9-0	152	20	Kontroll	16	÷ LPS	13,8	71,2	6,29	0,82	0,1	0,3	21,9	117,9	5,4
3P9-i	167	21,5	Kontroll	16	LPS	-	-	-	-	-	-	81,2	241,6	3,0
3P10-0	149	21	Lav	16	÷ LPS	2261,8	1166,1	4,88	0,72	0	0,01	30,8	68,7	2,2



Kode	Vekt	Lengde	Oljebehand- ling	Dager	Injeksjon	1-OH fenantren	1-OH pyren	EROD- aktivitet	CYP1A- konsentr- asjon	% haleinsitet helblod	% haleinsitet hodnyre	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - produksjon ikke-stimulerte	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - produksjon PMA-stimulerte	Stimulering indeks
3P10-i	236	23,5	Lav	16	LPS	-	-	-	-	-	-	42,9	161,6	3,8
3P11-0	249	23,5	Høy	16	÷ LPS	6097,4	955,5	24,46	1,21	0,3	0,2	14,4	59,9	4,2
3P11-i	134	19	Høy	16	LPS	-	-	-	-	-	-	20,0	147,9	7,4
3P12-0	116	18	Høy	16	÷ LPS	5349,4	1047,6	7,73	0,87	0,08	0,4	33,3	64,6	1,9
3P12-i	181	21,5	Høy	16	LPS	-	-	-	-	-	-	18,3	199,0	10,9
3P13-0	108	18	Medium	16	÷ LPS	8946,2	1786,8	15,37	1,24	0,5	0,005	18,6	53,4	2,9
3P13-i	147	20,5	Medium	16	LPS	-	-	-	-	-	-	45,2	74,3	1,6
3P15-0	164	21	Lav	16	÷ LPS	3523,1	1070,7	29,49	1,26	0,1	0	26,6	90,6	3,4
3P15-i	130	19	Lav	16	LPS	-	-	-	-	-	-	39,3	168,1	4,3
3P16-0	119	18,5	Kontroll	16	÷ LPS	30,7	866,1	2,91	0,85	0,1	0,1	48,0	336,8	7,0
3P16-i	198	22,5	Kontroll	16	LPS	-	-	-	-	-	-	45,8	106,3	2,3
3P19-0	108	18	Kontroll	16	÷ LPS	20,3	100,0	2,89	0,67	0,3	0,09	11,0	48,2	4,4
3P19-i	137	20,5	Kontroll	16	LPS	-	-	-	-	-	-	12,3	54,4	4,4
3P20-0	165	21	Kontroll	16	÷ LPS	47,0	746,3	4,62	0,87	0,05	0,02	29,0	36,1	1,2
3P20-i	127	19	Kontroll	16	LPS	-	-	-	-	-	-	15,4	20,8	1,3
3P21-0	215	23,5	Medium	16	÷ LPS	-	-	2,07	0,52	0,0007	0,2	13,1	74,5	5,7
3P21-i	158	20	Medium	16	LPS	-	-	-	-	-	-	19,0	71,0	3,7
3P23-0	214	22,5	Kontroll	16	÷ LPS	41,7	79,2	5,88	0,67	0	0,04	27,5	170,9	6,2
3P23-i	122	19,5	Kontroll	16	LPS	-	-	-	-	-	-	25,3	61,3	2,4
3P24-0	97	17,5	Medium	16	÷ LPS	5282,0	1577,0	23,51	1,62	0,1	0,004	24,2	94,6	3,4
3P24-i	136	19,5	Medium	16	LPS	-	-	-	-	-	-	35,8	123,4	3,9

Måleenheter:

vekt: g

lengde: cm

1-OH-fenantren og 1-OH-pyren: ng/g galle

EROD-aktivitet: pmol/min/mg protein

CYP1A-mengde: mOD/ug

% haleintensitet i helblod og hodenyre: % lysintensitet i "comet"-halen reaktivt til % lysintensitet i "hodet"

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon, ikke-stimulert og PMA-stimulert: pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/1000 celler

Stimuleringsindeks: mengde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fra PMA-stimulerte leukocytter/mengde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fra ikke-stimulerte leukocytter

## Vedlegg 2: Kjemikalieliste

Kjemikalie	Leverandør
7-etoksyresorufin	Sigma-Aldrich
Amplex Red	Sigma-Aldrich
Antibiotika	Sigma-Aldrich
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
DDT DL- Dithiothreitol (DDT)	Fluka Analytical
Dimetyl sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etanol, rektifisert	A/S vinmonopolet
Ethylene Diamine-Tetra-acetic Acid (EDTA)	Fluka
Folin reagent (reagent B)	Bio-Rad
Glyserol	Sigma-Aldrich
Geit anti-kanin IgG konjugert med HRP, GAR-HRP	Sigma-Aldrich
Heparin	Sigma-Aldrich
Hydrogenperoksid (30%)	Sigma-Aldrich
Kaliumklorid	Merck
Kaliumfosfat dibasisk	Sigma-Aldrich
Kaliumfosfat monobasisk	Sigma-Aldrich
Kanin-anti-fisk CYP1A antistoff	Biosense laboratories AS
Karbonat-bikarbonat (kapsel)	Sigma-Aldrich
Krebs-Ringer fosfatbuffer	Sigma-Aldrich
L-15 Medium (Leibovitz)	Sigma-Aldrich
L-Askorbinsyre 99%	Sigma-Aldrich
LPS fra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sigma-Aldrich
LMP Agarose	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat dibasisk	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat monobasisk	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	Merck
Natriumklorid	VWR
Pepperrot-peroksidase	Sigma-Aldrich
Percoll	GE Healthcare
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
Resorufin natriumsalt	Sigma-Aldrich
SYBRgold	Invitrogen
TMB PLUS 2	KEM EN TECH Diagnostics
Trifenylamin	Fluka
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Sigma-Aldrich
Trizma Hydroklorid	Sigma-Aldrich
Tryfanblå	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Glukuronidase/aryl sulfatase	Merck
$\beta$ -NADP redusert tetrasodiumsalt	Sigma-Aldrich

### Vedlegg 3: Buffere og løsninger

<b>Internstandard galle:</b>	
Metanol	80 %
Ascorbinsyre	1 %
Trifenylamin	16 µg/mL

<b>Homogeniseringsbuffer til lever:</b>	
Natriumfosfatbuffer	0,1 M
KCl	0,15 M
DTT	1 mM
Glyserol	5% v/v
pH 7,8	

<b>Mikrosomalbuffer:</b>	
Kaliumfosfatbuffer	0,1 M
KCl	0,15 M
Glyserol	20 % v/v
pH 7,8	

<b>Fortynningsbuffer til proteinanalyse:</b>	
Tris-buffer	0,1 M
pH 8,0 ved 4°C	

<b>Fortynningsbuffer til EROD lever:</b>	
Kaliumfosfatbuffer	0,1 M
pH 8	

<b>Coatingbuffer til CYP1A:</b>	
Karbonat-bikarbonatbuffer (kapsel)	0,005 M
pH 9,6	

<b>TTBS til CYP1A:</b>	
Tris-Buffer	20 mM
NaCl	0,5 M
Tween-20	0,0005 %
pH 8,5	

<b>Blokkeringsløsning til CYP1A:</b>	
TTBS med 1 % BSA	

<b>Antistoffbuffer til CYP1A:</b>	
TTBS med 0,1 % BSA	

<b>Agarose til comet:</b>	
LMP Agarose	0,75 %
NaCl	0,85 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,085g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,054 g L <sup>-1</sup>
EDTA	10 mM
pH 7,4	

<b>Lysisbuffer til comet:</b>	
NaCl	2,5 M
Na <sub>2</sub> EDTA	100 mM
Trizma base	10 mM
Triton x-100	1 %
pH 10	

<b>Elektroforesebuffer til comet:</b>	
NaOH	0,3 M
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mM
pH 13,2	

<b>Nøttraliseringbuffer til comet:</b>	
Trizma base	400 mM
pH 7,5	

<b>Tris EDTA (TE)-buffer til comet:</b>	
Trizma Hydroklorid	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

<b>Fargeløsning til comet:</b>	
SYBR gold fortynt x10 i DMSO	40 µL
TE-buffer	50 mL

<b>Arbeidsløsning til måling av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon</b>	
Pepperrot peroksidase	0,1 U mL <sup>-1</sup>
NaCl	145 mM

Natriumfosfat	5,7 mM
KCl	4,86 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,54 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,22 mM
Glukose	5,5 mM
pH 7,35	

<b>Reaksjonsløsning til måling av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon</b>	
Arbeidsløsning med 50 µM Amplex Red	

<b>Reaksjonsløsning med PMA til måling av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon</b>	
Reaksjonsløsning med 0,12 µg mL <sup>-1</sup> PMA	

<b>Natriumfosfatbuffer til måling av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon</b>	
Natriumfosfatbuffer	0,05 M
pH 7,4	

## Vedlegg 4: Utstysrliste

Utstyr	Leverandør
520S	Watson-Marlow
AG204 vekt	Mettler Toledo
Akvarier (20 L)	VWR International
Axio Scope fluorescensmikroskop	A1
BP 210 S vekt	Sartorius
BP 2100 S vekt	Sartorius
Comet Assay IV programvare	Perceptive Instruments
Countess Automated Cell Counter	Invitrogen
Cryolys avkjøler	Bertin Technologies
Diaplan mikroskop	Leitz
Disposable pellet mixer	VWR
Enduro Minimix vippebord	Labnet
Gen5 Data Analysis Software	Biotek
Heareus Multifuge 3 S-R	Thermo scientific
JMP 11 programvare	SAS Institute Inc.
Kolonner	Laget på instituttet
MaxiSorp 97-brønnsplater	Nunc
PHM 92 LAB pH-meter	Radiometer CoPenhagen
Precellys 24 homogenisator	Bertin Technologies
Prism 6 programvare	GraphPad
Reagensrør, 15 og 50 mL	Sarstedt
MTX 150 Micro-Ultracentrifuge	Sorvall Instruments
SkanWasher 300 platevasker	Skatron Instruments
Spectrafuge™ Mini Centrifuge	Labnet International, Inc.
Super Minor sentrifuge	MSE
SynergyMX plateleser	Biotek
TS8024 inkubator	Termaks
VS-C10 magnetomrører	VWR
Whirlimixer	Fisons