

# Måling av DNA-skade i blod fra fisk ved bruk av comet assay

Elise Nicoline Lorentine Eidem Zahl-Jansen



Masteroppgave i toksikologi

Institutt for biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

12.05.2018



© Elise Nicoline Lorentine Eidem Zahl-Jansen

2018

Måling av DNA-skade i blod fra fisk ved bruk av comet assay

Elise Nicoline Lorentine Eidem Zahl-Jansen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo



# Takk

Arbeidet gjort for denne oppgaven har blitt utført ved Institutt for biovitenskap (IBV), Universitetet i Oslo (UiO) og ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA) avdeling Solbergstrand. Min hovedveileder har vært Ketil Hylland (UiO), og medveiledere har vært Andrea Sahlman (UiO) og Tor Fredrik Holth (Fylkesmannen i Vestfold).

Jeg vil takke Ketil for å ha gitt meg muligheten til å jobbe med dette prosjektet, gode ideer og veiledning, og for å ha gitt meg all den tiden jeg trengte til og gjennomføre oppgaven.

Jeg vil også få takke de ansatte på Solbergstrand for hjelp med prøvetagning av fisk, siden jeg egentlig er redd for fisk.

En takk må også rettes til min onkel Per Henrik Zahl på Folkehelseinstituttet for hjelp og veiledning med statistikk, og til Tom Andersen (UiO) for litt krisehjelp med R.

Jeg vil få takke min supre venninne Sunniva, for å ha vært der for meg i alle runder av medvind og motvind, og for å ha bidratt med oppmuntring og godt humør gjennom alle år.

Takk til mamma for korrekturlesing og gode kafé-pauser, og til pappa, kapteinen på skuta, for oppmuntring til å bli akademiker og morsomme historier fra Drøbak og F/F Trygve Braarud.

Til slutt vil jeg få takk min kjære mann Stig Olav for all støtte, og mine svigerforeldre for at dere har latt meg pendle til Oslo i de siste månedene, og tatt på dere jobben med å passe på mine to kjære jenter; Millie Sofie og Maja Karine.

Kristiansund, Mai 2018

Elise Nicoline Lorentine Eidem Zahl-Jansen



# Sammendrag

Mange miljøgifter kan forårsake DNA-skade i akvatiske organismer, blant annet gjennom dannelsen av radikaler. En viktig type skade er DNA-trådbrudd, som kan kvantifiseres ved bruk av enkeltcelle-elektroforese, comet assay. Kunnskap om naturlige nivåer av skade i celler fra fiskeblod og mulighetene for å anvende comet assay med både røde og hvite blodceller er viktig for fremtidig overvåkning av gentoksiske effekter i akvatiske miljø.

Formålet med denne oppgaven var å undersøke bakgrunnskade, reparasjon og betydningen av lagring av blod for DNA trådbrudd i helblod og hvite blodceller fra fisk. Arter som ble undersøkt var torsk (*Gadus morhua*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Torsk er en økologisk og kommersielt viktig art som er mye brukt i miljøovervåkning i Norge. Regnbueørret har blitt mye brukt som modellorganisme i akvatisk økotoksikologi.

Ubehandlet blod fra regnbueørret ble støpt i agarose på spesielle plastfilmer og oppbevart i >12 timer i lysisbuffer for undersøkelser av grunnleggende nivå av skade. Blod fra torsk ble støpt i agarose på spesielle plastfilmer og ubehandlede filmer ble oppbevart i >12 timer og 3 uker i lysisbuffer for kontroll og undersøkelser av lagring. To filmer ble eksponert for hydrogenperoksid og lagret i >12 timer og 3 uker i lysisbuffer for positiv kontroll og undersøkelse av lagring. Seks filmer ble inkubert i ulike behandlinger i forskjellige tidsintervaller (24 og 48 timer) for mulighet for reparasjon, og deretter oppbevart i lysisbuffer i >12 timer.

Lave bakgrunnsnivåer av skade ble funnet for blodceller fra begge arter (<10 % DNA-skade). Sensitivitet for oksidativ skade ble undersøkt i røde og hvite blodceller fra torsk ved eksponering for hydrogenperoksid *in vitro*, og røde blodceller viste seg å være minst sensitive. Reparasjon av DNA ble undersøkt i helblod og hvite blodceller fra torsk og inkubering for reparasjon ga høyere skadenivåer enn peroksideksponering, med forskjeller mellom behandlingene, og 48 timer inkubasjon ga de høyeste nivåene av skade. Lagring av prøver i lysisbuffer viste at prøver kan lagres i minst 3 uker uten at det blir økt skade.





# Forkortelser

Ca <sup>++</sup>	Kalsium
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoxyribonucleic acid/deoksyribonukleinsyre
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Foetal calf serum
HCl	Hydrogenklorid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
IBV	Institutt for biovitenskap
IU	International unites/Internasjonale enheter
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenfosfat
LMP	Low melting point/Lavt smeltepunkt
NaCl	Natriumklorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -anhydrat	Natriumhydrogenfosfat-anhydrat
NaOH	Natriumhydroksid
NIVA	Norsk institutt for vannforskning
PBS	Phosphate buffered saline
UiO	Universitetet i Oslo



# Innholdsfortegnelse

Takk.....	V
Sammendrag.....	VII
Forkortelser.....	IX
<b>1 Introduksjon.....</b>	<b>1</b>
<i>Mål.....</i>	<i>4</i>
<b>2 Materialer og metode.....</b>	<b>5</b>
2.1 Hold av fisk, prøvetaking.....	5
2.2 Prøvebearbeidelse, separasjon og innstøping.....	5
<i>Design.....</i>	<i>7</i>
<i>Elektroforese og unwinding.....</i>	<i>9</i>
2.3 Scoring og farging.....	9
2.4 Statistikk.....	10
<b>3 Resultater.....</b>	<b>11</b>
3.1 DNA-skade og reparasjon.....	11
<i>Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd hos regnbueørret og torsk?.....</i>	<i>11</i>
<i>Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd mellom røde og hvite blodceller fra torsk?.....</i>	<i>12</i>
<i>Er det forskjell i effekter av oksidativ skade hos røde og hvite blodceller fra torsk?.....</i>	<i>14</i>
<i>Vil DNA repareres i større grad hvis EDTA ikke er tilstede?.....</i>	<i>15</i>
<i>Vil DNA repareres i større grad hvis cellene inkuberes i medium?.....</i>	<i>17</i>
<i>Er det en endring i reparasjon fra 24 til 48 timer etter oksidativ skade hos røde og hvite blodceller fra torsk?.....</i>	<i>19</i>
3.2 Lagring i lysisbuffer.....	20
<i>Vil tre ukers lagring i lysisbuffer føre til økt skade hos røde eller hvite blodceller fra torsk?.....</i>	<i>20</i>
<b>4 Diskusjon.....</b>	<b>21</b>
<i>Bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd.....</i>	<i>21</i>

	<i>Sensitivitet for oksidativ skade</i> .....	22
	<i>Reparasjon</i> .....	22
	<i>Lagring i lysisbuffer</i> .....	23
<b>5</b>	<b>Konklusjoner</b> .....	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Fremtidig forskning</b> .....	<b>26</b>
	<b>Litteraturliste</b> .....	<b>27</b>
	<b>Vedlegg</b> .....	<b>32</b>

# 1 Innledning

Økotoksikologisk overvåkning er sentralt i en verden med både gamle og nye utslipp av potensielt skadelige kjemikalier, og gentoksisitet er en sentral mekanisme for potensiell skade (Belfiore & Anderson, 2001, Kleinjans & van Schooten, 2002). Utslipp fra både naturlige og menneskeskapte kilder er dessverre en stor del av den verdenen vi lever i, og flere av disse kjemikaliene har skadelige egenskaper som persistens, bioakkumulering og toksisitet. Disse kjemikaliene finnes i både jord, luft og vann, og det akvatiske miljøet er ofte det ultimate oppbevaringsstedet. Mange akvatiske organismer vil derfor kunne komme i kontakt med en rekke skadelige kjemikalier og stoffer, i større eller mindre grad, avgrenset av regional utbredelse av både organismer og utslipp. En del av disse stoffene er så persistente at de vil kunne finnes i naturen i tiår og hundreår etter at selve utslippene har opphørt. Forurensende stoffer kan påvirke DNA gjennom flere mekanismer (Bolognesi & Cirillo, 2014), også oksidativ skade.

DNA i alle celler brytes og repareres kontinuerlig, både som enkelt- og dobbeltrådbrudd, blant annet som følge av oksidativt stress (Collins, 2009), og tilstedeværelse av høyere nivåer av DNA-skade som er forårsaket av miljøforurensning er grunn til bekymring, og noe som har ledet til utvikling av metoder for overvåking av slike skader, blant annet hos fisk (Hylland et al., 2006, Hylland et al., 2017). Men samtidig som at DNA-skade kan være en indikator for en eller annen miljømessig kilde til stress, så er DNAets natur og dets indre prosesser til dels krevende å undersøke. Celler har mekanismer for DNA-reparasjon. Og hvis prøver tatt for å undersøke grad av DNA-skade i en organisme får mulighet til å reparere DNAet, så blir resultatene misledende.

DNA-skade er en viktig biomarkør siden mange biologiske systemer og funksjoner er avhengig av genomets integritet (Shugart, 1990). Når DNA-molekylet opplever normale cellulære forhold veksler det mellom en stabil dobbeltrådet enhet og en oppløst form som er mer ustabil (Shugart, 2000). Alle celler utsettes hele tiden for både endogene og eksogene kilder til stress som kan skade DNAet, og de skadene som kan oppstå på DNAet etter slike påkjenninger blir raskt sanset av cellen og et intrikat nettverk av signalveier, gjerne kalt "DNA-skade respons" blir aktivert (Barzilai & Yamamoto, 2004). Slike kilder til stress kan være UV-stråling, varmesjokk eller eksponering for gentoksiske kjemikalier, og disse kan

forstyrre normal cellulær aktivitet og føre til forstyrrelser i DNAets integritet (Vilenchik & Knudson, 2003).

Oksidativt stress er en viktig mekanisme for DNA-skade, som oppstår når dannelsen av reaktive oksygenarter overgår antioksidant kapasiteten til en organisme (Barzilai & Yamamoto, 2004). Reaktive oksygenarter dannes av den mitokondrielle respirasjonskjeden og kan interagere med biomolekyler slik som proteiner, lipider og baser i DNA-molekylet (Collins, 2009).

Torsk (*Gadus morhua*) har vid utbredelse i Nord-Atlanteren og finnes i områder med temperaturer fra -1 °C til over 20 °C, men vanligst mellom 0-12 °C (Drinkwater, 2005). Torsk er en av de viktigste kommersielle og rekreasjonelle artene i Nord-Atlanteren, til tross for signifikant nedgang i antall i flere områder de siste tiårene (O'Brien et al., 2000).

Kystpopulasjonene av torsk er relativt stasjonære (Godø, 1995) noe som gir et godt grunnlag for å studere lokale toksiske effekter. Torsk har en lever med et høyt fettinnhold (40-80 %) og har derfor blitt brukt til å overvåke akkumulering av lipofile kjemikalier (Goksøyr et al., 1996).

Atlantisk torsk har en diett bestående av et bredt utvalg arter, både bentiske og pelagiske, der små torsk for det meste lever av for eksempel små krabber og reker, så spiser større torsk for det meste fisk (Hop et al., 1992). Torsk kan bli eksponert for toksiske kjemikalier både gjennom mat og ved direkte eksponering fra vann over gjellene (Grung et al., 2009). Torsk er en mye brukt art i miljøovervåking (Goksøyr et al., 1994, Hylland et al., 2009) noe som gir et historisk utgangspunkt for videre overvåking, med samme og nye metoder, og det er derfor interessant å utvikle metoder til å detektere DNA trådbrudd hos denne arten.

Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble benyttet til innledende forsøk til oppgaven siden den oppdrettes i Norge (Maroni, 2000) og har vært brukt som modell-art i akvatisk økotoksikologi i flere tiår (Cabrita et al., 2005, Mitchelmore & Chipman, 1998).

Metoden med enkelt-celle elektroforese som metode for å kvantifisere DNA trådbrudd ble beskrevet allerede på 80-tallet (Ostling & Johanson, 1984), og har siden blitt tilpasset og utbedret en rekke ganger (Gutzkow et al., 2013, Singh et al., 1988). Den vanligste metoden kalles "comet assay", som beskriver de karakteristiske halene som oppstår etter elektroforese, og som indikerer grad av DNA-skade i cellene. Metoden er nå en velkjent og veletablert metode for vurdering av både enkelt- og dobbeltrådede DNA brudd i en lang rekke

organismer, og antas å være en god indikator for DNA-skade (Collins et al., 1997). Metoden er regnet for å være sensitiv, enkel, rask og billig (Collins, 2004) og har blitt bredt akseptert som en metode for å vurdere gentoksisitet (Cotelle & Ferard, 1999). Comet assayet brukes i dag innen er rekke vitenskapelige retninger som et diagnostisk verktøy, også innen human overvåkning (Collins et al., 1997). Metoden kan også spesifiseres til å undersøke skader som følge av oksidativt stress, da ved å tilsette lesjonspesifikke enzymer som et steg i prosessen (Boiteux, 1993, Speit et al., 2004). Disse angriper da spesifikke typer skade, som for eksempel oksiderte puriner eller pyrimidiner (Collins, 2004). Selv om oksidativt stress er en viktig årsak til DNA skade, så er comet assayet i sin grunnleggende alkaliske form også kapabel til å detektere trådbrudd og alkaliske steder der ikke alle kan relateres til oksidativt stress.

Anvendelsen av comet assayet for overvåkning av gentoksisitet i akvatiske organismer er allerede vel etablert (El-Bibany et al., 2014, Taban et al., 2004, Cotelle & Ferard, 1999). Til tross for dette er det fortsatt uklarheter tilknyttet metoden, deriblant om DNA kan reparere seg. Comet assayet anvendes for å detektere DNA trådbrudd, potensielt som følge av ytre eller indre kilder til stress, og det er derfor viktig å ha klarhet i hvordan DNAets iboende egenskap til å selv reparere seg kan påvirke resultatet. Hvis DNA kan reparere seg selv etter prøvetakning og laboratorieprosessering av de aktuelle cellene, så er dette viktig å få klarhet i.

Comet assay brukt på blod er veletablert (Torbergesen & Collins, 2000, Woo et al., 2006) og torsk og regnbueørret, som andre ikke-mammalske vertebrater, har røde blodceller med kjerner som inneholder DNA (Medrano et al., 1990) noe som gjør dem velegnet som studieorganismer for bruk av comet assay i akvatiske miljøer.

Flere steg i comet protokollen er tilstede for å ta vare på cellene før analyse eller hemme DNA reparasjonsenzymer. Et viktig steg er tilsetning av etylenediaminetetraacetic acid (EDTA) til phosphate buffer saline (PBS). Dette gjøres for å forhindre koagulering av blodet, ved at EDTA binder blodets  $Ca^{++}$ -ioner som er nødvendig for å starte koaguleringen (Kumar & Satchidanandam, 2000), men EDTA vil også kompleksbinde andre metaller, som kan hemme reparasjonsenzymer. Om tilsetningen av EDTA utelates, vil dette potensielt kunne bidra til økt reparasjonsvirksomhet. I perioden fra cellene tas ut av organismen til de blir inaktivert (lysis-steget) vil DNA teoretisk kunne repareres. Dette kan avklares ved inkubering med medium og PBS med og uten EDTA.

Et aspekt ved comet assay som krever videre undersøkelser er hvordan prøver kan oppbevares over lengre tid før de analyseres. Noen undersøkelser har blitt gjort tidligere (Belpaeme et al., 1998, Fredriksen, 2013, Collins, 2014), men med varierende resultater. I felt er det ofte begrensede ressurser, og det er derfor viktig å avklare om celler i ferdigstøpte agarose-geler på GelBond® filmer kan oppbevares i lysis-buffer over lengre tid. Dette utvider mulighetene for analyse av prøver som ellers ikke kan oppbevares over lang tid uten at de ødelegges. Man kan da gjøre ferdig filmene med ganske enkelt utstyr, og frakte de ferdige filmene til et laboratorium med nødvendig utstyr for videre analyse. Elektroforese må utføres i et laboratorium hvor man har tilgang til elektrisitet og kjøling. Det er derfor svært interessant å undersøke om filmer kan oppbevares over lang tid i lysisbuffer og i et kjølig miljø uten at resultatene blir forstyrret.

## *Mål*

Målet med dette studiet var å få klarhet i egenskaper ved comet assayet som er relevante for framtidige analyser og for bruk i felt, spesielt for blod fra fisk, her torsk og regnbueørret.

- I) Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd hos regnbueørret og torsk?
- II) Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd mellom røde og hvite blodceller hos torsk?
- III) Er det forskjell i effekter av oksidativ skade på DNA hos røde og hvite blodceller fra torsk?
- IV) Vil DNA repareres i større grad hvis EDTA ikke er tilstede?
- V) Vil DNA repareres i større grad hvis cellene inkuberes i medium?
- VI) Er det en endring i reparasjon fra 24 til 48 timer etter oksidativ skade hos røde og hvite blodceller fra torsk?
- VII) Vil tre ukers lagring i lysisbuffer føre til økt skade hos røde eller hvite blodceller fra torsk?



## 2 Materialer og metode

Liste over kjemikalier og produkter (med leverandører) brukt i oppgaven finnes i vedlegg B.

### 2.1 Hold av fisk, prøvetaking

Blodprøver av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble tatt i kjelleren på IBV (Institutt for biovitenskap) ved Universitetet i Oslo (UiO). Det ble brukt oppdrettet regnbueørret. Fiskene ble avlivet med et hardt slag mot hodet. Blodprøvene ble tatt med en 1 mL sprøyte og en 0,6 x 30 mm sprøytespiss. Alle sprøytene og sprøytespissene ble på forhånd behandlet med heparin (10 000 IU/mL) for å hindre koagulering, og etter at prøven var tatt ble sprøytespissen tatt av før blodet ble overført til prøverør. Fiskene som ble tatt var av samme størrelse (300 – 400 g) og i god kondisjon. En mL blod fra hver fisk ble overført til en beholder som inneholdt 4 mL PBS + EDTA (145 mM NaCl, 8,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-anhydrat, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA; pH 7,5, kommersiell fremstilt) for å få en 5x fortykning av blodet og for å hindre koagulering. Alle prøvene ble lagret mørkt og på is før videre behandling.

Blodprøver av torsk (*Gadus morhua*) ble tatt på NIVA (Norsk Institutt for vannforskning) avdeling Solbergstrand ved Oslofjorden. Fiskene ble avlivet med et hardt slag mot hodet. Fiskene som ble tatt var juvenile, av omtrentlig samme størrelse (300-400 g) og i god kondisjon. Blodprøvene ble tatt med en 1 ml sprøyte og en 0,6 x 30 mm sprøytespiss. Alle sprøytene og sprøytespissene ble på forhånd behandlet med heparin (10 000 IU/mL) for å hindre koagulering, og etter at prøven var tatt ble sprøytespissen tatt av før blodet ble overført til prøverør. 1 mL blod fra hver fisk ble overført til en beholder som inneholdt 4 mL PBS + EDTA for og få en 5x fortykning av blodet, og for å hindre koagulering. Alle prøvene ble lagret mørkt og på is før transport tilbake til IBV for videre behandling.

### 2.2 Prøvebearbeidelse, separasjon og innstøping

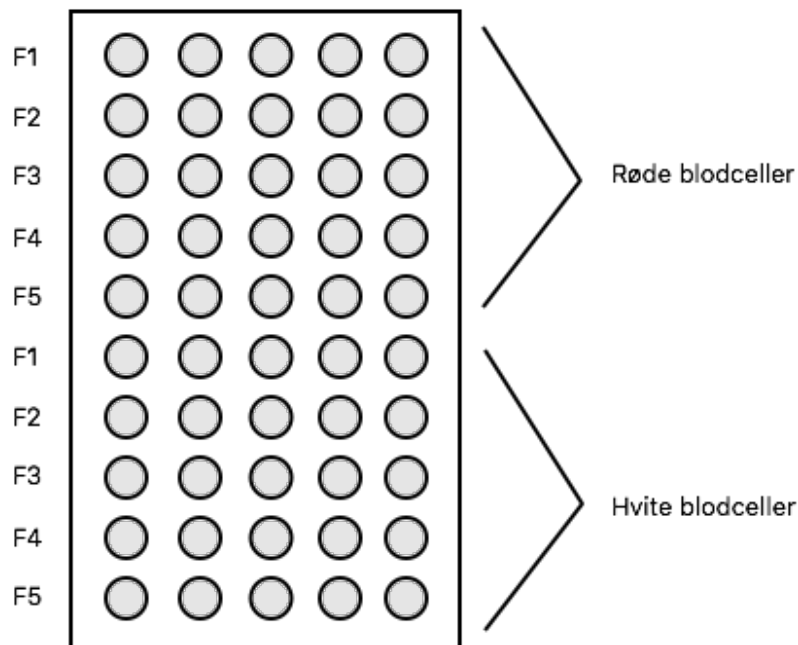
Ferdiglaget lysis-stock (2,5 M NaCl + 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA + 10 mM Trizma base; pH 10) ble blandet med 10 % dimetylsulfoksid (DMSO) og 1% Triton X-100. Arbeidsløsningen ble satt i kjøleskap ved 4°C for avkjøling.

LMP (Low Melting Point) agarose (0,75 %) ble løst i PBS + EDTA i en mikrobølgeovn. Agarosen ble så fordelt i 1,5 mL eppendorfrør og holdt flytende ved 37 °C på en varmeblokk.

Blodprøvene fra de 5 fiskene ble så fortynnet videre til en 1000x fortynning ved å ta 5 µL blod oppi 995 µL PBS + EDTA.

Blodprøvene fra hver fisk ble deretter separert i en percoll løsning. Det ble pipetert 1,5 mL 1,06 Percolløsning oppi et 15 mL sentrifugerør. Deretter ble det forsiktig pipetert 1,0 mL 1,04 Percolløsning oppå, og til slutt 1,0 mL fortynnet blod på toppen. Dette ble sentrifugert ved  $0,8 \times G$  i 40 minutter ved 4 °C. Leukocytene, de hvite blodcellene, la seg da som et bånd mellom de to Percolløsningene, og de røde blodcellene passerte helt gjennom og la seg i bunnen av røret. De hvite blodcellene ble så forsiktig pipetert ut og fortynnet 20x i PBS + EDTA (50 µL hvite blodceller oppi 950 µL PBS+EDTA).

Det ble laget totalt 10 GelBond® filmer, med 50 agarosegeldråper på hver (Figur 1). Filmene ble støpt fire og fire. Det ble blandet 360 µL LMP agarose med 40 µL prøve for hver runde med støping, slik at det til enhver tid var nok blanding til å støpe. Hver agarosedråpe var på 10 µL.



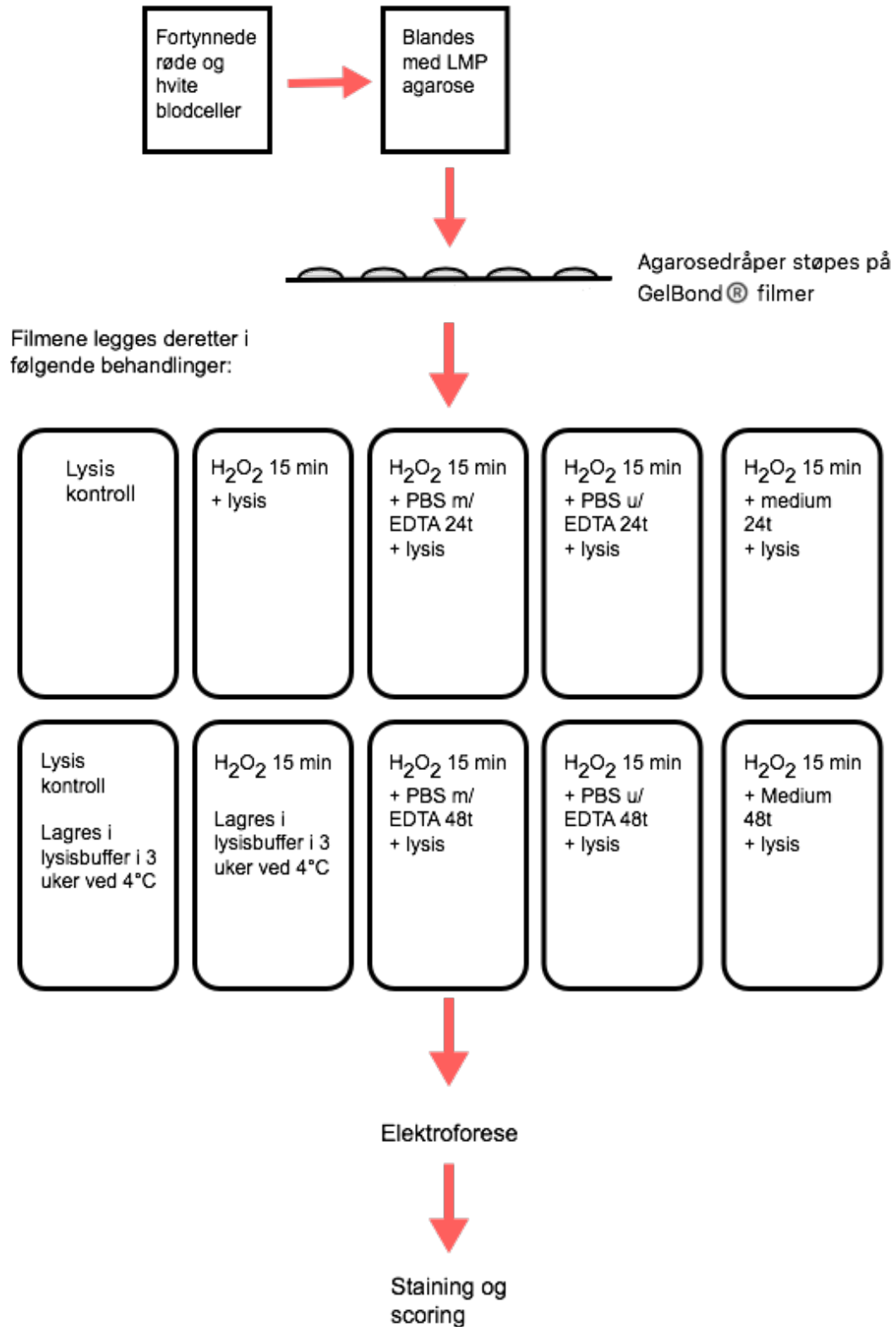
**Figur 1** Oppsett for hver GelBond® film. Fem fisk, med fem replikater av hver fisk, både røde og hvite blodceller. Hver agarosedråpe er på 10 µL.

## *Design*

Fortynnede røde og hvite celler ble støpt på en GelBond® film som vist i figur 1 og figur 2. Filmene ble deretter lagt i forskjellige behandlinger.

En film med ubehandlede celler ble lagt direkte i lysis-buffer over natten som kontroll og en film med ubehandlede celler ble lagt i lysis-buffer for lagring i ca. 3 uker. Åtte filmer ble behandlet med en 15 minutters eksponering med 10 µM hydrogenperoksid (30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fortynnet i PBS + EDTA). En av disse filmene ble lagt direkte i lysis-buffer, som behandlingskontroll, og lå over natten i lysisbuffer og en ble lagt i lysisbuffer for lagring i ca. 3 uker. Lysis-bufferen har et høyt saltinnhold, et løsemiddel (DMSO) og en detergent, noe som fjerner membranene fra cellene.

De 6 andre filmene ble lagt i tre ulike behandlinger. To ble lagt i PBS + EDTA, to ble lagt i PBS uten EDTA (145 mM NaCl, 8,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-anhydrat, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,5) og to ble lagt i medium (Leibovitz's L-15 Medium) med tilsatt Foetal Calf Serum (FCS). En av hver behandling lå til inkubering ved 4 °C i 24 timer, og en av hver behandling lå til inkubering ved 4 °C i 48 timer. Etter inkuberingen ble filmene flyttet over i lysis-buffer over natten og videre behandling fulgte standard comet protokoll. Hele designet er illustrert i figur 2.



**Figur 2** Skjematisk figur av comet-prosedyren og oppsett av forsøk. Totalt 10 filmer. Åtte eksponeres for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 15 minutter. Alle lå i lysis over natten (over 12 timer) untatt der det er angitt noe annet.

## *Unwinding og elektroforese*

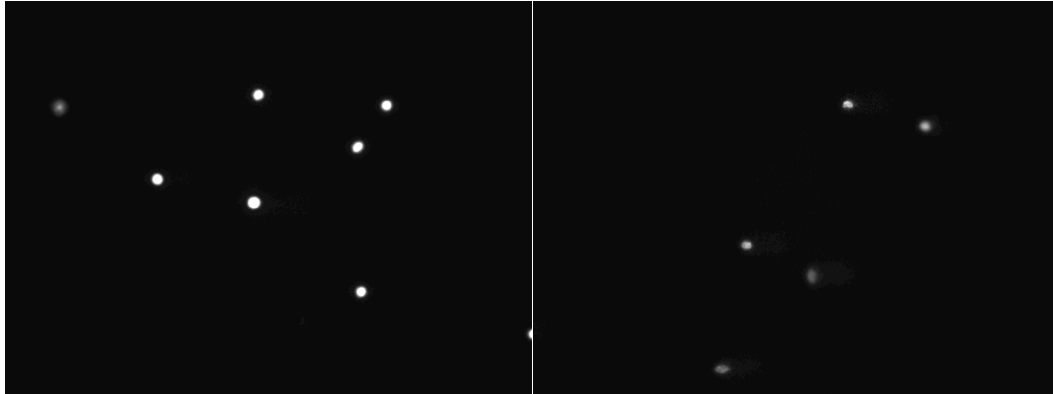
Etter å ha ligget over 12 timer i lysis-buffer ble filmene renset lett i PBS og avkobling (unwinding) av DNA ble utført ved at filmene ble lagt i avkjølt (4 °C) elektroforesebuffer (200 mL stock (3M NaOH, 10 mM EDTA) ble tilsatt 1,788 L dH<sub>2</sub>O og 12 mL HCl (37 %); pH 13,2) i 5 minutter. De ble deretter flyttet over i elektroforesekammeret der det var 1,4 L fersk elektroforesebuffer og lå der med sirkulasjon i 20 minutter. Total tid i elektroforesebuffer var omtrent 25 minutter.

Deretter ble elektroforese utført ved 4°C i 20 minutter med 24 V og 0,8 A. Elektroforesetanken ble deretter tømt og renset to ganger med destillert vann før neste kjøring.

Filmene ble så nøytralisert først i 5 minutter i nøytraliseringsbuffer (0,4 M Trizma-base, 0,4 M Trizma-HCl; pH 7,5) ved romtemperatur, og deretter i 15 nye minutter i ny nøytraliseringsbuffer. Dette for å hindre videre unwinding av DNA. Etter rensing med dH<sub>2</sub>O i ca. 1 minutt ble filmene lagt i etanol (96 %) i omtrent 5 minutter. De ble så flyttet over i en plastboks med ny etanol og holdt der i ca. 1,5 timer for fiksering. Etter fiksering ble filmene satt til tørking i et mørkt skap ved romtemperatur.

## **2.3 Farging og scoring**

Filmene ble farget med 50 µL SYBR® Gold (10x fortynt i DMSO) og 50 mL Trizma EDTA (TE) buffer (0,5 M Trizma buffer, 0,5 M EDTA; pH 8) i en plastboks med mørkt lokk på et vippebord i 20 minutter. Filmene ble så montert på en pleksiglassplate ved å "legge" en litt stor dråpe dH<sub>2</sub>O på dem, for deretter og forsiktig "bøye" filmen ned på denne, slik at det ikke danner seg luftbobler under filmen. Det samme ble så gjort med et dekkglass oppå filmen. Scoring ble utført med et Zeiss Axio Scope A1 fluorescensmikroskop (eksitasjon/emisjon 520/610 nm) med et 20x objektiv. Mikroskopet var koblet sammen med et kamera (Allied Vision Technologies). Scoringen av cellene ble gjort ved hjelp av programvaren Comet Assay IV (Perspective Instruments, versjon 4.3). 50 tilfeldig valgte celler fra hver gel ble scoret (Figur 3). Celler rundt kanten av gelen, celler som overlappeteller eller hadde en rar form ble ikke scoret.



**Figur 3** Røde blodceller fra torsk. Til venstre uskadede celler, til høyre celler behandlet med  $H_2O_2$  (fragmentert DNA har migrert i agarosegelen).

## 2.4 Statistikk

Alle analyser har blitt utført i R (R Core Team, 2018). Data fra cometanalyser er ofte ikke normalfordelte og det anbefales å transformere dataene (Bright et al., 2011), men i dette studiet beholdes dataene u-transformerte for en mer transparent analyse. Det ble valgt en konservativ retning for statistiske analyser med ikke-parametriske tester. Datasettet ble testet for normalfordeling med Shapiro-Wilks test (Shapiro & Wilk, 1965) og homogen varians med Levene's test (Levene, 1952). Dataene som er parede ble deretter testet med den ikke-parametriske Wilcoxon signed rank test, og u-parede data ble testet med Mann-Whitney U. Data der flere grupper ble sammenliknet ble testet med Kruskal-Willis test (Kruskal & Wallis, 1952). Signifikansnivå ble satt til  $p=0,05$ .

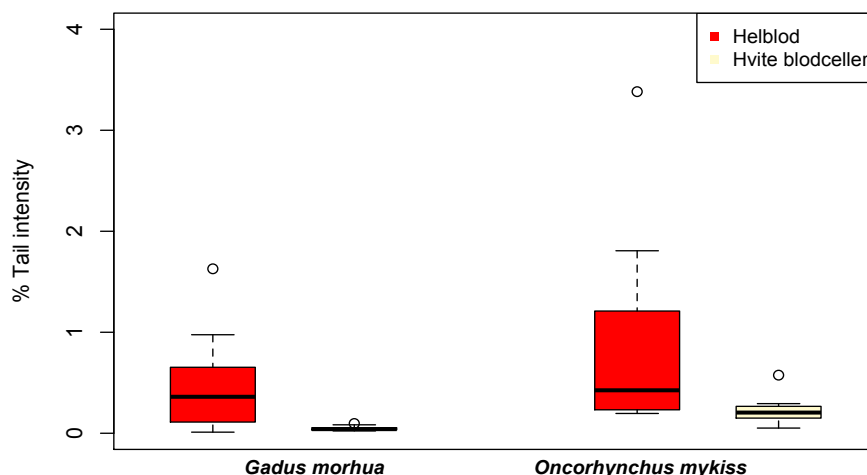
# 3 Resultater

Resultatene viser sammenlikning av torsk og ørret som studieorganisme (Figur 4), undersøkelse av bakgrunnsnivåer av skade i røde og hvite blodceller fra torsk (Figur 5 og 6), undersøkelse av sensitivitet for oksidativ skade i røde og hvite blodceller fra torsk (Figur 7), undersøkelse av betydningen av EDTA (Figur 8 og 9) og medium (Figur 10 og 11) for reparasjon, og hvilken betydning inkuberingstid har for reparasjon (Figur 12). Resultater fra lagring i 3 uker i lysisbuffer vises i figur 13. Alle rådata til oppgaven kan finnes i vedlegg A. Gruppene som er sammenliknet kommer alle fra det samme datasettet, og det er de samme fem fiskene (torsk) som er sammenliknet, bortsett fra i første avsnitt der også resultatene fra de innledende forsøkene med regnbueørret er inkludert.

## 3.1 DNA-skade og reparasjon

*Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd hos regnbueørret og torsk?*

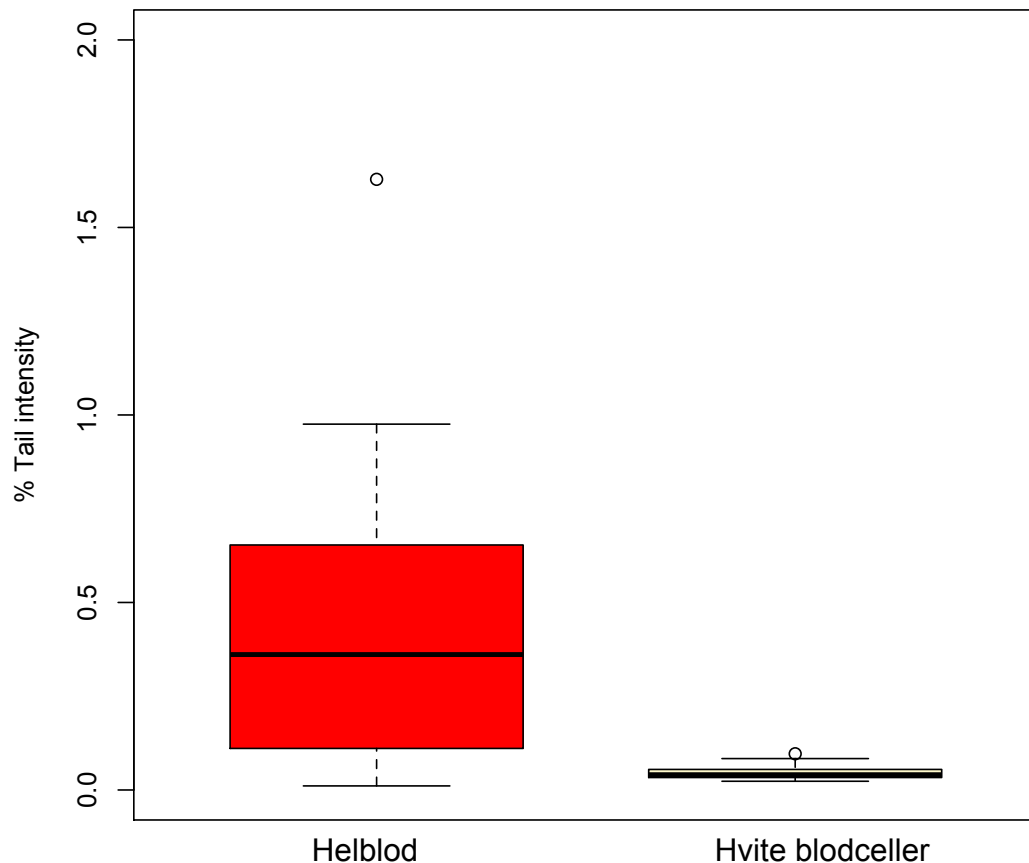
DNA-skade (% Tail intensity) i ubehandlede røde og hvite blodceller fra torsk (*Gadus morhua*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Figur 4). Mellom røde blodceller var det ingen signifikant forskjell ( $p=0,2$ ), mens det mellom de hvite blodcellene var en forskjell (Mann-WhitneyU,  $p=0,00001$ ).



**Figur 4** Grunnivåer av skade (% Tail Intensity) for henholdsvis torsk (n=5) og ørret (n=4). Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

*Er det forskjell i bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd mellom røde og hvite blodceller hos torsk?*

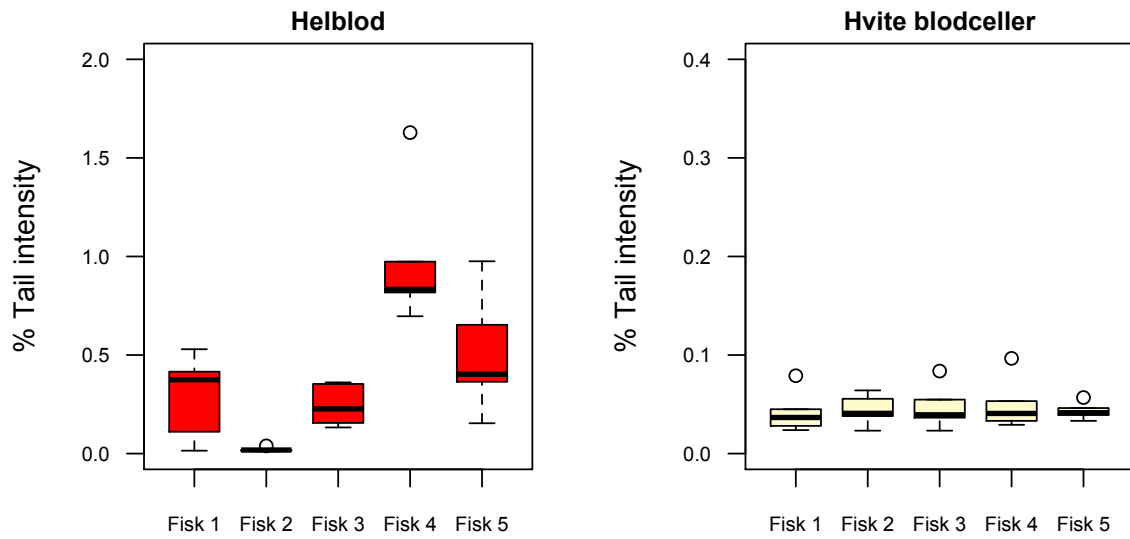
Sammenlikning av DNA-skade (% Tail intensity) for ubehandlede røde og hvite blodceller fra torsk (*Gadus morhua*)(Figur 5). Testing med Wilcoxon signed rank test ga signifikante forskjeller ( $p=0,00003$ ) mellom de to gruppene.



**Figur 5** DNA-skade (% Tail intensity) for røde og hvite blodceller hos ubehandlede torsk,  $n=5$ . Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

På individnivå (Figur 6) er det signifikante forskjeller mellom de røde blodcellene (Kruskal-Wallis;  $p=0,002$ ), mens det mellom individene ikke er signifikante forskjeller mellom de separerte hvite blodcellene (Kruskal-Wallis;  $p=0,9$ ).

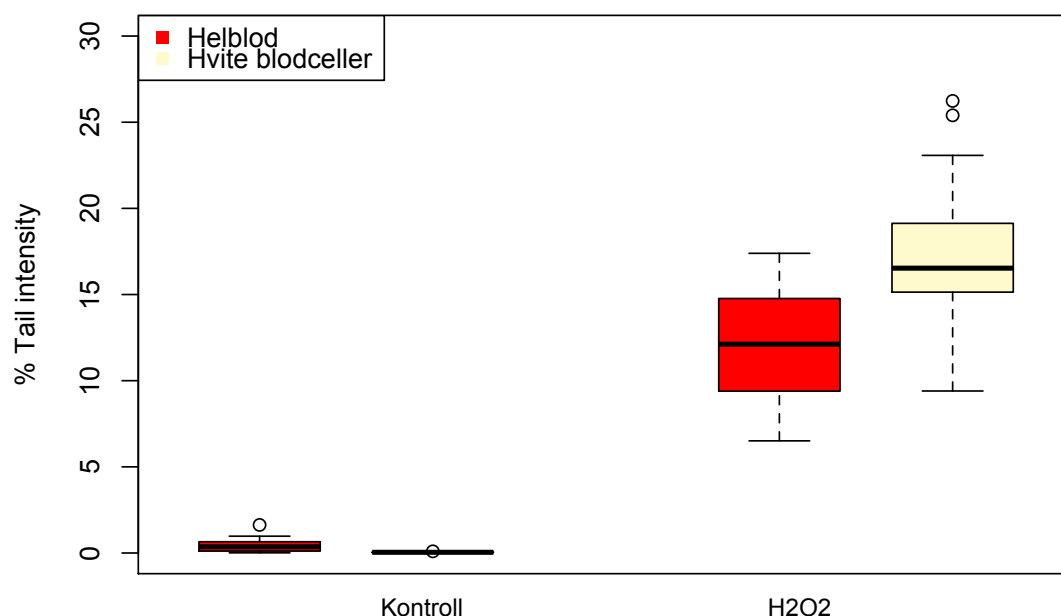




**Figur 6** Venstre: grunnivåer av DNA-skade (% Tail intensity) for ubehandlede røde blodceller for alle individene inkludert i studien (n=5). Høyre: grunnivåer av DNA-skade (% Tail intensity) for ubehandlede hvite blodceller for alle individene inkludert i studien (n=5). Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

*Er det forskjell i effekter av oksidativ skade på DNA hos røde og hvite blodceller fra torsk?*

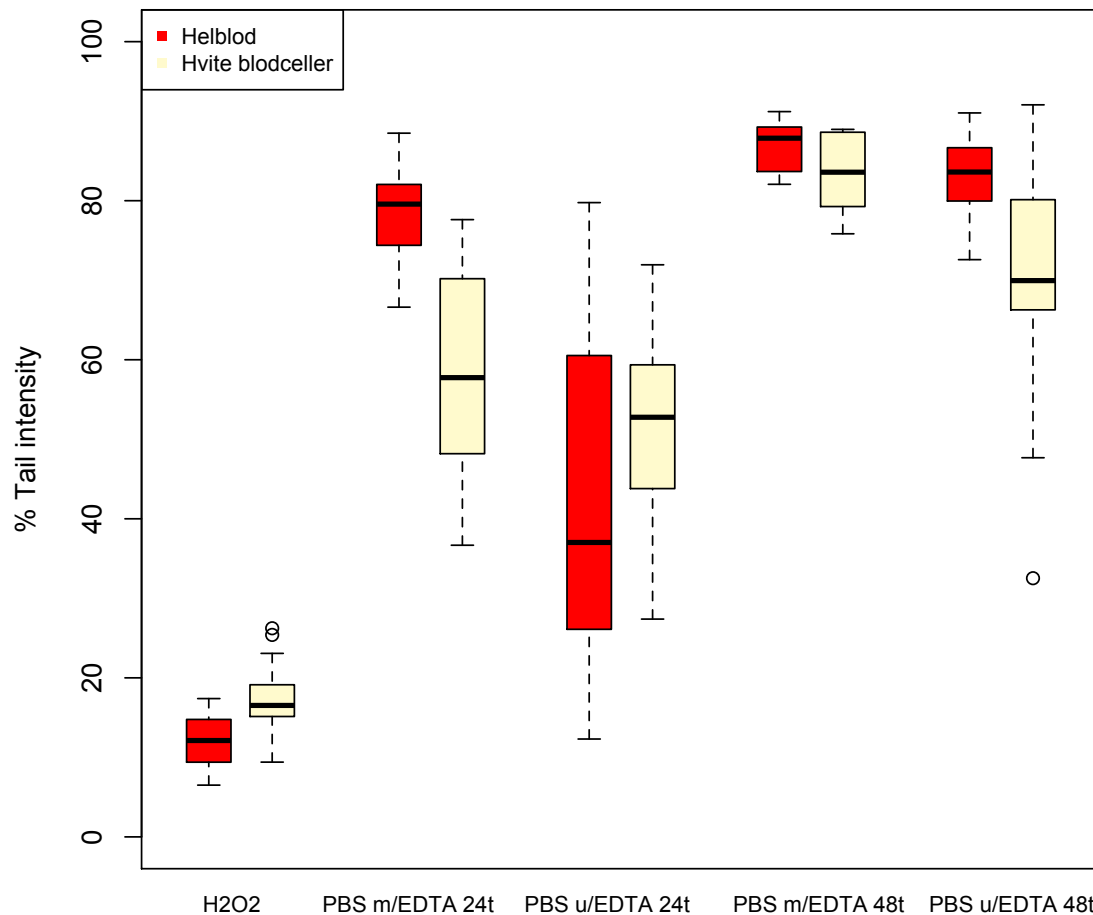
Resultater for undersøkelser av sensitivitet for oksidativ skade i røde og hvite blodceller vises under (Figur 7). Kontroll er ubehandlede celler, og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er celler eksponert for hydrogenperoksid. Ut fra figuren kan man se at de separerte hvite blodcellene er mer sensitive for oksidativ skade enn hva røde blodceller er, noe som også støttes av statistisk testing (Wilcoxon signed rank test; p=0,0004).



**Figur 7** DNA trådbrudd (% Tail intensity) for kontroll og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandlede celler. Kontroll er ubehandlede celler som ble lagt direkte i lysisbuffer etter at agarosegelene hadde satt seg på filmen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble inkubert i 15 minutter i 10µM hydrogenperoksid før den ble lagt i lysisbuffer. n=5. Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

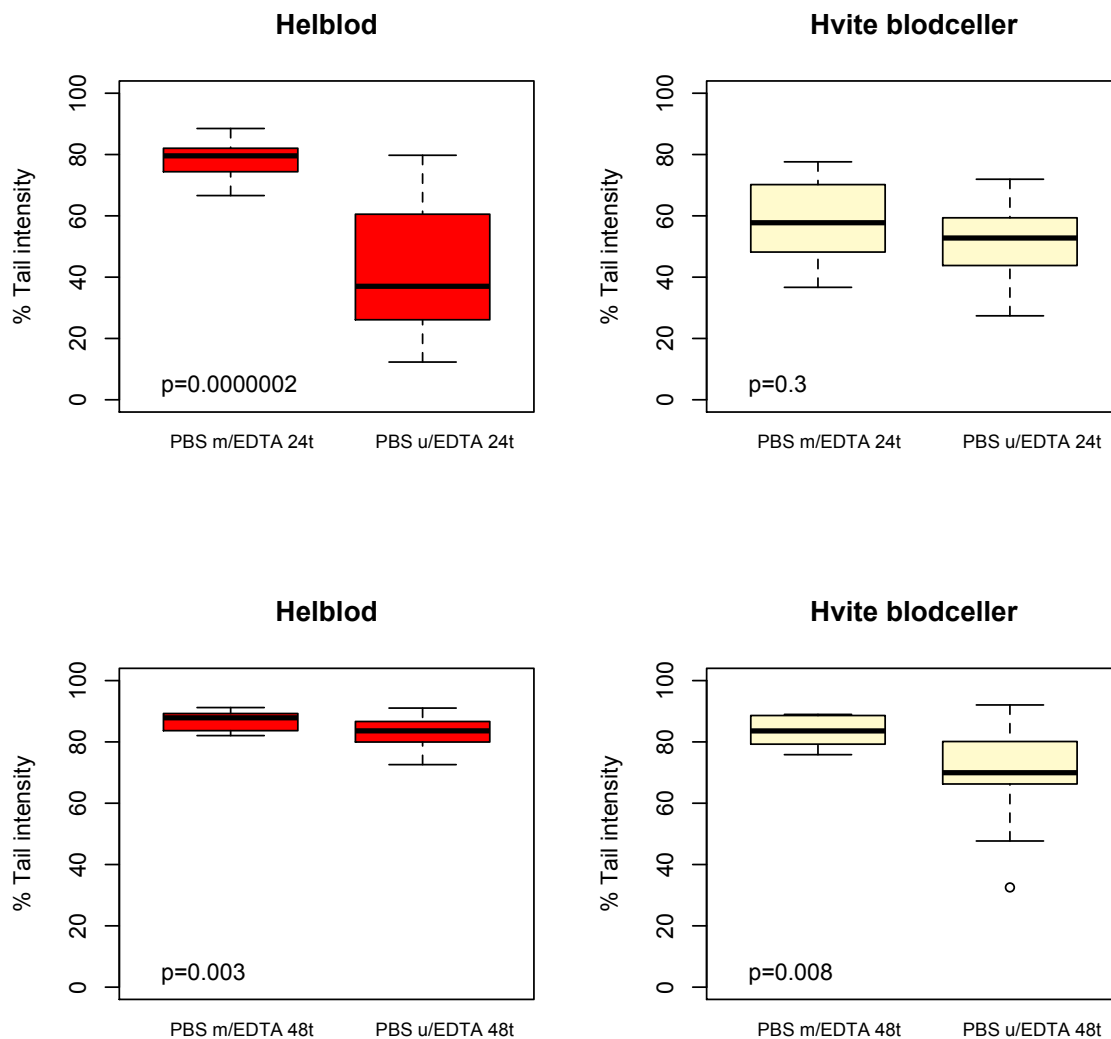
## Vil DNA repareres i større grad hvis EDTA ikke er tilstede?

Undersøkelse av om det er en økt grad av reparasjon i celler som ble inkubert i PBS som ikke var tilsatt EDTA sammenliknet med celler som ble inkubert i PBS med tilsatt EDTA viste at det er signifikante forskjeller mellom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og alle PBS behandlingene (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ) vist i figur 8.



**Figur 8** DNA-skade (% Tail intensity) for celler eksponert for peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS med EDTA i 24t, celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS uten EDTA i 24t, celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS med EDTA i 48t og celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS uten EDTA i 48t. n=5. Den nederste linjen i hver bok viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

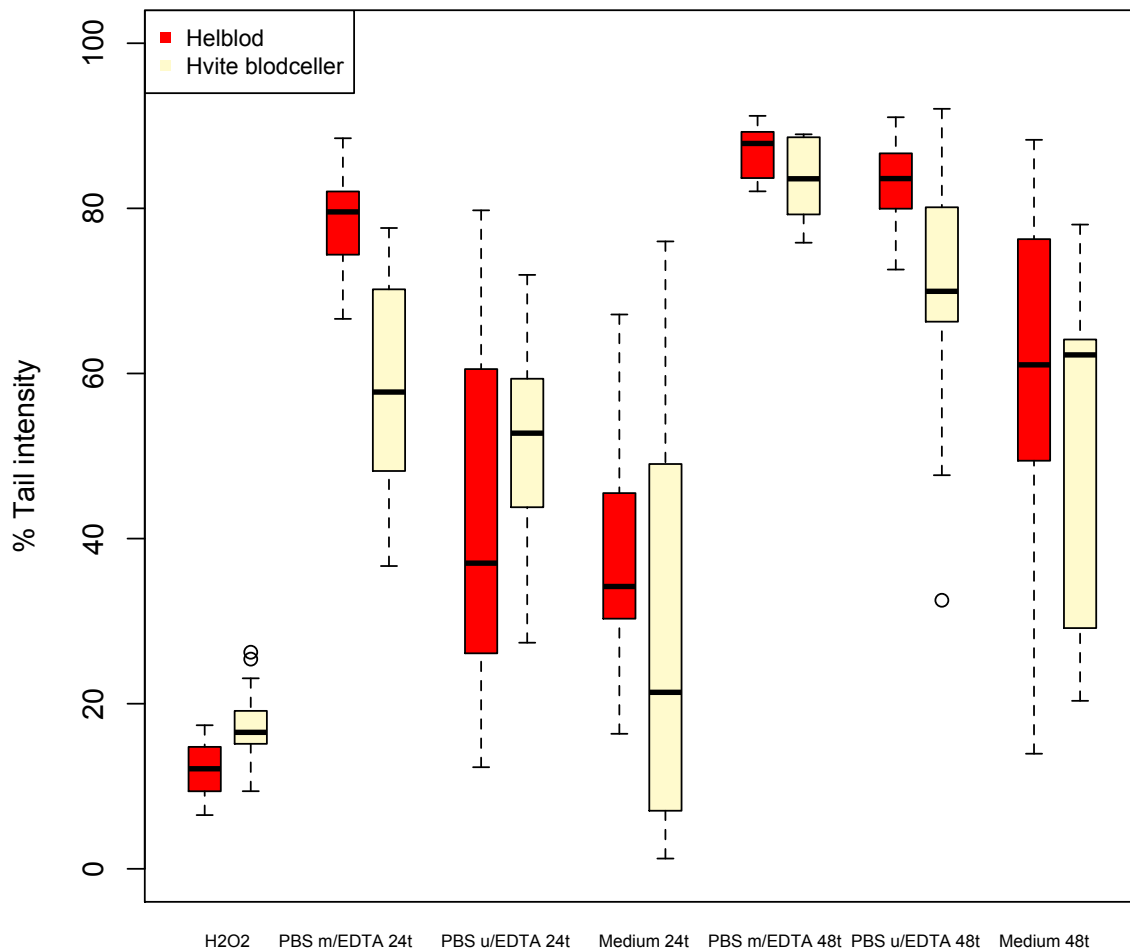
Det ble derfor testet videre med Wilcoxon signed rank test for de røde blodcellene, mens de hvite blodcellene ble testet med Mann-Whitney U da dataene for hvite blodceller er til dels mangelfulle og det ikke er sikkert at det er samme fisk som blir målt mot hverandre, for å se på forskjeller mellom de ulike behandlingene. Der ble det funnet signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom alle de parede gruppene bortsett fra mellom separerte hvite blodceller som hadde fått inkubere i 48 timer ( $p = 0,3$ ).



**Figur 9** DNA-skade i røde og hvite blodceller som har fått inkubere i PBS med og uten EDTA i 24 og 48 timers.  $n=5$ . Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

## Vil DNA repareres i større grad hvis cellene inkuberes i medium?

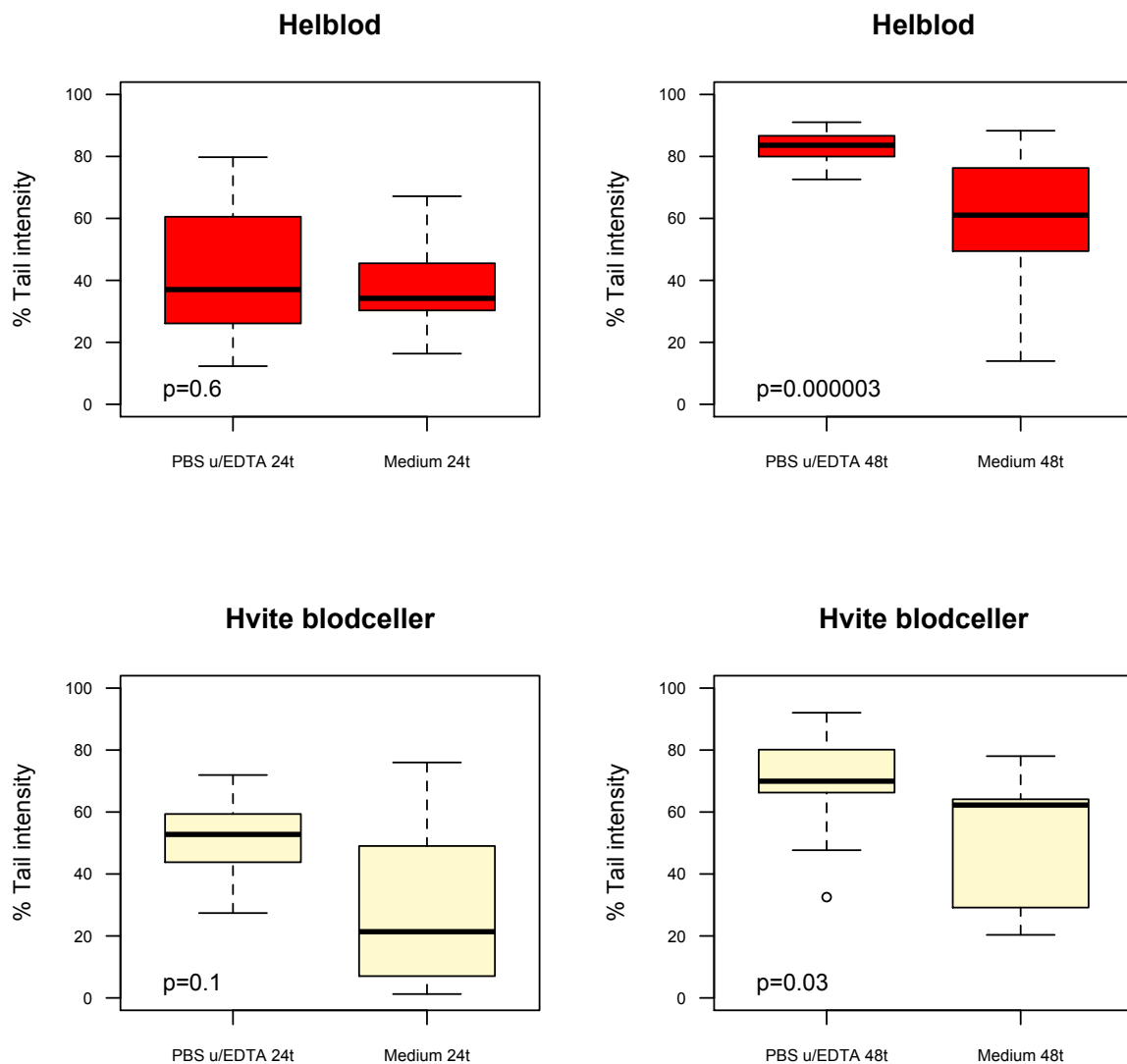
I figur 10 kan man se at det er forskjeller mellom PBS inkuberingene og inkuberingene i medium som krever nærmere undersøkelser. Da forventningen om reparasjon var størst i PBS uten EDTA og medium har det blitt testet statistisk mellom disse gruppene (Figur 11).



**Figur 10** Peroksideksponering sammenliknet med inkubering i PBS med og uten EDTA eller i medium i 24 eller 48 timer.  $n=5$ . Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

Wilcoxon signed rank test viste for røde blodceller at etter 24 t hadde ikke ( $p=0,6$ ) celler inkubert i medium reparert mer enn celler inkubert i PBS uten EDTA, etter 48 timer har de derimot reparert mer ( $p=0,000003$ ). For de hvite blodcellene ble det testet med Mann-Whitney U (siden resultatene fra de hvite blodcellene kan komme fra forskjellige fisker) og

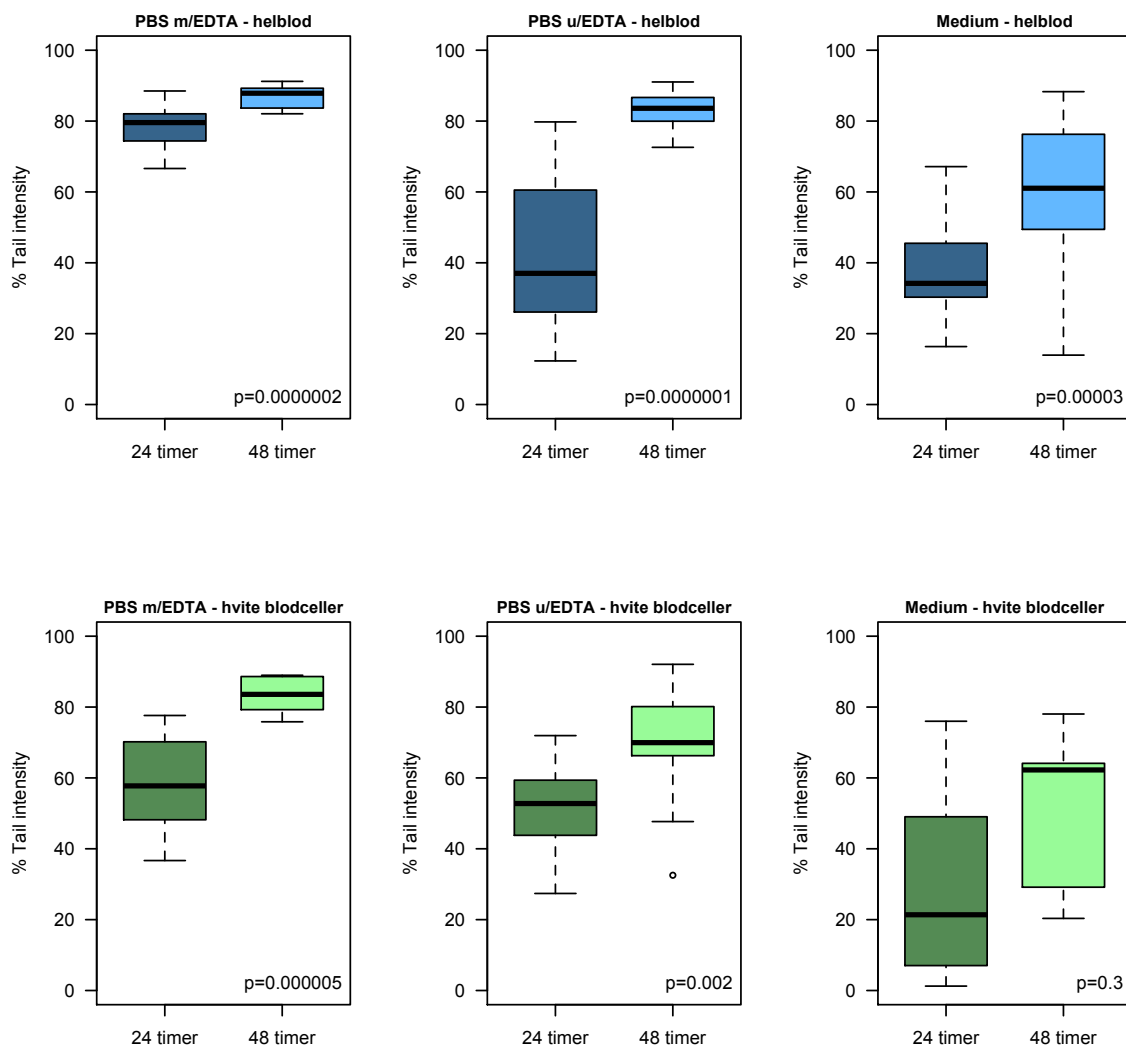
det ble funnet samme resultat, at etter 24 timer hadde cellene ikke reparert noe mer ( $p=0,1$ ), mens etter 48 timer hadde de reparert mer ( $p=0,03$ ).



**Figur 11** Øverst til venstre: røde blodceller eksponert for peroksid og deretter inkubert i PBS uten EDTA eller medium i 24 timer. Øverst til høyre: røde blodceller eksponert for peroksid og deretter inkubert i PBS uten EDTA eller medium i 48 timer. Nederst til venstre: hvite blodceller eksponert for peroksid og deretter inkubert i PBS uten EDTA eller medium i 24 timer. Nederst til høyre: hvite blodceller eksponert for peroksid og deretter inkubert i PBS uten EDTA eller medium i 48 timer.  $n=5$ . Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

*Er det en endring i reparasjon fra 24 til 48 timer etter oksidativ skade hos røde og hvite blodceller fra torsk?*

Resultatene for betydningen av inkubasjonstid ble testet med henholdsvis Wilcoxon signed rank og Mann-Whitney U for røde og hvite blodceller, og viste signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) for alle behandlingene bortsett fra hvite blodceller inkubert i medium ( $p = 0,3$ ) som kan sees i figur 12.



**Figur 12** Øverst til venstre: røde celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS med EDTA i 24 og 48 timer. Øverst i midten: røde celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS uten EDTA i 24 og 48 timer. Øverst til høyre: røde celler eksponert for peroksid og inkubert i medium i 24 og 48 timer. Nederst til venstre: hvite celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS med EDTA i 24 og 48 timer. Nederst i midten: hvite celler eksponert for peroksid og inkubert i PBS uten EDTA i 24 og 48 timer. Nederst til høyre: hvite celler eksponert for peroksid og inkubert i medium i 24 og 48 timer. Den nederste linjen i hver boks viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver boks er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver boks er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.

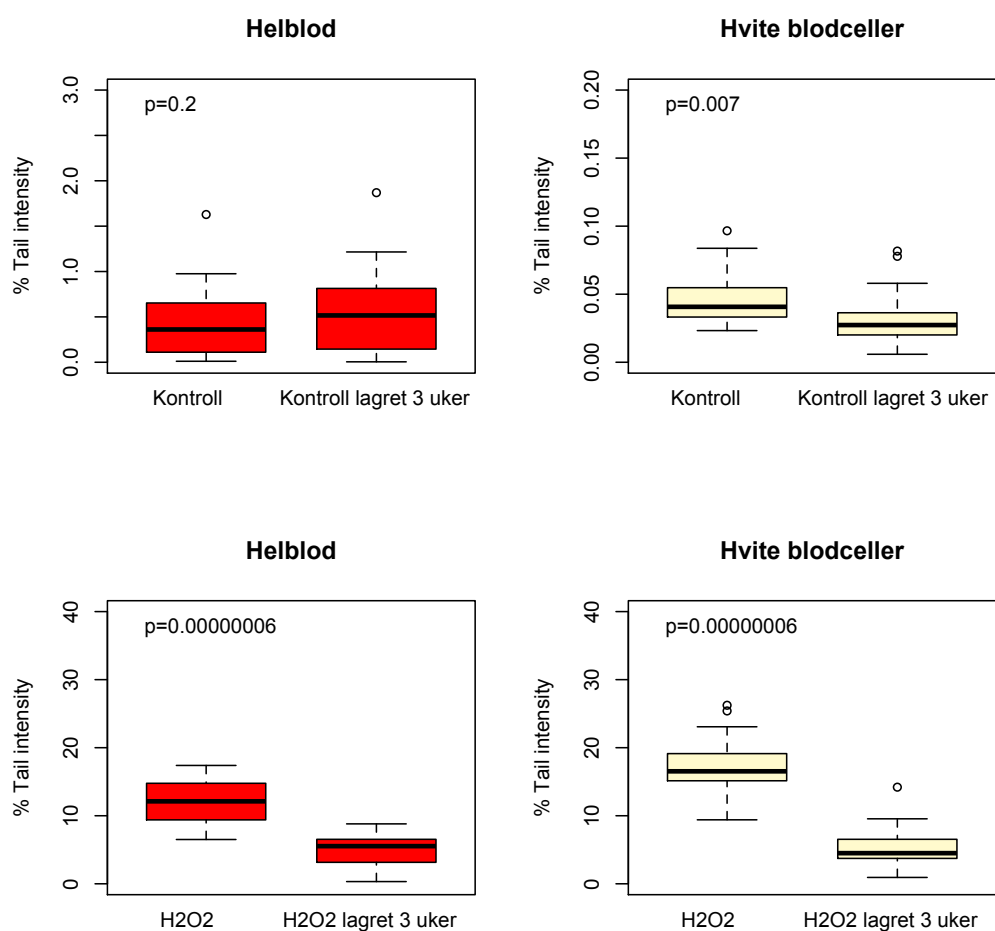
## 3.2 Lagring i lysisbuffer

*Vil tre ukers lagring i lysisbuffer føre til økt skade hos røde eller hvite blodceller fra torsk?*

Resultater for undersøkelser av påvirkning av lagring på prøvene vises i figur 13.

Ubehandlede røde blodceller var ikke signifikant påvirket ( $p=0,2$ ) av lagring i 3 uker.

Ubehandlede hvite blodceller hadde derimot signifikant mindre ( $p=0,007$ ) skader enn prøven som ikke hadde vært lagret. Også for celler eksponert for peroksid var det signifikant mindre skade ( $p<0,05$ ).



**Figur 13** Øverst til venstre: ubehandlede røde blodceller som har ligget i lysis over natten og i 3 uker. Øverst til høyre: ubehandlede hvite blodceller som har ligget i lysis over natten og i 3 uker. Nederst til venstre: røde blodceller som har blitt eksponert for peroksid (15 minutter i 10  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og ligget i lysis over natten og i 3 uker. Nederst til høyre: hvite blodceller som har blitt eksponert for peroksid (15 minutter i 10  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og ligget i lysis over natten og i 3 uker.  $n=5$ . Den nederste linjen i hver bok viser den første kvartilen og den øverste linjen viser den tredje kvartilen. I hver bok er det tegnet en horisontal strek som viser medianen av datasettet. Halene til hver bok er dratt ut til de ytterste målingene, og uteliggere er representert med prikker.



## 4 Diskusjon

Basert på tidligere funn av Fredriksen (2013), Hylland et al. (2017) og Sahlmann et al. (2017) ble det laget et design der det ble undersøkt for naturlig bakgrunnskade, sensitivitet for oksidativ skade, betydningen av reparasjon og lagring over tid i lysisbuffer. Juvenile torsk (*Gadus morhua*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble benyttet. Det ble brukt både røde og hvite blodceller, ettersom fisk har røde blodceller med kjerner som inneholder DNA (Medrano et al., 1990) og derfor kan undersøkes med comet assay, og hvite blodceller siden bruken av assayet på disse allerede er vel etablert både for fisk (Theodorakis et al., 1994, Fredriksen, 2013) og for mennesker (Collins & Azqueta, 2012). Tidligere studier med regnbueørret har blant annet blitt gjort på sperm (Cabrita et al., 2005) og larver (Mitchell et al., 2009).

### *Bakgrunnsnivå av DNA trådbrudd*

Analyser av bakgrunnsnivåer av skade hos torsk og regnbueørret ble utført på ubehandlede røde og hvite blodceller. Både røde og hvite blodceller fra begge arter hadde lave nivåer av DNA-skade (<10% Tail intensity), noe som regnes som akseptable nivåer (Collins, 2004). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i skade mellom røde blodceller fra de to artene, men for de hvite blodcellene var det en forskjell mellom artene. Tidligere undersøkelser av røde blodceller fra sandflyndre har vist varierende nivåer av bakgrunnskade i områder med ulik forurensningsgrad (Hylland et al., 2017). Torsk har tidligere vært vist å være mindre sensitiv for enkelte gentoksiske effekter sammenliknet med andre arter (Rybakovas et al., 2009). Det var derfor interessant å undersøke videre om det fantes forskjeller i bakgrunnsnivåer av skade i ubehandlede røde og hvite blodceller fra torsk. En sammenlikning av cellene viste at det er signifikante forskjeller mellom røde og hvite blodceller, der de hvite blodcellene hadde betydelig lavere nivå av skade enn røde, under 0,2% skade.

Det ble ikke funnet individuelle forskjeller mellom skadenivåene for hvite blodceller, når resultatene ble undersøkt fisk for fisk. Dette er i tråd med at hvite blodceller fra vertebrater tidligere har blitt vist å ha iboende lave nivåer av DNA-skade og er robuste mot å utvikle DNA-trådbrudd (Collins et al., 1995, Collins & Azqueta, 2012). Det ble funnet signifikante

forskjeller i DNA-skade mellom individene i ubehandlede røde blodceller, men alle individene hadde skadenivåer under 10% som regnes som akseptabelt for metoden.

### *Sensitivitet for oksidativ skade*

DNA-skade (% Tail intensity) økte signifikant når cellene ble eksponert for hydrogenperoksid, noe som var forventet siden  $H_2O_2$  induserer oksidativ skade. Men nivåene var fortsatt relativt lave (<30 %), sammenlignet med resultatene i Sahlmann et al. (2017) og Fredriksen (2013), noe som kan indikere en lav sensitivitet for oksidativ skade. Spesifikke celler er forskjellige i sin sensitivitet for DNA-skadende stoffer, og sirkulerende celler virker og være mindre sensitive enn for eksempel gjeller, fordøyelseskjertler og sperm (Frenzilli et al., 2009). Det ble funnet en signifikant forskjell i sensitivitet mellom røde og hvite blodceller, der hvite blodceller var mer sensitive for oksidativ skade enn røde blodceller. Dette er overraskende siden det er forventet at hvite blodceller skal være robuste. Røde blodceller er imidlertid utsatt for oksidativ stress kontinuerlig på grunn av oksygentransport og de har høye nivåer av noen antioksidant enzymer, som glutathion peroksidase (Birben et al., 2012). Sammenlikninger av røde og hvite blodceller fra fisk med comet assay har i liten grad blitt gjort tidligere, da de fleste studier er gjort på hvite blodceller.

### *Reparasjon*

Undersøkelser av reparasjon i cellene ble gjort ved at celler eksponert for hydrogenperoksid fikk inkubere i ulike behandlinger i 24 og 48 timer. Tidligere funn (Sahlmann et al., 2017) viste at det ved inkubering i PBS etter en kort eksponering (10-15 min) for hydrogenperoksid ble observert økte nivåer av skade, noe som også ble funnet i denne studien. Hvorfor dette skjer er ikke åpenbart, men det kan ha sammenheng med akkumulering av cellulær skade som senere resulterer i trådbrudd (Marnett, 2002) og primære reparasjonssteg for DNA-skader (Rastogi et al., 2010, Wilson & Bohr, 2007, Hook & Lee, 2004). Et annet funn i denne studien er at det var mindre skade i celler inkubert i PBS uten EDTA enn i celler inkubert i PBS med EDTA. Dette indikerer at EDTA påvirker cellenes mulighet til reparasjon, sannsynligvis ved å kompleksbinde essensielle metaller (for eksempel Zn) (Kumar & Satchidanandam, 2000) som er nødvendig for funksjonen til reparasjonsenzymer. DNAets reparasjonskapasitet er en

spesielt viktig faktor for cellenes mottagelighet for skade (Depledge, 1998) og små forskjeller i effektiviteten av DNA reparasjon kan resultere i en 10x så stor forskjell i følsomhet for gentoksisk skade (Hemminki, 1991).

Det ble også undersøkt om DNAet i celler inkubert i medium ville bli reparert i større grad enn DNA i celler inkubert i PBS. Cellene inkubert i PBS uten EDTA etter peroksidbehandling hadde de laveste skadenivåene og de ble sammenliknet med celler inkubert i medium. Det ble ikke påvist signifikant lavere nivåer av skade i celler som hadde blitt inkubert i medium i 24 timer sammenliknet med celler som hadde blitt inkubert i PBS uten EDTA i 24 timer. Men det ble funnet signifikant lavere nivå av skade i cellene som hadde inkubert i medium i 48 timer sammenliknet med cellene som hadde inkubert i PBS uten EDTA i 48 timer, noe som indikerer at det er komponenter i medium som enten gir redusert nivå av radikaler eller påvirker enzymaktiviteter (antioksidant-enzymmer og/eller enzymer involvert i ulike steg av DNA reparasjon).

Det ble funnet signifikant høyere nivåer av skade i alle behandlingene etter 48 timer sammenliknet med 24 timer, bortsett for hvite blodceller inkubert i medium. Disse forskjellene kan forklares med akkumulering av cellulær skade som tilslutt resulterer i trådbrudd (Marnett, 2002) eller mellomliggende reparasjonssteg i DNA (Rastogi et al., 2010). Når den intracellulære produksjonen av radikaler blir større enn det som kan absorberes av cellens anti-oksidant forsvarsmekanismer kan dette resultere i oksidativ skade på andre makromolekyler, slik som lipidperoksidering, DNA-trådbrudd eller dannelse av protein-addukter (Livingstone, 2003). Antioksidantaktivitet og mekanismer for DNA-reparasjon, som for eksempel base eksisjon, er viktige prosesser for å begrense skaden produsert av frie radikaler i cellene (Collins et al., 1997). Resultatene viser at inkubering i medium gir høyere grad av DNA reparasjon enn inkubering i PBS.

### *Lagring i lysisbuffer*

DNA-skade nivåer har tidligere blitt vist seg å være stabile i opp til 3 uker når celler lagres i kald lysisbuffer (Collins, 2014, Hylland et al., 2017). I denne studien ble det ikke funnet signifikante forskjeller av skade i ubehandlede røde blodceller som hadde vært lagret i lysisbuffer i tre uker sammenliknet med ubehandlede røde blodceller som hadde ligget i lysisbuffer over natten. Det ble funnet signifikant redusert skade i både røde og hvite

blodceller som hadde blitt eksponert for hydrogenperoksid før lagring i lysisbuffer i 3 uker sammenliknet med celler som etter eksponering for hydrogenperoksid kun lå i lysisbuffer over natten. Det er derfor behov for ytterligere testing av om langtidslagring av celler gir det samme resultater som måling av skade umiddelbart.

## 5 Konklusjoner

Det ble funnet lave naturlige nivåer av trådbrudd i helblod og hvite blodceller fra både torsk og regnbueørret (<10 %), noe som er akseptable nivåer av bakgrunsskade for gjennomføring av comet assay. Det var ikke åpenbar forskjell mellom de to artene eller mellom røde (helblod) eller hvite blodceller.

Både røde og hvite blodceller fra torsk ble funnet å være sensitive for oksidativ skade etter eksponering for hydrogenperoksid, hvite blodceller signifikant mer enn røde blodceller.

Inkubering i 24 t og 48 t etter peroksid-behandling førte til økt grad av skade, i størst grad for behandlinger med EDTA.

Det var ingen økning i skade etter 3 ukers lagring i lysis-buffer sammenlignet med 12 timer i lysis-buffer, verken for ubehandlede og peroksid-behandlede celler.

## 6 Fremtidig forskning

Videre studier av reparasjon bør gjøres over lengre tid, både med og uten eksponering for hydrogenperoksid, med spesielt fokus på rollen EDTA eller andre kompleksbindere spiller for reparasjon. I denne studien fant vi økning av skade når cellene ble holdt etter eksponering for oksidativ stress. Mekanismen(e) for denne utviklingen bør undersøkes videre: Er det en akkumulert oksidativ stress i cellen, hemming av reparasjonsenzymmer eller induksjon av enzymene som kutter DNA? Alle inkuberinger ble gjort ved 4 °C, og fremtidige studier bør undersøke om temperatur kan påvirke resultatet.

Studier av lagring i lysisbuffer bør utføres med langt flere tidsintervaller, der lagring over flere måneder bør undersøkes.

# Litteraturliste

- BARZILAI, A. & YAMAMOTO, K.-I. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 3, 1109-1115.
- BELFIORE, N. M. & ANDERSON, S. L. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489, 97-122.
- BELPAEME, K., COOREMAN, K. & KIRSCH-VOLDERS, M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415, 167-184.
- BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESEN, C., ERZURUM, S. & KALAYCI, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- BOITEUX, S. 1993. New trends in photobiology: Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of Escherichia coli: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19, 87-96.
- BOLOGNESI, C. & CIRILLO, S. 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60, 273-284.
- BRIGHT, J., AYLOTT, M., BATE, S., GEYS, H., JARVIS, P., SAUL, J. & VONK, R. 2011. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 485-493.
- CABRITA, E., ROBLES, V., REBORDINOS, L., SARASQUETE, C. & HERRÁEZ, M. P. 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50, 144-153.
- COLLINS, A., DUŠINSKÁ, M., FRANKLIN, M., SOMOROVSKÁ, M., PETROVSKÁ, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANAYIOTIDIS, M., RAŠLOVÁ, K. & VAUGHAN, N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 139-146.
- COLLINS, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26, 249.
- COLLINS, A. R. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681, 24-32.

- COLLINS, A. R. 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840, 794-800.
- COLLINS, A. R., AI-GUO, M. & DUTHIE, S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*, 336, 69-77.
- COLLINS, A. R. & AZQUETA, A. 2012. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 736, 122-129.
- COTELLE, S. & FERARD, J. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- DEPLEDGE, M. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399, 109-122.
- DRINKWATER, K. F. 2005. The response of Atlantic cod ( *Gadus morhua* ) to future climate change. *ICES Journal of Marine Science*, 62, 1327-1337.
- EL-BIBANY, A. H., BODNAR, A. G. & REINARDY, H. C. 2014. Comparative DNA damage and repair in echinoderm coelomocytes exposed to genotoxicants. *PLOS ONE*, 9, e107815.
- FREDRIKSEN, L. 2013. *Effects of environmental contaminants on Atlantic cod (Gadus morhua) from the inner Oslofjord*. Master thesis, University of Oslo.
- FRENZILLI, G., NIGRO, M. & LYONS, B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681, 80-92.
- GODØ, O. R. 1995. Transplantation-tagging-experiments in preliminary studies of migration of cod off Norway. *ICES Journal of Marine Science*, 52, 955-962.
- GOKSØYR, A., BEYER, J., EGAAS, E., GRØSVIK, B. E., HYLLAND, K., SANDVIK, M. & SKAARE, J. U. 1996. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 33, 36-45.
- GOKSØYR, A., BEYER, J., HUSØY, A.-M., LARSEN, H. E., WESTRHEIM, K., WILHELMSSEN, S. & KLUNGSØYR, 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, 21-35.
- 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, 254-265.
- GUTZKOW, K. B., LANGLEITE, T. M., MEIER, S., GRAUPNER, A., COLLINS, A. R. & BRUNBORG, G. 2013. High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*, 28, 333-340.
- HEMMINKI, K. 1991. Interindividual variation in the level of DNA and protein adducts in humans. *Ecogenetics (Grandjean P, ed)*. London: Chapman & Hall, 217-234.
- HOOK, S. E. & LEE, R. F. 2004. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 66, 1-14.
- HOP, H., GJØSÆTER, J. & DANIELSSEN, D. S. 1992. Seasonal feeding ecology of cod (*Gadus morhua* L.) on the Norwegian Skagerrak coast. *ICES Journal of Marine Science*, 49, 453-461.
- HYLLAND, K., RUUS, A., BØRSETH, J., BECHMANN, R., BARSIENE, J., GRUNG, M., TOLLEFSEN, K. & MYHRE, L. 2006. Biomarkers in monitoring-a review. *NIVA-rapport; 5205*. Norsk institutt for vannforskning.
- HYLLAND, K., RUUS, A., GRUNG, M. & GREEN, N. 2009. Relationships between physiology, tissue contaminants, and biomarker responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 226-233.
- HYLLAND, K., SKEI, B. B., BRUNBORG, G., LANG, T., GUBBINS, M. J., LE GOFF, J. & BURGEOT, T. 2017. DNA damage in dab (*Limanda limanda*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) from European seas. *Marine environmental research*, 124, 54-60.
- KLEINJANS, J. C. S. & VAN SCHOOTEN, F.-J. 2002. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 173-179.
- KRUSKAL, W. H. & WALLIS, W. A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583-621.
- KUMAR, P. & SATCHIDANANDAM, V. 2000. Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)tetraacetate as a blood anticoagulant: preservation of antigen-presenting cell function and antigen-specific proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from stored blood. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 578-583.
- LEVENE, H. 1952. On the power function of tests of randomness based on runs up and down. *The Annals of Mathematical Statistics*, 23, 34-56.

- LIVINGSTONE, D. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154, 427-430.
- MARNETT, L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181, 219-222.
- MARONI, K. 2000. Monitoring and regulation of marine aquaculture in Norway. *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 192-195.
- MEDRANO, J. F., AASEN, E. & SHARROW, L. 1990. DNA extraction from nucleated red-blood-cells *Biotechniques*, 8, 43-43.
- MITCHELL, D. L., ADAMS-DEUTSCH, T. & OLSON, M. H. 2009. Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8, 75-81.
- MITCHELMORE, C. L. & CHIPMAN, J. K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399, 135-147.
- O'BRIEN, C. M., FOX, C. J., PLANQUE, B. & CASEY, J. 2000. Climate variability and North Sea cod. *Nature*, 404, 142.
- OSTLING, O. & JOHANSON, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- R CORE TEAM 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- RASTOGI, R. P., KUMAR, A., TYAGI, M. B. & SINHA, R. P. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- RYBAKOVAS, A., BARŠIENĖ, J. & LANG, T. 2009. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas. *Marine Environmental Research*, 68, 246-256.
- SAHLMANN, A., WOLF, R., HOLTH, T. F., TITELMAN, J. & HYLLAND, K. 2017. Baseline and oxidative DNA damage in marine invertebrates. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 80, 807-819.
- SHAPIRO, S. S. & WILK, M. B. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52, 591-611.

- SHUGART, L. R. 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers.
- SHUGART, L. R. 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
- 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, 184-191.
- SPEIT, G., SCHÜTZ, P., BONZHEIM, I., TRENZ, K. & HOFFMANN, H. 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*, 146, 151-158.
- TABAN, I. C., BECHMANN, R. K., TORGRIMSEN, S., BAUSSANT, T. & SANNI, S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research*, 58, 701-705.
- THEODORAKIS, C. W., D'SURNEY, S. J. & SHUGART, L. R. 1994. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1023-1031.
- TORBERGSEN, A. C. & COLLINS, A. R. 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *European Journal of Nutrition*, 39, 80-85.
- VILENCHIK, M. M. & KNUDSON, A. G. 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 12871-12876.
- WILSON, D. M. & BOHR, V. A. 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA repair*, 6, 544-559.
- WOO, S., KIM, S., YUM, S., YIM, U. H. & LEE, T. K. 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1768-1775.

# Vedlegg

## Vedlegg A: Rådata (median % Tail intensity)

	<b>LysisR</b>	<b>LysisHV</b>	<b>H2O2R</b>	<b>H2O2HV</b>
Torsk 1	0.415469672	0.078987881	15.46704644	15.57075134
Torsk 1	0.374580022	0.045000991	14.81432806	15.70809789
Torsk 1	0.01482047	0.036628813	13.32150503	16.97897375
Torsk 1	0.110793307	0.023840895	12.4978748	14.75395486
Torsk 1	0.529363008	0.028108633	17.39131961	19.13015
Torsk 2	0.039071753	0.040818017	6.508415497	15.26030744
Torsk 2	0.018366048	0.023256986	6.948631945	21.93076122
Torsk 2	0.018088141	0.038051926	8.658877254	18.13236724
Torsk 2	0.010854235	0.064107673	11.87424286	19.9343212
Torsk 2	0.014877433	0.055585941	8.264206046	15.13948898
Torsk 3	0.361108503	0.0364392	9.392982727	20.51150638
Torsk 3	0.15548724	0.054779105	9.093081397	18.35900065
Torsk 3	0.226733659	0.039327623	8.120657314	23.0750602
Torsk 3	0.132665763	0.02326067	10.81538067	26.23521604
Torsk 3	0.353256054	0.083725782	10.17364655	25.3993703
Torsk 4	0.973670709	0.03319511	11.6000618	17.24564684
Torsk 4	1.628303908	0.053232607	12.46241231	16.40993687
Torsk 4	0.833188158	0.096593571	11.49835618	15.37802087
Torsk 4	0.817487194	0.040724207	14.76908393	18.36835675
Torsk 4	0.696683746	0.029201325	12.11821535	16.52995632
Torsk 5	0.364249806	0.041456313	13.30846183	9.977210792
Torsk 5	0.975513008	0.0568676	14.16169696	13.89027572
Torsk 5	0.653289839	0.033214002	15.28408929	15.10900871
Torsk 5	0.153929789	0.039156799	14.86637854	9.401795721
Torsk 5	0.402621509	0.046207151	16.42846255	11.90319332
	<b>Medium24tR</b>	<b>Medium24tHV</b>	<b>Medium48tR</b>	<b>Medium48tHV</b>
Torsk 1	34.2759082	3.25297332	61.23015517	20.3473137
Torsk 1	55.41080917	29.30537853	75.7580162	62.24927139
Torsk 1	39.41209791	13.44846568	61.04533536	64.11505413
Torsk 1	32.07052741	29.44316783	48.28345702	29.15922606
Torsk 1	54.52944631	10.81553673	51.55465235	78.03612916
Torsk 2	25.11287739	1.243801455	75.96520254	NA
Torsk 2	31.40443206	NA	86.95721017	NA
Torsk 2	35.23255839	NA	86.09639143	NA
Torsk 2	44.94142484	NA	88.30052168	NA

Torsk 2	49.65828826	NA	80.3299725	NA
Torsk 3	30.69479908	68.62250216	51.30394767	NA
Torsk 3	24.4615337	75.99495957	49.43162571	NA
Torsk 3	30.29890082	NA	50.26446836	NA
Torsk 3	33.10243061	NA	55.58030036	NA
Torsk 3	45.50864575	NA	68.60918458	NA
Torsk 4	23.24428843	NA	55.42508499	NA
Torsk 4	34.19636411	NA	67.36011322	NA
Torsk 4	55.93515117	NA	76.34949872	NA
Torsk 4	56.3052908	NA	76.31076496	NA
Torsk 4	67.14332214	NA	76.2700293	NA
Torsk 5	20.3951176	NA	13.94317192	NA
Torsk 5	16.3546042	NA	14.98846991	NA
Torsk 5	27.28466446	NA	15.06350183	NA
Torsk 5	33.35198739	NA	15.48994902	NA
Torsk 5	35.49722806	NA	38.26242362	NA
	<b>mEDTA24tR</b>	<b>mEDTA24tHV</b>	<b>mEDTA48tR</b>	<b>mEDTS48tHV</b>
Torsk 1	79.71994854	77.62006649	85.86040563	85.79010376
Torsk 1	85.74886725	71.71941495	87.86039957	78.65660808
Torsk 1	82.43206344	72.61233187	88.9166054	81.37741259
Torsk 1	79.57169663	47.8921848	88.01362073	75.8395191
Torsk 1	82.0435601	67.41246315	89.11795464	79.87334451
Torsk 2	84.99811533	48.25491092	84.72204007	NA
Torsk 2	76.10122183	NA	82.40393536	NA
Torsk 2	76.14648162	NA	83.67034775	NA
Torsk 2	72.90005611	NA	85.23825812	NA
Torsk 2	74.26615706	NA	82.56201351	NA
Torsk 3	81.55194057	NA	89.28196911	88.74773344
Torsk 3	88.49210806	NA	90.65676386	88.96849909
Torsk 3	85.66155808	NA	91.20387903	88.47229835
Torsk 3	86.04447517	NA	90.71438176	NA
Torsk 3	66.6133953	NA	88.73786762	NA
Torsk 4	68.57746711	58.98028885	86.63377618	NA
Torsk 4	77.10665788	62.09890233	88.5289396	NA
Torsk 4	74.3897362	36.67641302	89.69794807	NA
Torsk 4	76.66784168	40.14801877	90.59469846	NA
Torsk 4	68.86062198	51.32855616	89.26396835	NA
Torsk 5	82.0458998	55.11484608	82.06149689	NA
Torsk 5	80.64873079	56.51880016	83.62847803	NA
Torsk 5	80.64368708	48.11742785	82.88737938	NA
Torsk 5	72.98734628	68.66454022	86.15570002	NA
Torsk 5	76.15228939	72.60626361	82.94159334	NA
	<b>uEDTA24tR</b>	<b>uEDTA24tHV</b>	<b>uEDTA48tR</b>	<b>uEDTA48tHV</b>
Torsk 1	24.85402904	27.38822235	88.72895412	69.1185571
Torsk 1	51.03618126	52.76890154	89.49750118	32.52896184
Torsk 1	60.53104156	60.90276327	88.71772324	64.87857119

Torsk 1	66.14135696	57.01042927	91.03690225	67.1276883
Torsk 1	59.17171479	48.98950489	90.21227687	81.74246931
Torsk 2	12.30717407	NA	77.10646209	69.9513502
Torsk 2	14.13678043	NA	81.26322739	NA
Torsk 2	20.15078743	NA	85.37834569	NA
Torsk 2	21.95355444	NA	90.09971108	NA
Torsk 2	23.80851869	NA	85.83373239	NA
Torsk 3	29.43847599	43.79788252	86.6612273	86.92341293
Torsk 3	31.66083105	41.18240517	79.96024713	75.04532633
Torsk 3	26.10258668	71.94065282	83.37732957	83.77121275
Torsk 3	36.5112815	59.36141319	84.69035149	47.67761262
Torsk 3	38.35292023	NA	85.79250196	78.26446904
Torsk 4	30.42234135	NA	73.630176	68.46399471
Torsk 4	35.886836	NA	81.66696338	84.11677576
Torsk 4	37.02337456	NA	83.98854209	65.47836378
Torsk 4	44.14983976	NA	83.60562839	55.11376482
Torsk 4	52.58685796	NA	72.58807256	NA
Torsk 5	75.92342417	NA	80.73079509	92.05607069
Torsk 5	75.32678337	NA	78.7567388	75.20728937
Torsk 5	73.92173133	NA	75.65228287	78.51720984
Torsk 5	71.7545629	NA	83.00497063	67.07035857
Torsk 5	79.760037	NA	79.06273832	NA
	<b>LysislagretR</b>	<b>LysislagretHV</b>	<b>H2O2lagretR</b>	<b>H2O2lagretHV</b>
Torsk 1	0.330246373	0.081677678	6.535564245	8.444340693
Torsk 1	0.714882666	0.025537597	6.189362625	4.326670884
Torsk 1	0.241458335	0.058000482	7.716151875	7.192374248
Torsk 1	0.709166269	0.053330722	8.805177656	3.730576397
Torsk 1	1.074863431	0.077827927	7.895164481	6.450696043
Torsk 2	0.015154126	0.027608252	2.444551221	1.624385736
Torsk 2	0.004706693	0.027325503	1.626051001	0.933648907
Torsk 2	0.023917744	0.03091737	2.418090709	4.237092245
Torsk 2	0.012813127	0.036366831	0.325111283	2.073246741
Torsk 2	0.032269099	0.02006716	2.272235008	1.099938047
Torsk 3	0.228881699	0.042459747	3.200015025	5.427524981
Torsk 3	0.204025696	0.017600988	3.153761306	9.548952759
Torsk 3	0.293926249	0.015404935	4.499521899	5.010294644
Torsk 3	0.058501337	0.022856343	3.022732939	14.19821774
Torsk 3	0.144763583	0.038579109	5.017387462	8.850553352
Torsk 4	0.813805971	0.021126182	6.428663694	5.159200215
Torsk 4	0.728306116	0.030358459	6.632500105	6.537576242
Torsk 4	1.086246924	0.018538477	6.29514873	4.461605731
Torsk 4	0.515989467	0.029388363	7.7301053	8.907022607
Torsk 4	0.572073037	0.007363185	6.536959831	5.688092821
Torsk 5	0.558059891	0.022126843	4.968358852	4.354480855
Torsk 5	1.165099997	0.029179472	5.440265328	4.048152337
Torsk 5	1.071350131	0.015948771	5.532796435	4.501480362

Torsk 5	1.215635401	0.005861725	5.751846833	3.136023186
Torsk 5	1.868952005	0.021373721	6.463630217	3.348277453
	<b>ØrretR</b>	<b>ØrretHV</b>		
Ørret 1	0.269012603	0.051319264		
Ørret 1	0.196008379	0.110183189		
Ørret 2	0.613295143	0.209587877		
Ørret 2	3.382397461	0.189768934		
Ørret 3	0.223886629	0.239575181		
Ørret 3	0.240658086	0.200177461		
Ørret 4	0.581723635	0.575381155		
Ørret 4	1.807011016	0.293350402		

## Vedlegg B: Produkter og leverandører

<b>Produkt</b>	<b>Leverandør</b>
Destillert vann (dH <sub>2</sub> O)	Lokalt produsert
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma
Foetal calf serum (FCS)	Sigma
GelBond®	VWR
Hydrogenklorid (HCl)	VWR
Kaliumdihydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
Low melting point (LMP) agarose	Sigma
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma
Natriumhydrogenfosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma
Natriumklorid (NaCl)	VWR
Natriumhydroksid (NaOH)	VWR
Percoll	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS) EDTA	VWR
SYBR®Gold	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trizma-HCl	Sigma



Trizma-base

Sigma