

Interaksjoner mellom marine næringsstoffer og dioksiner hos mus med human AhR

Kristin Håberg

Masteroppgave i molekylærbiologi



Institutt for biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Bergen

November 2021

Interaksjoner mellom marine næringsstoffer og dioksiner hos mus med human AhR

Kristin Håberg

Masteroppgave i molekylærbiologi



Havforskningsinstituttet

November 2021

FORORD

Arbeidet med masteroppgaven ble utført ved forskningsgruppe Sjømat og ernæring ved Havforskningsinstituttet (HI) i Bergen fra januar 2020 til november 2021.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Ole Jakob Nøstbakken for god oppfølging gjennom hele året, hvor jeg og spørsmålene jeg har hatt alltid har blitt møtt med entusiasme og positiv innstilling. Takk også til alle ved sjømat og ernæring og ved molekylærbiologisk laboratorium som har tatt seg tid til å svare på spørsmål underveis, og som alltid har fått meg til å føle meg velkommen. Særlig vil jeg takke Hui-Shan Tung for god og omfattende opplæring i qPCR.

Takk til medstudenter ved HI for hyggelige lunsjpauser, diskusjoner og generelt sett et veldig fint studiemiljø. Jeg vil også takke mamma og pappa, familie og venner for støtte og oppmuntring gjennom året.

Bergen, november 2021

Kristin Håberg

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord.....	5
Forkortelser	8
Sammendrag.....	9
1. Introduksjon.....	10
1.1 Dioksiner og dioksinlignende forbindelser	10
1.2 Aryl hydrokarbon reseptor og cytokrom P450 1A	12
1.3 Toksikokinetikk og toksikodynamikk	14
1.4 Næringsstoffer og fremmedstoffer i sjømat	15
1.5 Tolerabelt ukentlig inntak	16
1.6 Artsspesifikke forskjeller i dioksintoksisitet.....	17
1.7 Reproduksjon og reproduktiv toksisitet.....	18
1.8 Mål	20
2. Materialer	22
2.1 Kjemikalier og reagenser.....	22
2.2 Kommersielle kits.....	23
2.3 Utstyr og instrumenter.....	23
2.4 Programvare	24
2.5 Primere til qPCR	25
2.6 Buffere og løsninger benyttet til SDS-PAGE og western blotting.....	25
2.7 Reaksjonsmikser og program benyttet til qPCR	26
2.7.1 Reaksjonsmikser og program for <i>OneStep RT-PCR</i>	26
2.7.2 Reaksjonsmikser og program for cDNA-syntese	26
2.7.3 Reaksjonsmikser og program for qPCR	27
3. Metoder	28
3.1 Eksperimentelt oppsett	28
3.2 Dyreforsøk.....	28
3.3 Homogenisering av vevsprøver og måling av proteininnhold.....	28
3.4 Western blotting	29
3.4.1 Natriumdodecylhydrogensulfat-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)	29
3.5.2 Western Blot.....	30
3.5.3 Normalisering mot totalt protein ved Stainfree-teknologi.....	30
3.5 ELISA.....	31
3.6 Kvantitativ polymerase kjedereaksjon	31
3.6.1 RNA-ekstraksjon	31
3.6.2 Måling av RNA-kvalitet.....	32

3.6.3 OneStep RT-PCR	32
3.6.4 cDNA-syntese	33
3.6.5 Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR)	33
3.6.6 Databehandling.....	34
3.7 Kvantifisering av fettinnhold i lever.....	34
3.8 Statistikk.....	34
4. Resultater.....	36
4.1 Vekt og organvekt	36
4.2 Fettsyreanalyser.....	37
4.3 Leverenzzymer	38
4.4 Nivåer av LH og T i plasma	39
4.5 Histologi.....	40
4.6 Spermkonsentrasjon	44
4.7 Western Blot.....	45
4.8 Kvantitativ PCR	49
5. Diskusjon.....	53
5.1 Metodologi	53
5.1.1 Western Blot.....	53
5.1.2 Kvantitativ PCR	54
5.1.3 ELISA.....	56
5.2 Dosering og eksponeringstidspunkt	56
5.3 Dioksin påvirket ikke HPG-akse og spermatogenese.....	57
5.4 Dioksin og laks ga induksjon av CYP1A1 i lever	59
5.5 Genuttrykk ble ikke påvirket av dioksin eller av laks	60
5.6 Laks påvirket kroppsvekt, levervekt og fettakkumulering i lever	61
5.7 Artsspesifisitet og relevans for human toksikologi	62
6. Konklusjon	64
Videre arbeid	64
Referanser.....	66

FORKORTELSER

AhR	Aryl hydrokarbon reseptor
AIP	Aryl hydrokarbon reseptor interagerende protein
ALT	Alanin transaminase
ANOVA	Variansanalyse
ARNT	Aryl hydrokarbon reseptor kjernetranslokator
AST	Aspartat transaminase
BSA	Bovint serum albumin
cDNA	Komplementær DNA
CONTAM	Kontaminanter i matkjeden
CYP	Cytokrom P450
DHA	Dokosaheksaensyre
dl-PCB	Dioksinlignende polyklorert bifenyl
EFSA	Den europeiske myndighet for matvaretrygghet
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Eikosapentaensyre
FSH	Follikkelstimulerende hormon
GnRH	Gonadotropinfrigjørende hormon
HPG	Hypotalamus-hypofyse-gonade
HRP	Pepperrotperoksidase
HSP90	Varmesjokkprotein 90
LH	Luteiniserende hormon
NOAEL	No observed adverse effect level
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCB	Polyklorert bifenyl
PCDD	Polyklorert dibenzodioksin
PCDF	Polyklorert dibenzofuran
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
SD	Standardavvik
SDS-PAGE	Natriumdodecylhydrogensulfat polyakrylamid gelektroforese
TEF	Toksiske ekvivalensfaktorer
TEQ	Toksiske ekvivalenter
TWI	Tolerabelt ukentlig inntak
VKM	Vitenskapskomiteen for mat og miljø
WHO	Verdens helseorganisasjon
XRE	Xenobiotisk responselement

SAMMENDRAG

Dioksiner og dioksinlignende PCB er en gruppe kjemiske forbindelser dannet via industrielle prosesser, som grunnet høy persistens vil akkumulere i fettvev hos mennesker og dyr. Fet fisk regnes som den største kilden til dioksiner i kostholdet, men anbefales også å inngå i kostholdet grunnet høyt innhold av omega-3-fettsyrer og andre essensielle næringsstoffer. Dioksiner har blitt knyttet til en rekke toksiske effekter mediert av transkripsjonsfaktoren aryl hydrokarbon reseptor, hvorav reproduktiv toksisitet regnes blant de mest sensitive. Effekter på spermkvantitet ble også valgt ut som kritisk effekt ved en revurdering av tolerabelt ukentlig inntak (TWI) for dioksiner gjort av EFSA i 2018, hvor TWI ble redusert fra 14 til 2 pg TEQ/kg kroppsvekt/uke. Det har imidlertid blitt vist betydelige artsforskjeller for respons for enkelte kongener, særlig for PCB126.

Målet for dette prosjektet har vært å undersøke effekten av utvalgte dioksin kongener (TCDD, HxCDF og PCB126) og av laks i dietten på reproduktiv toksisitet hos mus med human AhR. For å oppnå dette ble det benyttet materiale fra et dyreforsøk utført tidligere ved HI. I dette forsøket ble musene gitt diett med og uten de aktuelle kongenerne, samt med eller uten laks. Reproduktiv toksisitet som følge av den eksperimentelle behandlingen ble undersøkt ved endepunktene spermkonsentrasjon, testikkelvekt- og morfologi og konsentrasjoner av luteiniserende hormon (LH) og testosteron i plasma. Proteinuttrykk av CYP1A1 ble undersøkt i lever ved Western blot, og det ble målt genuttrykk for *CYP1A1*, *CYP1A2* og gener relatert til oksidativt stress og spermatogenese ved qPCR.

Det ble ikke sett effekter på reproduksjon som følge av dioksineksponering i denne studien, verken med hensyn på hormonskonsentrasjoner, påvirkning på testikler, spermkonsentrasjon eller genuttrykk. Det ble sett en induksjon av CYP1A1 på proteinnivå for gruppene som hadde fått dioksin, laks eller en kombinasjon av disse. Det var imidlertid i liten grad forskjell i uttrykk mellom kongenerne, og det ble ikke sett behandlingsrelaterte endringer på for uttrykk av *CYP1A1* på gennivå. Laks førte i tillegg til økt kropps- og levervekt samt økt fettakkumulering i lever. Resultatene fra forsøket kan indikere at den benyttede dosen ikke var tilstrekkelig til å påvirke reproduksjon hos mus med human AhR, potensielt på grunn av artsforskjeller i AhRs affinitet for dioksin og sekvestrering av dioksin som følge av økt fettakkumulering. Grunnet eksperimentelle utfordringer vil imidlertid ytterligere validering være nødvendig for flere av resultatene.

1. INTRODUKSJON

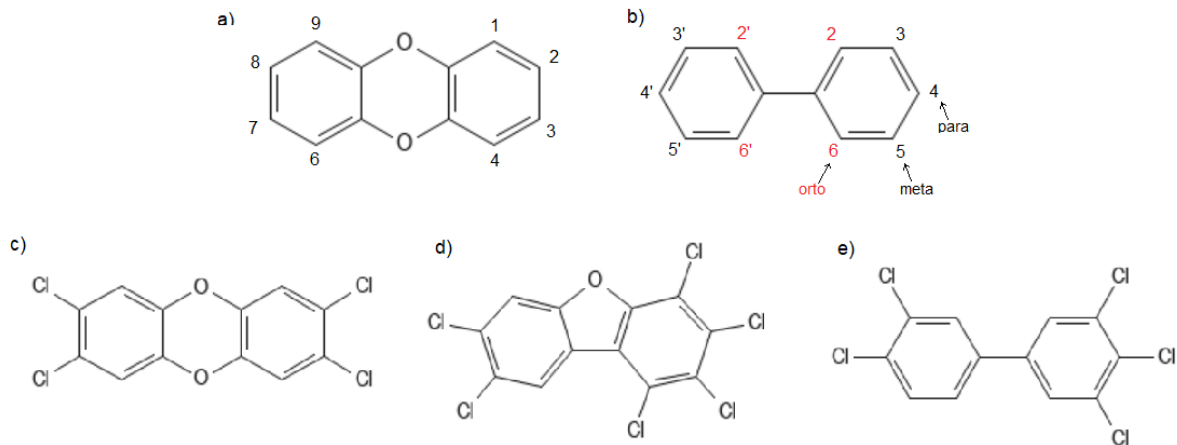
1.1 DIOKSINER OG DIOKSINLIGNENDE FORBINDELSER

Dioksiner og dioksinlignende forbindelser brukes som en fellesbetegnelse for en stor gruppe strukturelt relaterte organiske forbindelser, som inkluderer stoffgruppene polyklorerte dibenzo-*p*-dioksiner (PCDD), polyklorerte dibenzofuraner (PCDF) og dioksinlignende polyklorerte bifenyler (dl-PCB). De har blitt knyttet til en rekke toksiske effekter som oppstår via en felles mekanisme mediert av transkripsjonsfaktoren aryl hydrokarbon reseptor (AhR) (White og Birnbaum, 2009).

PCDD-er og PCDF-er består begge av trisykliske, planare forbindelser med opptil 8 klorsubstituenten (figur 1.1a, c, d). Variasjon i antall og plassering for kloratomene gir opphav til henholdsvis 75 og 135 ulike PCDD- og PCDF-forbindelser (kongenere) med varierende toksisitet (Srogi, 2008). Blant disse er først og fremst kongenere med klorsubstitusjon i posisjonene 2, 3, 7 og 8 relevante i toksikologisk sammenheng, ettersom disse fungerer som ligander for AhR og i liten grad deltar i metabolske reaksjoner slik at de er svært persistente (Lindén et al., 2010). Ytterligere klorering utenom 2,3,7,8-posisjonene gir generelt lavere toksisitet, og 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) regnes derfor som den mest toksiske kongeneren (Lindén et al., 2010). PCDD- og PCDF-forbindelser har ingen industrielle eller teknologiske bruksområder, men kan dannes som uønskede biprodukter ved blant annet produksjon av klorholdige kjemikalier, klorbleking av papirmasse, og avfallsforbrenning og andre forbrenningsreaksjoner hvor klorerte forbindelser er til stede (Rappe, 1994). Strengere regulering av blant annet avfallshåndtering og produksjon av klorholdige kjemikalier har ført til betydelig reduserte utslipp av dioksiner fra industrielle kilder i Europa de siste tiårene (EFSA CONTAM, 2018).

Polyklorerte bifenyler (PCB) er i likhet med PCDD/F-er kjemisk stabile, og dette samt egenskaper som ikke-brennbarhet, lav akutt toksisitet, høyt kokepunkt og lav varmeledningsevne gjorde dem attraktive i industriell sammenheng (Borja et al., 2005). De var derfor i utstrakt produksjon fram til 1970-tallet, da større bevissthet rundt persistens og helse- og miljøeffekter førte til at produksjonen opphørte i de fleste land (EFSA CONTAM, 2018). Kun kongenere som kan innta en planar struktur er i stand til å fungere som ligander for AhR og dermed gi dioksinlignende toksisitet. Dette bestemmes i stor grad av posisjonene til kloratomene, ettersom substitusjon i *orto*-posisjoner gir økt sterisk hindring slik at en planar

konformasjon ikke er mulig (figur 1.1b). PCB-kongenere kategoriseres derfor videre som dioksinlignende eller ikke-dioksinlignende, hvor 12 mono-*orto* eller non-*orto* forbindelser med minst fire kloratomer utgjør de dioksin-lignende PCB-ene, og de øvrige 197 mulige forbindelsene regnes som ikke-dioksinlignende (EFSA CONTAM, 2018).



Figur 1.1: Dioksiner og dioksinlignende PCB. A: Generell struktur for polyklorerte dibenzo-p-dioksiner. B: Generell struktur for polyklorerte bifenyler, med *orto*-posisjoner markert i rødt. C-E: Polyklorerte dibenzo-p-dioksiner, polyklorerte dibenzofuraner og dioksinlignende polyklorerte bifenyler eksemplifisert ved 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) (C), 1,2,3,4,7,8-heksaklorodibenzofuran (D) og 3,3',4,4',5-pentaklorobifenyl (PCB126) (E).

Dioksiner og dioksinlignende PCB finnes generelt som komplekse blandinger heller enn som spesifikke kongenere. Dette, samt de store forskjellene i potensitet som finnes mellom ulike kongenere, har gjort det nødvendig å opprette et system for sammenligning av ulike dioksinblandinger som mennesker eksponeres for. TEF-verdier har derfor blitt satt for 17 PCDD/F-kongenere med klorsubstitusjon i 2,3,7,8-posisjoner og 12 dioksinlignende PCB-er (EFSA CONTAM, 2018). TEF-verdiene gir et estimat for potensiteten til hver kongener relativt til TCDD, som siden den regnes som den mest toksiske kongeneren gis verdien 1. Ved å multiplisere konsentrasjonen av hver kongener med sin TEF-verdi og addere disse produktene fås en TEQ-verdi for blandingen. TEF/TEQ-systemet legger da til grunn en antakelse om ren additiv effekt for kombinasjonen av kongenerne, og at alle kongenerne deler samme AhR-medierte virkemåte (Van den Berg et al., 2006). TEF-verdiene har blitt revurdert flere ganger siden konseptet ble innført på 80-tallet, senest i 2005 (Van den Berg et al., 2006). Et utvalg av WHO₂₀₀₅-TEF-verdiene, som benyttes i denne oppgaven, er gitt i tabell 1.1.

Tabell 1.1: Utvalgte WHO₂₀₀₅-TEF-verdier. Verdiene er hentet fra Van den Berg et al. (2006).

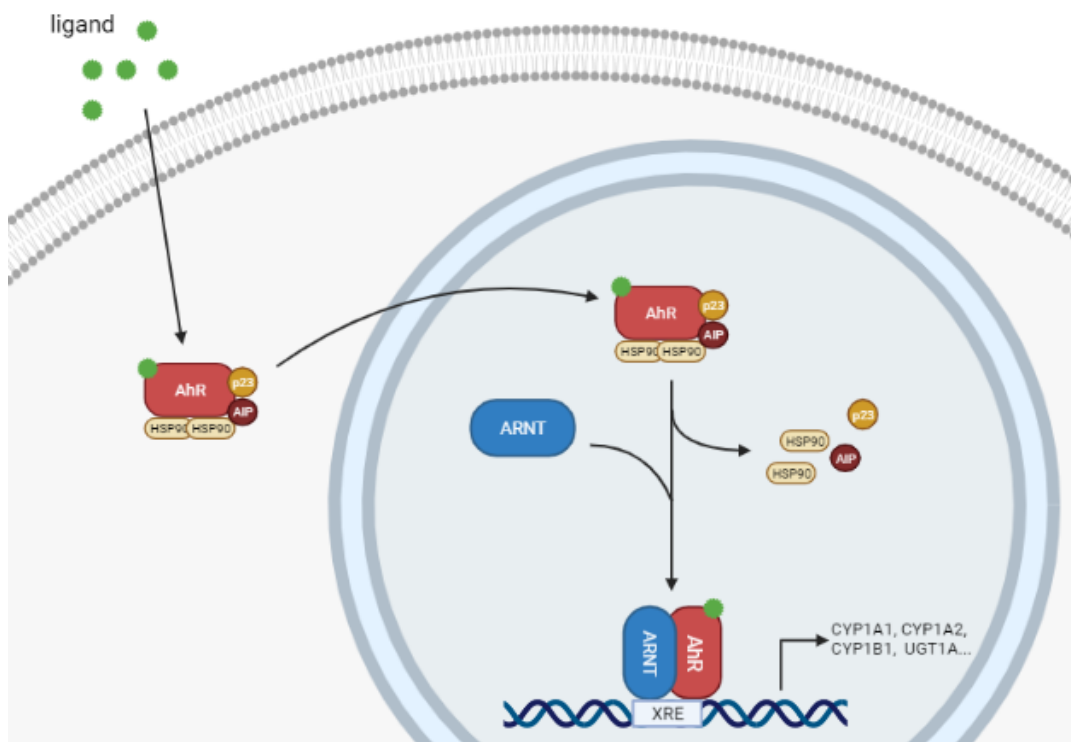
PCDD-er og PCDF-er		dl-PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	PCB 77	0.0001
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 81	0.0003
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	PCB 126	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	PCB 169	0.03
OCDD	0.0003	PCB 105	0.00003
2,3,7,8-TCDF	0.1	PCB 114	0.00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0.03	PCB 118	0.00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01		
OCDF	0.0003		

1.2 ARYL HYDROKARBON RESEPTOR OG CYTOKROM P450 1A

Aryl hydrokarbon reseptor (AhR) tilhører basisk heliks-loop-heliks/PER ARNT Sim-familien (bHLH/PAS) av transkripsjonsfaktorer, og knyttes først og fremst til sine funksjoner innen metabolisme og toksisitet for dioksiner og andre halogenerte aromatiske hydrokarboner (Lindén et al., 2010). AhR har en modulær struktur, med flere ulike domener som alle bidrar til korrekt fungering. I likhet med de andre proteinene i bHLH/PAS-familien har den nær N-terminal et basisk heliks-loop-heliks motiv som deltar i DNA-binding, og PAS-domener som deltar i binding til andre proteiner med PAS-domener. I tillegg har AhR et transaktiveringsdomene, et kjernelokaliseringssignal, og som det eneste ligandaktiverede medlemmet av bHLH/PAS-familien et ligandbindingssted (Furness et al., 2007).

AhR er konserverte mellom ulike arter (Hahn, 2002) og er uttrykt i de fleste vevstyper (Foster et al., 2010). En rekke aromatiske forbindelser kan fungere som ligander for AhR, inkludert dioksiner og dioksinlignende PCB, og andre halogenerte og polysykliske aromatiske hydrokarboner (Tian et al., 2015). AhR finnes i inaktiv form i cytosol, hvor den stabiliseres av aryl hydrokarbon reseptor interagerende protein (AIP), p23 og to molekyler varmesjokkprotein 90 (HSP90) (Denison et al., 2002). Ligandbinding gir en konformasjonsendring i AhR som tillater translokasjon til cellekjernen, hvor chaperonproteinene dissosierer og AhR i stedet binder AHR kjernetranslokator (ARNT). AhR-ARNT-dimere kan så binde xenobiotisk respons-elementer (XRE) som finnes i tilknytning til AhR-regulerte gener, og gi endret uttrykk

av disse gjennom mekanismer som inkluderer rekruttering av kofaktorer, remodellering av kromatin og økt promotertilgang (DeGroot et al., 2011).



Figur 1.2: Klassisk reaksjonsvei for AhR. AhR er i ubundet form lokalisert i cytosol, i kompleks med chaperonproteinene p23, AIP og HSP90. Ligandbinding gir en konformasjonsendring som tillater AhR å gå inn i kjernen, hvor chaperonproteinene løsner og AhR i stedet binder ARNT. Binding av AhR-ARNT til xenobiotisk respons-elementer i tilknytning til AhR-regulerte gener gir økt uttrykk av en rekke gener som deltar i biotransformasjon av fremmedstoffer, deriblant CYP1A1. *Created with BioRender.com*

Blant genene som konsistent reguleres av AhR finnes CYP1A1, samt flere andre enzymer som deltar i biotransformasjon av fremmedstoffer. CYP1A1 er blant de best studerte AhR-regulerte genene, og har blitt brukt som en indikator for AhR-aktivering og dioksintoksisitet siden det vanligvis kun finnes i lave nivåer i celler, men konsistent induseres ved AhR-aktivering (Safe, 1995). I likhet med de andre medlemmene av cytokrom P450-familien er CYP1A1 en monooksygenase som katalyserer tilføyelse av en hydroksylgruppe til substratene. Dette øker vannløseligheten til substratene, slik at de enklere kan skilles ut av kroppen/cellen eller eventuelt fungere som substrater i videre reaksjoner. CYP1A1 har en bred substratspesifisitet, og har stor betydning for metabolisme og detoksifisering av fremmedstoffer (Mescher og Haarmann-Stemann, 2018).

1.3 TOKSIKOKINETIKK OG TOKSIKODYNAMIKK

Toksikokinetikk og toksikodynamikk er mye brukte begreper innen toksikologi som sammen beskriver et fremmedstoffs skjebne og påvirkning på en organisme. Toksikokinetikk beskriver kroppens behandling og omsetning av fremmedstoffer, og deles ofte inn i absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon. Dioksiner kan tas opp både via fordøyelsessystemet, respirasjonssystemet og gjennom huden. For mennesker antas imidlertid over 90% av total eksponering å komme fra mat, og da hovedsakelig animalske produkter (EFSA CONTAM, 2018). Absorberte dioksiner distribueres videre til hele kroppen via blodbanen, men vil som lipofile molekyler hovedsakelig lagres i fettvev og i lever. Kongenere med lav grad av klorsubstitusjon metaboliseres kun i svært begrenset grad av enzymer som deltar i biotransformasjon av fremmedstoffer, slik at de vil akkumulere i organismer og biomagnifiseres oppover i næringskjeder (EFSA CONTAM, 2018). Halveringstid avhenger hos mennesker blant annet av mengden man eksponeres for, kjønn, alder og BMI, men regnes for TCDD hos voksne til å være rundt 7-11 år (Milbrath et al., 2009).

Toksikodynamikk beskriver på den annen side fremmedstoffers interaksjoner med målmolekyler og effektene fremmedstoffene forårsaker i kroppen. Dioksineksponering har blitt knyttet til en rekke ulike effekter, blant annet levertoksisitet, reproduktiv og utviklingsmessig toksisitet, karsinogenisitet og forstyrrelse av immunsystem, metabolisme og hormonsystem (White og Birnbaum, 2009). Leveren er generelt sensitiv for påvirkning fra toksikanter grunnet sin rolle innen detoksifisering og metabolisme av komponenter fra mat, og kan også i stor grad påvirkes av dioksiner (Hassoun et al., 2000). Dioksiner har også blitt vist å kunne virke hormonforstyrrende ved lave doser, og særlig reproduktiv og utviklingsmessig toksisitet regnes blant de mest sensitive dioksinmedierte effektene (EFSA CONTAM, 2018).

AhRs involvering i dioksintoksisitet er klart etablert gjennom en rekke studier. Blant annet har det blitt vist en sammenheng mellom ulike dioksinkongeneres affinitet for AhR og deres toksisitet (Poland og Knutson, 1982), og i studier med AhR-knockout mus har en rekke toksiske effekter etter dioksineksponering kun blitt sett hos mus med fungerende AhR (Fernandez-Salguero et al., 1996). I tillegg har typiske effekter av dioksineksponering blitt sett hos mus med kontinuerlig aktiv AhR, selv uten dioksineksponering (Brunnberg et al., 2006). De molekylære mekanismene bak AhR-mediert toksisitet er derimot ikke fullt forståtte, men flere virkemåter og mekanismer har blitt foreslått. CYP1A1 og andre biotransformasjonsenzymer induert ved den klassiske mekanismen for AhR kan for noen AhR-ligander, for eksempel benzo(a)pyren, gi økt toksisitet ved bioaktivering av liganden til mer reaktive metabolitter (Ma

og Lu, 2007). CYP1A1 kan også bidra til dannelse av oksidativt stress via ufullstendige elektronoverføringer som gir genering av reaktive oksygenforbindelser (Dalton et al., 2002). Bioaktivering har liten betydning for dioksintoksisitet ettersom dioksiner i liten grad er metaboliserbare ved CYP-enzymmer. Oksidativt stress antas derimot i stor grad å være involvert i dioksinmedierte toksiske responser (Stohs, 1990).

I tillegg til gener involvert i biotransformasjon av fremmedstoffer regulerer AhR også en stor mengde andre gener, blant annet innen cellevekst og metabolisme (Barouki et al., 2007). Videre har direkte interaksjoner med flere andre reseptorer og transkripsjonsfaktorer blitt vist, blant annet østrogenreseptor og androgenreseptor (Ohtake et al., 2008). AhR har derfor blitt beskrevet som en xenosensor som fører sammen ulike reaksjonsveier, slik at cellen kan respondere adaptivt på fremmedstoffer (Tian et al., 2015). Samtidig har AhR funksjoner innen normal celledyrking, blant annet relatert til cellevekt og til homeostase for lever og immunsystem (Barouki et al., 2007). Det har derfor også blitt foreslått at AhR-mediert toksisitet oppstår som følge av upassende eller langvarig aktivering av reseptoren som forstyrrer dens endogene funksjoner, heller enn aktivering i seg selv (Bock og Köhle, 2006).

1.4 NÆRINGSSTOFFER OG FREMMEDSTOFFER I SJØMAT

Sjømat har et høyt innhold av flere essensielle næringsstoffer, men er også en betydelig kilde til miljøgifter. Blant annet regnes sjømat, og da spesifikt fet fisk, for å utgjøre det største bidraget av dioksiner og dioksinlignende PCB i kostholdet (EFSA CONTAM, 2018). Både positive effekter fra næringsstoffer og negative effekter fra miljøgifter må derfor tas hensyn til ved utarbeiding av kostråd og risikovurderinger. Positive helseeffekter fra blant annet jod, selen, vitamin D og omega-3 fettsyrer har imidlertid gjentatte ganger blitt vurdert til å veie opp for mulige negative effekter fra miljøgifter (Hellberg et al., 2012, Mozaffarian og Rimm, 2006, Sioen et al., 2008, VKM, 2014). I de nasjonale kostrådene for Norge blir det derfor anbefalt å innta 2-3 fiskemiddager (tilsvarende 300-450 g) i uka, hvorav minst 200 g bør være fet fisk (Helsedirektoratet, 2016).

Jod og selen er begge mineraler som er nødvendige i små mengder for å opprettholde normale kroppslige funksjoner. Jod er en komponent i hormonene T3 og T4 som skilles ut fra skjoldkjertelen (VKM, 2014), og mange selenholdige proteiner (selenoproteiner) har viktige funksjoner blant annet som antioksidanter, antiinflammatoriske enzymer eller innen

hormonproduksjon (Rayman, 2012). Vitamin D er viktig for opprettholdelse og utvikling av skjelett og bidrar til regulering av kalsium- og fosfatnivåer i blodet (VKM, 2014).

Flerumettede fettsyrer deles inn etter antallet karbonatomer fra metylenden av molekylet til første dobbelbinding, og både omega-3- og omega-6-fettsyrer har viktige funksjoner i kroppen (Wathes et al., 2007). Blant de essensielle omega-3-fettsyrene finnes de marine fettsyrene dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA), som i en rekke studier har blitt knyttet til positive effekter på kardiovaskulær helse og redusert mortalitet fra hjerte- og karsykdommer (Kris-Etherton et al., 2003, Abeywardena og Patten, 2011, Mozaffarian og Wu, 2011). Kardioprotektive effekter av omega-3-fettsyrer inkluderer reduksjon av triglyserider i plasma, reduksjon i hjerterate og blodtrykk og anti-trombotiske og anti-inflammatoriske effekter (Mozaffarian og Wu, 2011). EPA og DHA har også blitt vist å kunne redusere oksidativt stress i celler, og via mekanismer relatert til dette ha innvirkning på dioksintoksisitet (Majkova et al., 2011, Türkez et al., 2012). I tillegg er det mulig at nivåene av omega-3-fettsyrer og CYP1A1 gjensidig påvirker hverandre, ettersom CYP-enzymet deltar i metabolisme av fettsyrer (Hankinson, 2016, Konkel og Schunck, 2011) samtidig som EPA og DHA har blitt vist å kunne redusere dioksinmediert induksjon av CYP1A1 (Gdula-Argasińska et al., 2015, Wiest et al., 2016).

1.5 TOLERABELT UKENTLIG INNTAK

Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA) er et byrå tilknyttet Den europeiske union (EU), som har som formål å gi uavhengige, vitenskapelige vurderinger og bistå Europakommisjonen, Europaparlamentet og EUs medlemsland i spørsmål som angår mattrygghet. EFSA's panel for kontaminanter i næringskjeden (CONTAM) gjennomførte i 2018 en revurdering av dioksiner og dioksinlignende forbindelser i mat som omfattet effekter, forekomst og risiko for dioksiner hos mennesker og dyr, hvor tolerabelt ukentlig inntak (TWI) ble redusert fra 14 til 2 pg TEQ/kg kroppsvekt (EFSA CONTAM, 2018). TWI brukes ofte i risikovurderinger, og defineres som den maksimale mengden av et stoff som kan inntas ukentlig gjennom livet uten nevneverdig risiko for negative helseeffekter (VKM, 2014). Tolerabelt ukentlig inntak brukes som regel fremfor tolerabelt daglig inntak for dioksiner og andre stoffer med lang halveringstid og stor evne til bioakkumulering.

I en tidligere risikovurdering gjort i 2001 ble TWI for dioksiner og dioksinlignende forbindelser i mat satt til 14 pg TEQ/kg kroppsvekt. Dette ble gjort med grunnlag i dyrestudier, blant annet

Faqi et al. (1998) og Ohsako et al. (2001) hvor effekter på reproduksjonssystem ble sett hos avkom av eksponerte rotter ved lave doser (EFSA CONTAM, 2018). Ingen studier av effekter hos mennesker ble på dette tidspunktet funnet å tilfredsstille kravene som ble satt for gjennomgangen. I 2018 ble det gjort en ny vurdering hvor også studier publisert etter 2001, deriblant studier på mennesker, ble inkludert. Redusert spermkvalitet sett i Russian Children's Study og i Seveso ble i denne gjennomgangen valgt ut som kritisk effekt (EFSA CONTAM, 2018). I 1976 førte en eksplosjon på en kjemisk fabrikk i nærheten av Seveso til store utslipp av TCDD, og i studier gjort i etterkant ble det blant annet funnet endringer i spermkonsentrasjon og -motilitet hos menn eksponert i puberteten eller tidligere (Mocarelli et al., 2008). I Russian Children's Study ble 516 gutter eksponerte for høye bakgrunnsnivåer av dioksiner fulgt over 10 år, og det ble funnet en assosiasjon mellom nivå av TCDD i serum og redusert spermkvalitet, med en NOAEL på 7.0 pg TEQ/g fett (Mínguez-Alarcón et al., 2017). TWI ble da på grunnlag av denne verdien redusert til 2 pg TEQ/kg kroppsvekt, ettersom inntak høyere enn denne verdien ble estimert til å gi høyere dioksinnivåer enn NOAEL-verdien bestemt fra Russian Children's Study.

1.6 ARTSSPESIFISKE FORSKJELLER I DIOKSINTOKSISITET

Det har i flere studier blitt vist at ulike arter og stammer responderer ulikt på dioksineksponering, både med hensyn til TCDDs affinitet for AhR, hvilke effekter som ses og hvilke gener som induseres ved AhR-aktivering (Flaveny et al., 2009b, Carlson et al., 2009, Larsson et al., 2015). Ulike arter kan i tillegg ha ulik sensitivitet for spesifikke kongenere eller grupper av kongenere, slik at potensitet for kongenere relativt til TCDD også kan variere (Carlson et al., 2009). Ettersom TEF-verdier i stor grad er utarbeidet fra studier på forsøksdyr eller ikke-menneskelige cellelinjer kan slike forskjeller være relevante for diskusjoner rundt i hvor stor grad TEF-verdiene er overførbare til mennesker (EFSA CONTAM, 2018). Dette har særlig blitt trukket fram for PCB126, som grunnet høy potensitet i dyrestudier har blitt gitt en høy TEF-verdi sammenlignet med andre PCBer (Van den Berg et al., 2006). PCB126 utgjør en stor andel av total TEQ-eksponering fra sjømat, til tross for at den utgjør en relativt liten andel av total dioksinkonsentrasjon (Nøstbakken et al., 2021). Imidlertid har flere studier utført med humane cellelinjer vist lavere respons for PCB126 for AhR-aktivering og CYP1A-induksjon enn det som har blitt funnet i dyrestudier (Larsson et al., 2015, Silkworth et al., 2005, van Ede et al., 2014, Zeiger et al., 2001). Tilsvarende har en høyere respons blitt sett for enkelte andre kongenere, blant annet 1,2,3,4,7,8-HxCDF (Larsson et al., 2015). EFSA anbefaler derfor en

revurdering av WHO₂₀₀₅-TEF-verdiene, og spesielt PCB126, hvor også nyere resultater med humane cellelinjer tas med i betraktning (EFSA CONTAM, 2018).

Ulikheter i AhRs struktur, særlig i ligandbindingsstedet, har blitt foreslått som en mulig forklaring for artsforskjellene som ses for dioksintoksisitet. Ved analyse av AhRs struktur hos to musestammer med ulik dioksinsensitivitet (C57BL/6 og DBA/2) ble det blant annet sett en alanin til valin-substitusjon (A375V) i ligandbindingsstedet hos den lite sensitive stammen (Ema et al., 1994). Samme substitusjon ble også funnet i human AhR (Ema et al., 1994). Human AhR har også blitt funnet å ha en lavere affinitet for mange typiske AhR-ligander, inkludert TCDD og dl-PCBer, enn AhR hos sensitive stammer av forsøksdyr (Connor og Aylward, 2006). Samtidig har transaktiveringsdomenet i human AhR høy grad av homologi til AhR hos marsvin, som regnes blant de mest TCDD-sensitive artene (Korkalainen et al., 2001), og ved sammenligning av lymfocytter fra menneske, rotte og mus i en studie av Nohara et al. (2006) ble høyest CYP1A1-induksjon sett hos menneske. For enkelte andre ligander, blant annet indirubin, har også human AhR vist høyere bindingsaffinitet enn AhR hos mus (Flaveny og Perdew, 2009).

1.7 REPRODUKSJON OG REPRODUKTIV TOKSISITET

Spermatogenese er hos pattedyr en nøye regulert prosess hvor spermatogonia differensieres til spermatocytter og videre til runde og elongerte spermatider gjennom koordinerte mitotiske og meiotiske celledelinger. Spermatogenese og en rekke andre reproduktive prosesser reguleres i stor grad via hypothalamus-hypofyse-gonade (HPG) aksen, som involverer hormoner utskilt fra hypothalamus, fra gonadotrope celler i hypofysen og fra gonadene (Thackray et al., 2010). Gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) skilles ut i pulser fra hypothalamus, og stimulerer produksjon og utskillelse av gonadotropinene luteiniserende hormon (LH) og follikkelstimulerende hormon (FSH) ved å binde GnRH-reseptorer på gonadotrope celler (Jin og Yang, 2014). Den pulsvise utskillelsen av GnRH er nødvendig for stimulering av gonadotropinproduksjon ettersom en konstant utskillelse gjør at produksjon i stor grad opphører (Bliss et al., 2010). LH og FSH binder videre reseptorer på henholdsvis testosteronproduserende Leydig-celler og på Sertoli-celler. Testosteron har som det viktigste hannlige kjønnshormonet roller innen blant annet maskulinisering og utvikling av reproduksjonssystem på fosterstadiet, pubertetsutvikling og spermatogenese (Zhou et al., 2019). Sertoli-celler er viktige for spermatogenese gjennom å regulere modning av spermatider og ha støttefunksjoner for

spermceller, og gjennom produksjon av næringsstoffer og regulatoriske molekyler (Hai et al., 2014). FSH er, alene og i kombinasjon med testosteron, en viktig regulator for Sertolicellers vekst og funksjon (Oduwole et al., 2018). Både LH, FSH og testosteron bidrar derfor direkte eller indirekte i regulering av spermatogenese.

Uttrykk av hormonene i HPG-aksen påvirkes og reguleres på flere måter, blant annet ved negativ tilbakekopling fra testosteron og andre kjønnshormoner (Thackray et al., 2010) og ved interaksjoner med andre reseptorer og signalveier (Toufexis et al., 2014). AhR har også blitt vist å være uttrykt ved alle nivåer av HPG-aksen (Huang et al., 2000, Roman et al., 1998, Schultz et al., 2003). Det er derfor mulighet for påvirkning fra TCDD og relaterte forbindelser gjennom hele signalveien. Flere studier har funnet endringer i uttrykk og produksjon av hormonene som deltar i aksene ved eksponering for TCDD. I en serie studier av Takeda et al. ble mRNA-uttrykk av gonadotropiner undersøkt hos avkom etter TCDD-eksponering under graviditet, og det ble funnet redusert uttrykk for LH og FSH både hos mus (Takeda et al., 2014) og hos rotter (Takeda et al., 2009). De samme effektene ble ikke sett ved eksponering av voksne rotter (Takeda et al., 2009) eller hos AhR-knockout rotter (Hattori et al., 2018).

Videre har en rekke reproduktive effekter blitt sett i dyrestudier etter dioksineksponering, blant annet redusert kullstørrelse og fertilitet, morfologiske endringer og redusert vekt for ulike reproduktive organer, forsinket pubertetsutvikling, reduserte testosteronnivåer, og redusert spermantall og spermproduksjon. Sensitivitet for dioksiner og andre miljøgifter varierer gjennom livet, og fosterstadiet regnes som den mest sensitive perioden. Mange studier har derfor undersøkt effekter hos avkom etter eksponering under graviditet, ofte ved en enkelt dose dag 15 av graviditeten (Bell et al., 2007, Bjerke og Peterson, 1994, Gray et al., 1995, Mably et al., 1992b, Roman et al., 1995).

Mably et al. (1992a, 1992b) fant at eksponering av hannlige rotter for en enkelt, lav dose TCDD på fosterstadiet ga reduserte testosteronnivåer i plasma, endret utvikling av reproduksjonssystem, feminisert seksuell oppførsel og redusert spermantall og -produksjon. Flere av disse endringene var fortsatt til stede ved kjønnsmodning, slik at prenatal eksponering førte til en langvarig reduksjon i reproduktiv funksjon (Mably et al., 1992b). Lignende resultater ble funnet i flere påfølgende studier med tilsvarende doseringsoppsett, blant andre Bjerke og Peterson (1994), Gray et al. (1995) og Roman et al. (1995). Også hos Faqi et al. (1998), som målte effekter hos avkom etter TCDD-eksponering fra 2 uker før parring og gjennom graviditet og amming, ble redusert spermantall og -produksjon samt redusert testosteronnivå sett. Endring i spermparametre ble funnet for alle doseringsgruppene både hos Faqi et al. og Mably et al., og

regnes basert på studier i dyr og mennesker som en av de mest sensitive effektene ved dioksineksponering (EFSA CONTAM, 2018). I en studie av Bell et al. (2007) ble redusert kroppsvekt og forsinket pubertetsutvikling sett for avkom etter TCDD-eksponering dag 15 av graviditet, men i kontrast til tilsvarende tidligere studier ble ingen effekter på spermparametre sett. Spermparametre har også i andre nyere studier vært upåvirket av dioksineksponering (Ikeda et al., 2005, Ohsako et al., 2001), og manglende reproduksjon av sensitive reproduktive effekter sett i tidlige studier har blitt trukket fram som et usikkerhetsmoment i forbindelse med dioksintoksisitet (Bell, 2011).

De molekylære mekanismene bak dioksinmediert reproduktiv toksisitet er ikke fullt forståtte, men flere reaksjonsveier antas å kunne ha betydning. AhR har betydning for normal fungering av mannlig reproduksjonssystem blant annet ved regulering av mannlig kjønnsbestemmelse, spermutvikling og testikulær funksjon (Karman et al., 2011, Hansen et al., 2014). Oksidativt stress kan også ha betydning for reproduktiv toksisitet, ved mekanismer relatert til induksjon av peroksidativ skade på plasmamembran til spermceller, DNA-skade og apoptose, som sammen gir en svekkelse i spermfunksjon (Agarwal et al., 2014).

1.8 MÅL

Hovedmål for masterprosjektet var å undersøke hvordan eksponering for utvalgte dioksinkongenere og samtidig inntak av laks påvirker dioksintoksisitet hos mus med human AhR, med vekt på reproduktiv toksisitet. Mus med innsatt human AhR er brukt for å gi større overførbarhet til human toksikologi, ettersom forskjeller i AhRs struktur regnes som en mulig grunn for artsspesifikke forskjeller i dioksinsensitivitet. I tillegg til TCDD ble kongenerne 1,2,3,4,7,8-HxCDF og PCB126 inkludert da disse er blant kongenerne som i størst grad har blitt vist å ha ulik respons hos mennesker og hos forsøksdyr. Reproduktiv toksisitet har gjentatte ganger tidligere blitt trukket fram som en sensitiv effekt ved dioksineksponering, og størst vekt har derfor blitt lagt på effekter på reproduksjonssystem og signalveier som antas å kunne påvirke reproduksjon. Vektøkning og økt fettakkumulering i lever har blitt sett hos mus i tidligere studier ved inntak av laks, og ble derfor også målt som faktorer som kan påvirke sjømatens effekt på toksisitet. Følgende hypoteser ble satt opp:

H₁: Dioksineksponering kan gi forstyrrelser i reproduktiv funksjon hos mus med human AhR, uttrykt ved redusert spermkonsentrasjon, endringer i hormonkonsentrasjoner, morfologiske endringer i testiklene og endret genuttrykk.

H₂: Eksponering for TEF-justerte doser av TCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDF og PCB126 vil i ulik grad gi induksjon av CYP1A1 hos mus med human AhR.

H₃: Sjømat kan redusere reproduktiv toksisitet og CYP1A-induksjon sett ved dioksineksponering.

2. MATERIALER

2.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER

Navn	Nr/id	Produsent
100x Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail	5872	Cell Signaling Technology
10x PBS	161-0780	Bio-Rad
10x Trisglycine SDS Buffer	161-0732	Bio-Rad
2x Laemmli Sample Buffer	161-0737	Bio-Rad
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents	RPN 2232	Sigma-Aldrich
Anti-CYP1A1 antibody	ab235185	abcam
Anti-CYP1A1 Antibody (A-9)	sc-393979	Santa Cruz Biotechnology
CYP1A1, Polyclonal Antibody	MBS9409697	MyBioSource
ECL™ Blocking Agent	RPN 2125	Sigma-Aldrich
Eddiksyre, 99.8%, for analysis	64-19-7 (CAS)	Acros Organics
GelPilot 50 bp Ladder	239025	Qiagen
GelRed		Biotium
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP	G-21234	Thermo Fisher
Kloroform, LiChrosolv® for HPLC	CAS 67-66-3	Avantor/VWR
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	04887352001	Roche
Metanol	67-56-1 (CAS)	Honeywell
Precision Plus Protein™ Western C™ Standard	161-0376	Bio-Rad
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	161-0381	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagent	79306	Qiagen
RIPA-buffer	R0278	Sigma-Aldrich
RNA 6000 Ladder	AM7152	Invitrogen
RNase inhibitor		Qiagen
RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen
TAE buffer		Bio-Rad
TaqMan™ Reverse Transcription Reagents	4304134	Thermo Fisher

TE buffer	A8569	PanReac AppliChem
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	10026938	Bio-Rad
Tween® 20	P1379	Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	M3148	Sigma-Aldrich

2.2 KOMMERSIELLE KITS

Navn	Bruksområde	Produsent	CAS-nummer
Pierce 660 nm Protein Assay Kit	Proteinmåling	Thermo Scientific	22662
Mouse Testosterone ELISA Kit	Hormonmåling	Biomatik	EKF58576
Mouse LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit	Hormonmåling	Biomatik	EKF57817
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Test av primere		210212
RNA 6000 Nano Kit	RNA-kvalitet	Agilent	5067-1511
EZ1 RNA Tissue Mini Kit	RNA-rensing	Qiagen	959034

2.3 UTSTYR OG INSTRUMENTER

Instrument	Bruksområde	Produsent
ChemiDoc™ XRS+ System	Avbildning gel og blott	Bio-Rad
Centrifuge 5810R	Sentrifugering	Eppendorf
UP100H	Sonikering	Hielscher Ultrasonics
Mini-PROTEAN® Tetra System	Elektroforese	Bio-Rad
Power Pac 200	Elektroforese	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Western Blot	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size PVDF Membrane	Western Blot	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks	Western Blot	Bio-Rad
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels (4-15%)	Elektroforese	Bio-Rad
Compact Shaker KS 15 A	Risteinkubator	Edmund Bühler GmbH
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384	qPCR	Roche

MicroAmp® Optical Adhesive Film	qPCR	Applied Biosystems
MicroAmp® Adhesive Film Applicator	qPCR	Applied Biosystems
MicroAmp™ Splash-Free 96-Well Base	qPCR	Applied Biosystems
CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System	qPCR	Bio-Rad
Mixmate	Platesentrifuge	Eppendorf
Biomek 4000	Pipetteringsrobot	Beckman coulter
NanoDrop	Konsentrasjonsmåling	Thermo Fisher
T100 Thermal Cycler	cDNA og OneStep	Bio-Rad
PCR Plate, 96-well, non-skirted	cDNA	Thermo Fisher
MicroAmp™ 96-well Full Plate Cover	cDNA	Applied Biosystems
BioAnalyzer	RNA-kvalitet	Agilent
Chip Priming Station	RNA-kvalitet	Agilent Life Sciences
MS 3 S36 Basic Chip Vortex	Rister	IKA
Precellys 24 Tissue Homogenizer	Homogenisering	Bertin Instruments
Block Heater SBH130DC	Varmeblokk	Stuart
Victor X5 Multilabel Plate Reader	Proteinmåling	PerkinElmer

2.4 PROGRAMVARE

Programvare	Bruksområde	Produsent
Agilent 2100 BioAnalyzer	RNA-kvalitet	Agilent Technologies
Biorender	Figurer	Biorender
Bio-Rad CFX Maestro	qPCR	Bio-Rad
Excel	Databehandling	Microsoft
GraphPad Prism 8	Figurer og statistikk	GraphPad Software Inc
Image Lab 6.0.1	Avbilding gel og blott	Bio-Rad
NDP.view2	Histologi	Hamamatsu
ImageJ	Histologi	

2.5 PRIMERE TIL QPCR

Primer	Retning	Nukleotidsekvens (5'-3')	Produsent
<i>efl1a1</i>	F	ACG AGG CAA TGT TGC TGG TGA C	Thermo Fisher
	R	GTG TGA CAA TCC AGA ACA GGA GC	
<i>cypl1a1</i> (primer 1)	F	CAT CAC AGA CAG CCT CAT TGA GC	Thermo Fisher
	R	CTC CAC GAG ATA GCA GTT GTG AC	
<i>cypl1a1</i> (primer 2)	F	CCT CTT TGG AGC TGG GTT TG	Thermo Fisher
	R	TGC TGT GGG GGA TGG TGA AG	
<i>cypl1a2</i>	F	AAG ACA ATG GCG GTC TCA TC	Thermo Fisher
	R	GAC GGT CAG AAA GCC GTG GT	
<i>GPX4</i>	F	GCA GGA GCC AGG AAG TAA TC	Thermo Fisher
	R	GGC TGG ACT TTC ATC CAT TT	
<i>cat</i>	F	CGG CAC ATG AAT GGC TAT GGA TC	Thermo Fisher
	R	AAG CCT TCC TGC CTC TCC AAC A	
<i>ccin</i>	F	TCC AGG AGA ACC TGT GGCTGA A	Thermo Fisher
	R	TCA TAC CGC CAC GCT GTC TTC A	
<i>ybx3</i>	F	CAA GCG GCT AAT GGT CCA AAC C	Thermo Fisher
	R	GTT CTC AGT TGG TGC TTC ACC TG	
<i>gapdhs</i>	F	TAC TGT TGT CCA GCT ACG GC	Thermo Fisher
	R	GCT CTG GGA TGA CTT TGC CT	

2.6 BUFFERE OG LØSNINGER BENYTTET TIL SDS-PAGE OG WESTERN BLOTTING

Løsning	Innhold
Prøvebuffer	950 µl Laemmli Sample Buffer
	50 µl β-mercaptoetanol
1x Running buffer	100 ml 10x Trisglycine SDS Buffer
	900 ml dH ₂ O
1x Transfer Buffer	200 ml 5x Transfer Buffer
	600 ml dH ₂ O
	200 ml etanol
Vaskebuffer (0.05% PBS-Tween)	100 ml 10x PBS
	900 ml dH ₂ O
	500 µl Tween-20

5% blokkingsbuffer	1 g ECL Blocking Agent 20 ml 0.05% PBS-Tween
2% blokkingsbuffer	0.4 g ECL Blocking Agent 20 ml 0.05% PBS-Tween

2.7 REAKSJONSMIKSER OG PROGRAM BENYTTET TIL QPCR

2.7.1 REAKSJONSMIKS OG PROGRAM FOR *ONESTEP RT-PCR*

Reaksjonsmiks		Program		
5x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer	5 µl	Revers transcriptase	30 min	50°C
Q Solution	5 µl	PCR-aktivering	15 min	95°C
dNTP-mix	1 µl	Denaturering	45 sek	94°C
Forward primer	0.5 µl	Annealing	45 sek	60°C
Reverse primer	0.5 µl	Extension	1 min	72°C
RNase-inhibitor	0.25 µl	Final extension	10 min	72°C
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	1 µl			
MQ-H ₂ O	10.75 µl			
Templat-RNA	1 µl			

x35

2.7.2 REAKSJONSMIKS OG PROGRAM FOR cDNA-SYNTSE

Reaksjonsmiks		Program		
10X TaqMan RT Buffer	5µl	Inkubering	10 min	25°C
25 mM MgCl ₂	11µl	Revers transkripsjon	60 min	48°C
10 mM deoxyNTPs Mixture	10µl	Revers transkripsjon	5 min	95°C
Random hexamer primers	2.5µl	inaktivering		
RNase Inhibitor (20U/µl)	1µl			
Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	1.67 µl			

2.7.3 REAKSJONSMIKS OG PROGRAM FOR QPCR

Reaksjonsmiks	per prøve	Program		
SYBR GREEN PCR	2.8µl	Preinkubering	5 min	95°C
Master Mix (2X)		Amplifisering		
Forward primer	0.1µl	Denaturering	10 sek	95°C
Reverse primer	0.1µl	Annealing	10 sek	60°C
ddH ₂ O	5µl	Extension	10 sek	72°C
				x45
		Smeltepunktsanalyse	5 sek	95°C
			1 min	65°C
				97°C
		Kjøling	10 sek	40°C

3. METODER

3.1 EKSPERIMENTELT OPPSETT

Et 2x4 fraksjonelt faktorielt design ble brukt i dyreforsøket. Faktorielle design gjør det mulig å teste effekten av flere variabler samtidig samt eventuelle interaksjonseffekter mellom variablene, og gjør at statistisk styrke kan økes uten å øke antall dyr (Festing et al., 2002).

Mus med innsatt human AhR ble brukt for å øke relevans for humane reaksjoner. Musene ble delt inn i 8 grupper (n=10) med eksponering for ulike dioksinforbindelser og med og uten laks i dietten (Tabell 1).

Tabell 1.1: Eksperimentelt design.

		Toksikant (n=20)			
		Kontroll	TCDD	HxCDF	PCB126
Laks (n=40)	Kasein	n=10	n=10	n=10	n=10
	Laks	n=10	n=10	n=10	n=10

3.2 DYREFORSØK

Dyreforsøket ble utført av andre ved Havforskningsinstituttet i forkant av denne oppgaven. 80 hannlige mus (C57BL/6J med innsatt human AhR) ble inndelt i 8 grupper med 10 dyr, og ble gitt dietter med ulike sammensetninger av dioksin og laks som beskrevet i avsnitt 3.1. Musene var 3 uker gamle ved starten av forsøket, og forsøket varte i 13 uker. Veiing av musene, måling av spermkonsentrasjon og av ALT og AST i plasma og opparbeiding av histologiske snitt ble utført av andre ved HI, og data fra disse analysene ble analysert som en del av masterprosjektet. Vev fra lever og testikler ble benyttet til henholdsvis Western blot og qPCR.

3.3 HOMOGENISERING AV VEVSPRØVER OG MÅLING AV PROTEININNHOLD

Levervev fra mus ble homogenisert ved sonikering, og total proteinkonsentrasjon ble målt for hver prøve ved bruk av Pierce 660nm Protein Assay. 10 mg vev ble tilsatt 600 µl RIPA-buffer med 1x Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail, og sonikert i 90 sekunder med veksling mellom 15 sekunder sonikering og 10 sekunder pause. De sonikerte prøvene ble sentrifugert ved 20817g og 4°C i 20 min, og supernatant ble samlet opp. Proteinkonsentrasjon ble målt ved å tilsette 150 µl Pierce 660nm Protein Assay Reagent til 10 µl homogenisert prøve og 10 µl Pre-Diluted Pierce Bovine Serum Albumin Standards på en 96-brønnsplate. Både prøver og

BSA-standarder ble målt i duplikater. Platen ble tildekket, og inkubert i 1 minutt med risting i romtemperatur etterfulgt av 5 minutter i romtemperatur. Absorbans ved 660nm ble målt ved bruk av VICTOR Multilabel Plate Reader, og proteinkonsentrasjon for prøvene ble funnet ved hjelp av standardkurve generert fra BSA-standardene. De homogeniserte prøvene ble oppbevart ved -80°C frem til videre bruk.

3.4 WESTERN BLOTTING

Western blotting muliggjør identifikasjon av spesifikke målproteiner ved bruk av antistoff-antigen-interaksjoner. SDS-PAGE (natriumdodecylhydrogensulfat polyakrylamid gelelektroforese) benyttes først for å separere proteinene i en biologisk prøve etter størrelse. Den anioniske detergenten SDS bryter sekundær- og tertiærstrukturer og tilfører en uniform negativ ladning, og tilsetning av β -merkaptoetanol eller andre reduserende agenter i kombinasjon med koking bryter disulfidbindinger til stede i proteinene. Forskjeller mellom proteinene i ladning og struktur elimineres dermed, slik at proteinene vil migrere ved ulik hastighet gjennom en polyakrylamidgel tilført elektrisk spenning avhengig av sin molekylvekt.

De separerte proteinene kan deretter overføres til en PVDF- eller nitrocellulosemembran ved bruk av elektrisk spenning, og et primært antistoff som binder spesifikt til målproteinet tilsettes. Konjugering av primært eller sekundært antistoff til et reporterenzym som katalyserer en lysproduserende kjemisk reaksjon, for eksempel pepperrotperoksidase (HRP), muliggjør deteksjon av målproteinet ved bruk av kjemiluminescens.

3.4.1 NATRIUMDODECYLHYDROGENSULFAT-POLYAKRYLAMID GELELEKTROFORESE (SDS-PAGE)

Prøve fra lever ble blandet 1:1 med prøvebuffer, denaturert i 5 min ved 95°C og separert på en 4-15% polyakrylamid-gel (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel, Biorad). Elektroforesen ble kjørt i en Mini-PROTEAN Tetra Cell fra Biorad, og running buffer (1x Trisglysin SDS) ble brukt som buffer i elektroforesekammeret. 10 μ g protein ble applisert i hver brønn, og 4 μ l Precision Plus Protein™ Western C™ Standard (Biorad) ble brukt som standard. Elektroforesen ble kjørt ved 200V i ca. 45 min, til fargefronten nådde bunn av gelen.

3.5.2 WESTERN BLOT

PVDF-membran ble aktivert ved blottlegging i metanol i ca. 1 min, og filterputer ble blottlagt i 1x transferbuffer. En blotting sandwich ble deretter tillaget i en Trans-Blot Turbo Cassette, bestående av følgende komponenter oppført fra anode til katode: filterpute, PVDF-membran, gel, og filterpute. Overføring ble gjort ved bruk av Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, på forhåndsinnstilt Turbo-program (1.3A/22V i 7 minutter). Membranen ble deretter blokket med 5% blokkingsbuffer i 2 timer i romtemperatur med risting, og vasket 3x10 min i vaskebuffer etter blokkering. Anti CYP1A1-antistoff (sc-393979) ble fortynnet 1:500 i 2% blokkingsbuffer (20 µl antistoff, 10 000 µl blokkingsbuffer), og Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate ble fortynnet 1:10000 i samme løsning. Membranen ble inkubert med antistoffløsningen i 1t i romtemperatur med risting, og deretter over natta ved 4°C. Dagen etter ble membran vasket 5x10 min i vaskebuffer for å fjerne ubundet antistoff. Fremkallingsløsning (ECL Prime Western Blotting Detection Reagents) ble laget ved å blande de to komponentene 1:1 som beskrevet i produsentens protokoll, og tilsatt til membranen i 3 minutter. Blottet ble fremkalt ved bruk av ChemiDoc™ XRS+ System, og optimalisering for intense bånd ble valgt.

3.5.3 NORMALISERING MOT TOTALT PROTEIN VED STAINFREE-TEKNOLOGI

Normalisering av Western blot-resultater mot et referanseprotein eller mot totalt proteininnhold er nødvendig der resultatene skal brukes til relativ eller absolutt kvantifisering, for å justere for ulikheter i applisering på gel og overføring til membran. I denne oppgaven er normalisering mot totalt proteininnhold benyttet, utført ved Stain-free bildetaking av gel som beskrevet av Posch et al. (2013). Stainfree-teknologi involverer tilsetning av en trihalo-forbindelse til akrylamidgelene som vil binde irreversibelt til tryptofan i proteinene, slik at proteinene gjøres fluorescente ved eksponering for UV-lys. Normalisering ved Stainfree-teknologi har blitt vist å ha sammenlignbar eller høyere sensitivitet enn både normalisering mot referanseproteiner og normalisering ved mer tradisjonelle stains som Coomassie Brilliant Blue eller Ponceau (Gürtler et al., 2013, Rivero-Gutiérrez et al., 2014, Welsh et al., 2020). Normalisering mot totalt protein anbefales også ofte fremfor normalisering mot referanseproteiner, ettersom referanseproteiner som et minimum bør valideres for uendret uttrykk under de gjeldende eksperimentelle forholdene og for at den benyttede konsentrasjonen ligger innenfor det lineære dynamiske området for deteksjonsmetoden (Gürtler et al., 2013).

Før overføring av proteiner til membran ble gelen avbildet på ChemiDoc™ XRS+ System med Stain-free gel som applikasjon. 1 min aktivering og 1 sek eksponeringstid ble benyttet. Etter

overføring ble gelen avbildet på nytt for å kontrollere overføringseffektivitet. Aktivering ble da satt til None, og samme eksponeringstid som ved avbildning før overføring (1 sek) ble benyttet.

Normalisering ble utført i ImageLab. Bands and Lanes-funksjonaliteten i programmet ble benyttet for å markere brønner i bildene av blottet og den korresponderende Stain-free-gelen, samt det ønskede båndet i blottet. Stain-free-bildet ble satt som normaliseringskanal, og Normalization lane ble satt til brønnen som inneholdt prøve fra kontrollgruppen. Brønnene som inneholdt proteinstandard ble markert som standard under Molecular Weight Analysis Tools slik at disse ble ekskludert fra beregningen. Lane Profile ble deretter gjennomgått for hver brønn på begge bildene for å bekrefte lik bakgrunnssubtraksjon og at hele båndområdet var inkludert. Verdier for Normalized Volume kalkulert i programmet ble til slutt eksportert til Excel og benyttet videre til grafer og statistisk analyse.

3.5 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gjør det mulig å identifisere og kvantifisere hormoner i biologiske prøver med høy sensitivitet, ved bruk av antistoff-antigen-interaksjoner. Nivåer av luteiniserende hormon (LH) og testosteron i plasma ble målt ved bruk av kommersielle kompetitive ELISA-kits spesifisert i materialer, ved å følge vedlagte protokoller. Brønnene i platen som brukes har på forhånd blitt dekket med et referanseantigen, og 50 µl prøve ble først inkubert sammen med enzymmerket antistoff mot målproteinet. Assayet baserer seg dermed på kompetitiv binding av det merkede antistoffet til antigen som finnes i prøvene og til referanseantigenet, hvor antistoffet i prøver med høy konsentrasjon av målhormonet i større grad vil binde antigen i prøven slik at mindre blir tilgjengelig for å binde referanseantigen i brønnene. HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) tilsettes deretter, etterfulgt av TMB Substrate, som endrer farge når det oksideres av HRP. Etter tilsetting av Stop Solution ble absorbans målt ved 450 nm, og den inverse sammenhengen som finnes mellom absorbans og konsentrasjon av målhormon ble brukt for å finne konsentrasjon til prøvene.

3.6 KVANTITATIV POLYMERASE KJEDERAKSJON

3.6.1 RNA-EKSTRAKSJON

BioRobot EZ1 og RNA 6000 Nano kit ble benyttet for rensing av RNA. Testikkelvev fra mus ble overført til homogeniseringsrør (Precellys) fylt med 750 µl Qiazol og 4 keramiske kuler. Vevet ble oppbevart på tørris under tilsettingen. Prøvene ble deretter homogenisert ved 6000

rpm i 3x15 sek i en Precellys® 24 homogenisator. De homogeniserte prøvene ble tilsatt 150 µl kloroform, med inkubasjon i romtemperatur i 5 minutter før tilsetning og 3 minutter etter tilsetning, før de ble sentrifugert ved 4°C og 12 000 x g i 15 minutter. Dette utløste en fase-separasjon hvor RNA ble separert fra proteiner, DNA og øvrige komponenter i prøvene. Den øverste blanke fasen som inneholdt RNA ble overført til et nytt rør og videre renses ved bruk av BioRobot EZ1 og EZ1 RNA Tissue Mini Kit etter produsentens protokoller. 10 µl DNase ble tilsatt for hver prøve.

3.6.2 MÅLING AV RNA-KVALITET

Etter rensing av prøvene i BioRobot EZ1 ble RNA-konsentrasjon og A_{260}/A_{280} - og A_{260}/A_{230} -ratioer for hver prøve målt ved bruk av Nanodrop. Absorbansratioer er mye benyttet som et mål på renhet for DNA- og RNA-prøver, hvor rene RNA-prøver har en ratio rundt 2.1 og ratioer > 1.8 gjerne regnes som tilstrekkelig rene for de fleste videre bruksområder. 12 tilfeldig valgte prøver ble videre analysert ved BioAnalyzer og RNA 6000 Nano LabChip Kit. Alle reagenser ble først inkubert i romtemperatur, og RNA-prøvene ble denaturert på varmeblokk ved 70°C i 2 minutter. 0.5 µl RNA Nano dye (RNA Nano 6000) ble videre tilsatt til 32.5 µl gel-matrix (RNA Nano 6000), og gelblandingen ble sentrifugert ved 13 000 g i 10 minutter. En RNA 6000 Nano Chip ble plassert i Chip Priming Station, og 9 µl gelblanding, 5 µl RNA Marker, 1 µl RNA ladder og 1 µl prøve ble tilsatt til sine respektive brønner etter produsentens protokoll. Chipen ble vortexet ved 2400 rpm i 1 minutt før den ble analysert i BioAnalyzer. Dette ga et RNA-integritetsnummer og et elektroferogram for hver av prøvene, slik at grad av degradering kunne kontrolleres. Det ble ikke målt uventede verdier for noen av prøvene, verken for A_{260}/A_{280} - og A_{260}/A_{230} -ratioer eller RNA-integritet, og alle 72 prøvene ble derfor benyttet videre i qPCR.

3.6.3 ONESTEP RT-PCR

For å kontrollere fungerende amplifisering av primere ble OneStep RT-PCR kit (Qiagen) etterfulgt av agarose gelelektroforese av PCR-produktene utført. En miks bestående av 5 µl ekstrahert RNA fra hver av prøvene ble benyttet som templat i reaksjonen. Primerene ble fortynnet til 50 µM med TE-buffer, og blandet ved vortex i 3x30 sek. En reaksjonsmiks som spesifisert i 2.7.1 ble tillaget for hver av primerene, og PCR ble deretter kjørt på maskin på

program spesifisert i 2.7.1. En 1% agarosegel ble laget med 1g agarose, 100 ml TAE buffer og 2.5 μ l GelRed. Agarosen ble løst opp ved oppvarming i mikrobølgeovn, løsningen ble kjølt ned til rundt 50 grader og gelen fikk stivne i rundt 30 min. 2 μ l 10x BlueJuice loading buffer ble tilsatt til 8 μ l PCR-produkt. 6 μ l GelPilot 50 bp ble benyttet som standard. Elektroforesen ble kjørt på 80 V i ca. 1t, og gelen ble fremkalt på ChemiDoc™ XRS+ System med GelRed som applikasjon.

3.6.4 cDNA-SYNTSE

Hver av RNA-prøvene ble fortynnet med milli-Q vann til en konsentrasjon på 50 ng/ μ l. Endelig konsentrasjon ble kontrollert med NanoDrop og justert dersom den ikke lå innen 5% fra ønsket konsentrasjon. En blanding av RNA fra alle prøvene ble brukt til å lage en fortynningsserie med konsentrasjoner på 100, 50, 25, 12.5, 6.25 og 3.125 ng/ μ l. De reelle konsentrasjonene ble målt med NanoDrop og registrert. En reaksjonsmiks som beskrevet i avsnitt 2.7.2 ble laget, og 40 μ l ble tilsatt til hver brønn i en 96-brønnplate. 10 μ l RNA fra de ulike prøvene og fortynningsstandardene ble tilsatt til hver sine brønner og blandet med reaksjonsmiksen. Fortynningsstandarder ble tilsatt i triplikater og prøver ble tilsatt i duplikater. En No amplification-kontroll bestående av 40 μ l reaksjonsmiks uten enzymer og 10 μ l RNA-blanding med 50 ng/ μ l konsentrasjon, og en No template-kontroll bestående av 40 μ l reaksjonsmiks og 10 μ l milli-Q vann ble inkludert. Platen ble tildekket og sentrifugert ved 50 x g i 1 minutt. cDNA-syntese ble kjørt på T100 Thermal Cycler med program spesifisert i avsnitt 2.7.2. Platen ble lagret ved -20°C fram til videre bruk.

3.6.5 KVANTITATIV POLYMERASE KJEDEREAKSJON (qPCR)

cDNA-plate ble sentrifugert ved 1200 x g i 1 min og fortynnet 1:1 med milli-Q vann ved bruk av pipetteringsrobot. Platen ble blandet ved sentrifugering ved 1200 x g i 1 min og vortexing ved 1500 rpm i 5 minutter. En reaksjonsmiks som beskrevet i avsnitt 2.7.3 ble laget for hver av primerene. 8 μ l reaksjonsmiks ble blandet med 2 μ l cDNA ved bruk av pipetteringsrobot. PCR-platen ble sentrifugert ved 1500 x g i 2 min, og qPCR ble kjørt på program spesifisert i avsnitt 2.7.3.

3.6.6 DATABEHANDLING

De målte dataene fra qPCR ble først gjennomgått i CFX Maestro. Smeltekurve og standardavvik for replikater for hver av prøvene ble kontrollert. Ettersom store standardavvik ble sett for mange av prøvene plassert langs ytterkanten av platene ble prøvene plassert i nederste rad på platen (prøve 34-35 og 70-72) konsekvent ekskludert før analyse. For prøver plassert langs høyre kant av platen ble replikat 2 (plassert langs ytterkanten) ekskludert der denne hadde en betydelig høyere C_q-verdi enn replikat 1.

Stabiliteten til referansegenene ble deretter testet ved bruk av Reference Gene Selector Tool i CFX Maestro, hvor GeNorm-algoritmen benyttes. Det ble her sett høy stabilitet for *eef1a1*, mens de tre andre referansegenene både hadde lavere stabilitet og flere problemer med hensyn til replikater og reproduisibilitet. Det ble derfor valgt å kun normalisere mot *eef1a1* heller enn et gjennomsnitt av de fire referansegenene som opprinnelig planlagt.

C_q-verdier ble deretter eksportert til Excel for videre behandling. er i denne oppgaven presentert som uttrykk relativt til referansegen ($2^{\Delta C_q}$), ved bruk av differansen mellom C_q-verdiene for referanse- og målgen for hver prøve etter følgende formel:

$$2^{\Delta C_q} = 2^{(C_q(\text{referansegen}) - C_q(\text{målgen}))}$$

3.7 KVANTIFISERING AV FETTINNHOOLD I LEVER

Representative utvalg fra histologibilder av lever for hver prøve ved 20x forstørrelse ble brukt som utgangspunkt for analyse i ImageJ. Bildene ble konvertert til 8-bit, og terskelverdi (Image->Adjust->Threshold) ble forsøkt satt slik at en tydelig separasjon av fettvakuoler kunne ses og minst mulig andre cellekomponenter ble medregnet. Den valgte terskelverdien (235) ble holdt konstant for alle bildene. Mørk bakgrunn ble valgt slik at fettvakuolene ble farget svarte, og et utvalg som omfattet svarte piksler ble opprettet (Edit->Selection->Create Selection). Svarte piksler ble målt (Analyze->Measure), og det resulterende målet for areal (Area) ble registrert.

3.8 STATISTIKK

Rådata fra dyreforsøket ble behandlet i Microsoft Excel. Statistisk analyse og tillaging av grafer ble gjort i GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Alle resultater er presentert ved gjennomsnitt \pm standardavvik (SD) for hver av behandlingsgruppene. Homogenitet i gruppevarians ble bestemt ved Levenes test. Der

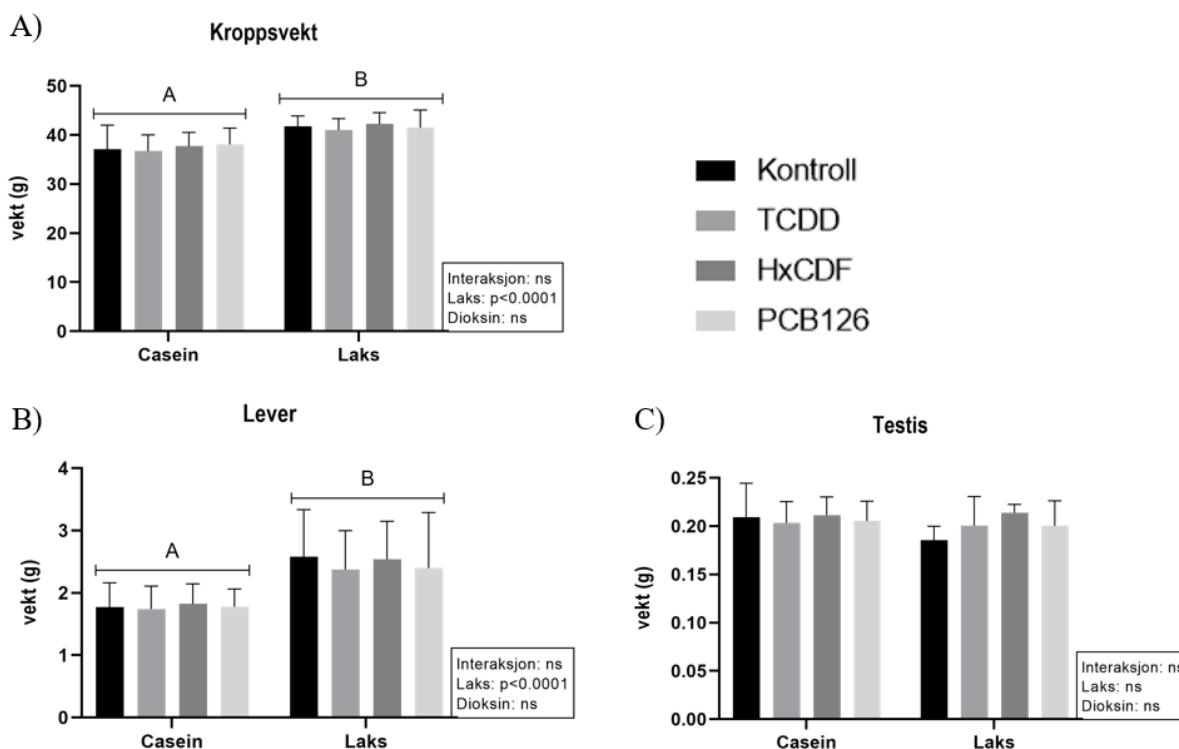
homogenitet i gruppevarians var til stede ble toveis variansanalyse (ANOVA) med laks og dioksin som hovedfaktorer brukt for å teste om signifikante forskjeller fantes mellom de ulike nivåene for hovedfaktorene eller for interaksjon mellom faktorene. Der signifikante dioksineffekter ble sett ble ANOVA etterfulgt av post hoc-testen Tukey's multiple comparisons. Dersom homogenitet i gruppevarians ikke var til stede, ble dataene først forsøkt log -transformert. Hvis homogenitet fortsatt ikke var oppfylt etter transformasjon ble de nonparametriske testene Kruskal-Wallis test og Mann-Whitney test brukt for å teste for forskjeller mellom gruppene. Det ble brukt bokstaver i figurer for å markere signifikante forskjeller mellom eksperimentelle grupper, hvor grupper som ikke deler en bokstav er signifikant forskjellige. Forskjeller mellom grupper ble definert som signifikante ved $p \leq 0.05$.

4. RESULTATER

4.1 VEKT OG ORGANVEKT

Ved starten av forsøket var kroppsvekt tilnærmet lik for alle musene, og musene ble veid ukentlig under dyreforsøket for å måle vektøkning som følge av eksperimentell behandling. Det ble sett en betydelig vektøkning for alle gruppene i løpet av forsøksperioden, men en større økning ble sett for gruppene som hadde fått laks (figur 4.1a). Dette ble bekreftet ved toveis ANOVA hvor en hovedeffekt for laks med $p < 0.0001$ ble sett, uten signifikante dioksin- eller interaksjonseffekter.

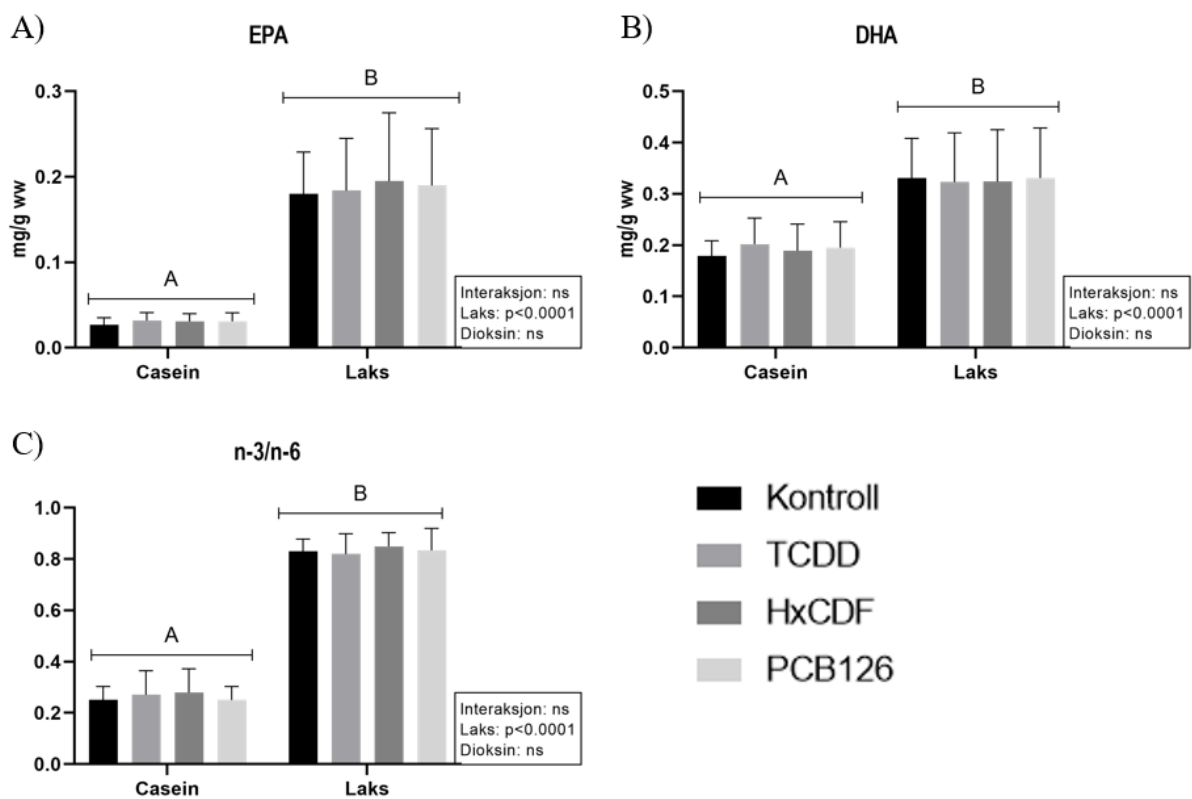
Testikler og lever ble veid ved slutten av forsøket, og gjennomsnittlig vekt for hver gruppe er presentert i figur 4.1b og 4.1c. Levervekt var økt for gruppene som hadde fått laks sammenlignet med gruppene som hadde fått kasein. Forskjellen mellom gruppene ble funnet å være statistisk signifikant ved Kruskal-Wallis test ($p = 0.0045$) og ved en Mann-Whitney test der det ble sett bort fra effekten av dioksin ble gruppen som fikk laks vist å være signifikant forskjellig fra gruppen som fikk kasein ($p < 0.0001$). Det ble derimot ikke observert signifikante endringer i testikkelvekt som følge av behandling.



Figur 4.1: Kroppsvekt og organvekter. Total kroppsvekt (A), levervekt (B) og testikkelvekt (C) målt etter 13 uker med eksperimentelle dietter. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD ($n = 10$). P-verdier fra toveis ANOVA (A, C) og Mann-Whitney test (B) er oppgitt i boks til høyre for hver graf. Ulike store bokstaver representerer statistisk signifikans ($p < 0.05$) for hovedeffekt for laks.

4.2 FETTSYREANALYSER

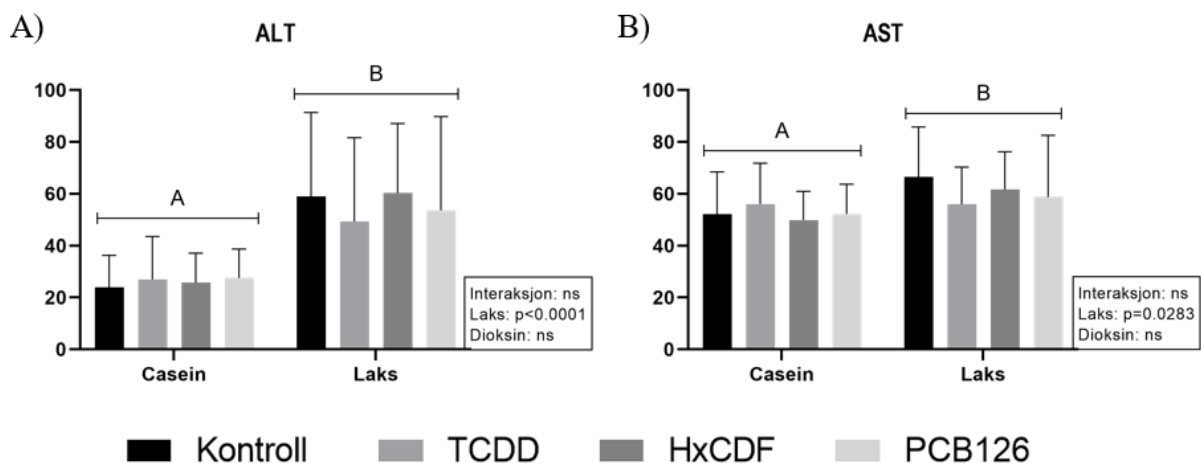
For å undersøke opptak av fettsyrer fra kostholdet, og spesifikt de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA, ble nivået av ulike langkjede mettede og umettede fettsyrer målt i røde blodceller. Laks i dietten ga en signifikant økning ($p < 0.0001$) både for EPA og DHA og for omega-3/omega-6 ratio, uten signifikante dioksin- eller interaksjonseffekter (figur 4.2).



Figur 4.2: Marine omega-3-fettsyrer. Nivåer av de marine fettsyrene EPA (A) og DHA (B), og omega-3/omega-6 ratio (C) ble målt i røde blodceller. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD ($n=10$). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf. Ulike store bokstaver representerer statistisk signifikans ($p < 0.05$) for hovedeffekt for laks.

4.3 LEVERENZYMER

Leverenzymene aspartat aminotransferase (AST) og alanin aminotransferase (ALT) har funksjoner innen blant annet aminosyremetabolisme og energihomeostase, og er mye brukte biomarkører for leverskade (McGill, 2016). Nivåer av ALT og AST ble derfor målt i plasma, og gjennomsnittlige verdier for hver av de eksperimentelle gruppene ble sammenlignet. For begge enzymene, men i størst grad for ALT, ble det sett høyere nivåer for gruppene som hadde fått laks (figur 4.3). Resultatet ble bekreftet med toveis ANOVA med log-transformerte data for ALT og toveis ANOVA for AST, hvor en hovedeffekt av laks med henholdsvis $p < 0.0001$ og $p = 0.0283$ ble sett. Ingen signifikante dioksin- eller interaksjonseffekter ble funnet for konsentrasjoner av ALT og AST.

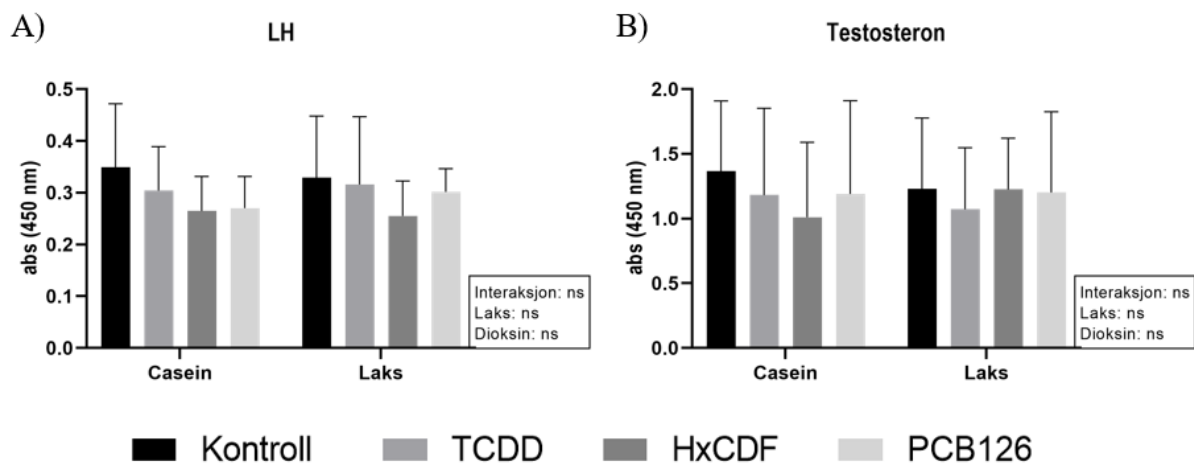


Figur 4.3: Leverenzymmer. Nivåer av leverenzymene ALT (A) og AST (B) ble målt i plasma. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD ($n=10$). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf. Ulike store bokstaver representerer statistisk signifikans ($p < 0.05$) for hovedeffekt for laks. ANOVA ble for ALT utført med log-transformerte data.

4.4 NIVÅER AV LH OG T I PLASMA

Hormonene LH og testosteron deltar i regulering av spermatogenese, og konsentrasjon ble derfor målt i plasma ved bruk av kommersielle kompetitiv ELISA-kits. For begge hormonene lå imidlertid de målte hormonkonsentrasjonene i øvre ende av, og til dels utenfor, deteksjonsområdet til kitet. Nøyaktige konsentrasjoner kunne derfor ikke regnes ut, og en ny måling med 1:8 fortykning av prøvene ble gjort for testosteron hvor målingene i høyest grad lå utenfor deteksjonsområdet. De målte verdiene var i dette forsøket lavere enn i det første forsøket, men fortsatt var enkelte av verdiene for høye. Absorbansverdiene oppnådd for LH og for testosteron med 1:8 fortykning vises derfor i figur 4.4 som et estimat for forskjellene mellom gruppene.

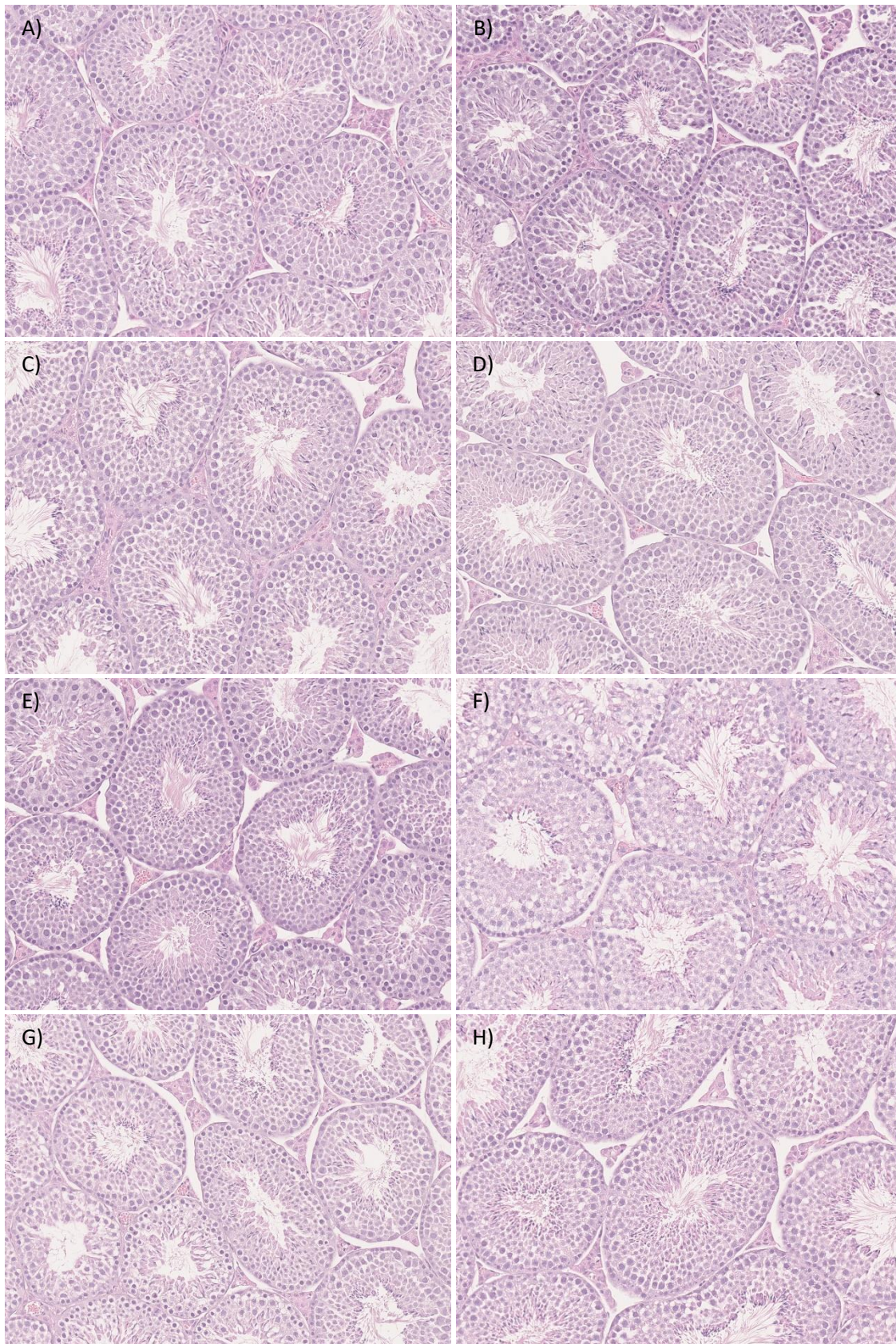
Det ble sett en svak tendens til lavere absorbansverdier for gruppene som hadde blitt eksponert for dioksin, særlig for HxCDF. Imidlertid var det stor spredning i de målte verdiene innad i hver av gruppene, og det ble ikke funnet signifikante endringer i absorbansverdier ved toveis ANOVA som følge av behandling.



Figur 4.4: Absorbansverdier for hormonmålinger i plasma. Nivåer av LH (A) og testosteron (B) ble målt i plasma ved kompetitiv ELISA. Da en andel av målingene lå utenfor deteksjonsområdet til kitet kunne hormonkonsentrasjoner ikke regnes ut, og de målte absorbansverdiene vises derfor som estimat for forskjeller mellom gruppene. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD (n=10). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf.

4.5 HISTOLOGI

Histologiske snitt fra lever og testikkel fra hver av musene ble analysert i visningsprogrammet NDP.view2. Testikkelsnittene ble sammenlignet visuelt med hovedvekt på de enkelte seminiferous tubuli, med hensyn til tilstedeværende komponenter, form og pakking. Representative utsnitt ved 20X forstørrelse for alle behandlingsgruppene er vist i figur 4.5. Form og pakking av seminiferous tubuli varierte både innad i hvert snitt og mellom de individuelle snittene, og mengden modne spermceller som kunne ses i lumen varierte i stor grad mellom tubuli innad i hvert snitt. Det var imidlertid ingen tydelige forskjeller mellom de ulike eksperimentelle gruppene, verken for utforming og pakking av seminiferous tubuli eller mengde modne spermceller. Det ble heller ikke funnet misfarging eller andre uregelmessigheter som skilte seg ut for noen gruppe.



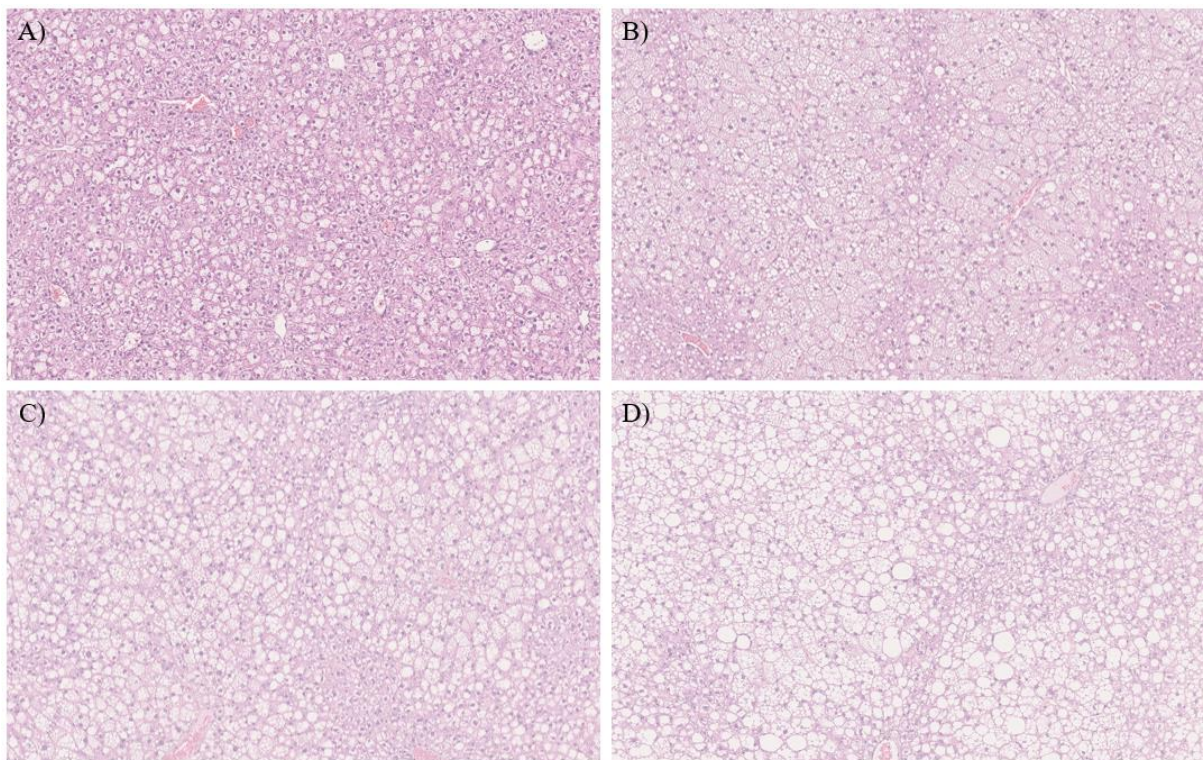
Figur 4.5: Testikkelhistologi for de åtte behandlingsgruppene. Snittene ble analysert ved bruk av programvaren NDP.view2 (Hamamatsu) og vises her ved 20X forstørrelse. For alle snittene ble seminiferous tubuli med modne sædceller i lumen sett. A) Kasein kontroll. B) Laks kontroll. C) Kasein TCDD. D) Laks TCDD. E) Kasein HxCDF. F) Laks HxCDF. G) Kasein PCB126. H) Laks PCB126.

Tilstedeværelse av nødvendige komponenter for spermatogenese ble videre undersøkt i individuelle seminiferous tubuli i hvert av snittene. Leydigceller og Sertoliceller ble sett i alle prøvene, sammen med en modning av spermceller i seminiferous tubuli ved tilstedeværelse av spermatogonier, spermatocytter, og runde og elongerte spermatider. Strukturelle uregelmessigheter og apoptotiske germ cells ble videre kun sporadisk sett, og uten tilknytning til eksperimentell behandling. Figur 4.6 viser de observerte komponentene i og rundt en seminiferous tubule i prøve 73 behandlet med kontroll kasein. Tilsvarende resultater ble sett for de andre eksperimentelle gruppene.

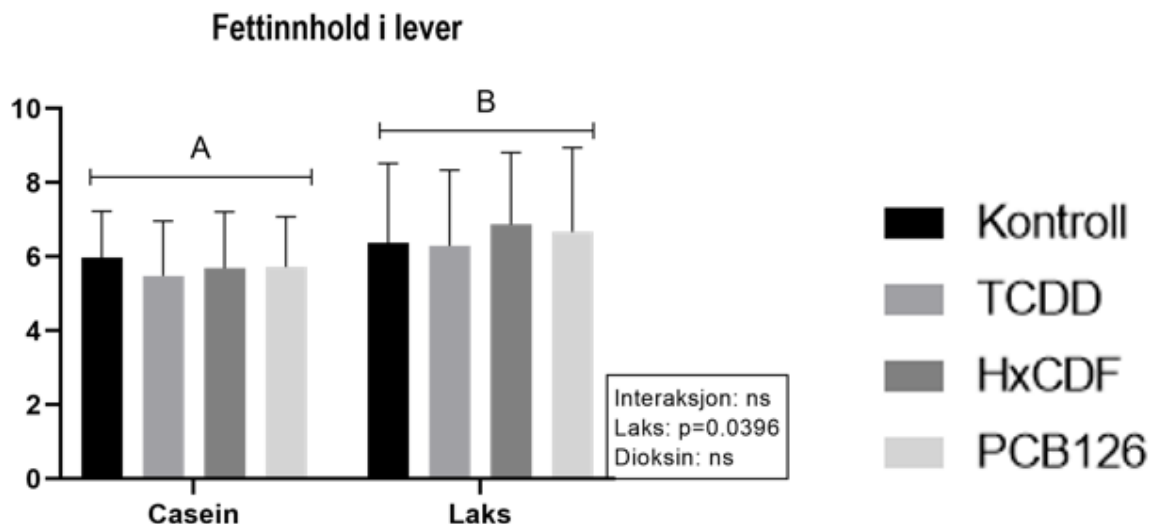


Figur 4.6: Seminiferous tubule hos mus behandlet med kontroll kasein, med nødvendige komponenter for spermatogenese markert. Histologiske snitt ble analysert ved bruk av programvaren NDP.view2 (Hamamatsu), og vises her ved 35X forstørrelse. Følgende celletyper til stede i og rundt en seminiferous tubule er markert: Leydigceller (L), Sertoliceller (S), spermatogonia (G), spermatocytter (C), og runde (R) og elongerte (E) spermatider.

Leversnitt ble sjekket visuelt i NDP.view2 for uregelmessigheter og generelle strukturelle trekk, og forskjeller mellom behandlingsgruppene ble ikke observert. En stor andel av prøvene hadde et høyt innhold av fett i cellene, og fettinnholdet varierte mellom prøvene (figur 4.7). En estimert kvantifisering av fettinnhold i hver prøve ble derfor gjort i ImageJ, og gjennomsnittlig fettinnhold ble sammenlignet for hver av gruppene (figur 4.8). Gruppene som fikk laks hadde et høyere nivå av fett i leveren sammenlignet med gruppene som fikk kasein, bekreftet ved toveis ANOVA hvor hovedeffekt for laks var statistisk signifikant med $p=0.0396$. Dioksineksponering ga ingen signifikante endringer i fettinnhold, og det ble heller ikke sett interaksjonseffekter.



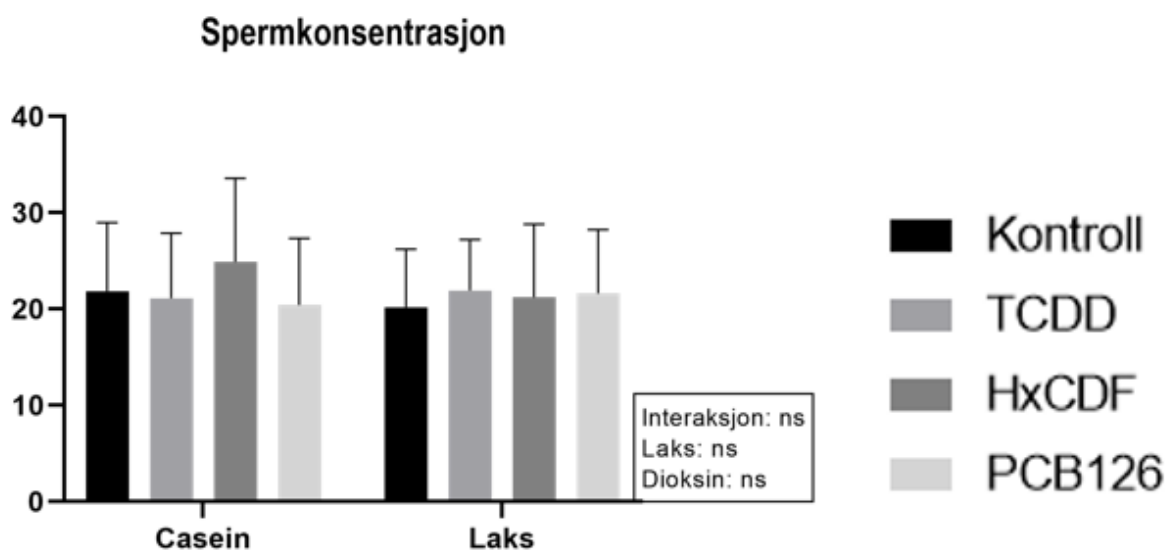
Figur 4.7: Utvalgte leversnitt med ulike nivåer av fett. Histologiske leversnitt ble analysert ved bruk av programvaren NDP.view2 (Hamamatsu), og vises her ved 10X forstørrelse. A) Snitt fra mus nr. 47 behandlet med PCB126 kasein, med fettnivå kvantifisert til 3.539. B) Snitt fra mus nr. 54 behandlet med HxCDF laks, med fettnivå kvantifisert til 5.123. C) Snitt fra mus nr. 2 behandlet med kontroll laks, med fettnivå kvantifisert til 6.728. D) Snitt fra mus nr. 22 behandlet med HxCDF laks, med fettnivå kvantifisert til 10.56.



Figur 4.8: Fettinnhold i lever. Fettinnhold ble kvantifisert i ImageJ ved bruk av histologiske snitt fra lever, som beskrevet i avsnitt 3.7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD (n=10). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf. Ulike store bokstaver representerer statistisk signifikans ($p < 0.05$) for hovedeffekt for laks.

4.6 SPERMKONSENTRASJON

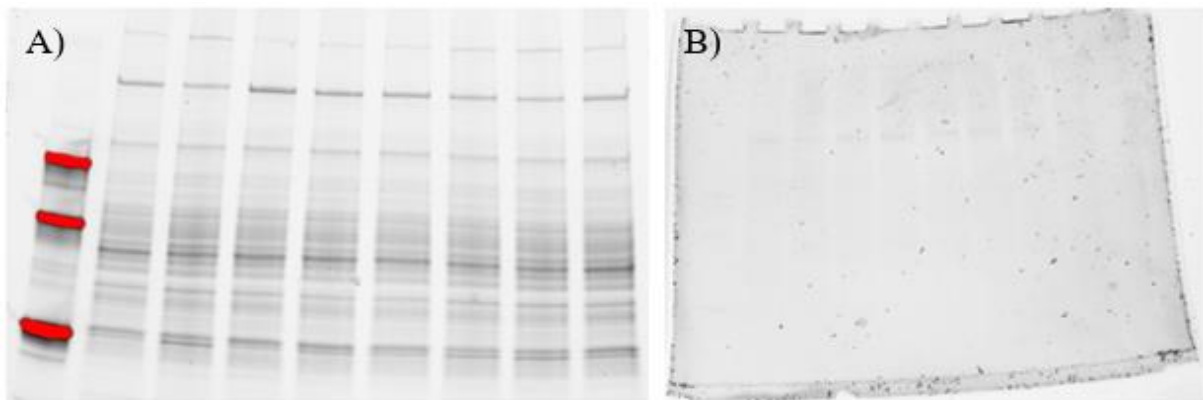
Det ble for spermkonsentrasjon sett lignende verdier for de ulike gruppene, med unntak av HxCDF kasein som hadde en noe høyere verdi. Ingen statistisk signifikant forskjell ble imidlertid funnet ved toveis ANOVA, verken for hovedeffekt av laks eller dioksin, eller interaksjonseffekter.



Figur 4.8: Spermkonsentrasjon, oppgitt som totalt epididymal spermtall ($\times 10^6$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD (n=10). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf.

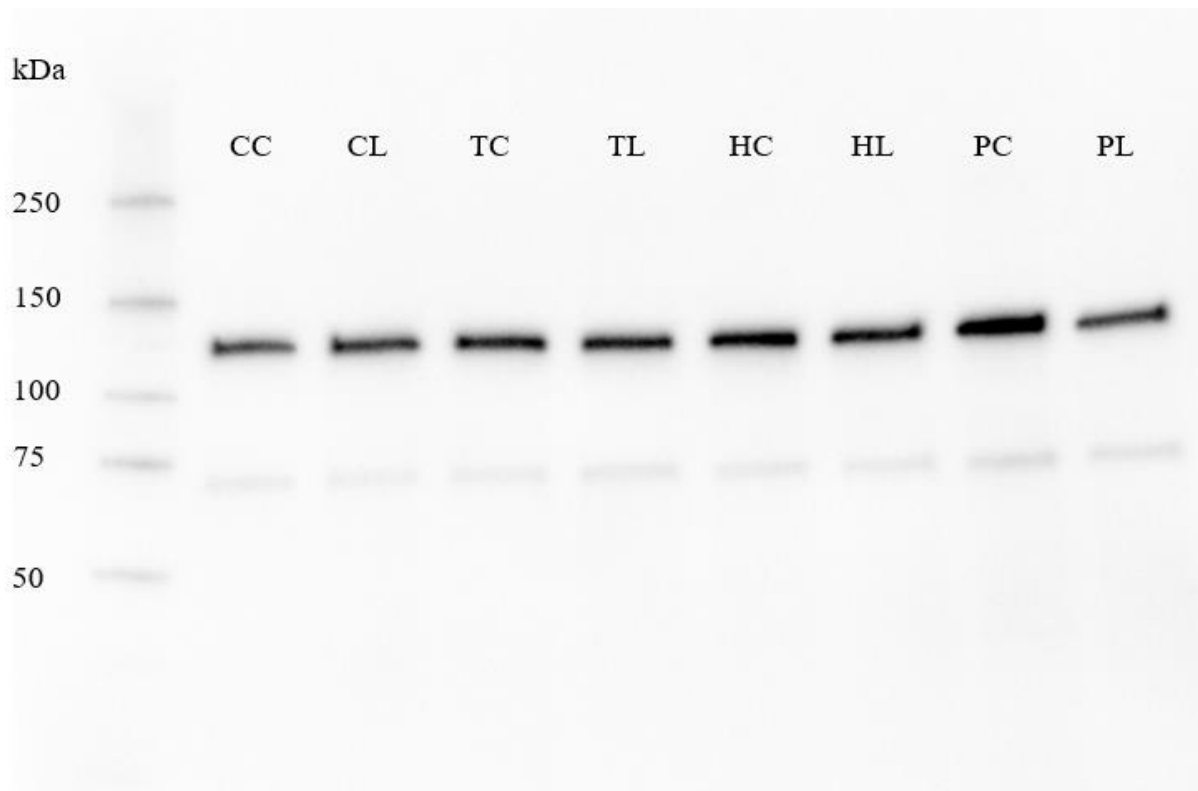
4.7 WESTERN BLOT

CYP1A1 ble forsøkt detektert i de 80 leverhomogenatene fra dyreforsøket ved bruk av Western blotting, for å undersøke om ulik grad av induksjon kunne ses mellom de eksperimentelle gruppene. Alle gelene ble applisert med én prøve fra hver av gruppene, og båndstyrke relativt til prøven fra kontrollgruppen ble kalkulert for hver prøve. Gelene ble avbildet før og etter overføring til membran for å kontrollere henholdsvis korrekt mengde og separasjon av proteiner i hver brønn, og fullstendig overføring til membran. Bilder av en representativ gel er vist i figur 4.9. For alle gelene ble det sett en som forventet separasjon av proteiner og en relativt lik mengde protein i hver brønn. Etter overføring kunne kun deler av standarden og et bånd ved høy molekylvekt ses på gelen, slik at relevante proteiner antas å ha blitt overført til membranen.



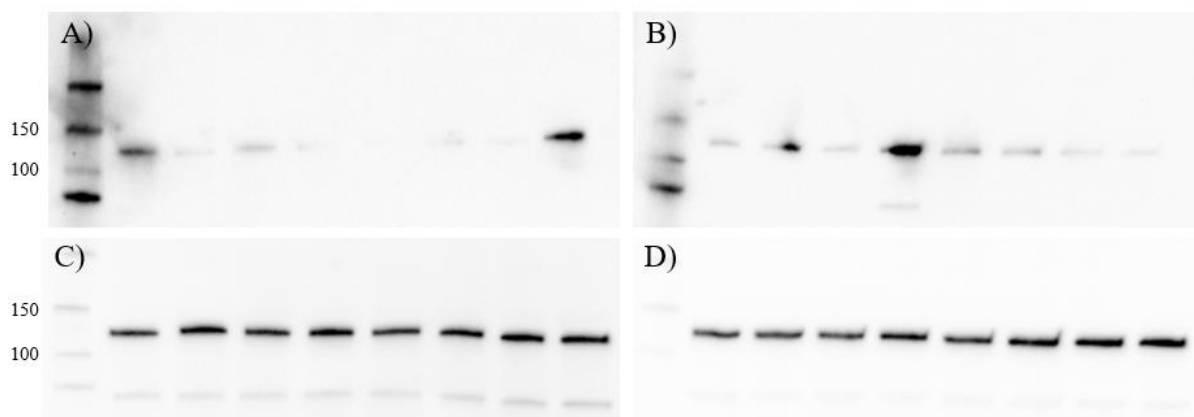
Figur 4.9: SDS-polyakrylamid gel benyttet til Western blot avbildet før og etter overføring til membran. 10 μ g protein fra prøver av homogenisert levervev fra mus tilhørende de åtte eksperimentelle gruppene ble separert på en 4-15% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel (Bio-rad). Gelen ble avbildet ved bruk av Stainfree gel-applikasjon på ChemiDoc™ XRS+ System. A) Gel før overføring til PVDF-membran, med 1 min aktivering og 1 sek eksponeringstid. B) Gel etter overføring til PVDF-membran, uten aktivering og med 1 sek eksponeringstid. Figuren viser gel for prøve 33-40, og tilsvarende resultater ble sett for de øvrige prøvene.

For alle prøvene og blottene ble det sett et distinkt bånd rundt 130 kD samt et svakt bånd rundt 70 kD, som eksemplifisert i figur 4.10. Dette stemmer imidlertid ikke overens med forventet størrelse for CYP1A1 på 57 kD. Videre var båndet tydelig til stede for alle prøvene, kontrollgruppen inkludert, og det var til dels store forskjeller mellom biologiske replikater innad i hver gruppe. Det er derfor usikkert om det observerte båndet tilsvarer CYP1A1, og dette vil bli diskutert nærmere i avsnitt 5.1.1.



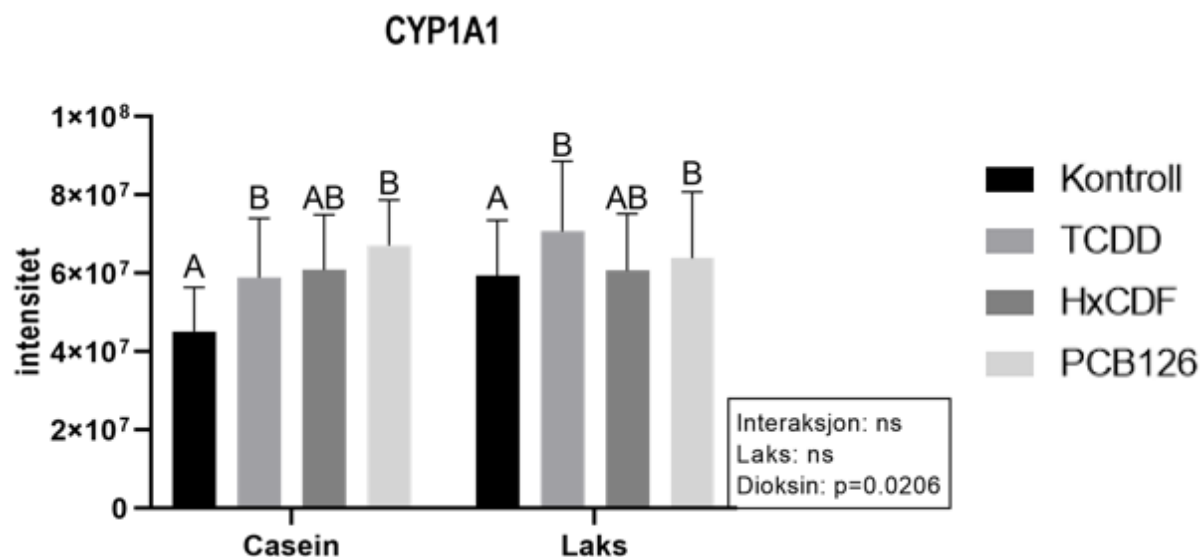
Figur 4.10: Representativt Western blot med CYP1A1-antistoff. CYP1A1 ble detektert i homogenisert levervev fra mus ved bruk av Anti-CYP1A1 Antibody (sc-393979). 10 μ g protein ble tilsatt til hver brønn, og Precision Plus Protein WesternC Standards ble brukt som proteinstandard. Prøver fra mus behandlet med kontroll kasein (CC), kontroll laks (CL), TCDD kasein (TC), TCDD laks (TL), HxCDF kasein (HC), HxCDF laks (HL), PCB126 kasein (PC) og PCB126 laks (PL) ble inkludert på blottene. Det ble sett et bånd ved rundt 130 kDa samt et svakere bånd ved rundt 70 kDa. Figuren viser blott for prøve 65-72, og tilsvarende resultater ble sett for de øvrige prøvene.

Ettersom forventet båndstørrelse ikke ble oppnådd ble tre ulike antistoff for CYP1A1 forsøkt (figur 4.11 a-c). Samme bånd ble imidlertid sett på alle blottene, uavhengig av antistoff. Det ble også forsøkt å doble mengden β -merkaptoetanol og inkuberingstiden ved 95°C i tilfelle størrelsen skyldtes ufullstendig denaturering, også dette med samme resultat (figur 4.11d). Anti-CYP1A1 Antibody (sc-393979) ble også benyttet til et blott med prøver fra Leydigceller (MLTC-1) og Sertoliceller (TM4) fra mus med og uten eksponering for 5 pM TCDD, og det ble igjen sett bånd ved samme størrelse med en oppregulering for TCDD (upublisert).



Figur 4.11: Western blot med ulike CYP1A1-antistoff (A-C) og med økt mengde β -merkapttoetanol (D). Svakere signal ses i a) og b) grunnet en feil i eksperimentell utførelse som senere ble rettet opp. Prøve fra hver av de åtte behandlingsgruppene tilsvarende 10 μ g protein ble brukt til hvert av blottene. Precision Plus Protein WesternC Standards ble brukt som proteinstandard. A) Blott med Rabbit CYP1A1 Polyclonal Antibody (MBS9409697). B) Blott med Rabbit Anti-CYP1A1 antibody (ab235185). C) Blott med Anti-CYP1A1 Antibody (A-9) (sc-393979). D) Blott med Anti-CYP1A1 Antibody (A-9) (sc-393979), og dobbel mengde β -merkapttoetanol samt dobbel inkuberingstid ved 95°C.

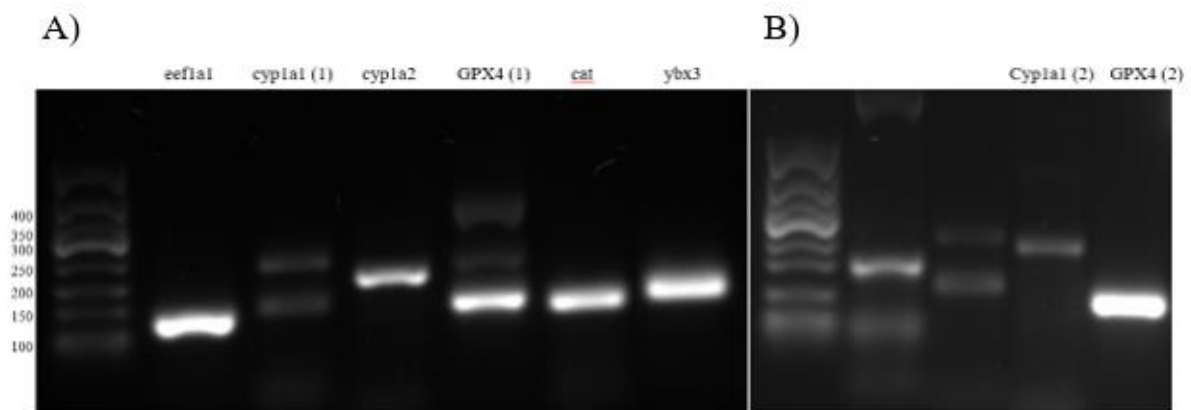
Båndet ved 130 kDa ble normalisert mot den korresponderende Stainfree-brønneren, og intensitet ble kvantifisert for hver av prøvene. Kontrollgruppen skilte seg ut med lavere uttrykk, og det ble også sett mindre forskjeller mellom dioksinkongenerne (figur 4.12). Toveis ANOVA ga en p-verdi på 0.0206 for hovedeffekt for dioksin, med TCDD og PCB126 signifikant forskjellige fra kontroll.



Figur 4.12: Båndintensitet for Western Blot med CYP1A1-antistoff. Bånd fra Western blot for hver av prøvene ble normalisert mot den korresponderende Stainfree-brønningen, og båndstyrke ble kvantifisert i Image Lab som beskrevet i avsnitt 3.5.3. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SD (n=10). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf. Ulike store bokstaver representerer statistisk signifikans ($p < 0.05$) for hovedeffekt for dioksin.

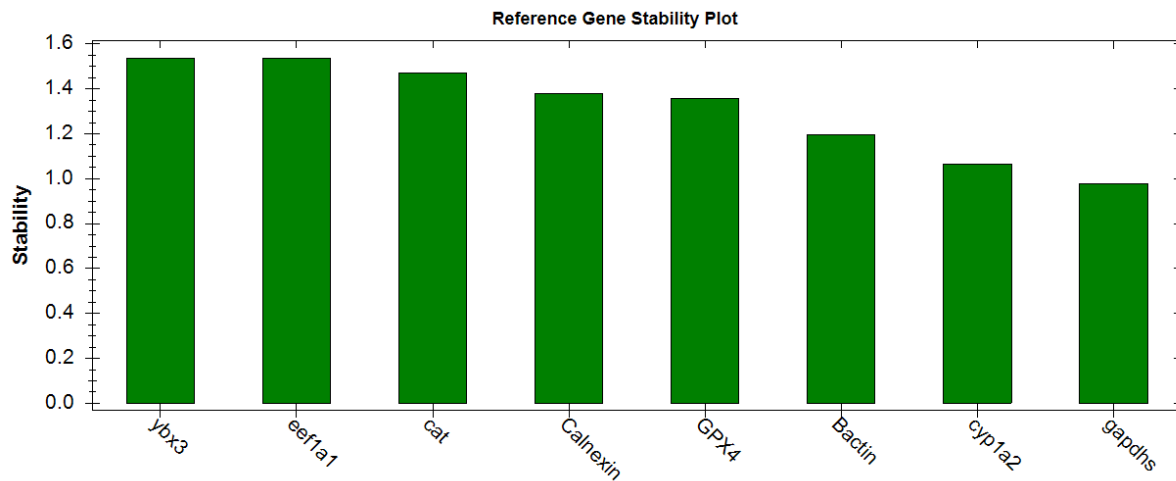
4.8 KVANTITATIV PCR

De benyttede primerene ble i forkant av qPCR-reaksjonen kontrollert ved OneStep RT-PCR etterfulgt av agarose gelelektroforese (figur 4.13a). Det ble sett ett tydelig bånd med korrekt størrelse for de fleste primerene, med svake bånd ved lav molekylvekt for enkelte av genene som kan korrespondere til noe dannelse av primerdimere. For *CYP1A1* og *GPX4* ble derimot flere bånd sett: *CYP1A1* ga to svake bånd mens *GPX4* ga et sterkt bånd ved rett størrelse samt to svakere bånd ved lavere molekylvekt. Det ble derfor forsøkt andre primere for disse to genene, som igjen ble testet ved OneStep og gelelektroforese (figur 4.13b). *GPX4* ga for de nye primerne et svært sterkt bånd ved korrekt størrelse, mens *CYP1A1* ga et svakere bånd ved korrekt størrelse hvor det igjen ble sett signal ved lav molekylvekt. Primer 2 ble derfor benyttet til qPCR for *GPX4*, og både primer 1 og 2 ble benyttet for *CYP1A1*.



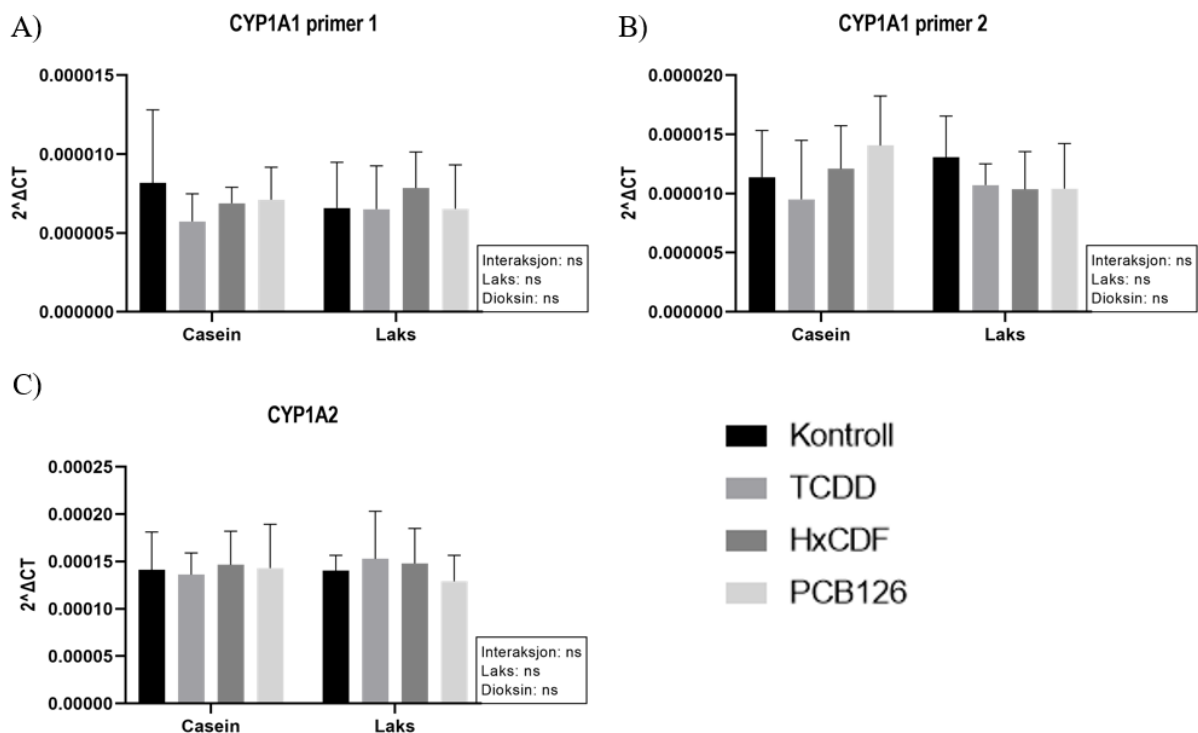
Figur 4.13: Test av primere. OneStep RT-PCR etterfulgt av agarose gelelektroforese ble gjort for hver av de benyttede primerene. En blanding av RNA fra alle prøvene ble benyttet som templat i PCR-reaksjonen, og PCR-produktene ble etterpå tilsatt BlueJuice loading buffer og kjørt på en 1% agarosegel. Gelen ble farget med GelRed og fremkalt på ChemiDoc™ XRS+ System. GelPilot 50 bp ble benyttet som standard. Umarkerte brønner i figuren inneholder *cyp1a1*-primere som ikke ble benyttet videre i qPCR.

Videre ble stabiliteten til referansegeneene testet, sammen med målgenene, ved bruk av GeNorm-algoritmen benyttet i Reference Gene Selection Tool i CFX Maestro. Det ble sett høy stabilitet for alle genene, med høyest stabilitet for *eef1a1* og *ybx3* (figur 4.14).



Figur 4.14: Stabilitet for gener benyttet i qPCR. Reference Gene Selection Tool i CFX Maestro, hvor GeNorm-algoritmen blir benyttet, ble brukt for å teste stabilitet til referansegene sammenlignet med målgenene. TBP og cyp1a1 ble ekskludert fra analysen av algoritmen.

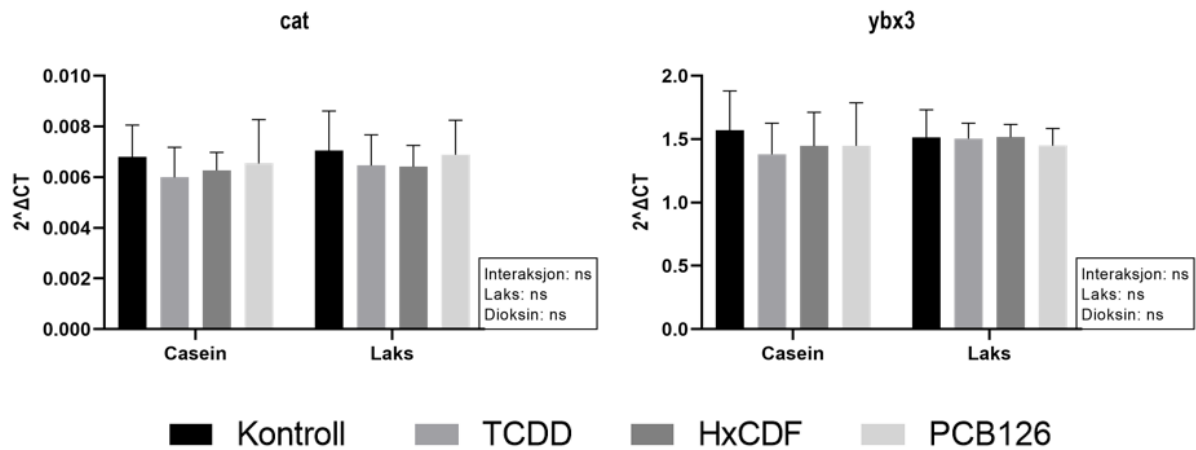
Genuttrykk for *CYP1A1* ble målt ved de to primerne spesifisert i avsnittet over og i avsnitt 2.5, og det ble i tillegg målt uttrykk av *CYP1A2* (figur 4.14). For *CYP1A2* ble det i svært liten grad sett forskjeller mellom gruppene. For *CYP1A1* var det noe mer variasjon, men det kunne i liten grad ses en sammenheng mellom de to benyttede primerne og forskjellene var ikke statistisk signifikante.



Figur 4.14: Uttrykk av *CYP1A1* og *CYP1A2* i testikler. Genuttrykk ble målt ved qPCR, ved bruk av primere spesifisert i avsnitt 2.5. De målte C_q -verdiene ble normalisert mot C_q -verdien for referansegenet *eef1a1* for hver prøve og presenteres som $2^{\Delta C_q}$. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SD (n=8). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf.

Det ble i tillegg målt uttrykk av antioksidantene *GPX4* og *cat*, og de spermatogenese-relaterte genene *ccin*, *ybx3* og *gapdhs*. De tre sistnevnte ble inkludert med bakgrunn i en proteomikkanalyse utført tidligere ved HI, hvor *ccin*, *ybx3* og *gapdhs* viste endret uttrykk som følge av dioksineksponering. Uheldigvis ble det sett svært høye effektiviteter for *GPX4* og *gapdhs*, og betydelig amplifisering av negative kontroller for *ccin*. Uttrykk relativt til referansegenet *eef1a1* er derfor kun presentert for *cat* og *ybx3*.

Det ble sett en tendens til redusert uttrykk som følge av dioksineksponering for *cat*, særlig for gruppene som hadde fått kasein. Denne forskjellen var imidlertid ikke statistisk signifikant ved toveis ANOVA, og det ble heller ikke sett signifikante effekter av laks eller av interaksjonseffekter. Det ble heller ikke sett endringer som følge av behandling for *ybx3*.



Figur 4.15: Uttrykk av *cat* og *ybx3* i testikler. Genuttrykk ble målt ved qPCR, ved bruk av primere spesifisert i avsnitt 2.5. De målte C_q -verdiene ble normalisert mot C_q -verdien for referansegnet *eef1a1* for hver prøve og presenteres som $2^{\Delta C_q}$. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SD (n=8). P-verdier fra toveis ANOVA for laks (hovedeffekt), dioksin (hovedeffekt) og interaksjonseffekt mellom laks og dioksin er oppgitt i boks til høyre for hver graf.

5. DISKUSJON

Hovedmål i dette prosjektet har vært å undersøke påvirkning av ulike dioksinkongenere og av laks i dietten på dioksinmediert reproduktiv toksisitet hos mus med human AhR. Det ble imidlertid ikke observert endringer som følge av eksperimentell behandling verken for genuttrykk eller for reproduktive endepunkt, men det ble sett en oppregulering av CYP1A1 på proteinnivå som følge av både laks og dioksin. Noen av de oppnådde resultatene må likevel ses som usikre grunnet eksperimentelle utfordringer. Mangelen på observert dioksintoksitet gjorde det i liten grad mulig å vurdere effekter fra laks på toksisitet, men det ble observert økt kropps- og levervekt, økt fettakkumulering i lever samt endret uttrykk av leverenzymene ALT og AST hos gruppene som hadde fått laks.

5.1 METODOLOGI

Både for Western Blot, hormonmålinger ved ELISA og qPCR gjorde uventede resultater og eksperimentelle problemer at de oppnådde resultatene må anses som usikre. Jeg har likevel valgt å inkludere disse resultatene i oppgaven, basert på grunnngivninger gitt under.

5.1.1 WESTERN BLOT

Ved Western Blotting med CYP1A1-antistoff ble det sett et bånd med markert ulik størrelse enn det som var forventet, og uspesifikk binding og multimerisering av CYP1A1 ble vurdert som mulige forklaringer på dette.

Uspesifikk binding kan i Western blotting oppstå av ulike grunner, blant annet kryssreaktivitet for primært eller sekundært antistoff, ukompatibel blokkingsbuffer og utilstrekkelig blokkering eller vasking. Ettersom både vasking og blokkering ble intensivert i løpet av feilsøkingen uten endringer i resultat, samt at det ble sett ett distinkt bånd ved feil størrelse heller enn en generell uspesifikk binding, ble vasking og blokkering ansett som lite trolige forklaringer. Det ble også forsøkt tre ulike CYP1A1-antistoff, hvorav to var polyklonale og det siste som ble benyttet i de inkluderte blottene var monoklonalt og HRP-konjugert. I motsetning til polyklonale antistoff, som består av en heterogen blanding av antistoffer derivert fra ulike B-celler, produseres monoklonale antistoff fra én B-lymfocyt-klone. De gjenkjenner derfor én enkelt epitop på antigenet og vil i mindre grad enn polyklonale antistoff kryss reagere med andre proteiner (Lipman et al., 2005). Spesifisiteten til det monoklonale antistoffet ble ytterligere validert ved BLAST (Altschul et al., 1990) av epitopen antistoffet gjenkjenner, hvor betydelig sekvenslikhet

kun ble sett for CYP1A1 (100%) og CYP1A2 (89%). Da samme bånd ble detektert ved bruk av alle tre antistoffene anses kryssreaktivitet for det primære antistoffet som lite sannsynlig. På grunn av HRP-konjugering av det monoklonale antistoffet ble det da heller ikke benyttet sekundært antistoff, slik at båndet ikke kan skyldes kryssreaktivitet for sekundært antistoff. Videre anses deteksjon av samme bånd også i Leydigceller og Sertoliceller fra mus ved bruk av samme anti-CYP1A1 antistoff å øke sannsynligheten for at det detekterte båndet tilsvarer CYP1A1.

Denaturering og SDS-binding før gelelektroforese vil i teorien gi proteinene en konstant ladning-masse-ratio slik at de utelukkende migrerer i henhold til sin molekylvekt. Det har imidlertid blitt vist at bindingsnivåer for SDS varierer blant annet som følge av proteiners tertiærstruktur og hydrofobisitet, slik at målte molekylvekter ikke vil være eksakte. Mer spesifikt har membranproteiner ofte blitt observert å ha en migrasjon som ikke korrelerer med formelbaserte molekylvekter, muligens grunnet ufullstendig denaturering og SDS-binding (Rath et al., 2009). CYP1A1 er også glykosylert ved serin 71 (The UniProt Consortium, 2019), og glykosylering regnes som en posttranslasjonell modifisering som kan gi store utslag på molekylvekt. Det kan derfor tenkes at det svake båndet sett rundt 70 kDa skyldes uventet migrering potensielt i kombinasjon med glykosylering, og at båndet på ~130 kDa oppstår som følge av dimerisering av størstedelen av CYP1A1-molekylene. Jeg har som følge av disse vurderingene valgt å anta at båndet på 130 kDa tilsvarer CYP1A1 i denne oppgaven, men ytterligere validering vil være nødvendig for å i større grad bekrefte dette.

Ved måling av total proteinkonsentrasjon ved BCA-assay ble det ikke inkludert blank, slik at de målte verdiene ikke er justert for bakgrunn fra RIPA-buffer med proteaseinhibitorer som prøvene ble homogenisert i. Det må derfor antas at mindre enn 10 µg protein i praksis har blitt benyttet per brønn. Hensikten med proteinmåling var imidlertid å oppnå en lik mengde protein for hver brønn, og mengden brukt til Western blotting ble justert basert på oppnådd signal. Manglende bakgrunnsjustering vil derfor ikke ha påvirket resultatet, utover unøyaktig rapportering av benyttet mengde.

5.1.2 KVANTITATIV PCR

Det ble sett betydelig høyere C_q -verdier for prøver plassert langs ytterkanten av 384-brønnsplaten for flere av genene, og dette påvirket uheldigvis både standardkurver, inter-run kontroller og et utvalg av prøvene. Det kan tenkes at prøvemateriale har fordampet fra disse

brønnene grunnet ufullstendig plateforsegling, eventuelt at kontaminasjon i større grad har blitt innført enn for brønnene lenger inne på platen. Det ble imidlertid ikke funnet en løsning på problemet innen tidsskjemaet til rådighet.

For duplikater plassert langs kanten av platen med store standardavvik ble duplikatet lengst mot kanten ekskludert fra analyse. Dette ble gjort fordi det ble sett et konsekvent mønster med avvikende C_q -verdier for disse prøvene, samtidig som det andre duplikatet hadde C_q -verdier sammenlignbare med de andre prøvene på platen. Prøver plassert nederst på platen ble derimot konsekvent ekskludert, da begge duplikatene her kunne være påvirket av den observerte kanteffekten.

Det blir anbefalt i MIQE-retningslinjene å benytte flere referansegener, og normalisering mot kun ett referansegen må støttes av klare bevis for at uttrykk ikke varierer som følge av behandling (Bustin et al., 2009). Det ble derfor opprinnelig inkludert fire referansegener, og stabiliteten til disse ble testet sammen med målgenene ved bruk av GeNorm-algoritmen (figur 4.14). Stabiliteten for tre av disse var imidlertid relativt lav, i tillegg til at det i flere tilfeller var store standardavvik mellom replikater både for prøver og for standarder. På grunn av dette ble kun *eef1a1* benyttet, siden det her ble bekreftet høy stabilitet samt at gode data ble oppnådd.

Det ble i dette forsøket inkludert standardkurver for å kontrollere reproduserbarhet og lineært område for reaksjonene, samt for å bestemme primerspesifikke effektiviteter. Det ble ut fra disse kurvene sett varierende effektiviteter, med verdier på 120-140% for flere av de inkluderte genene. $2^{\Delta C_q}$ -metoden forutsetter tilnærmet lik effektivitet for målgen og referansegen (Livak og Schmittgen, 2001), og dette vil da ikke være oppfylt for de målte dataene. Ved forskjeller i effektivitet vil ikke forskjeller mellom C_q -verdier for målgen og referansegen holdes konstante ved varierende mengde templat, slik at det oppnås unøyaktige beregninger av relative konsentrasjoner (Bustin et al., 2009). Effektiviteter over 100% kan i tillegg tyde på problemer med reaksjonen som vil kreve optimalisering, for eksempel tilstedeværelse av inhibitorer. Det ble vurdert å benytte en metode for databehandling hvor det blir justert for ulike effektiviteter, for eksempel som beskrevet av Pfaffl (2001). Dette ble likevel ikke gjort fordi standardkurvene i seg selv, og dermed også de beregnede effektivitetene, ble regnet som usikre grunnet til dels store forskjeller mellom tekniske replikater.

Ettersom prøver for samme gen ble separert over flere plater var det nødvendig med interrun-kontroller for å justere for forskjeller blant annet i instrumentinnstillinger og prøvetillaging. Da de planlagte kontrollene i liten grad var brukbare ble det laget en justeringsfaktor basert på

standardkurvene. Denne vil imidlertid heller ikke gi en nøyaktig justering, særlig siden standardkurvene ofte ikke var optimale. Kombinasjonen av den observerte kanteffekten, usikker interrun-justering, kun ett referansegen og varierende effektiviteter vil dermed gi svært usikre data. Resultatene er likevel i stor grad inkludert, da de antas å i det minste kunne gi en indikasjon på uttrykksmønster for de ulike genene.

5.1.3 ELISA

Ved kvantifisering av LH og T ved ELISA lå målingene i øvre del og til dels utenfor deteksjonsområdet til kitet, og en nøyaktig kvantifisering kunne derfor ikke gjennomføres. En estimert kvantifisering for testosteron hvor målinger utenfor standardkurven ble ekskludert ga imidlertid en gjennomsnittlig verdi for alle prøvene på 18 ng/ml, som er markert høyere enn flere nivåer målt tidligere. I en studie hvor ulike målemetoder for testosteron i mus ble sammenlignet ble gjennomsnittsverdier på rundt 3.5 ng/ml sett, med maksimale verdier rundt 17 ng/ml (Handelsman et al., 2015). Testosteronnivåer lavere enn 4 ng/ml har også blitt sett i andre studier hvor dette har blitt målt, blant annet Mably et al. (1992b), Gray et al. (1995), Roman et al. (1995), Faqi et al. (1998) og Ohsako et al. (2001). Samtidig ble målinger med forventet spredning og konsentrasjoner oppnådd for standardkurven i dette forsøket, og det ble visuelt observert at de to utførte testosteronmålingene i stor grad samsvarte. Tilsvarende samsvarte målingene for LH og testosteron, som også var forventet ettersom LH direkte regulerer produksjon av testosteron. Det ble derfor antatt at målingen grunnleggende sett hadde fungert, selv om en forklaring på forskjellen i konsentrasjon fra tidligere studier ikke ble funnet.

5.2 DOSERING OG EKSPONERINGSTIDSPUNKT

62.5 ng TEQ/kg fôr ble gitt i dyreforsøket, som omtrentlig vil tilsvare en dosering på 10 ng TEQ/kg kroppsvekt/dag. Kronisk dosering med 10 ng/kg kroppsvekt/dag forventes å gi en kroppsbyrde på 100 ng/kg kroppsvekt (EFSA CONTAM, 2018), som er sammenlignbart med doser gitt i tidligere dyrestudier hvor reproduktive effekter ble sett. Blant annet ble det for redusert spermkonsentrasjon estimert en kroppsbyrde på 25 ng TCDD/kg kroppsvekt hos Faqi et al. (1998), og en maternell kroppsbyrde på 28 ng/kg kroppsvekt hos Mably et al. (1992a). 100 ng/kg kroppsvekt ble også satt som øvre grenseverdi for kroppsbyrde under EFSAs revurdering av TWI for dioksiner i 2018, slik at kun studier med lik eller lavere kroppsbyrde enn dette ble inkludert (EFSA CONTAM, 2018). Det var derfor forventet at den benyttede dosen skulle gi målbare effekter på reproduksjon.

Samtidig har flere studier av nyere dato med lignende doseringsoppsett ikke vist endringer i spermkonsentrasjon. Bell et al. (2007) observerte forsinket pubertetsutvikling, men ingen endringer for spermparametre, ved en enkelt dose på 50 ng/kg kroppsvekt. Tilsvarende ble ingen spermrelaterte effekter sett hos Ohsako et al. og Ikeda et al., hvor henholdsvis en enkelt dose på opptil 800 ng TCDD/kg kroppsvekt, og repetert dosering med en innledende dose på 400 ng TCDD/kg kroppsvekt med oppfølgingsdoser på 80 ng/kg kroppsvekt ble benyttet (Ikeda et al., 2005, Ohsako et al., 2001). Alle de overnevnte studiene har også undersøkt effekter etter eksponering på fosterstadiet, som regnes som det mest sensitive tidsrommet for eksponering for dioksiner og andre miljøgifter. I dette forsøket ble derimot musene eksponert i 13 uker fra 3 til 16 ukers alder. Eksponeringen har da foregått fra før pubertet og kjønnsmodning og fram til voksen alder, slik at kritiske stadier for utvikling av reproduksjonssystem har blitt omfattet. Likevel kan dette også ha påvirket mangel på observert toksisitet.

5.3 DIOKSIN PÅVIRKET IKKE HPG-AKSE OG SPERMATOGENESE

Verken testikkelvekt, testikkelhistologi, spermkonsentrasjon eller nivåer av LH og testosteron var endret som følge av dioksineksponering. Mangelen på effekt for alle endepunktene indikerer at reproduksjon ikke ble påvirket av den benyttede dosen.

Testikkelvekt kan gi informasjon om funksjonell tilstand for reproduksjonssystemet, hvor økt vekt kan indikere en forstyrrelse i væskebalanse og redusert vekt gjerne indikerer redusert spermatogenese (Creasy, 2003). Redusert vekt har blitt sett etter dioksineksponering i flere tidligere studier (Gray et al., 1995, Jin et al., 2008, Mably et al., 1992a, Roman et al., 1995). Samtidig har ingen signifikante endringer blitt sett i andre studier (Faqi et al., 1998, Ohsako et al., 2001, Theobald og Peterson, 1997). Måling av organvekt i toksikologiske studier kan videre kompliseres dersom kroppsvekt samtidig påvirkes av toksikanten eller av andre faktorer. Organvekt oppgis derfor ofte relativt til kroppsvekt for å skille mellom redusert organvekt som primær mekanisme for en toksikant, og en reduksjon som oppstår sekundært til redusert kroppsvekt. Det forutsettes imidlertid da et proporsjonalt forhold mellom endring i kroppsvekt og endring i organvekter. Bailey et al. undersøkte forholdet mellom kroppsvekt og ulike organvekter hos rotter, og utarbeidet ut fra dette anbefalinger for analysemetoder for hvert organ basert på proporsjonalitet. Testikler var i deres studie blant organene hvor proporsjonalitet ikke var oppfylt, slik at relativ organvekt ikke ble regnet som et godt mål (Bailey et al., 2004). I dette forsøket ble det sett en tydelig økning i kroppsvekt som følge av laks, samtidig som absolutt testikkelvekt var upåvirket av eksperimentell behandling. Relativ testikkelvekt var derimot

signifikant redusert hos gruppene som hadde fått laks. Tatt i betraktning vurderingene fra Bailey et al. antas imidlertid denne reduksjonen å være en konsekvens av generell vektøkning, og dermed være uten annen biologisk betydning. Organvekter er derfor oppgitt som absolutt vekt i denne oppgaven.

Histologiske undersøkelser har blitt regnet blant de mest sensitive metodene for å oppdage endringer på mannlig reproduksjon forårsaket av fremmedstoffer (Ulbrich og Palmer, 1995). I tillegg til å være en sensitiv deteksjonsmetode for toksisitet kan histologiske undersøkelser gi informasjon om virkemåte for toksikanter som påvirker spermatogenese, ettersom ulike angrepspunkter til dels vil kunne føre til ulike effekter. Blant annet kan det ses degenerering og apoptose av ulike celletyper som inngår i spermatogenese for toksikanter som virker direkte på spermatocytter eller spermatogonia, tilbakeholdelse av spermatider ved utilstrekkelige testosteronnivåer, og degenerering av elongerte spermatider ved skade på Sertoliceller (Vidal og Whitney, 2014). Ved TCDD-eksponering har det tidligere blitt sett blant annet degenerering av germ cells i ulike stadier av spermatogenese (El-Sabeawy et al., 1998, Jin et al., 2008), redusert antall tubuli som inneholdt sperm (Choi et al., 2008), redusert diameter for seminiferous tubuli (El-Sabeawy et al., 1998, Choi et al., 2008), og pyknotiske kjerner og cellerester i lumen i enkelte tubuli (Faqi et al., 1998). I kontrast til disse studiene ble her ingen histologiske endringer sett etter dioksineksponering. Imidlertid var det stor variasjon i mengden elongerte spermceller i lumen mellom ulike tubuli innad i hvert snitt. Modning av spermceller kan hos mus deles inn i tolv stadier med til dels ulik sammensetning av spermceller i seminiferous tubuli (Ernst et al., 2019). Det er derfor mulig at forskjeller i andelen tubuli med elongerte spermatider i lumen kunne ha blitt sett mellom de eksperimentelle gruppene ved en opptelling av tubules med og uten modne spermceller i hvert snitt, hvor også de spermatogenetiske stadiene måtte ha blitt tatt i betraktning.

I likhet med hos Ohsako et al. og Ikeda et al. ble det heller ikke sett redusert spermkonsentrasjon som følge av dioksineksponering. Bell et al. (2007) foreslår i sin artikkel forskjeller mellom laboratorier med hensyn til dyr, dyrehold, tellemetoder og statistiske analyser som mulige årsaker for manglende replikasjon av effekter på spermatogenese i nyere studier. Spermantall blir også regnet som et variabelt endepunkt (Ashby et al., 2003), og spermproduksjon kan påvirkes av blant annet diett, stressnivåer og generell helse (Foster et al., 2010). I en systematisk oversikt over studier hvor TCDDs effekt på spermatogenese ble undersøkt, utført av Foster et al., ble det konkludert med at spermantall i bitestikler var knyttet til TCDD-eksponering i større grad enn spermproduksjon og spermatogenese. Det ble derfor foreslått at TCDDs påvirkning

på reproduktiv funksjon kan skyldes dysregulering av androgensignalisering eller spermoverføring og bitestikkel-funksjon heller enn effekter på testikler (Foster et al., 2010). Mangelen på endringer for både testikkelmorfologi og spermkonsentrasjon kan tyde på at spermatogenese ikke ble påvirket av det benyttede eksponeringsoppsettet. Det ble heller ikke sett endringer i konsentrasjoner av LH eller testosteron, slik at også androgensignalisering via HPG-aksen antas å være intakt.

5.4 DIOKSIN OG LAKS GA INDUKSJON AV CYP1A1 I LEVER

Normalisering mot totalt protein ga lavere uttrykk for kontroll kasein sammenlignet med gruppene som hadde fått dioksin, laks eller en kombinasjon av disse. Forskjellen mellom gruppene var imidlertid relativt små, og tydelig uttrykk ble sett også for kontrollgruppen som ikke vil ha blitt eksponert for dioksiner eller andre typiske eksogene AhR-ligander via dietten. Dersom det antas at det observerte båndet tilsvarer CYP1A1 er dette uventet, da lavt konstitutivt uttrykk av CYP1A1 samt kraftig induksjon ved eksponering for AhR-ligander er svært etablert innen toksikologi og gjentatte ganger har blitt sett i lever hos mus og rotter (Moorthy, 2000, Walker et al., 1999, Zacharova et al., 2003). Et nivå av CYP1A1-uttrykk også uten eksponering for dioksiner eller andre miljøgifter, for eksempel som følge av endogene AhR-ligander som kan ha vært til stede i dietten, vil likevel ikke være unaturlig. Blant annet har arakidonsyremetabolitter, heme-metabolitter og tryptofanmetabolitter blitt foreslått som endogene AhR-ligander (Nguyen og Bradfield, 2008), og døgnvariasjoner potensielt relatert til matinntak har blitt sett for uttrykk av både AhR og CYP1A1 (Ávila-Rosales et al., 2021, Tanimura et al., 2011). I tillegg har induksjon av CYP1A1 blant annet blitt vist som følge av hyperoksi (Okamoto et al., 1993) og eksponering for stoffer uten vist AhR-affinitet (Gradelet et al., 1997), slik at CYP1A1-induksjon ikke alltid er knyttet til AhR-aktivering (Delescluse et al., 2000).

Lav grad av induksjon ved dioksineksponering kan videre være relatert til artsspesifikke forskjeller i ligandaffinitet for AhR, som nevnt i avsnitt 1.6. CYP1A1-induksjon hos mus med human AhR (hAhR) har også tidligere blitt undersøkt. Moriguchi et al. målte CYP1A1-induksjon hos mus med hAhR etter eksponering for AhR-ligandene TCDD og 3-metylkolantren (3-MC) på fosterstadiet, og sammenlignet med induksjon hos en dioksinsensitiv (C57BL/6J) og en dioksinresistent (DBA/2) musestamme. For 3-MC ble det da sett sammenlignbar induksjon for hAhR og DBA/2, mens TCDD ga betydelig svakere induksjon hos hAhR enn hos både DBA/2 og C57BL/6J (Moriguchi et al., 2003). Det har også blitt sett høyere

ligandbindingsaffinitet for blant annet indirubin for human AhR både generelt og innsatt hos mus, og det har ut fra dette blitt foreslått at human AhR i større grad enn AhR hos gnagere er tilpasset aktivering ved endogene ligander (Flaveny et al., 2009a, Flaveny et al., 2009b). Det kan også tenkes at den benyttede dosen ikke har vært tilstrekkelig til å gi en tydelig induksjon, særlig tatt i betraktning mulig lavere dioksinsensitivitet hos mus med human AhR. Dette støttes også av at en tydeligere induksjon ble sett for eksponering av Leydig- og Sertolicellene, hvor human AhR ikke er innsatt og det ble benyttet en mer akutt dosering.

Ettersom TEF-justerte doser ble benyttet vil lik grad av CYP1A1-induksjon i utgangspunktet være forventet for ulike dioksinkongenerne, men som nevnt i avsnitt 1.6 har ulik sensitivitet blitt sett for 1,2,3,4,7,8-HxCDF og PCB126 i tidligere studier med humane cellelinjer. Det ble her ikke sett store forskjeller mellom kongenerne, men HxCDF hadde et noe lavere uttrykk enn TCDD og PCB126. Dette står i motsetning til blant andre Larsson et al. (2015), hvor det ble sett høyere respons for HxCDF og lavere respons for PCB126 enn TEF-verdiene skulle tilsi.

5.5 GENUUTTRYKK BLE IKKE PÅVIRKET AV DIOKSIN ELLER AV LAKS

Det ble målt genuttrykk av *CYP1A1*, *CYP1A2*, *cat* og *ybx3* i testikler ved bruk av qPCR, og det ble ikke sett forskjeller i uttrykk mellom gruppene for noen av genene. Det har tidligere blitt vist at det ikke nødvendigvis er en klar sammenheng mellom gen- og proteinuttrykk. Det vil heller ikke være unaturlig med et lavere uttrykk på gennivå enn på proteinnivå ettersom musene her ble eksponert over 13 uker, både fordi mRNA har lavere stabilitet enn proteiner og fordi forskjellige tilbakekoplingsmekanismer kan finnes for å begrense genuttrykk i signalveier.

Ybx3 er et nukleinsyrebindende protein som er viktig for mannlig fertilitet (Snyder et al., 2015), og en nedregulering som tidligere sett ved proteomikk ville derfor kunne hatt innvirkning på spermatogenese. Det ble imidlertid ikke sett behandlingsrelaterte endringer i dette forsøket.

Cat er en oksidoreduktase som katalyserer spalting av den reaktive oksygenforbindelsen hydrogenperoksid (H_2O_2) til oksygen og vann. Det er dermed en antioksidant som inngår i cellens beskyttelse mot reaktive oksygenforbindelser. Katalaseaktivitet har i tidligere studier vært redusert som følge av dioksineksponering (Kern et al., 2002, Latchoumycandane et al., 2002). Det ble i denne studien sett en svak tendens mot redusert uttrykk, og det kan derfor tenkes at en lignende effekt kunne ha blitt sett også for mus med hAhR ved bruk av et annet doseringsoppsett. Dette er imidlertid usikkert tatt i betraktning at forskjellen ikke var statistisk signifikant samt usikkerhetsfaktorene diskutert i avsnitt 5.1.2.

Det ble heller ikke sett endringer i genuttrykk verken for CYP1A1 eller CYP1A2 i testikler som følge av behandling. Det ble derimot målt svært høye C_q -verdier, slik at uttrykk av CYP1A i testikler ser ut til å være lavt. Tilsvarende resultater har blitt funnet i tidligere studier, blant annet ble CYP1A1 ikke detektert i testikler ved qPCR hos Magre et al. (2012) og hos Korkalainen et al. (2004), og kun svært lavt uttrykk ble sett hos Yamamoto et al. (2004). Det har blitt vist et svært høyt konstitutivt uttrykk av AhR repressor (AhRR) i testikler, og lav TCDD-sensitivitet og lav grad av CYP1A1-induksjon i testikler har blitt foreslått å ha sammenheng med dette (Magre et al., 2012). Det finnes generelt også ulike tilbakekoplingsmekanismer for begrenning av *CYP1A1*-uttrykk i AhR-signalveien, blant annet relatert til CYP1A1-basert H_2O_2 -produksjon (Morel et al., 1999), slik at endringer i CYP1A1-uttrykk på proteinnivå uten endringer på gennivå kan tenkes etter langvarig eksponering. Det vil heller ikke være mulig å sammenligne uttrykk i lever og i testikler direkte, da lever har et betydelig høyere uttrykk av CYP1A1. Proteinuttrykk måtte derfor ha blitt målt også i testikler for å oppnå et fullstendig bilde.

5.6 LAKS PÅVIRKET KROPPSVEKT, LEVERVEKT OG FETTAKKUMULERING I LEVER

En vestlig diett karakterisert ved høyt energiinnhold fra proteiner, mettet fett og sukrose ble brukt i dyreforsøket, hvor en andel av kaseininnholdet ble erstattet med laks i de aktuelle gruppene. En slik diett regnes å i større grad representere et vestlig humant kosthold, og ble også benyttet ettersom dietten med laks ville ha et høyt fettinnhold og det var ønskelig å opprettholde et tilsvarende nivå av fett også i kaseindiettene. Det ble i dette forsøket sett en vektøkning for alle de eksperimentelle gruppene, sammen med et høyt innhold av fett i lever hos de fleste individene. Imidlertid ble en større vektøkning sett for gruppene som hadde fått laks enn gruppene som hadde fått kasein.

I likhet med kroppsvekt var også levervekt og mengden fett i lever signifikant økt hos gruppene som hadde fått laks, slik at økningen i kroppsvekt til en viss grad kan ha sammenheng med økt grad av fettakkumulering i leveren. Det ble også sett økte nivåer av leverskademarkørene ALT og AST for gruppene som hadde fått laks. Leveren har en sentral rolle innen metabolisme og energihomeostase ettersom glukose, fettsyrer og aminosyrer fra mat fraktes til leveren via portalåresystemet, og der blir metabolisert og lagret eller distribuert til andre organer regulert av næringsstoff- og hormonsignaler (Rui, 2014). Fettlever er nært relatert til overvekt og kan skyldes et for høyt energiinntak fra kostholdet, i tillegg til forstyrrelser i lipogenese, transport av fettsyrer fra leveren og fettsyreoksidasjon (Reddy og Rao, 2006). Dioksineksponering har

også blitt vist å kunne bidra til progresjon av fettlever via AhR-medierte endringer i blant annet i fettsyremetabolisme (Angrish et al., 2012). Ettersom fet fisk gir eksponering for dioksiner og andre fettløselige miljøgifter er det mulig at slike effekter kan ha bidratt til den økte lipidakkumuleringen sett i lever hos gruppene som hadde fått laks. Ingen forskjeller ble imidlertid sett som følge av dioksineksponering verken for kroppsvekt, levervekt eller fettakkumulering i lever, slik at det virker mer sannsynlig at endringene skyldes dietten i seg selv, for eksempel på grunn av ulik fettsyresammensetning.

Det kan likevel tenkes at den betydelig økte fettakkumuleringen hos de fleste individene har hatt en innvirkning på observert dioksintoksisitet. Dersom svakere effekter relatert til fettmetabolisme og -akkumulering har vært til stede som følge av dioksineksponering kan disse ha blitt maskert av den generelle økningen som følge av høyt fettnivå i dietten. Økt kroppsvekt og fettakkumulering kan også ha påvirket dioksintoksisitet via endringer i distribusjon og eliminasjon av dioksin. Fettvev har stor betydning for lagring og toksikokinetikk for dioksiner og andre fettløselige miljøgifter (Jackson et al., 2017), og overvekt har blitt satt i sammenheng med høyere kroppsbyrde for dioksin samtidig som en høyere andel vil lagres i fettvevet (Kim et al., 2011). En slik sekvestrering av dioksin kan gi en beskyttende effekt ved høyere fettnivåer ettersom lavere nivåer da vil være tilgjengelige i andre celler og vev hvor negative effekter kan forekomme (La Merrill et al., 2013).

5.7 ARTSSPESIFISITET OG RELEVANS FOR HUMAN TOKSIKOLOGI

Toksiske responser både påvirker og påvirkes av en lang rekke fysiologiske prosesser, slik at helhetlige responser vanskelig kan skilles fra konteksten de oppstår i. In vivo-forsøk vil derfor være nødvendige for å opprettholde cellulære og molekylære mekanismer ved studier av mekanismer for toksikanter. Mus er mye brukte modellorganismer, og transgene stammer hvor humane gener har blitt satt inn, slik som mus med human AhR, kan videre bidra til å kompensere for artsspesifikke forskjeller som finnes mellom mus og mennesker.

Det må likevel utvises forsiktighet ved sammenligning av resultater fra forsøksdyr med mennesker. For transgene stammer kan inkompatibilitet mellom innsatt humant protein og nødvendige murine kofaktorer og interagerende proteiner gi andre responser enn det som ville blitt sett hos mennesker (Moriguchi et al., 2003). Det ble også her brukt kun hannlige mus av en innavlet stamme, som dermed ikke representerer genetisk og kjønnsbasert variasjon som finnes hos mennesker. Mennesker vil også i reelle situasjoner eksponeres for en rekke ulike

stoffer samtidig, og slike stoffinteraksjoner vil i noen tilfeller kunne gi andre effekter enn forventet ved synergistiske eller antagonistiske mekanismer.

6. KONKLUSJON

Verken hormonnivåer, testikkelmorfologi, hormonnivåer eller genuttrykk var i dette forsøket endret som følge av dioksineksponering. Det kan derfor tyde på at den benyttede dosen ikke forårsaket reproduktiv toksisitet hos mus med human AhR.

Det ble sett en induksjon av CYP1A1 på proteinnivå i lever både for laks og for dioksin, med en noe svakere induksjon av HxCDF enn TCDD og PCB126. Induksjonen som følge av dioksineksponering var likevel betydelig svakere enn forventet, og det ble heller ikke sett endringer i genuttrykk for *CYP1A1* i testikler.

Det ble ikke sett interaksjonseffekter mellom laks og dioksin verken for reproduktive endepunkt eller for CYP1A1-induksjon. Mangelen på reproduktive effekter gjorde det likevel vanskelig å vurdere sjømatens effekt på reproduksjon. Laks i dietten ga derimot økt kropps- og levervekt, og økt grad av fettakkumulering i lever. Disse effektene kan ha hatt innvirkning på observert dioksintoksisitet.

VIDERE ARBEID

På grunn av de eksperimentelle problemene som oppstod for qPCR, ELISA og Western blot burde deler av forsøkene ha blitt gjentatt for å oppnå sikrere resultater. Det hadde vært ønskelig å kjøre qPCR-platene hvor det ble sett store standardavvik for duplikater på nytt, og å gjenta hormonomålingene med fortynnede prøver. Ytterligere validering av resultatet bør også gjennomføres for Western blotting ettersom det ikke ble sett bånd ved forventet størrelse for CYP1A1. Først og fremst burde det ha blitt inkludert en positiv kontroll hvor CYP1A1 har blitt bekreftet å være uttrykt, for eksempel opparbeidede cellelysater fra HeLa-, Hep G2- eller EOC 20-celler som foreslått av produsenten for antistoffet. Videre burde muligheten for at dimerisering av proteiner kan ha funnet sted undersøkes nærmere. For eksempel kunne kaotropiske denaturanter som urea ha blitt forsøkt. Proteinuttrykk av CYP1A1 burde også undersøkes i testikler, for å oppnå et klarere bilde av uttrykksmønster sammenlignet med det målte genuttrykket.

Det kunne også ha blitt forsøkt andre metoder for deteksjon av CYP1A1, for eksempel ved ELISA eller ved EROD-aktivitet. Proteomikk kan også benyttes for å oppnå informasjon om mulige dioksinregulerte proteiner som så kan undersøkes nærmere.

Det kan tenkes at flere toksiske effekter ville ha blitt sett dersom en høyere dose hadde blitt benyttet. Det vil også bli foretatt en måling av dioksinnivåer i lever på et senere tidspunkt, som vil kunne gi informasjon om reell kroppsbyrde som følge av den benyttede dosen.

REFERANSER

- Abeywardena, M.Y. & Patten, G.S. 2011. Role of ω 3 long-chain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 11, pp. 232-46. doi:10.2174/187153011796429817
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. & du Plessis, S.S. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32, pp. 1-17. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, pp. 403-10. doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2
- Angrish, M.M., Mets, B.D., Jones, A.D. & Zacharewski, T.R. 2012. Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 128, pp. 377-386. doi:10.1093/toxsci/kfs155
- Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Joiner, R. & Haseman, J. 2003. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci*, 74, pp. 129-38. doi:10.1093/toxsci/kfg093
- Ávila-Rosales, O.S., Díaz-Muñoz, M., Camacho-Carranza, R., Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., García-Rebollar, J.O. & Espinosa-Aguirre, J.J. 2021. Daytime Restricted Feeding Modifies the Temporal Expression of CYP1A1 and Attenuated Damage Induced by Benzo[a]pyrene in Rat Liver When Administered before CYP1A1 Acrophase. *Toxics*, 9, pp. 130. doi:10.3390/toxics9060130
- Bailey, S.A., Zidell, R.H. & Perry, R.W. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicologic pathology*, 32, pp. 448-466.
- Barouki, R., Coumoul, X. & Fernandez-Salguero, P.M. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*, 581, pp. 3608-3615. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.046
- Bell, D.R. 2011. *The Developmental Toxicity of Dioxin to the Developing Male Reproductive System in the Rat: Relevance of the AHR for Risk Assessment*. Hoboken, NJ, USA: Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bell, D.R., Clode, S., Fan, M.Q., Fernandes, A., Foster, P.M., Jiang, T., Loizou, G., MacNicoll, A., Miller, B.G., Rose, M., Tran, L. & White, S. 2007. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the developing male Wistar(Han) rat. I: No decrease in epididymal sperm count after a single acute dose. *Toxicol Sci*, 99, pp. 214-23. doi:10.1093/toxsci/kfm140
- Bjerke, D. & Peterson, R.E. 1994. Reproductive toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: different effects of in utero versus lactational exposure. *Toxicology and applied pharmacology*, 127, pp. 241-249.
- Bliss, S.P., Navratil, A.M., Xie, J. & Roberson, M.S. 2010. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*, 31, pp. 322-340. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.002
- Bock, K.W. & Köhle, C. 2006. Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical pharmacology*, 14;72(4):393-404. doi:10.1016/j.bcp.2006.01.017.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J. & Gallardo, S. 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process biochemistry (1991)*, 40, pp. 1999-2013. doi:10.1016/j.procbio.2004.08.006
- Brunnberg, S., Andersson, P., Lindstam, M., Paulson, I., Poellinger, L. & Hanberg, A. 2006. The constitutively active Ah receptor (CA-AhR) mouse as a potential model for dioxin exposure—Effects in vital organs. *Toxicology*, 224, pp. 191-201. doi:10.1016/j.tox.2006.04.045

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, pp. 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Carlson, E.A., McCulloch, C., Koganti, A., Goodwin, S.B., Sutter, T.R. & Silkworth, J.B. 2009. Divergent Transcriptomic Responses to Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists between Rat and Human Primary Hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 112, pp. 257-272. doi:10.1093/toxsci/kfp200
- Choi, J.-S., Kim, I.-W., Hwang, S.-Y., Shin, B.-J. & Kim, S.-K. 2008. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on testicular spermatogenesis-related panels and serum sex hormone levels in rats. *BJU International*, 101, pp. 250-255. doi:https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.07202.x
- Connor, K.T. & Aylward, L.L. 2006. Human Response to Dioxin: Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Molecular Structure, Function, and Dose-Response Data for Enzyme Induction Indicate an Impaired Human AhR. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 9, pp. 147-171. doi:10.1080/15287390500196487
- Creasy, D.M. 2003. Evaluation of testicular toxicology: A synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 68, pp. 408-415. doi:https://doi.org/10.1002/bdrb.10041
- Dalton, T.P., Puga, A. & Shertzer, H.G. 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chemico-Biological Interactions*, 141, pp. 77-95. doi:https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00067-4
- DeGroot, D., He, G., Fraccalvieri, D., Bonati, L., Pandini, A. & Denison, M.S. 2011. AhR ligands: promiscuity in binding and diversity in response. *The Ah receptor in biology and toxicology*, pp. 63-79.
- Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G. & Rahmani, R. 2000. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology*, 153, pp. 73-82. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00305-X
- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P. & Bonati, L. 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact*, 141, pp. 3-24. doi:10.1016/S0009-2797(02)00063-7
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Bruschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Furst, P., Håkansson, H., Halldorsson, T., Lundebye, A-K., Pohjanvirta, R., Rylander, L., Smith, A., van Loveren, H., Waalkens-Berendsen, I., Zeilmaker, M., Binaglia, M., Gomez Ruiz, J.A., Horvath, Z., Christoph, E., Ciccolallo, L., Ramos Bordajandi, L., Steinkellner, H. & Hoogenboom, L.R. 2018. Scientific Opinion on the risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA Journal* 2018;16(11):5333, 331 pp. doi :https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5333
- El-Sabeawy, F., Wang, S., Overstreet, J., Miller, M., Lasley, B. & Enan, E. 1998. Treatment of Rats during Pubertal Development with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Alters Both Signaling Kinase Activities and Epidermal Growth Factor Receptor Binding in the Testis and the Motility and Acrosomal Reaction of Sperm. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, pp. 427-442. doi:https://doi.org/10.1006/taap.1998.8426

- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S. & Fujii-Kuriyama, Y. 1994. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem*, 269, pp. 27337-43.
- Ernst, C., Eling, N., Martinez-Jimenez, C.P., Marioni, J.C. & Odom, D.T. 2019. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nat Commun* 10, 1251. doi: 10.1038/s41467-019-09182-1
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.-J. & Chahoud, I. 1998. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, pp. 383-392.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. 1996. Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 140, pp. 173-9. doi:10.1006/taap.1996.0210
- Festing, M., Overend, P., Borja, M.C. & Berdoy, M. 2002. The Design of Animal Experiments: reducing the use of animals in research through better experimental design. London: The Royal Society of Medicine Press.
- Flaveny, C.A., Murray, I.A., Chiaro, C.R. & Perdew, G.H. 2009a. Ligand selectivity and gene regulation by the human aryl hydrocarbon receptor in transgenic mice. *Molecular pharmacology*, 75, pp. 1412-1420. doi:10.1124/mol.109.054825
- Flaveny, C.A., Murray, I.A. & Perdew, G.H. 2009b. Differential Gene Regulation by the Human and Mouse Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicological Sciences*, 114, pp. 217-225. doi:10.1093/toxsci/kfp308
- Flaveny, C.A. & Perdew, G.H. 2009. Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol Cell Pharmacol*, 1, pp. 119-123. doi:10.4255/mcpharmacol.09.15
- Foster, W.G., Maharaj-Briceño, S. & Cyr, D.G. 2010. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Environ Health Perspect*, 118, pp. 458-64. doi:10.1289/ehp.0901084
- Furness, S.G.B., Lees, M.J. & Whitelaw, M.L. 2007. The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Letters*, 581, pp. 3616-3625. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.011
- Gdula-Argasińska, J., Czepiel, J., Totoń-Żurańska, J., Jurczyszyn, A., Perucki, W. & Wołkow, P. 2015. Docosahexaenoic acid regulates gene expression in HUVEC cells treated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett*, 236, pp. 75-81. doi:10.1016/j.toxlet.2015.05.002
- Gradelet, S., Astorg, P., Pineau, T., Canivenc, M.-C., Siess, M.-H., Leclerc, J. & Lesca, P. 1997. Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and β -apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochemical pharmacology*, 54, pp. 307-315.
- Gray, L., Kelce, W., Monosson, E., Ostby, J. & Birnbaum, L. 1995. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long-Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and applied pharmacology*, 131, pp. 108-118.
- Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A.A., McDonald, K., Kohn, J.E. & Posch, A. 2013. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*, 433, pp. 105-111. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.010

- Hahn, M.E. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, 141, pp. 131-160. doi:10.1016/S0009-2797(02)00070-4
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z. & He, Z. 2014. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 29, pp. 66-75. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.007
- Handelsman, D.J., Jimenez, M., Singh, G.K.S., Spaliviero, J., Desai, R. & Walters, K.A. 2015. Measurement of Testosterone by Immunoassays and Mass Spectrometry in Mouse Serum, Testicular, and Ovarian Extracts. *Endocrinology*, 156, pp. 400-405. doi:10.1210/en.2014-1664
- Hankinson, O. 2016. The role of AHR-inducible cytochrome P450s in metabolism of polyunsaturated fatty acids. *Drug Metab Rev*, 48, pp. 342-50. doi:10.1080/03602532.2016.1197240
- Hansen, D.A., Esakky, P., Drury, A., Lamb, L. & Moley, K.H. 2014. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Important for Proper Seminiferous Tubule Architecture and Sperm Development in Mice. *Biology of Reproduction*, 90. doi:10.1095/biolreprod.113.108845
- Hassoun, E.A., Li, F., Abushaban, A. & Stohs, S.J. 2000. The relative abilities of TCDD and its congeners to induce oxidative stress in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure. *Toxicology*, 145, pp. 103-113. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00221-8
- Hattori, Y., Takeda, T., Nakamura, A., Nishida, K., Shioji, Y., Fukumitsu, H., Yamada, H. & Ishii, Y. 2018. The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochemical pharmacology*, 154, pp. 213-221.
- Hellberg, R.S., DeWitt, C.A.M. & Morrissey, M.T. 2012. Risk-Benefit Analysis of Seafood Consumption: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp. 490-517. doi:https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00200.x
- Helsedirektoratet. 2016. *Kostrådene* [Online]. Oslo: Helsedirektoratet. Available: <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/kostrad-for-befolkningen> [Accessed 07.09 2021].
- Huang, P., Rannug, A., Ahlbom, E., Håkansson, H. & Ceccatelli, S. 2000. Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the Expression of Cytochrome P450 1A1, the Aryl Hydrocarbon Receptor, and the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator in Rat Brain and Pituitary. *Toxicol Appl Pharmacol*, 169, pp. 159-167. doi:10.1006/taap.2000.9064
- Ikeda, M., Tamura, M., Yamashita, J., Suzuki, C. & Tomita, T. 2005. Repeated in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206, pp. 351-5. doi:10.1016/j.taap.2004.11.019
- Jackson, E., Shoemaker, R., Larian, N. & Cassis, L. 2017. Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Comprehensive Physiology*, 7, pp. 1085-1135. doi:10.1002/cphy.c160038
- Jin, J.-M. & Yang, W.-X. 2014. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*, 551, pp. 15-25. doi:10.1016/j.gene.2014.08.048
- Jin, M.H., Ko, H.K., Hong, C.H. & Han, S.W. 2008. In utero exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the development of reproductive system in mouse. *Yonsei medical journal*, 49, pp. 843-850.
- Karman, B.N., Hernández-Ochoa, I., Ziv-Gal, A. & Flaws, J.A. 2011. Involvement of the AHR in Development and Functioning of the Female and Male Reproductive Systems. Hoboken, NJ, USA: Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Kern, P.A., Fishman, R.B., Song, W., Brown, A.D. & Fonseca, V. 2002. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver. *Toxicology*, 171, pp. 117-25. doi:10.1016/s0300-483x(01)00564-9

- Kim, M.J., Marchand, P., Henegar, C., Antignac, J.P., Alili, R., Poitou, C., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Le Bizec, B., Barouki, R. & Clément, K. 2011. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect*, 119, pp. 377-83. doi:10.1289/ehp.1002848
- Konkel, A. & Schunck, W.H. 2011. Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1814, pp. 210-22. doi:10.1016/j.bbapap.2010.09.009
- Korkalainen, M., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. 2001. The AH receptor of the most dioxin-sensitive species, guinea pig, is highly homologous to the human AH receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, pp. 1121-9. doi:10.1006/bbrc.2001.5317
- Korkalainen, M., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. 2004. Primary structure and inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of aryl hydrocarbon receptor repressor in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, pp. 123-131. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.028
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J. 2003. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, pp. e20-e30. doi:10.1161/01.ATV.0000038493.65177.94
- La Merrill, M., Emond, C., Kim, M.J., Antignac, J.P., Le Bizec, B., Clément, K., Birnbaum, L.S. & Barouki, R. 2013. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect*, 121, pp. 162-9. doi:10.1289/ehp.1205485
- Larsson, M., van den Berg, M., Brenerová, P., van Duursen, M.B., van Ede, K.I., Lohr, C., Luecke-Johansson, S., Machala, M., Nesper, S., Pěňčíková, K., Poellinger, L., Schrenk, D., Strapáčová, S., Vondráček, J. & Andersson, P.L. 2015. Consensus toxicity factors for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls combining in silico models and extensive in vitro screening of AhR-mediated effects in human and rodent cells. *Chem Res Toxicol*, 28, pp. 641-50. doi:10.1021/tx500434j
- Latchoumycandane, C., Chitra, K.C. & Mathur, P.P. 2002. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis. *Toxicology*, 171, pp. 127-35. doi:10.1016/s0300-483x(01)00563-7
- Lindén, J., Lensu, S., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. 2010. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol*, 31, pp. 452-478. doi:10.1016/j.yfrne.2010.07.002
- Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J. & Weis-Garcia, F. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46, pp. 258-268. doi:10.1093/ilar.46.3.258
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, pp. 402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Ma, Q. & Lu, A.Y. 2007. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*, 35, pp. 1009-16. doi:10.1124/dmd.107.015826
- Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A. & Peterson, R.E. 1992a. In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and applied pharmacology*, 114, pp. 118-126.
- Mably, T.A., Moore, R.W. & Peterson, R.E. 1992b. In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: I. Effects on androgenic status. *Toxicology and applied Pharmacology*, 114, pp. 97-107.

- Magre, S., Rebourcet, D., Ishaq, M., Wargnier, R., Debard, C., Meugnier, E., Vidal, H., Cohen-Tannoudji, J. & Le Magueresse-Battistoni, B. 2012. Gender differences in transcriptional signature of developing rat testes and ovaries following embryonic exposure to 2,3,7,8-TCDD. *PLoS one*, 7, pp. e40306-e40306. doi:10.1371/journal.pone.0040306
- Majkova, Z., Layne, J., Sunkara, M., Morris, A.J., Toborek, M. & Hennig, B. 2011. Omega-3 fatty acid oxidation products prevent vascular endothelial cell activation by coplanar polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol*, 251, pp. 41-9. doi:10.1016/j.taap.2010.11.013
- McGill, M.R. 2016. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J*, 15, pp. 817-828. doi:10.17179/excli2016-800
- Mescher, M. & Haarmann-Stemmann, T. 2018. Modulation of CYP1A1 metabolism: From adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options. *Pharmacology & Therapeutics*, 187, pp. 71-87. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.012.
- Milbrath, M.O.G., Wenger, Y., Chang, C.-W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B.W. & Jolliet, O. 2009. Apparent Half-Lives of Dioxins, Furans, and Polychlorinated Biphenyls as a Function of Age, Body Fat, Smoking Status, and Breast-Feeding. *Environ Health Perspect*, 117, pp. 417-425. doi:10.1289/ehp.11781
- Mínguez-Alarcón, L., Sergeyev, O., Burns, J.S., Williams, P.L., Lee, M.M., Korrick, S.A., Smigulina, L., Revich, B. & Hauser, R. 2017. A Longitudinal Study of Peripubertal Serum Organochlorine Concentrations and Semen Parameters in Young Men: The Russian Children's Study. *Environ Health Perspect*, 125, pp. 460-466. doi:10.1289/EHP25
- Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Patterson, J.D.G., Milani, S., Limonta, G., Bertona, M., Signorini, S., Tramacere, P., Colombo, L., Crespi, C., Brambilla, P., Sarto, C., Carreri, V., Sampson, E.J., Turner, W.E. & Needham, L.L. 2008. Dioxin Exposure, from Infancy through Puberty, Produces Endocrine Disruption and Affects Human Semen Quality. *Environ Health Perspect*, 116, pp. 70-77. doi:10.1289/ehp.10399
- Moorthy, B. 2000. Persistent expression of 3-methylcholanthrene-inducible cytochromes P4501A in rat hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther*, 294, pp. 313-22.
- Morel, Y., Mermod, N. & Barouki, R. 1999. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H(2)O(2) and NFI. *Molecular and cellular biology*, 19, pp. 6825-6832. doi:10.1128/MCB.19.10.6825
- Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Nishimura, N., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y. & Yamamoto, M. 2003. Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, pp. 5652-5657. doi:10.1073/pnas.1037886100
- Mozaffarian, D. & Rimm, E.B. 2006. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama*, 296, pp. 1885-99. doi:10.1001/jama.296.15.1885
- Mozaffarian, D. & Wu, J.H. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*, 58, pp. 2047-67. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063
- Nguyen, L.P. & Bradfield, C.A. 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical research in toxicology*, 21, pp. 102-116. doi:10.1021/tx7001965
- Nohara, K., Ao, K., Miyamoto, Y., Ito, T., Suzuki, T., Toyoshiba, H. & Tohyama, C. 2006. Comparison of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats, and humans: most potent induction in humans. *Toxicology*, 225, pp. 204-13. doi:10.1016/j.tox.2006.06.005
- Nøstbakken, O.J., Rasinger, J.D., Hannisdal, R., Sanden, M., Frøyland, L., Duinker, A., Frantzen, S., Dahl, L.M., Lundebye, A.K. & Madsen, L. 2021. Levels of omega 3 fatty acids, vitamin D,

- dioxins and dioxin-like PCBs in oily fish; a new perspective on the reporting of nutrient and contaminant data for risk-benefit assessments of oily seafood. *Environ Int*, 147, pp. 106322. doi:10.1016/j.envint.2020.106322
- Oduwole, O.O., Peltoketo, H. & Huhtaniemi, I.T. 2018. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, pp. 763-763. doi:10.3389/fendo.2018.00763
- Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Takeda, K., Aoki, Y. & Sone, H. 2001. Maternal exposure to a low dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicological Sciences*, 60, pp. 132-143.
- Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y. & Kato, S. 2008. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun*, 370, pp. 541-546. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.054
- Okamoto, T., Mitsunashi, M., Fujita, I., Sindhu, R.K. & Kikkawa, Y. 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochemical and biophysical research communications*, 197, pp. 878-885.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, pp. e45-e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Poland, A. & Knutson, J.C. 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22, pp. 517-554. doi:10.1146/annurev.pa.22.040182.002505
- Posch, A., Kohn, J., Oh, K., Hammond, M. & Liu, N. 2013. V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. *Journal of visualized experiments : JoVE*, pp. 50948-50948. doi:10.3791/50948
- Rappe, C. 1994. Dioxin, patterns and source identification. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 348, pp. 63-75. doi:10.1007/BF00321606
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G. & Deber, C.M. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, pp. 1760-1765. doi:10.1073/pnas.0813167106
- Rayman, M.P. 2012. Selenium and human health. *Lancet*, 379, pp. 1256-68. doi:10.1016/s0140-6736(11)61452-9
- Reddy, J.K. & Rao, M.S. 2006. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, pp. G852-G858. doi:10.1152/ajpgi.00521.2005
- Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustín, O. & de Medina, F.S. 2014. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical Biochemistry*, 467, pp. 1-3. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.027
- Roman, B.L., Pollenz, R.S. & Peterson, R.E. 1998. Responsiveness of the Adult Male Rat Reproductive Tract to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure: Ah Receptor and ARNT Expression, CYP1A1 Induction, and Ah Receptor Down-Regulation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 150, pp. 228-239. doi:10.1006/taap.1998.8388
- Roman, B.L., Sommer, R.J., Shinomiya, K. & Peterson, R.E. 1995. In utero and lactational exposure of the male rat to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: impaired prostate growth and development without inhibited androgen production. *Toxicology and applied pharmacology*, 134, pp. 241-250.

- Rui, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4, pp. 177-97.
doi:10.1002/cphy.c130024
- Safe, S.H. 1995. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol Ther*, 67, pp. 247-81.
doi:10.1016/0163-7258(95)00017-b
- Schultz, R.d., Suominen, J., Värre, T., Hakovirta, H., Parvinen, M., Toppari, J. & Pelto-Huikko, M. 2003. Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology*, 144, pp. 767-776.
- Silkworth, J.B., Koganti, A., Illouz, K., Possolo, A., Zhao, M. & Hamilton, S.B. 2005. Comparison of TCDD and PCB CYP1A Induction Sensitivities in Fresh Hepatocytes from Human Donors, Sprague-Dawley Rats, and Rhesus Monkeys and HepG2 Cells. *Toxicological Sciences*, 87, pp. 508-519. doi:10.1093/toxsci/kfi261
- Sioen, I., De Henauw, S., Verbeke, W., Verdonck, F., Willems, J.L. & Van Camp, J. 2008. Fish consumption is a safe solution to increase the intake of long-chain n-3 fatty acids. *Public Health Nutr*, 11, pp. 1107-16. doi:10.1017/s1368980007001450
- Snyder, E., Soundararajan, R., Sharma, M., Dearth, A., Smith, B. & Braun, R.E. 2015. Compound Heterozygosity for Y Box Proteins Causes Sterility Due to Loss of Translational Repression. *PLoS genetics*, 11, pp. e1005690-e1005690. doi:10.1371/journal.pgen.1005690
- Srogi, K. 2008. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. *Environmental chemistry letters*, 6, pp. 1-28.
doi:10.1007/s10311-007-0105-2
- Stohs, S.J. 1990. Oxidative stress induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radical Biology and Medicine*, 9, pp. 79-90.
- Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T. & Yamada, H. 2009. Maternal Exposure to Dioxin Disrupts Gonadotropin Production in Fetal Rats and Imprints Defects in Sexual Behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, pp. 1091-1099.
doi:10.1124/jpet.109.151282
- Takeda, T., Taura, J., Hattori, Y., Ishii, Y. & Yamada, H. 2014. Dioxin-induced retardation of development through a reduction in the expression of pituitary hormones and possible involvement of an aryl hydrocarbon receptor in this defect: a comparative study using two strains of mice with different sensitivities to dioxin. *Toxicology and applied pharmacology*, 278, pp. 220-229.
- Tanimura, N., Kusunose, N., Matsunaga, N., Koyanagi, S. & Ohdo, S. 2011. Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner. *Toxicology*, 290, pp. 203-7. doi:10.1016/j.tox.2011.09.007
- Thackray, V.G., Mellon, P.L. & Coss, D. 2010. Hormones in synergy: Regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol*, 314, pp. 192-203. doi:10.1016/j.mce.2009.09.003
- Theobald, H.M. & Peterson, R.E. 1997. In Utero and Lactational Exposure to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Effects on Development of the Male and Female Reproductive System of the Mouse. *Toxicology and applied pharmacology*, 145, pp. 124-135.
- Tian, J., Feng, Y., Fu, H., Xie, H.Q., Jiang, J.X. & Zhao, B. 2015. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. *Environ Sci Technol*, 49, pp. 9518-9531. doi:10.1021/acs.est.5b00385
- Toufexis, D., Rivarola, M.A., Lara, H. & Viau, V. 2014. Stress and the reproductive axis. *Journal of neuroendocrinology*, 26, pp. 573-586. doi:10.1111/jne.12179

- Türkez, H., Geyikoglu, F. & Yousef, M.I. 2012. Ameliorative effect of docosahexaenoic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damage in rat liver. *Toxicol Ind Health*, 28, pp. 687-96. doi:10.1177/0748233711420475
- Ulbrich, B. & Palmer, A.K. 1995. Detection of Effects on Male Reproduction—A Literature Survey. *Journal of the American College of Toxicology*, 14, pp. 293-327. doi:10.3109/10915819509008703
- The UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47: D506-515 (2019). doi:10.1093/nar/gky1049
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N. & Peterson, R.E. 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci*, 93, pp. 223-41. doi:10.1093/toxsci/kfl055
- van Ede, K.I., Gaisch, K.P., van den Berg, M. & van Duursen, M.B. 2014. Differential relative effect potencies of some dioxin-like compounds in human peripheral blood lymphocytes and murine splenic cells. *Toxicol Lett*, 226, pp. 43-52. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.026
- Vidal, J.D. & Whitney, K.M. 2014. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis*, 4, pp. e979099-e979099. doi:10.4161/21565562.2014.979099
- VKM 2014. Benefit-risk assessment of fish and fish products in the Norwegian diet – an update. Opinion of the Scientific Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM).
- Walker, N.J., Portier, C.J., Lax, S.F., Crofts, F.G., Li, Y., Lucier, G.W. & Sutter, T.R. 1999. Characterization of the dose-response of CYP1B1, CYP1A1, and CYP1A2 in the liver of female Sprague-Dawley rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154, pp. 279-86. doi:10.1006/taap.1998.8595
- Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E. & Aitken, R.J. 2007. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. *Biol Reprod*, 77, pp. 190-201. doi:10.1095/biolreprod.107.060558
- Welsh, J.A., Jenkins, L.M., Kepley, J., Lyons, G.C., Moore, D.M., Traynor, T., Berzofsky, J.A. & Jones, J.C. 2020. High Sensitivity Protein Gel Electrophoresis Label Compatible with Mass-Spectrometry. *Biosensors (Basel)*, 10. doi:10.3390/bios10110160
- White, S.S. & Birnbaum, L.S. 2009. An Overview of the Effects of Dioxins and Dioxin-Like Compounds on Vertebrates, as Documented in Human and Ecological Epidemiology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27, pp. 197-211. doi:10.1080/10590500903310047
- Wiest, E.F., Walsh-Wilcox, M.T., Rothe, M., Schunck, W.H. & Walker, M.K. 2016. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Vascular Dysfunction and Attenuate Cytochrome P4501A1 Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Toxicol Sci*, 154, pp. 43-54. doi:10.1093/toxsci/kfw145
- Yamamoto, J., Ihara, K., Nakayama, H., Hikino, S., Satoh, K., Kubo, N., Iida, T., Fujii, Y. & Hara, T. 2004. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: Organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sciences*, 74, pp. 1039-1049. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.022
- Zacharova, L.Y., Gulyaeva, L.F., Lyakhovich, V.V., Mikhailova, O.N., Timofeeva, O.A., Filipenko, M.L. & Kaledin, V.I. 2003. Cytochrome P4501A1 and 1A2 Gene Expression in the Liver of 3-Methylcholanthrene- and o-Aminoazotoluene-Treated Mice: A Comparison between PAH-Responsive and PAH-Nonresponsive Strains. *Toxicological Sciences*, 73, pp. 108-113. doi:10.1093/toxsci/kfg053

- Zeiger, M., Haag, R., Höckel, J., Schrenk, D. & Schmitz, H.J. 2001. Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci*, 63, pp. 65-73. doi:10.1093/toxsci/63.1.65
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q. & He, Z. 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 76, pp. 2681-2695. doi:10.1007/s00018-019-03101-9