

Alkylfenolers innvirkning på glyserofosfolipidmembraner og kolesterol i torskehjerne

Av Kristin Lind-Larsen



Hovedfagsoppgave til
Cand. Scient.-graden i miljøkemi ved
Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen 2003

1	<u>FORKORTELSER</u>	<u>3</u>
2	<u>SAMMENDRAG</u>	<u>5</u>
3	<u>FORMÅL</u>	<u>6</u>
4	<u>INNLEDNING</u>	<u>7</u>
4.1	ALKYLFENOLER	7
4.1.1	ALKYLFENOLER SOM ØSTROGENHERMER	8
4.1.2	ALKYLFENOLER OG BIOLOGISKE MEMBRANER	9
4.2	AUTOOKSIDASJON	10
4.3	PRODUSERT VANN	11
4.4	LIPIDER	12
4.4.1	UPOLARE LIPIDER	12
4.4.2	POLARE LIPIDER	14
4.4.3	FETTSYRER	16
4.4.4	NOMENKLATUR	16
4.4.5	METABOLISME AV FETTSYRER	18
4.5	FOSFOLIPIDMEMBRANER	19
4.5.1	TEMPERATURRELATERTE ENDRINGER AV LIPIDSAMMENSETNINGEN	20
4.6	KOLESTEROL OG ØSTROGEN	22
4.6.1	KOLESTEROLSYNTESEN	22
4.6.2	HORMONER	22
4.6.3	HORMONHERMERE	23
4.6.4	ØSTROGEN	23
5	<u>METODER</u>	<u>24</u>
5.1	EKSPONERING AV FISK	24
5.2	PRINSIPP FOR EKSTRAKSJON AV LIPIDER	25
5.3	PRINSIPP FOR TRANSESTERIFISERING	25
5.4	PRINSIPP FOR SEPARASJON PÅ KOLONNER	26
5.4.1	SEPARASJON AV LIPIDKLASSER	26
5.5	PRINSIPP FOR GASS KROMATOGRAFI (GC)	27
5.5.1	RESPONSAKTOR	27
5.5.2	KVANTIFISERING	28
5.5.3	IDENTIFIKASJON	30
5.5.4	ECL-VERDIER	30
5.6	PRINSIPP FOR MASSE SPEKTROMETRI	31
5.6.1	IDENTIFIKASJON	31
5.6.2	FRAGMENTERING AV FETTSYREMETYLESTERE	32
5.6.3	KOLESTEROL	34
5.6.4	ETERLIPIDER	35
5.7	MULTIVARIAT DATABEHANDLING OG PRINSIPAL KOMPONENT ANALYSE (PCA)	37
5.8	PRINSIPP FOR MONOLAGSSTUDIER	37
5.9	STATISTISKE METODER	39

5.10	FEILKILDER	39
6	<u>EKSPERIMENTELT</u>	41
6.1	KJEMIKALIER	41
6.2	INSTRUMENTER.....	41
6.3	LIPID EKSTRAKSJON, FOLCH.....	41
6.4	SEPARASJON AV LIPIDKLASSER	42
6.5	TRANSESTERIFISERING (METANOLYSE).....	42
6.6	GASS KROMATOGRAFI	42
6.7	GC-MS.....	42
6.8	MONOLAGSSTUDIER, LANGMUIR.....	43
7	<u>RESULTATER.....</u>	45
7.1	LIPIDINNHold I TORSKEHJERNE.....	45
7.2	LIPIDKLASSEFORDELING I TORSKEHJERNE	46
7.3	FETTSYREPROFIL.....	48
7.4	KOLESTEROL	52
7.5	LANGMUIR MONOLAGSSTUDIER.....	53
8	<u>DISKUSJON</u>	56
8.1	LIPIDINNHold OG LIPIDKLASSEFORDELING I TORSKEHJERNE.....	56
8.2	FETTSYREPROFILEREN I TORSKEHJERNE	57
8.3	KOLESTEROL	60
8.4	LANGMUIR MONOLAGSSTUDIER.....	64
9	<u>VIDERE ARBEID</u>	66
10	<u>KONKLUSJON.....</u>	67
11	<u>REFERANSELISTE.....</u>	68
12	<u>APPENDIKS.....</u>	76

1 Forkortelser

AME	metylalk-1-enyl eter
ATP	adenosin trifosfat
CoA	coenzym A
diPUFA	flerumettede fettsyrer i begge posisjoner
DMA	dimetylacetaler
ECL	“equivalent chain length”
ELSD	“evaporative light scattering detector”
ER	endoplasmatisk retikulum
FA	frie fettsyrer
FID	“flame ionization detector”
GC	gass kromatograf
HI	Havforskningsinstituttet
HMG-CoA reduktase	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl Coenzyme A reduktase
HPLC	“high performance liquid chromatography”
IUPAC	“international union of pure and applied chemistry”
LCAT	lecithin cholesterol acyltransferase
M ⁺	molekylærion
m/z	molekylmasse/ladning
MMA	gjennomsnittlig molekylært overflateareal
mN/m	milli newton per meter, overflatespenning
MS	masse spektrometer
-n-	normal, rettkjedet

NL	nøytrallipid
PA	fosfatidsyre
PC	fosfatidylcholin
PC1, PC2	prinsipal komponent 1 og 2
PCA	prinsipal komponent analyse
PE	fosfatidyletanolamin
PE plasmalogen	1-O-alk-1-enyl-2-acyl-glyserofosfonyletanolamin
PI	fosfatidylinositol
PL	polarlipid
PLD	fosfolipiase D
ppb	parts per billion 10^{-9}
ppm	parts per million 10^{-6}
PS	fosfatidylserin
PUFA	“poly unsaturated fatty acid”
ROS	reactive oxygen-derived species
RSD	relativt standardavvik
RT	retensjonstid
SD	standardavvik
-sec-	sekundær
SFT	statens forurensingstilsyn
-t-	tertsiær
TL	totallipid
TLC	“thin layer chromatography”
Å	Ångstrøm $1\text{Å}=10^{-10}\text{m}$

2 Sammendrag

Oljeindustrien slipper ut store mengder produsert vann, som inneholder flere potensielle giftstoffer, blant annet alkylfenoler. Det ble tidlig vist at alkylfenoler kan ha skadelig virkning, særlig på grunn av østrogenhermende effekter. Alkylfenolers østrogenhermende egenskaper er blitt undersøkt i en rekke forsøk, både in vitro og in vivo. Det er funnet flere ulike effekter som følge av alkylfenoleksponering. Langkjedede alkylfenoler kan starte vitellogeninproduksjon i hannkjønn, påvirke kjønnsdifferensiering, påvirke enzymaktivitet og transport over cellemembraner og virke som oksidanter. Et studie ved Havforskningsinstituttet (HI) i Bergen viste at selv små mengder alkylfenoler førte til østrogenlignende effekter. Mitt arbeid er en videreføring av dette prosjektet.

Membran- og kolesteroleffekter i torskehjerne, som følge av alkylfenoleksponering, ble undersøkt. Forsøket ble utført ved å eksponere torsk med en blanding av 4-t-butylfenol, 4-n-pentylfenol, 4-n-heksylfenol og 4-n-heptylfenol. Sammenligning av kontrollgruppen, positiv kontrollgruppen (østrogeneksponert) og fire ulike grupper med ulike konsentrasjoner av alkylfenoleksponering viste endringer i kolesterolnivået og fettsyreprofilen. Fettsyreprofilen til de ulike lipidklassene ble funnet ved GC-analyse. Det var ingen endringer i fettsyreprofilen til totalt lipid. I fettsyreprofilen til nøytralt lipid ble det funnet nedgang i de umettede fettsyrene, og noe økning i de mettede fettsyrene i forhold til kontrollgruppen. GC-analysen viste også signifikant ($p < 0,05$) nedgang i kolesterolnivå som følge av østrogeneksponering og alkylfenoleksponering. Langmuir monolagsstudiene viste at alkylfenoler kan forandre overflatespenningsisotermen til et monolag av polarlipid fra torskehjerne. Økt alkylkjedelengde førte til økt påvirkning av overflatespenningsisotermen til monolaget. Resultatet av studiet viser at alkylfenoleksponering har effekter på lipidene i torskehjerne selv i meget små konsentrasjoner. Monolagsstudiene viser at alkylfenoler er potensielle membranforstyrrende stoffer. Resultatene fra dette studiet viser at det bør jobbes videre med studier på alkylfenoler og produsert vanns effekter på cellemembraner.

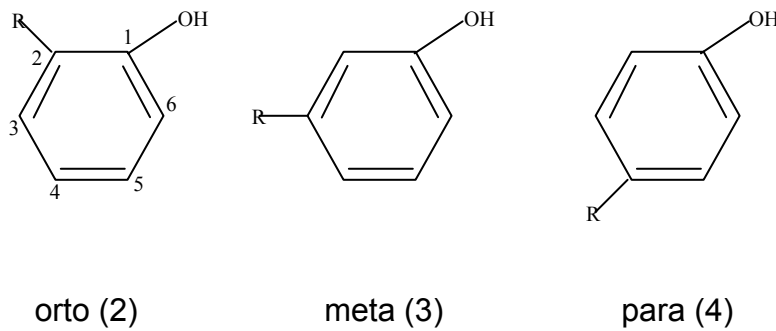
3 Formål

Havforskningsinstituttet startet et prosjekt høsten 1997 med ønske om å undersøke alkylfenolers østrogenhermende evne i torsk. De undersøkte endring i hormonell utvikling, gonadeutvikling og eggkvalitet hos eksponert torsk. Det ble funnet flere østrogeneffekter (Meier et al. 2002). Det var ikke alle effekter som kunne forklares ut fra østrogeneffekter, og det ble derfor startet videre arbeid med undersøkelse av membraneffekter i hjernen og leveren til den eksponerte torsken. Det er tidligere vist at østrogen kan påvirke kolesterolnivået i plasma, og det skulle undersøkes om alkylfenoler kunne påvirke kolesterolnivået i hjernen. For å undersøke om alkylfenoler kan påvirke membraner skulle det gjøres monolagsstudier. Alkylfenolers påvirkning av membranen kan føre til endringer i membransammensetningen, derfor skulle torskkehjernene undersøkes for å se om det var endringer i lipidsammensetningen i hjernen. Hensikten med arbeidet var å se om alkylfenoleksponering førte til endring i kolesterolnivå og endringer i fettsyresammensetningen i torskkehjerne. Det skulle også undersøkes om alkylfenoler kan påvirke overflatespenningsisotermen til monolag bestående av polarlipid fra torskkehjerne.

4 Innledning

4.1 Alkyfenoler

Alkyfenoler er fenoler med en alkylgruppe i orto- (2), meta- (3) eller para- (4) posisjon til OH-gruppen (kan også navngis med tall der karbon med OH-gruppe regnes som 1), der alkylgruppen kan være rettkjedet eller forgrenet. De ulike alkyfenolene har ulike fysiske egenskaper.



Figur 1. Alkyfenoler kan ha alkylkjeden (R) i tre ulike posisjoner i forhold til OH-gruppen.

Alkyfenoler er giftige for fisk, og bidrar både til akutt og kronisk giftighet (Røe 1998, Nimrod & Benson 1996). LC50 verdien for nonylfenol ligger mellom 17-3000 ppb for fisk (LC 50 verdien er den eksponeringskonsentrasjonen som fører til 50 % dødelighet). Alkyfenoler metaboliseres hurtig, men akkumuleres også i gallen, fordøyelsessystemet og leveren. Det er også vist at nonylfenol, merket med radioaktivitet, tas opp i hjernen på fisk (Tollefsen et al. 1998 (torsk), Arukwe et al. 2000 (laks)).

Utslipp av alkyfenoler i avløpsvann fra renseanlegg, da som alkyfenol etoxylater, regnes som de største kildene til alkyfenol forurensing. Alkyfenol etoxylater er ikke-ioniske surfaktanter, der surfaktantaktiviteten kommer fra alkyfenoler som den hydrofobe delen, og med en para substituert lang kjede med flere etylenoksid ledd som den hydrofile delen. Etoxylatener kan ha opptil 100 repetisjoner, der lengden på kjeden avgjør løselighet i vann (Nimrod & Benson 1996). Alkyfenol etoxylater har blitt

brukt i rengjøringsmidler, bilpleie, maling, limprodukter og plantevernmidler m.m., men er nå forbudt å bruke i Norge.

Alkylfenoler finnes naturlig i råolje, og på grunn av alkylfenolers løselighet i vann, vil produsert vann fra oljeindustrien inneholde alkylfenoler. I 1999 ble det sluppet ut ca 15000 kg alkylfenoler bare fra oljeindustrien i Norge (SFT-rapport 1762/2000).

4.1.1 Alkylfenoler som østrogenhermer

Det ble tidlig vist at enkelte alkylfenoler kan erstatte østradiol i østrogenreseptorer (Mueller & Kim 1978). Alkylfenolene er imidlertid ikke like potente ligander som østrogen. Det kreves at alkylkjeden til alkylfenolen er lenger enn 3 C for å ha østrogenaktivitet (Routledge & Sumpter 1997).

I 1991 ble det rapportert at 4-nonylfenol kunne gi liv til østrogenavhengig brystkreftceller (Soto et al. 1991). Det er gjort flere funn av vitellogenin i hannfisk. Vitellogenin er et fosfolipoprotein som skilles ut av leveren til kjønnsmodne hunnvirveldyr etter østrogenstimuli. Funn av dette proteinet i hannfisk brukes som biomarkør for absorpsjon av østrogenhermende stoffer, som nonylfenol (Harries et al. 1997, Sumpter & Jobling 1995).

Det er gjort flere studier der man har funnet vitellogenin i hannfisk i naturlig miljø, Jobling et al. (1998) fant vitellogenin i hannmort. Det er flere forsøk med påvising av vitellogenin i hannfisk fra elver i England (Tyler & Routledge 1998, van Aerle et al. 2001, Allen et al. 1999). Det er også påvist vitellogeninproduksjon i hannfisk som følge av ulik alkylfenoleksponering. Fra forsøk med fisk eksponert for 4-t-pentylfenol fant Gimeno et al. (1998) vitellogenin i hannkarpe, Toomey et al. (1999) fant vitellogenin som følge av octylfenoleksponering. Binding av nonylfenol til østrogenreseptoren kan indusere vitellogenin, det er gjort funn med konsentrasjoner av nonylfenol på mellom 20-50 µg/l i regnbueørret (Nimrod & Benson 1996).

Østrogeneffekter fra så små vannkonsentrasjoner som det er i vann rundt oljeplattformer er ikke blitt bekreftet med eksponeringsforsøk med alkylfenoler i vann. Nimrod og Benson (1996) mener derfor at det er usannsynlig med hormonhermende effekt i fisken ved akutt utsettelse for nonylfenol fra omgivelsene fordi fisken utsettes for alt for små konsentrasjoner. For å finne hva reelle doser i naturlige omgivelser er,

kan man benytte bioakkumuleringsfaktorer. Bioakkumuleringsfaktorer kan brukes til å estimere hvilken eksponeringsdose som vil tilsvare vannkonsentrasjonen av et stoff. Slik kan man eksponere fisken for reelle doser og se om disse har effekter.

Bioakkumuleringsfaktoren for langkjedete alkylfenoler (>C4) er 75-1250 ganger (Servos 1999) og det er vist at den for heptylphenol i torsk er 600 (Tollefsen et al. 1998).

Meier et al. (2002) fant en rekke effekter som følge av lav alkylfenoleksponering, der laveste dose er regnet som reelle kroppskonsentrasjon til fisk rundt oljeplattformer (se 5.1). Nivået av 17-østradiol i blodplasma ble redusert i alkylfenoleksponert hunntorsk. Gonadene til alkylfenoleksponert hunntorsk viste en lavere gonadosomatisk indeks (forholdet mellom vekten av gonadene til kroppsvekt) enn kontrollfisk, og gonadene ble senere utviklet. Det ble regnet ut at fisk eksponert for laveste dose alkylfenol (0,02ppm) ville startet gyting 21 dager senere enn kontrollen. Testosteronnivået falt hos hannfisk med laveste dose alkylfenol, og hannfisken startet å produsere vitellogenin, noe som er unormalt for hannkjønn (Meier et al. 2002). Endringer i østrogennivået i hunnfisk som følge av alkylfenoleksponering er også observert etter eksponering av nonylfenol i laks og regnbueørret (Arukwe et al. 1997, Harris et al. 2001).

4.1.2 Alkylfenoler og biologiske membraner

Alkylfenoler kan virke i membranen. Fra eksperiment med modellmembraner er det vist at de strukturelle egenskapene til membranen kan influeres av membranassosierte molekyler (Lee 1977, Jørgensen et al. 1991). Alkylfenoler er amfifile (har en hydrofil del og en hydrofob del), og kan derfor lett trenge seg inn i de biologiske membraner som er bygget opp av amfifile fosfolipider.

Molekyler kan interferere fysisk med lipidmembraner på ulike måter. Type interaksjon avhenger av den amfifile karakteren til molekylet, der svært polare molekyler vil inkorporeres i de polare områder av membranene, mens upolare molekyler vil inkorporeres i upolare områdene av membranene. Upolare molekyler kan inkorporeres mellom fettsyrene i membranen og dermed minske interaksjonen mellom disse, dette kan endre karakteren til membranen. Amfifile molekyler kan på grunn av sin polare og upolare karakter inkorporeres både mellom hodegruppen og halen i membranene (Jørgensen et al. 1991). Inkorporeringer vil forstyrre de kreftene

som holder membranen sammen, og disse vil svekkes slik at membranen blir av mer flytende karakter.

Det er gjort forsøk som tyder på at alkylfenoler virker i den hydrofobe delen av cellen. Okai et al. (2000) har kommet til dette fra forsøk der de har sett på nonylfenol sin evne til å virke som oksidant. De viste at upolare antioksidanter beskyttet cellen mot oksidering fra alkylfenoler, mens hydrofile antioksidanter ikke hadde innvirkning.

Alkylfenolene kan påvirke enzymaktiviteten ved både å endre de fysiske forhold i membranene og ved å regulere transporten av elektroner og ioner over cellemembranen. Dette ble vist av Cascorbi og Ahlers (1989) som fant at alkylfenoler kunne hemme Na^+/K^+ pumpene (i kinesiske hamster ovarium celler). Hughes et al. (2000) viste at alkylfenoler hemmer Ca^{2+} pumpene (i ER fra testikkelceller i rotter). Ca^{2+} er viktig for regulering av flere prosesser i cellene som metabolisme, cellevekst, energi ved ATP-ase og kolesterolsyntesen via HMG-CoA reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl Coenzyme A reduktase) (Roitelman et al. 1991, Ruehlmann et al. 1998).

I fisk er lipider hovedenergikilde og det er derfor mulig at kjemikalier lagret i fettvev lettere kan mobiliseres og transporteres rundt i kroppen på steder der forurensing kan gjøre større skade (Tyler et al. 1998).

4.2 Autooksidasjon

"Reactive oxygen-derived species" (ROS) er både radikale ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, $\text{RO}\cdot$) og ikke-radikale oksygen (H_2O_2 , HOCl) komponenter. Noen av dem er svært reaktive. ROS er potensiell giftige forbindelser som dannes som biprodukter i ulike prosesser i cellen. De kan dannes i tilknytning til enzymaktivitet, auto-oksidering og membrantransportsystemer. Mengden ROS-produksjon i cellen kan økes ved nærvær av flere naturlige og menneskelagde xenobiotiks (fremmed stoff). Forurensing kan stimulere ROS produksjon indirekte og direkte ved flere ulike mekanismer. Alkylfenoler kan særlig påvirke på tre måter: Membranbundet transport, ved dannelse av hydroksylradikaler (som er svært reaktive) og ved å påvirke enzymaktivitet. ROS radikaler kan starte auto-oksidasjon. Auto-oksidasjon består av tre faser; først en langsom startfase før de frie radikalene inngår i en

selvakselererende kjedereaksjon, reaksjonen stanses når to radikaler danner ikke-radikale produkter.

Enzymatisk oksidasjon skjer for eksempel ved at lipooksygenaser oksiderer umettede fettsyrer til hydroperoksider.

Kroppen har naturlige mekanismer for å holde ROS produksjon og andre reaktive stoffer under kontroll ved antioksidantsystemer. Det eksisterer en balanse mellom pro-oksidente og antioksidante prosesser i kroppen, men denne balansen kan ødelegges ved økt eksponering av forurensing som stimulerer ROS-dannelse (Livingstone 2001).

Okai et al. (2000) har vist at alkylfenoler kan virke ved å fremme hydroksylradikal dannelse, som kan sette i gang og/eller øke auto-oksideringen i celler. Dette kan ødelegge og endre molekyler i cellemembraner, og generelt i cellen. Resultater i Okai sine forsøk tyder på at nonylfenol induisert ROS angrep i hovedsak angriper lipidene i cellemembranen.

4.3 Produsert vann

Produsert vann er vann som følger med olje og gass opp fra reservoarene. Det er formasjonsvann som naturlig befinner seg i grunnen, og vann som er injisert i reservoaret for å holde trykket oppe. Når vannet er brakt til overflaten renses det til en viss grad for olje (maks tillatt innhold er 40 mg/l) og slippes ut i sjøen. Det er foreløpig ikke utslippskrav på annet enn olje i produsert vann, så vannet renses ikke for andre oppløste komponenter som for eksempel alkylfenoler, metaller og annet. Årsaken til dette er primært "at det ikke eksisterer renseprosesser som er formålmessige for så store vannmengder" (SFT-rapport 1762/2000). Mengden av produsert vann øker når oljefeltet blir eldre, og kan komme opp i 98 % av det som pumpes opp av brønnen. Det kjemiske innholdet i produsert vann vil variere noe fra felt til felt. I 1999 ble det totalt sluppet ut ca 15000 kg alkylfenoler fra oljeindustriens plattformen i Norge (SFT-rapport 1762/2000). Innen 2005 er det et mål at det skal være null-effekt utslipp av farlige stoffer fra oljeindustrien. Det vil si at det skal kun slippes ut kjemikalier i mengder som ikke har skadelig effekt. Det er ikke enighet eller kunnskaper nok til å lage grenseverdier for hvilket nivå av kjemikalier som kan skade. Det er derfor viktig å vise at selv i små mengder vil alkylfenoler ha skadelig effekt. Meier et al. (2002) har vist at eksponering med den antatte "bodyburden" for fisk

rundt oljeplattformer av alkylfenol blant annet fører til forsinket utvikling av kjønnsorgansystemet. Tungmetaller, organiske syrer og alkylfenoler er noen av stoffene som slippes urensset ut i havet i form av produsert vann. Graden av giftighet vil avhenge av utslippsmengde og miljøets evne til å absorbere, nyttegjøre eller uskadeliggjøre forurensningen. Det er viktig å vite i hvilken grad disse stoffene kan skade det marine miljøet, og det er derfor nødvendig å undersøke effekten av disse. Langtidsforsøk med reelle doser på ulike arter er derfor relevant.

4.4 Lipider

Lipider er en klasse av biologiske molekyler, hvor felles egenskap er at de har liten eller ingen affinitet for vann, og er lettoppløselige i organisk løsemiddel.

Lipider kan deles opp i to underklasser: Upolare lipid og polare lipid. De upolare lipidene er i hovedsak energilager, mens de polare lipider er viktige komponenter i cellemembranen. Blant de upolare lipidene finner vi triacylglyserider, voks og steroider, mens polare lipid er glyserofosfolipider, sfingolipider og glykoglyserider. Eterlipider finnes både som polare og upolare lipid.

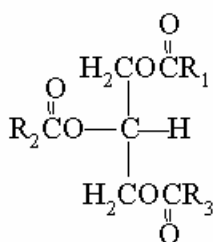
4.4.1 Upolare lipider

4.4.1.1 *Triacylglyserider*

Triacylglyserider, heretter kalt triglyserider, er den største gruppen av upolare lipid. De er bygget opp av glyserol med esterbindinger til tre fettsyrer. Det er også diglyserider (med to fettsyrer) og monoglyserider (med én fettsyre).

Karbonene i glyserol nummereres sn-1, sn-2 og sn-3 fra toppen til bunn.

Triglyserider er i hovedsak energilagere, energien frigis ved metabolsk oksidasjon.



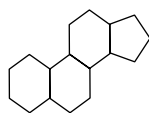
Figur 2. Triacylglyserol R_1 i sn-1 posisjon, R_2 i sn-2 posisjon og R_3 i sn-3 posisjon.

4.4.1.2 Voks

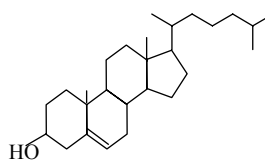
Voks er en ester som består av en fettsyre og en langkjedet alifatisk alkohol. I marine dyr er voks i hovedsak energilager, og er egnet til dette fordi voks har lav egenvekt. I havet er det særlig enkelte zooplankton som er rike på voks. I arktisk copepod (zooplankton) kan voks utgjøre opp mot 70% av tørrvekten (Lee 1975).

4.4.1.3 Steroider

Steroider er forbindelser som er bygget opp rundt syklopentanoperhydrofenantren. Steroidene har biologiske funksjoner som hormoner (østrogen), vitaminer (vitamin A) og membrankomponenter (kolesterol). I plasma hos fisk forekommer mellom 65 og 75 % av kolesterolet i esterifisert form (Larsson & Fange 1977). Esterifisert kolesterol har en fettsyre festet med en esterbinding til OH-gruppen på kolesterol.



Figur 3. Syklopentanoperhydrofenantren



Figur 4. Kolesterol

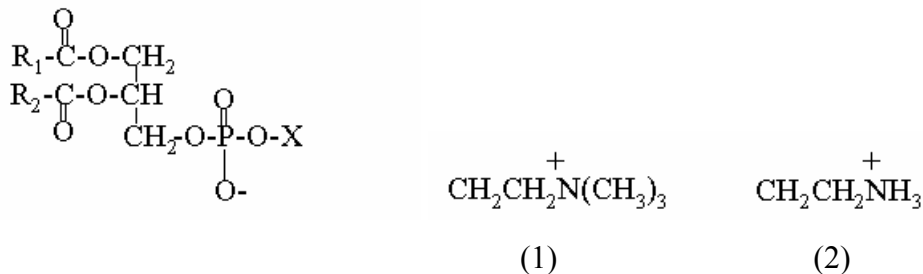
4.4.2 Polare lipider

4.4.2.1 Glyserofosfolipider

Glyserofosfolipider, heretter kalt fosfolipider, er basert på glyserol med en fosfatgruppe i sn-3 posisjon og fettsyrer i sn-1 og sn-2 posisjon. I fosfolipid er fosfatgruppen bundet til hydroksygruppen i en aminoalkohol eller en polyalkohol. Ulik hodegrupper gir de ulike fosfolipidklassene. De viktigste fosfolipidene er fosfatidylcholin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) og fosfatidylinositol (PI).

I torsk utgjør PC og PE størsteparten av fosfolipidene henholdsvis 54-69 % og 20-28 %. Det er stor forskjell på sammensetningen av fosfolipider i de ulike vevene, disse dataene er hentet fra muskel, hjerte, lever, gjeller og milten til torsk (Lie & Lambertsen 1991). For torskéhjerne har Tocher og Harvie (1988) funnet at det er ca 26 % PC, 30 % PE, 6 % PS og 2 % PI.

Figur 5 viser et fosfolipid der X kan være etanolamin, cholin, serin eller inositol.



Figur 5. Figuren viser oppbygning av fosfolipid. X=(1) fosfatidylcholin

X=(2) fosfatidyletanolamin.

De fleste fosfolipid har en mettet fettsyre i sn-1 posisjon og en umettet fettsyre i sn-2 posisjon, men i marine organismer finner man fosfolipider med umettede fettsyrer i både sn-1 og sn-2 posisjon. Et ekstremt eksempel er netthinnen til ørret der PE inneholder 41 % 22:6/22:6 (Bell & Tocher 1989).

Torskéhjerne har også diPUFA (flerumettede fettsyrer i begge posisjoner) i PE er 15,5% diPUFA og for PC er 26,1% diPUFA. I hovedsak er dette 22:6/22:6 (Bell & Dick 1991).

4.4.2.2 Sfingolipider

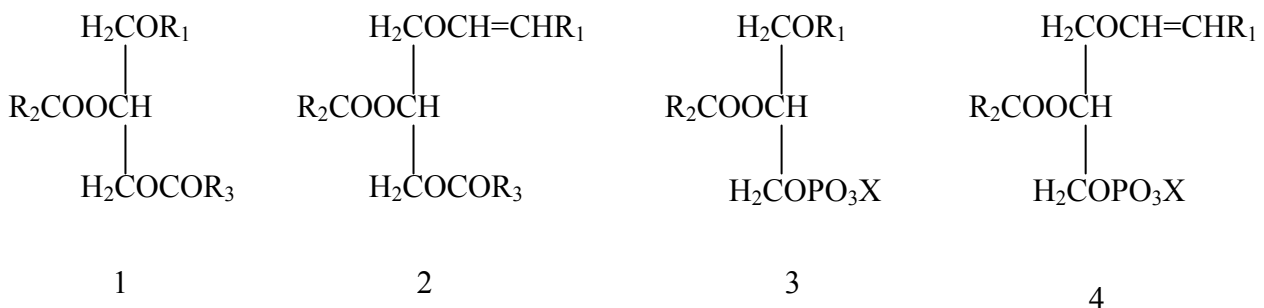
Sfingolipider er basert på sfingosin der aminogruppen er bundet til en fettsyre, og den primære hydroksygruppen er bundet til en fosfatgruppe (cholinfosfat eller etanolaminfosfat er mest vanlig) eller et suktermolekyl. I torskkehjerne er det ca 1,8 % sfingomylin og 2,6 % cerebrosider (Tocher & Harvie 1988).

4.4.2.3 Glykoglyserolipider

Glykoglyserolipider er bygget opp som fosfolipidene, men i stedet for en fosforgruppe i sn-3 er det ulike suktermolekyler. I torskkehjerne er det ca 2,6 % glykosylglycerider (Tocher & Harvie 1988).

4.4.2.4 Eterglyserolipider

Det er fire hovedgrupper eterglyserolipider avhengig av om de er slektet til triglyserid eller fosfoglyserid, og om de har en dobbeltbinding etter eterbindingen eller ikke. Etergruppen er som regel i sn-1 posisjon.



Figur 6. Figuren viser oppbygningen til ulike eterlipider.

Etanolaminderivater av type 4 forekommer i marine organismer, og kalles PE plasmalogen. Allerede i 1985 fant man at 50 % av PE i pattedyrhjerner forekom som plasmalogener (Sastry 1985).

Bell og Dick (1993) viste at i PE fra torskkehjerne er 36-38 % 1-O-alk-1-enyl-2-acylglyserofosfonyletanolamin (PE plasmalogen), og ikke PE. PE plasmalogen fra torskkehjerne inneholder 52,6 % PUFA (flerumettede fettsyrer), der det er mest av 18:0/20:5n3, 18:1/20:5n3 og 18:1/22:6n3.

Bell og Dick viste at det generelt er mer n6 og mindre n3 i alk-enyl-acyl PE enn i diacyl PE.

Det er ikke helt klart hvilken oppgave PE plasmalogenene har, men den store forskjellen i komposisjonen mellom diacyl PE og alk-enyl-acyl PE kan tyde på forskjellig strukturell og metabolsk rolle (Bell & Dick 1993).

4.4.3 Fettsyrer

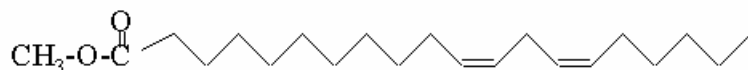
Fettsyrer er en av hovedkomponentene i lipider, der de inngår i esterifisert form. En fettsyre består oftest av en uforgrenet hydrokarbonkjede med en karbonylgruppe i den ene enden. Fettsyrer kan deles i tre grupper etter antall dobbelbindinger i hydrokarbonkjeden: Mettede fettsyrer (ingen dobbelbindinger), enumettede fettsyrer (en dobbelt binding) og flerumettede fettsyrer (2-6 dobbelbindinger).

Dobbelbindingene finnes i hovedsak i *cis* figurasjon. Hvis det er flere dobbelbindinger finnes de som regel i serie, der dobbelbindingene er avskilt av en metylgruppe. I tillegg til rettkjedede fettsyrer, finnes det også fettsyrer med forgreninger (isofettsyrer har metylgruppe n2 posisjon, antiso fettsyre har metylgruppe n3 posisjon) eller ringstrukturer i kjeden.

4.4.4 Nomenklatur

Fettsyrene navngis på flere måter: Systematiske navn (IUPAC), numeriske navn og trivialnavn. IUPAC navn er lange og upraktiske, og derfor lite i bruk. I nyere litteratur er numeriske navngivning brukt, men enkelte bruker fremdeles trivialnavn. Jeg har valgt å bruke numerisk navngivning.

I den numeriske nomenklaturen angir man antall karbon i kjeden (A), antall dobbelbindinger (B) og tilslutt plassering av dobbelbindingene (C), A:BnC. Da dobbelbindingen for det meste kommer i serie med en metylengruppe i mellom holder det å oppgi nummer på første dobbelbinding regnet fra metylenden. Disse navnsettes ved å oppgi nummer for første dobbelbinding fra metylenden. Tidligere ble merking fra metylenden kalt ω , 20:2n6 = 20:2 ω 6. Navngivning telt fra karbonylenden merkes Δ .



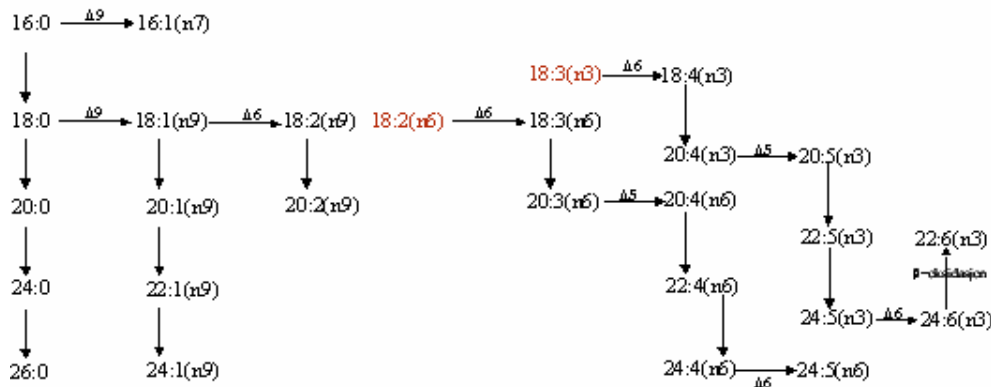
Figur 7. Fettsyren 20:2n6 (talt fra metylenden), 20:2Δ11 (talt fra karbonylenden)

Tabell 1. Tabellen gir oversikt over de mest vanlige fettsyrene i torsk med numerisk navngivning, trivial navn og IUPAC navn.

numerisk navn	trivial navn	IUPAC
Mettet		
14:00	myristinsyre	tetradekansyre
16:00	palmitinsyre	heksadekansyre
18:00	stearinsyre	oktadekansyre
enumettet		
16:1n7	palmitoleinsyre	cis-9-heksadekensyre
18:1n9	oleinsyre	cis-9-oktadekensyre
20:1n9	gondoinsyre	cis-11-eicosensyre
22:1n11		cis-docosensyre
24:1n9	nervoinsyre	cis-15-tetracosensyre
flerumettet		
18:2n6	linolsyre	9,12-oktadekandiensyre
18:3n3	linolensyre	9,12,15-oktadekantriensyre
20:4n6	arachidonsyre	5,8,11,14-eicosatetraensyre
20:5n3	timnodoninsyre	5,8,11,14,17-eicosapentaensyre
22:6n3	cervoninsyre	4,7,10,13,16,19-docosaheksaensyre

4.4.5 Metabolisme av fettsyrer

Biosyntesen av fettsyrer skjer ved en flertrinns enzymkatalysert addisjon av et C₂-fragment til syrebundet coenzym A (CoA). Acetyl-CoA er det mest vanlige utgangsstoffet og gir en partalls karbonkjede, der 16:0 er produkt. Hvis propionyl-CoA er utgangsstoffet, får man oddetalls karbonkjeder og isobutyryl-CoA gir en forgrenet kjede med partall i karbonkjede.



Figur 8. Hovedveiene i fettsyresyntesen med utgangspunkt i 16:0. Vertikale piler viser addisjon av C₂ fragment, og horisontale piler viser desaturering. De røde fettsyrene på figuren er essensielle fettsyrer. Marine fisk ser ut til å trenge 20:5n3 og 22:6n3 tilført i føde, i tillegg til 18:2n6 og 18:3n3 (Tocher & Ghioni 1999, Bell et al. 1986).

For å danne dobbeltbindinger skjer det en enzymkatalysert reaksjon som gir en spesifikk *cis*-konfigurasjon.

Fisk og pattedyr introduserer alltid den første dobbeltbindingen i $\Delta 9$ posisjon, og videre desaturering skjer mellom den første dobbeltbindingen og karbonylgruppen.

Planter derimot kan sette dobbeltbindinger mellom $\Delta 9$ og metylenden og danne fettsyrer i n3 og n6 familiene. Disse er essensielle for fisk og innføres via føden.

Marine fisk er rike på n3 fettsyrer (Mathews et al. 2000, Vance & Vance 1996).

Virveldyr mangler muligheten til å produsere 18:2n6 og 18:3n3 fra 18:1n9. Derfor er virveldyr avhengig av å få disse fettsyrene igjennom maten for å kunne danne C₂₀ og C₂₂ PUFA. Disse fettsyrene er essensielle for strukturen og funksjonen til virveldyrs cellemembran (Stubbs & Smith 1984, Ghioni et al. 1999).

C₂₀ PUFA er viktig som forløper til mange biologisk aktive derivater, eikosanoider, som er kritiske for celledsignalering. I nordatlantisk fisk består PUFA av ca 90% 20:5n₃ og 22:6n₃ (Ackman & McLeod 1988).

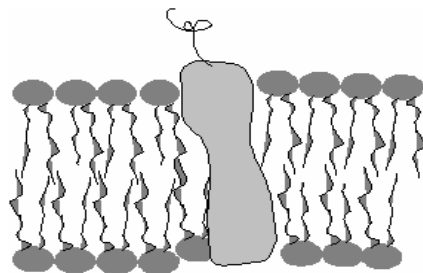
Ferskvannsfisk og marine fisk ser ut til å ha ulike behov for fettsyrer via maten.

Marine fisk trenger i tillegg til 18:2n₆ og 18:3n₃, også 20:5n₃ og 22:6n₃ som er svært viktige for overlevelse og vekst (Owen et al. 1975).

4.5 Fosfolipidmembraner

Fosfolipidene er amfile molekyler, og er hovedkomponenter i biologiske membraner. Fosfolipidene danner et dobbeltlag, der hodegruppene (polare) vil peke utover mot vannfasen og halene (upolare) vil peke mot hverandre (Figur 9). Membranen holdes sammen av tiltrekningskrefter mellom fosfolipidhalene, frastøtningskrefter mellom de hydrofobe fosfolipidhalene og vannfasen, og tiltrekningskrefter mellom de hydrofile hodegruppene og vannfasen. Alle lipidtypene er integrert i membranen. Proteiner kan være integrert i membranen eller forankret på utsiden av membranen.

Membranen i levende organismer er ikke en homogen struktur, men består av ulike lipidklasser som er heterogent fordelt. Singer og Nicholson kom i 1972 med en modell for biologiske membraner som har gitt oss noe av dagens forståelsen av membraner.



Figur 9. Figuren viser et fosfolipid bilag der et protein er integrert etter Singer og Nicholson-modellen. De hydrofile hodegruppene ligger ut mot vannfasen, mens de hydrofobe halegruppene ligger innover (Singer & Nicholson 1972).

Membranen er sensitiv for kjemisk forurensing. Forurensing kan påvirke alle biologiske prosesser som er avhengig av likevekt i membranen for å kunne fungere optimalt. På grunn av den polare karakteren til mange kjemikalier vil de kunne akkumuleres i den hydrofobe delen av biologiske membraner. Som resultat av akkumulering i membraner er det sett tap av membranintegritet og endringer i membranens struktur og funksjon. Endringer i membranen vil også føre til endring i lipidmiljøet rundt protein og det kan endre reseptorenes og enzymenes funksjoner. Parametere som membrantykkelse, hodegruppehydrering, fluiditet og fettsyresammensetning regulerer aktiviteten til membranbundne enzymer (Sikkerma et al. 1994 og 1995).

De fysiske egenskapene til membranen bestemmes av fosfolipidene, fettsyresammensetningen i disse og interaksjonen med kolesterol og proteiner i membranen. Graden av umettetthet i fettsyrene er viktig for fluiditeten i membranen, og for å gi et riktig miljø for membranfunksjonene. En av de viktigste tilpassingsprosesser membranen har er endring i fluiditeten. Dette gjøres for tilpasning til termiske eller fysiske og kjemiske endringer.

4.5.1 Temperaturrelaterte endringer av lipidsammensetningen

Vekselvarme organismer fra regioner med stor variasjon i temperaturen har en stor utfordring i å opprettholde den fysiologiske funksjonen til cellemembranen, da denne er sensitiv for temperaturendringer. Mange fysiologiske prosesser er avhengige av cellemembranen da flere reseptorer er lokalisert der, den er matriks for enzymfunksjoner og signaloverføring, barriere for diffusjon, reaksjonsflate og membranen kan virke som regulelement i utvekslingen av informasjon og metabolitter mellom celler (Williams & Hazel 1994).

Membranen eksisterer i to hovedfaser, en fast fase (gel fase) og en flytende fase (væske-krySTALLINSK fase). Transisjonstemperaturen er temperaturen ved overgangen mellom disse to og påvirkes av sammensetningen i membranen. Membranen kan ikke opprettholde sine funksjoner i fast fase. Farkas et al. (1994) fant at transisjonstemperaturen for membranene i fisk ligger noen grader under temperaturen i vannet. For å holde transisjonstemperaturen under vanntemperaturen

og for å opprettholde membranens funksjoner, må sammensetningen i membranen endres kontinuerlig. Høyere transisjonstemperatur kommer som følge av høyere ordenen i lipidlaget. Lavere transisjonstemperatur følger av mindre orden i lipidlaget. Lipidbilaget kan endres på tre måter: Ved endring i antall dobbeltbindinger i allerede eksisterende fettsyrer, ved å restrukturere de polare hodegruppene eller ved omfordeling av fosfolipider i membranen. Økt umettetthet gir større uorden i membranen, økt mettetthet gir større orden. Endringer i eksisterende fettsyrer kan skje ved forlengelse av eller innføring av dobbeltbindinger i fettsyrene. Restrukturering endrer forholdet mellom hodegruppene og dette gir membranen andre egenskaper. PE med sin koniske form bidrar til større uorden, mens PC, som er sylindrisk, øker ordenen i bilaget og bidrar dermed til å heve transisjonstemperaturen. Omfordeling av fosfolipidene skjer ved å danne nye fosfolipider fra eksisterende fettsyrer og hodegrupper (Farkas et al. 1994, Bell et al. 1986, Lie et al. 1989, Dey et al. 1993, Williams & Hazel 1994).

Tilpassing til kaldere vann skjer ved å øke andelen 18:1 og 20:5 fettsyrer. Ved innsetting av en dobbeltbinding i en mettet fettsyre oppnås den største senkningen i transisjonsverdien for membranen. Det er derfor økning i 18:1 nivå som er ventet å være den mest vanlige tilpasningen til kaldere vann. Det spekuleres i om det er andre mekanismer for endringer i membranen enn de overnevnte, der kolesterol kan være en viktig kompensator for endring i fluiditet. Forsøk gjort med karpe-erythrocyter viste små endringer i fosfolipidene, men viste membranfluiditetsendringer, som mulig kan komme fra endringer i kolesterolnivå (se Williams & Hazel 1994 for sammendrag).

Det er også andre membrankomponenter som kan være med å påvirke membranene. Buda et al. (1994) spekulerer i om membranproteiner kan være ansvarlige for kompensasjon av membranfluiditeten ved endring i temperatur.

Det er ikke bare temperaturendringer som fører til endring av fluiditeten til cellemembranen. Kolesterol er en naturlig komponent i membranen, og fører til økt uorden i membranen. Den økte uordenen kommer av at det er vanskelig å ordne fettsyrene inntil det stive kolesterolmolekylet. Kolesterol reduserer også kreftene mellom fettsyrehalene til fosfolipidene, dette er med å gi økt fluiditet (Gennis 1989). Forsøk viser at narkotiske kjemikalier (narkose er definert som en reversibel forstyrrelse av membranfunksjonene, og blir forårsaket ved akkumulering av

forurensing i fettstoffer i organismen) senker transisjonstemperaturen og øker fluiditeten til fosfolipidmembranen. Når membraner blir eksponert for høye konsentrasjoner av stoff som er aktive i membran-vann interfasen, vil lipid-vann interaksjonen senkes og interaksjon mellom halene vil dominere. Dette vil gi endringer i likevekten til membranen (Wezel & Opperhuizen 1995).

Sikkerma et al. (1994) viste at cellen kan kompensere for tap av membranintegritet som følge av inkorporering av lipofile stoffer ved å endre lipidsammensetningen.

4.6 Kolesterol og østrogen

4.6.1 Kolesterol syntesen

Det første trinnet i kolesterol syntesen er omdannelse av acetat (C2) til mevalonat (C6), der det viktigste enzymet er HMG-CoA reduktase. Dette trinnet er den viktigste regulatoren i kolesterol syntesen. Deretter skjer flere reaksjoner der man ender opp med squalene (C30). Squalene er en forgrenet, umettet karbonkjede. Til slutt skjer en serie med ringdannende reaksjoner som gir kolesterol. Kontroll av kolesterol syntesen skjer på både transkripsjons og translasjons nivå, der kolesterol selv eller en av derivatene spiller aktive roller i translasjonskontrollen. Enzymene reguleres hormonelt av insulin og glukagon, trolig ved å påvirke syntesen av enzym på transkripsjonsnivå (Mathews et al. 2000) . Man vet imidlertid ikke om alle reguleringstrinnene for kolesterol syntesen. Philipp og Shapiro (1981) viste at østrogen har effekt på HMG-CoA nivået. De så østrogenindusert økning av HMG-CoA reduktase. Roitelman (1991) fant at Ca^{2+} har en regulerende effekt på HMG-CoA reduktase.

4.6.2 Hormoner

Generelt sett er hormoner molekyler som blir syntetisert og utskilt av spesialiserte celler, og som blir fraktet til målcellen via blodsirkulasjonen. I målcellen kan hormonet påvirke metabolismen eller stimulere andre typer responser som er spesifikke for målcellen. Steroidhormon har en lipofil natur og virker ved å diffundere gjennom cellemembranen og binde seg til proteiner i cellekjernen, steroidhormonreseptorer, eller interferere via plasmamembranen ved reseptorer eller membranbundete kinaser.

Kolesterol er den biosyntetiske kilden til alle steroide hormoner.

4.6.3 Hormonhermere

Hormonhermere er stoffer med den egenskap at de etterligner naturlige hormoner.

Hormonhermere går også under samlebetegnelsen xenobiotika.

De fysiologiske effektene til hormoner er mange da hormonhermere og antagonister kan virke inn på flere trinn. Det er vist at hormonsyntese, sekresjon, transport og signalomforming er områder der alkylfenoler og andre xenobiotika kan virke.

Antagonister er substanser som motvirker den cellulære virkingen til agonister (for eksempel hormon) ved å binde seg til den cellulære reseptoren for stoffet, og blokke dens virkning. Agonist er en substans som binder seg til reseptoren, og aktiverer reseptoren. Det er tenkelig at xenobiotika kan virke både som antagonister og agonister, der de vil aktivere noen av reseptorene som det naturlige stoffet aktiverer, men vil blokkere andre.

4.6.4 Østrogen

Østrogenernes hovedoppgave er kjønnsbestemmelse og utvikling av hunnkjønn.

Produksjonen av østrogener starter med et signal fra hypothalamus til hypofysen i hjernen, som frigjør stimulatorer fra gonadene. Aktivering av steroidhormonsyntesen involverer både stimulering av kolesterolhydrolyse og opptak av kolesterol til mitokondriene i målorganet.

Østrogenreseptorer finnes i mange vev, blant annet leveren, hjernen, hypofysen og gonadene. Østrogen virker ved å binde seg til østrogenreseptorer i cellen. I cellekjernen vil hormonreseptorkomplekset binde seg med østrogenresponselementet til DNA og indusere transkripsjon.

Østrogenhermere binder seg til østrogenreseptorer, men med en svakere affinitet enn østrogen.

5 Metoder

5.1 Eksposering av fisk

Forsøket ble utført på to år gammel førstegangsgytende torsk. Torsken kom fra en stamme Norsk Arktisk torsk som er alt opp ved Havforskningsinstituttets (HI) stasjon i Øygarden utenfor Bergen. Fisken ble transportert fra Austevoll havbruksstasjon i august 1999 og brakt til HI (Nordnes) hvor den gikk i utendørs kar frem til forsøket startet i november. Fisken ble fordelt i sju grupper, hver på 40 fisk og overført til 10 m³ innendørs tanker. Lyset under forsøket ble regulert til det naturlige lysregimet (Bergen, 60° N) og vanntemperaturen var 8-10 °C. Fisken ble fra august til forsøksstart fôret med kommersielt fiskefôr (tørrpellet fra Felleskjøpet, 10% lipid). Det var en kontrollgruppe fisk, en positiv kontrollgruppe som fikk østrogen (17β-østradiol) (kalles positiv kontroll fordi vi vet at alkylfenoler har østrogenhermende egenskaper og ønsket å kunne sammenligne med en gruppe eksponert for østrogen) og fem grupper med ulik dosering av alkylfenol. 17β-østradiol dosering var 5 ppm. Alkylfenolene ble gitt i fem forskjellige doseringer, en gang per uke i fire uker. Til sammen ble fiskene eksponert for fem ulike doser alkylfenoler: 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm. Det ble brukte en blanding med 4-t-butylfenol, 4-n-pentylfenol, 4-n-hexylfenol og 4-n-heptylfenol. 17β-østradiol og alkylfenolene ble løst i 1,2-propandiol og ble blandet i en pasta bestående av oppmalt tørrpellets, vann og fiskeolje. Pastaen ble sugd opp i en plastslange og applisert ved hjelp av en sonde direkte i magesekken på den bedøvede fisken. Både fisken og pastaen ble veid umiddelbart før og etter dosen ble gitt, for å holde kontroll med doseringen. Fisken ble avlivet ved slag i hodet. Hjernene ble tatt hurtig ut, frosset i flytende nitrogen og lagret ved -80 °C til videre analyse. Mine analyser er på hunntorsk.

Dosen av alkylfenol ble bestemt fra en beregnet kroppskonsentrasjonsmodell for individer i sjø. Rye et al (1996) simulerte spredningen av alkylfenol fra produsert vann fra Haltenbanken, og kalkulerte det sannsynlige opptaket i en pelagisk fisk ved bruk av en modell. Modellen viste at størsteparten av fiskene rundt oljeplattformene ville få en "bodyburden" på 1-10 ppb (Rye et al. 1996). Meier (2002) valgte 5 ppb av hver av de fire alkylfenolene, som skulle tilsvare en realistisk dose. Når dosene i forsøket

skal regnes tilbake til sjøvannkonsentrasjoner må det tas hensyn til bioakkumuleringsfaktorer. Vår dosering vil tilsvare en teoretisk sjøvannkonsentrasjon på 0,032 ppb totalt alkylfenol.

5.2 Prinsipp for ekstraksjon av lipider

Løsemidlene i lipidekstraksjon må være polare nok til interaksjon mellom molekyler og ioner. De må være polare nok til å løse de komplekse polare lipidene i vevet, men samtidig være upolare nok til at de løser opp nøytrale lipid. Alkohol brukes for å ødelegge hydrogenbindinger og ioniske krefter mellom lipid og protein. Foruten oppløsning krever ekstraksjonen at man får fjernet ikke-lipid materiale som også er blitt ekstrahert ut.

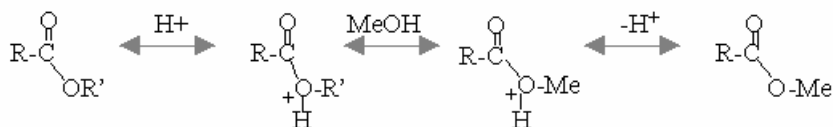
Det har siden 1957 vært Folch og Bligh & Dyer sine metoder for lipidekstraksjon som har vært brukt. Begge metodene benytter en blanding av kloroform og metanol til oppløsning. Tilsetning av vann til et tofasesystem fjerner ikke-lipid materiale. Jeg har valgt å bruke en forenklet utgave av Folch metoden i liten skala, da jeg ikke har så mye materiale (Folch et al. 1957, Christie 1993a).

5.3 Prinsipp for transesterifisering

(Christie 1993b)

I gass kromatografi ser man på fettsyremetylestere, så fettsyrene må frigis fra glyserol og metyleres før analyse. Til dette brukes en syrekatalysatormetode med HCl i CH₃OH.

Reaksjonsligning 1. Syrekatalysert transesterifisering med metanol



5.4 Prinsipp for separasjon på kolonner

Et kromatografisk system består av en stasjonær fase og en mobil fase. Den stasjonære fasen kan være et fast stoff, gel, væske eller en fast stoff/væske blanding. Den mobile fasen kan være gass eller væske som flyter over eller gjennom den stasjonære fasen.

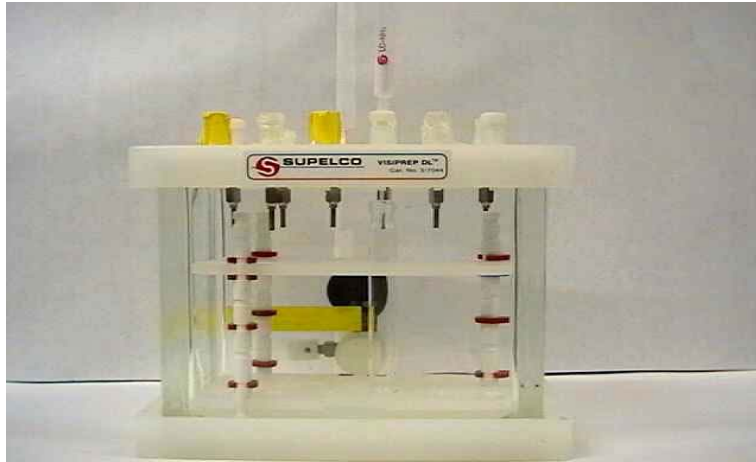
Valg av stasjonærfasen blir gjort på bakgrunn av distribusjonskoeffisientene (K_d) til stoffene som skal separeres. K_d beskriver hvordan et stoff fordeler seg mellom to ikke-blandbare faser. For to slike faser, A og B, er verdien av K_d konstant ved en gitt temperatur og er gitt ved uttrykket:

Formel 1. Ligning for å regne ut distribusjonskoeffisienten K_d

$$\frac{\text{Konsentrasjonen av stoffet i fase A}}{\text{Konsentrasjonen av stoffet i fase B}} = K_d$$

5.4.1 Separasjon av lipidklasser

Lipidklassene kan separeres ved hjelp av kolonner med aminopropyl som stasjonær fase (Supelclean LC-NH₂, 3ml, Supelco) (Kalunzny et al. 1985). Aminopropyl er en polar fase og lipidklassene blir eluert med væsker med økende polaritet og separerer nøytrallipid (NL), frie fettsyrer (FA) og polarlipid (PL). For separeringen brukes et Vac Elut apparat fra Supelco (Kaluzny et al. 1985). Det er en glassboks med stativ til prøverør og et lokk med ventiler til Bond Elut kolonnene. Boksen er forbundet med en vakuumpumpe for lettere å drive oppløsningen igjennom.



Figur 10. Bildet viser et Vac Elut apparat som ble brukt for å separere de ulike lipidklassene

5.5 Prinsipp for gass kromatografi (GC)

Molekylene blir separert på grunn av forskjellene i distribusjonskoeffisient til de fordampede stoffene mellom væskefasen og gassfasen. Molekylene får dermed ulik retensjonstid etter ulike polaritet.

5.5.1 Responsfaktor

Før en kvantifiserer fettsyremetylestere må man korrigere for eventuelle tap av enkelte fettsyremetylestere, dette gjøres ved hjelp av responsfaktorer (Ackman 1972, Christie 1989a). Systemets responsfaktorer blir kontrollert mot standarder. Jeg har funnet responsfaktorene empirisk, da dette er det mest stabile. For å finne de empiriske responsfaktorene har jeg brukt en standard blanding av fettsyremetylestere der den relative mengden fettsyremetylester variere. Responsfaktoren til fettsyre X regnes relativt til responsfaktor 18:0 =1.

Som standard har jeg brukt en standardblanding (GLC 68D), fra NuChek Prep Elysia USA, som er spesielt designet for analyse av marine fettsyrer. Denne inneholder 20 mettede og umettede fettsyremetylestere fra 14:0 til 24:1n9, der den relative mengden varierer fra 1 % til 16 % med 99 % renhet.

Jeg kjørte standarder for hver tiende prøve og regnet ut responsfaktoren (RF).

Formel 2. Ligning for å finne responsfaktor

$$RF(X) = \frac{A(X) * M(18:0)}{A(18:0) * M(X)}$$

A(X) = areal fettsyre X

A(18:0)= areal 18:0

M(X)= relativ mengde til fettsyre X i standard

M(18:0)= relativ mengde 18:0 i standard

Responsfaktorene regnes fra areal av topper i NuChek, mot relativ mengde i % av standardblanding. Fettsyremetylester som ikke finnes i standardblandingen, får responsfaktor lik nærmeste beslektede fettsyremetylester.

5.5.2 Kvantifisering

Det er mulig å bestemme mengden fettsyre ut fra bruk av intern standard. Jeg har brukt 19:0 fettsyre, da denne ikke finnes i betydelige mengder i naturen og derfor egner seg godt som intern standard.

Formel 3. Ligning for bestemmelse av mengden av fettsyre X

$$M(X) = \frac{A(X) * M(I)}{A(I)}$$

M(X)=total mengde av fettsyre X

M(I)=mengde intern standard

A(X)=areal av fettsyre X

A(I)=areal av intern standard

Arealet er hentet fra data som er korrigert for responsfaktor.

Formel 4. Ligning for å regne ut den normaliserte verdien til fettsyre X

$$\text{normaliserte verdier} = \frac{A(X) * 100}{A(T)}$$

A(X)=areal korrigeret fettsyre X

A(T)=sum areal alle fettsyrer

Mengde lipid relativ til våtvekten av prøven brukes for å unngå feil som følge av prosentregning i normalisert data.

Formel 5. Ligning for å regne ut mg fettsyre pr 100 mg våtvekt

$$\text{våtvekt} = \frac{M(X) * V * C * 100}{\text{Lipid\%}}$$

V= volum lipid ekstrakt tilsatt kolonne 0,5 ml

C= konsentrasjonen på lipid ekstrakt ca 4 mg/ml

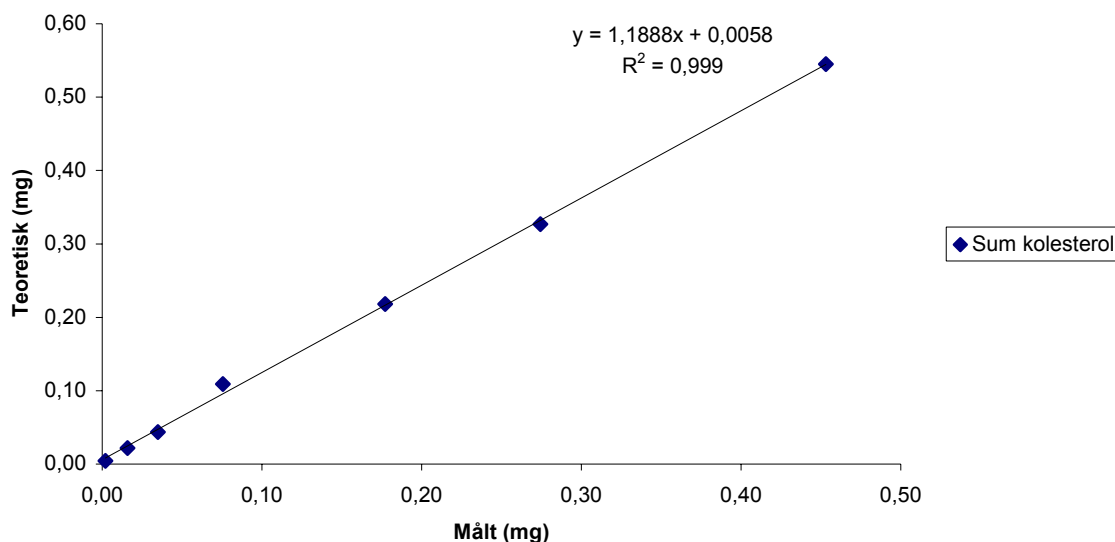
For å kompensere for tap av kolesterol under analysen brukes en standardkurve for kjente kolesterolprøver som gir en ligning for korreksjon av kolesterol.

Standardkurven er funnet av Meier.

Formel 6. Ligning for korreksjon av kolesterolinnholdet, likningen er funnet fra standardkurven i Figur 11.

$$\text{kolesterol}_{\text{utregnet}} = 1,1888X + 0,0058$$

X= sum kolesterol kvantifisert ut fra mengde internstandard



Figur 11. Standardkurve for kolesterol. Funnet som kvantifiserte mengder kolesterol fra GC-analyse, mot det teoretiske nivået av kolesterol.

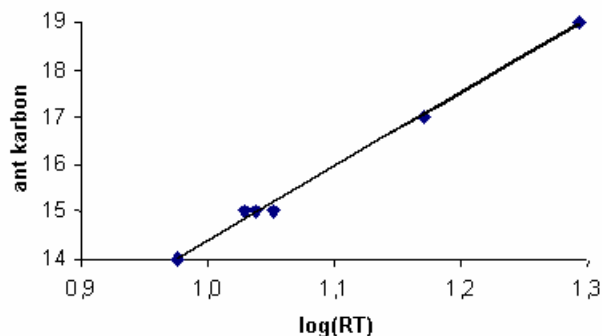
5.5.3 Identifikasjon

Fettsyremetylestere identifiseres ved å sammenligne med standarder kjørt på samme kolonne under samme forhold. Marine lipider inneholder store mengder fettsyrer, og ikke alle er tilgjengelige som rene standarder. Til identifikasjon av ukjente topper har jeg brukt masse spektrometer (MS).

5.5.4 ECL-verdier

"Equivalent chain length" (ECL) verdier brukes til identifikasjon der man benytter det lineære forholdet mellom logaritmen til retensjonstiden og antall karbon i fettsyren (Miwa et al. 1960, Woodford & van Gent 1960).

Ved plott av logaritmen til retensjonstiden (RT) mot antall karbon til de mettede fettsyrene kan man finne en ligning for det rettlinjede forholdet som kan gi ECL verdiene til de andre fettsyrene. ECL verdier kan brukes til å identifisere ukjente syrer ut fra den "familien" av fettsyrer den hører til (n3, n9, mettet osv.) (Ackman 1972).



Figur 12. ECL verdier for tre nære toppe for å identifisere hvilken som er 15:0. Den lineære grafen fra de mettede fettsyrene går igjennom verdien til den midterste toppen noe som viser at denne er 15:0.

5.6 Prinsipp for masse spektrometri

I GC-MS er det først en GC som separerer prøven, og deretter introduseres molekylene inn i MS etter ulik retensjonstid. I MS blir molekylene bombardert med elektroner og ionisert. De ulike positivt ladede fragmentene blir så ledet videre til detektoren som registrerer molekylvekt per ladning (m/z). Ut fra de ulike fragmentene og m/z kan utgangsmolekylet identifiseres.

MS i kombinasjon med GC er mye brukt ved identifikasjon av fettsyrer fra naturprodukt. GC-MS gir god spesifisasjon og har høy sensitivitet. GC-MS egner seg godt til rask identifikasjon av hele fettsyreprofilen, og resultatet kan lett overføres til GC analyser med FID ("flame ionization detector").

5.6.1 Identifikasjon

Det er ikke lett å eksakt bestemme lokaliseringen av dobbeltbindinger, dessuten er de flerumettede esterene ustabile, og man finner ikke molekylærion for disse.

Brakstad (1993) har imidlertid vist at det er mulig å bestemme dobbeltbindingsposisjonen til langkjedede enumettede metylestere ved bruk av multivariatanalyse av fragmentene.

For flerumettede estere er det vist at det er spesifikke fragmenter som indikerer plasseringen av dobbeltbindingene (Fellenberg et al. 1986, Brauner & Budzikiewicz 1982). Dette gjør det mulig å identifisere fettsyremetylestere ut fra GC-MS analyse.

5.6.2 Fragmentering av fettsyremetylestere

5.6.2.1 Rettkjedede, mettede fettsyremetylestere

(Odham & Stenhagen 1972, Christie 1989b)

Her er molekylærionet M^+ er alltid tilstedet. McLafferty omleiring gir basetoppen på $m/z=74$. Tap av metanol gir topp på M^+-31 . Topp på M^+-43 kommer som følge av tap av C_3H_7 . Man ser også en serie av oksygenholdige tap fra metylenden $[(CH_2)_nCOOCH_3]^+$ $n=2,3,4\dots$ $n=2$ gir $m/z=87$, $n=6$ gir $m/z=143$, $n=10$ gir $m/z=199$. Det er også topper fra hydrokarbonioner, for eksempel $m/z=43$ (C_3H_7) og $m/z=57$ (C_4H_9).

Eksempel på 14:0 finnes i appendiks Di.

5.6.2.2 Forgrenede mettede fettsyremetylestere

(Ryhage & Stenhagen 1959, Apon & Nicolaidis 1975)

Kløyving av binding på estersiden av metylsidekjeden gir $CH_3OCO(CH_2)_n^+$, A-ion
Kløyvning kan skje på andre siden av sidekjeden og man får B-ion
 $CH_3OCO(CH_2)_n(CH_3)CH^+$. Når B-ionet mister CH_3OH , dannes C-ionet. D-ion dannes når C-ionet mister H_2O .

Aneiso har A-ion M^+-57 , B-ion M^+-29 , C-ion M^+-61 og D-ion M^+-79 .

Iso har kun D-ion M^+-65 som stor topp.

For å skille mellom antiso, iso og rettkjedete benyttes at:

$M^+-29 \gg M^+-31$ for antiso

$M^+-29 = M^+-31$ for iso

$M^+-29 < M^+-31$ for mettede

5.6.2.3 Enumettede fettsyremetylestere

(Odham & Stenhagen 1972, Christie 1989b)

Her er molekylærionet lite, men tilstede. Basetopp kommer fra den umettede hydrokarbonkjeden (C_4H_7) på $m/z=55$. Det er en serie av umettede hydrokarbonfragmenter ($m/z=44+n*14$) $n=1,2,3..$ Det er fragmenter som M^+-32 , M^+-74 og M^+-116 , og topper på m/z 74 og m/z 87.

Eksempel på 24:1n9 finnes i appendiks Di.

Flerumettede fettsyremetylestere deles i to grupper: Diumettet og flerumettede fettsyremetylestere (Myher et al. 1974, Fellenberg et al. 1986, Christie 1989b)

5.6.2.4 Diumettet

Her er molekylærion er lite, men tilstede. C_5H_7 som gir baseionet på $m/z=67$.

Får hydrokarbonserie $m/z=(67+n*14)$ $n=1,2,3..$

Får fragmenter som M^+-32 , M^+-74 og M^+-116

Eksempel på 20:2n6 finnes i appendiks Di.

5.6.2.5 Flerumettede

Disse får baseionet fra en hydrokarbonkjede med dobbeltbindinger (C_6H_7) $m/z=79$.

Molekylærionet er ikke alltid tilstedeværende da det er ustabilt. Det er heller ikke andre store fragmenter som kan fortelle om antall dobbeltbindinger.

Man kan allikevel bestemme dobbeltbindingenes plassering i forhold til metylenden for n3, n6 og n9 seriene. Fellenberg et al. (1986) viser at karakteristiske topper relatert til dobbeltbindingenes plassering kommer frem ved fragmentering etter to dobbeltbindinger telt fra metylenden. Meier (1997) systematiserte dette i sin hovedfagsoppgave og kom frem til en sammenheng mellom flere fragmenter.

n3-serien: $m/z108 \gg m/z150$

n4-serien: $m/z122 > m/z108 > m/z150$

n6-serien: $m/z150 > m/z108 \gg m/z192$

n9-serien: $m/z 192 > m/z108 \gg m/z150$

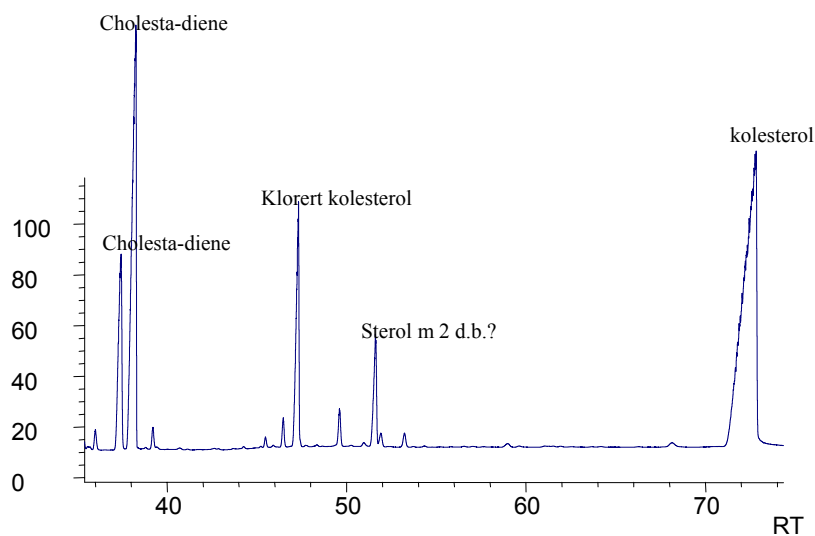
Det er fragmenter som kan fortelle noe om dobbeltbindingers plassering i forhold til karbonylenden. Ved å kombinere disse opplysinger kan man altså finne strukturen til flerumettede fettsyremetylester ved bruk av MS (Brauner & Budzikiewicz 1982, Mjøs & Pettersen 2003).

<u>første dobbeltbinding fra enden</u>	<u>peak</u>
$\Delta 4$	m/z166
$\Delta 5$	m/z180
$\Delta 6$	m/z194
$\Delta 7$	m/z208
$\Delta 8$	m/z222
$\Delta 9$	m/z236
$\Delta 10$	m/z250
$\Delta 11$	m/z264

Eksempel på 22:6n3 og 20:4n6 finnes i appendiks Dii.

5.6.3 Kolesterol

Det er kjent at det dannes kolesterolderivater under oppvarming, der kolesterol dehydrerer og det dannes en ny dobbeltbinding (Volin 2001). Dekomponeringen skjer både under transesterifisering og ved injeksjonen i GCen. Videre kan det skje isomering der dobbeltbindinger bytter plass. Disse kolesterolderivatene elueres i forkant av kolesterol. De er relativt stabile og summert sammen med kolesterol for å finne totalt kolesterol innhold.



Figur 13. Kromatogrammet fra GC viser kolesteroltoppen og noen av kolesterolderivatene.

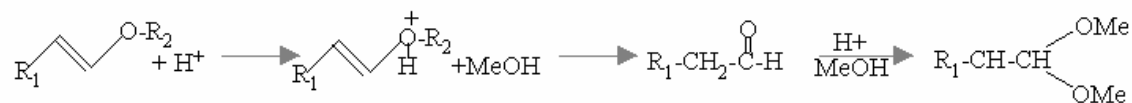
Kolesterolderivatene ble delvis identifisert med MS. Kolesterol har basetopp på 386 m/z, som er molekylærvekten. Tap av vann gir molekylærion på 368 m/z, dette er den mest vanlige nedbrytningen. Det blir også dannet derivater med flere dobbeltbindinger, m/z 366, kolesterol med klor m/z 404 og kolesterolmetyleter m/z 400 (Bortolomeazzi et al. 2000). Kolesterol i mine data er summen av de ulike kolesteroltoppene, som er korrigert etter Formel 6.

Eksempel på kolesterol, cholesta-diene, kolesterol med klor og kolesterolmetyleter finnes i appendiks *Dii* og *Diii*.

5.6.4 Eterlipider

For å bestemme komposisjonen til alk-enyldelen av plasmalogener må man frigi denne ved syrebehandling og en får dannet et aldehyd som hydrolyserer videre til dimetylacetal med metanol.

Reaksjonsligning 2. Syrekatalysert esterifisering av plasmalogen



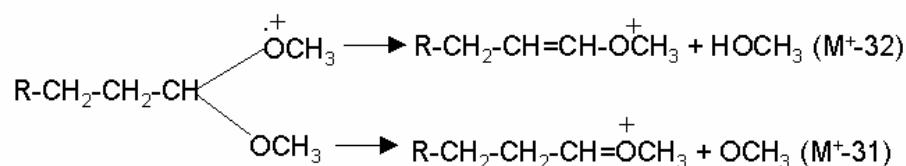
Dimetylacetalene kan detekteres på GC og GC-MS, men det er rapportert om dekomponering av dimetylacetal til metylalk-1-enyl eter som et tilleggsprodukt ved enkelte injeksjonsteknikker for GC. Brosche fant at ved å bruke lav temperatur ved injeksjon på GC, ville man unngå fragmentering (Brosche et al. 1985). Christie (1989c) understreker at tilstedeværelsen av dimetylacetal i fettsyremetylester analyse bare er en indikasjon på plasmalogen i prøven, da produksjonen av dimetylacetal ikke er kvantitativ.

5.6.4.1 Identifikasjon av dimetylacetal og metylalk-1-enyl eter

(Christiansen et al. 1968)

Dimetylacetaler og metylalk-1-enyl eter gir svake molekylær ion (M^+), men finner M^+-31 som er tap av OCH_3 . Ser også et typisk tap av 64, der den andre metanol gruppen også har forsvunnet (Christiansen et al. 1968).

Reaksjonsligning 3. Dannelse av M^+-30 og M^+-31



For dimetylacetaler er baseion på m/z 75, med en topp på m/z 71. For metylalk-enyl eter er det m/z 71 som er baseion, og det er ingen topp på m/z 75.

Det er vanskelig å si noe om plassering på dobbeltbindinger i de umettede dimetylacetalene (Brosche et al. 1985).

Eksempel på dimetylacetal og metylalk-enyleter finnes i appendiks Div.

5.7 Multivariat databehandling og prinsipal komponent analyse (PCA)

Fra GC analysene er det store mengder data, med mange objekter og enda flere variable. For å se sammenhenger mellom disse faktorene brukes multivariat evaluering som reduserer kompleksiteten i data, og ivaretar informasjonen fra variablene. Før å redusere informasjonsmengden plottes objektene i det multivariable rommet som variablene spenner ut. Derfra legges en eller flere latente variable (prinsipal komponenter, PC1 osv.) slik at de forklarer mest mulig av objektene spredning. Ved projeksjon av objektene ned på den latente variabelen finner man skårevektorene. Skårevektorenes lengde viser hvor mye av objektets varians den latente variabelen forklarer. På samme måte kan variablene plottes i objektrommet og projeksjon på den latente variabelen gir da ladningsvektorer som forteller hvor mye varians det er mellom den opprinnelige og den nye variabelen.

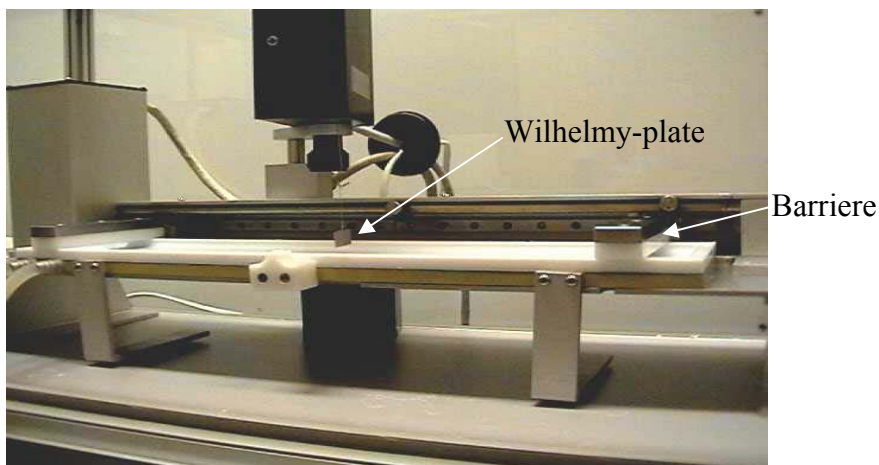
I PCA velges de latente variable slik at de er ortogonale, og dermed forklarer størst mulig varians. Ved å plote skåreverdiene i et diagram med to prinsipal komponenter som akser, vil avstanden mellom objektene være et mål på likhet. Ved plott av ladningsverdiene vil vinkelen mellom variablene vise korrelasjon mellom disse. I både ladningsplott og skåreplott vil avstanden til origo være proporsjonal med den forklarte variansen i PCA modellen.

For at alle variablene skal vektlegges har jeg forbehandlet data der jeg har normalisert alle fettsyrene mot total sum av fettsyrene i prøven. Jeg har også delt alle variablene på snittet av variablene, for å jevne ut forskjellen mellom de ulike toppene. Uten dette vil de store toppene dominere modellen.

5.8 Prinsipp for monolagsstudier

For å se på egenskapene til et monolag, benyttes en metode fra Langmuir og Blodgett (Blodgett & Langmuir 1937). Det benyttes at det er tre ulike faser av monolaget. Gassfasen er den fasetilstanden de fleste monolagene får når de spres på overflaten av en væske, subfasen (vanligvis vann). Her er det liten interaksjon mellom de enkelte monolagsmolekylene som orienterer seg med sidegruppene parallelt med overflaten. Kondensert fase dannes ved at monolaget presses sammen. De upolare delene av molekylene løftes opp av monolagsplanet og de enkelte molekylene pakkes sammen. I denne fasen vil komprimering av arealet føre til store trykkendringer og ved videre komprimering vil monolaget kollapse.

Kollaps punktet er det absolutte minimumsarealet som et monolag kan komprimeres ned til, og monolaget har da det høyeste overflatetrykket det kan eksistere under. Videre komprimering vil føre til at monolaget kollapse og overflatemolekylene pakkes i tilfeldige arrangementer. Monolaget komprimeres ved at de to barrierene som avgrensner monolaget presses sammen. Ved å måle endringen i overflatespenningstrykket (mN/m) og arealet av monolaget (gjennomsnittlig molekylareal (MMA), \AA^2) vil man få et mål for egenskapene til monolaget. Jeg brukte et datakontrollert, programmerbart Langmuir-Blodgett instrument av typen KSV Minitrough, levert av KSV Instruments LTD. Forsøket går ut på at en Wilhelmy-plate senkes ned i væsken, der en viss væskemengde vil løftes opp langs plateveggen som en følge av kapillære krefter. Denne platinaplaten er festet til en vekt som måler endring i trykk (mN/m) med følsomhetsområde mellom 0 og 100 mN/m . Det er et hydrofilt materiale (delrin) på trau og på barrierer for å minske motstand. Barrierenes posisjon lar seg måle av en optisk måleenhet (KSV instruksjonsmanual).



Figur 14. Langmuir apparat

5.9 Statistiske metoder

Formel 7. Ligning for å regne gjennomsnitt, kalt snitt i mitt data.

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Formel 8. Ligning for å regne standardavvik.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

n = antall prøver

X_i = prøve nr i sin verdi

Formel 9. Ligning for student's t -fordeling, kalt t -test.

$$T = \frac{\bar{X} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

μ = gjennomsnittet til normalfordelingen til de n prøvene

Konfidensintervall på 95 % vil si at det er 95 % sannsynlig at H_0 er feil hvis $t < 0,05$.

H_0 : Kontrollgruppen er lik de andre gruppene.

5.10 Feilkilder

Det vil alltid være feilkilder ved innveing av prøver og for tillaging og fortynning av løsninger. I mitt forsøk vil det særlig være i den interne standarden. Den er først veid inn, deretter fortynnet for så å bli overført til prøven med en Hamilton-pipette. Det er også en kromatografisk usikkerhet ved utregningen fra NuChek standarden.

Fettsyreprofilen til prøvene er regnet ut fra de normaliserte data. Problemet med normalisert data er at generell økning i for eksempel fettsyrer ikke vil komme frem siden data er prosent. I normalisert data vil også en økning et sted nødvendigvis vise en senkning et annet sted, da det hele tiden skal summeres til 100. For å unngå

dette har jeg for de data der jeg har endringer, fettsyreprofilen til nøytrallipid og kolesterolnivå, regnet ut data som mg fettsyre per 100 mg våtvekt hjerneprove. Da prøvene mine inneholder store mengder umettede fettsyrer vil disse være ekstra utsatt for oksidasjon. Jeg har prøvd å ta hensyn til dette ved å jobbe under nitrogenatmosfære så sant det var mulig. Prøvene har også vært oppbevart i frys under nitrogenatmosfære. Ved oksidasjon vil man se en senkning i nivået til de umettede fettsyrene og en tilsvarende økning når det gjelder mettede fettsyrer. Dette er ikke observert.

I den frie fettsyrefraksjonen var det problemer under opparbeidelsen av prøvene. Det ble observert at i noen av fraksjonene var det tapt umettede fettsyrer. Dette hadde ikke skjedd i alle prøvene og reaksjonen er ukjent.

For å teste hva som hadde skjedd, ble tre fraksjoner sammenlignet. I den ene var det kun lipid og løsemiddel (A), i de to andre var det lipid og løsemiddel, der løsemiddelet hadde blitt kjørt gjennom Bond Elut kolonnen (B og C). I B ble løsemiddelet dampet helt bort, mens i C ble løsemiddelet ikke dampet helt bort.

Resultatet viste at løsningen som ikke var kjørt igjennom kolonnen, ikke skadet fettsyrene. Prøven B og C viste at ved svært god neddamping ikke var skade på fettsyrene (B), mens det ved ufullstendig neddamping (C) var skade på fettsyrene. Dette tyder på at det er et stoff i kolonnene som fettsyrene reagerer med, men at dette stoffet kan dampes bort.

Da frie fettsyrefraksjonen er en liten del av totallipidet valgte jeg å bruke prøvene videre.

Det ligger også en feilkilde i det jeg kaller polarlipid fraksjonen, jeg har jo ikke sett på GC analysene for polarlipid bare regnet den ut fra TL, NL og FA.

6 Eksperimentelt

6.1 Kjemikalier

Alle kjemikalier ble levert av Merck dersom annet ikke er angitt.

Alle kjemikalier var av kvaliteten "pro analysis" dersom annet ikke er angitt.

Etanol og Isopropanol ble levert av Arcus.

NuChek, Prep Elysia, USA.

6.2 Instrumenter

Sentrifuge Beckman CS 15R (rotor C1015 eller F0850).

Branson 5200 Ultralydbad

Gasskromatograf HP5890 med FID autosampler

Retsch mixer

Thermax varmeskap

MasseSpektroskopi Finnigan MD 800 GC-MS

Langmuir-Blodgett instrument, KSV Minitrough

6.3 Lipid ekstraksjon, Folch

Jeg brukte hele hjernen for å få nok materiale. Den var på ca 0,5 g.

Prøven ble veid inn i 15 ml glassrør med skrukork. Prøven ble så homogenisert i 2 ml CH_3OH , med glasstav, deretter tilsatte jeg 4 ml CHCl_3 for videre homogenisering med glasstav. Prøven ble satt i ultralydbad (120 watt, romtemperatur) i 30 min. For fjerning av vev ble prøven filtrert gjennom en glassfiltertrakt under vakuum. Vevet ble vasket med 4ml $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), 2ml CHCl_3 og til slutt 1 ml CH_3OH . Filtratet ble så ristet med 0,88 % kalsiumklorid oppløsning KCl (aq) ($\frac{1}{4}$ av volumet) for å fjerne ikke-lipid materiale. Filtratet ble sentrifugert og øvre fase (vannfasen) ble fjernet med pipette. Nedre fase ble ristet med 1 ml 0,88 % KCl (aq), sentrifugert og den øverste fasen fjernet. Til tørking av nederste fase brukte jeg MgSO_4 (s) og filtrerte ned i et veid glassrør, og skylte med 2x1 ml CHCl_3 .

Løsningsmiddel ble dampet vekk under nitrogengass til konstant vekt og lipidinnholdet bestemt gravimetrisk.

Lipidmaterialet ble oppløst i CHCl_3 til en konsentrasjon på 8 mg/ml og oppbevart under nitrogenatmosfære ved $-18\text{ }^\circ\text{C}$ til videre analyse.

6.4 Separasjon av lipidklasser

Bond Elut kolonnen ble vasket to ganger med 2 ml heksan for å aktivere den. Jeg satte 500 μl lipidekstrakt (8 mg/ml) på kolonnen. Det ble det brukt 4 ml kloroform:isopropanol (2:1), 4 ml 2 % eddiksyre i dietyleter og 6 ml metanol for eluering av henholdsvis NL, FA og PL. De rør med prøver som skulle til GC eller MS var på forhånd tilsatt 19:0 fettsyre som intern standard.

6.5 Transesterifisering (metanolyse)

For TL tok jeg 0,5 ml lipid ekstrakt og dampet inn. NL, PL og FA dampet jeg inn etter separasjon. Glassrør med tørt lipid og 19:0 intern standard ble tilsatt 1ml metanolyse-reagens. Metanolyse-reagens er 5 % HCl løst i MeOH, denne ble laget på laboratoriet. Prøven ble satt i ovn ved $100\text{ }^\circ\text{C}$ i 2 timer. Korken måtte skrues til etter 10 minutter. Etter nedkjøling dampet jeg vekk halvdelen av metanolblandingen med nitrogen-gass og erstattet væsken med destillert vann. Metylesterne ble ekstrahert med 2x2 ml heksan.

6.6 Gass kromatografi

Jeg brukte en Hewlett Packard 5890 A, med HP 7673 autoinjektor og FID.

Stasjonærfasen var 0,20 μm polyetylenglycol, og kolonnen en CP-WAX-52 CB 25mx0,25mm fused silica carbowax kolonne.

Temperaturprogram: Startet på $90\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min.). Oppvarming med $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$ til $160\text{ }^\circ\text{C}$ og videre oppvarming med $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$ til $225\text{ }^\circ\text{C}$. Det blir holdt $225\text{ }^\circ\text{C}$ i 12 min., før videre oppvarming med $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$ til $240\text{ }^\circ\text{C}$. Denne temperaturen ble så holdt i 33 min., til hele prøven var kommet gjennom kolonnen.

6.7 GC-MS

Jeg brukte en Finnigan MD 800 GC-MS. Kolonnen var en WCOT fused silica 25 m med 0,25 mm indre diameter, belagt med CP-Wax 52CB fra Varian.

6.8 Monolagsstudier, Langmuir

Arbeidet med monolagsstudier ble gjort i samarbeid med Thorny C. Andersen. Karet som løsningen skulle fylles i tok 180 ml væske, så vi regulerte nivået med vann etter hvor mye alkylfenolløsning vi skulle tilsette se Tabell 2.

Vi fylte MilliQ-vann i karet og sugde av eventuelt støv. Så appliserte vi lipidløsningen, 20 μ l, på vannflata, ved hjelp av en hamiltonpipette. Vi brukte tre ulike lipidløsninger der lipidet var løst i kloroform til konsentrasjon ca 10 mg/ml (PL hjerne 12 mg/ml, PC_{16/22:6} 13 mg/ml, PL lever 10 mg/ml). Vi lot lipidlaget stå i noen minutter før vi startet målingene, slik at kloroformen fordampet. Deretter ble alkylfenolløsningene tilsatt ved å sprøyte den under barrierene. Vi ventet i 10 minutter slik at det var likevekt i lipidlaget, da vi startet maskinen. Konsentrasjonen til lipidløsningen ble bestemt ved å applisere 10 μ l lipidløsning som ble veid etter at kloroformen hadde fordampet (Cahn modell 4700 automatic electrobalance).

Tabell 2. Tabellen viser konsentrasjon på alkylfenolløsningen, hvor mye alkylfenolløsning som skal tilsettes for å oppnå riktig konsentrasjon. Den viser også hvor mye vann som skal tilsettes i Langmuirkaret.

Navnfenol	kons Løsning uM	tilsettes langmuir, ml
		5 uM
4-n-pentylfenol	117,78	7,6
<i>ml vann</i>		174
4-n-heptylfenol	124,80	7,2
<i>ml vann</i>		173
4-n-butylfenol	228,07	3,9
<i>ml vann</i>		176
4-n-heksylfenol	196,63	4,6
<i>ml vann</i>		175
oktylfenol	27,75	32,4
<i>ml vann</i>		148
nonylfenol	22,77	39,5
<i>ml vann</i>		140

Navnfenol	kons alkylfenolløsning uM	1uM	5 uM	10uM	20uM
		tilsettes langmuir, ml			
4-n-pentylfenol	117,78	1,53	7,64	15,28	30,57
<i>ml vann</i>		180,00	174,00	165,00	150,00

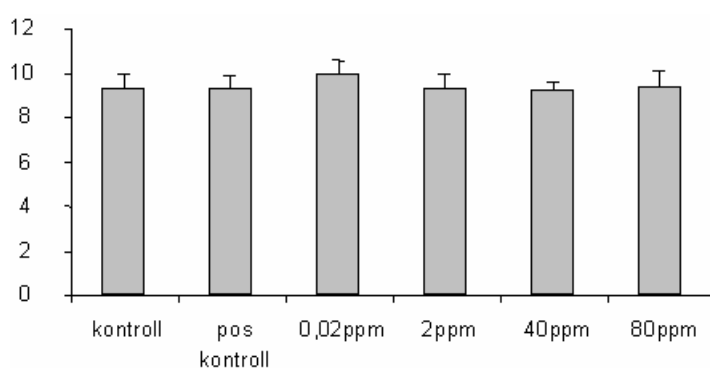
7 Resultater

Seks grupper fisk ble undersøkt og fire av gruppene ble eksponert for ulik mengde av alkylfenol blanding. En gruppe var kontroll som ikke ble eksponert og en annen var positiv kontroll som ble eksponert med 17 β -østradiol. Positiv kontrollgruppen ble østrogeneksponert for å kunne sammenligne effekter fra alkylfenoleksponering med østrogeneffekter. Gruppene som ble eksponert med blandingen av de fire alkylfenolene kalles 0,02 ppm, 2 ppm, 40 ppm og 80 ppm, i forhold til mengde alkylfenol de ble eksponert for.

7.1 Lipidinnhold i torskهجjerne

Lipidet fra torskهجjernene ble ekstrahert ut, separert i lipidklasser med NH_2 kolonner, transesterifisert og analysert på GC. Fettsyren 19:0 ble brukt som intern standard for å kunne regne ut mengden av fettsyrer i de ulike gruppene lipid: Nøytrallipid, frie fettsyrer og polarlipid. Totallipid ble også undersøkt.

Etter ekstraksjonen ble lipidinnholdet bestemt gravimetrisk, som prosent av totalvekten til torskهجjernen. En fullstendig oversikt over lipidinnholdet i torskهجjerne finnes i appendiks B1. Figur 15 viser lipidinnholdet i de ulike gruppene Figur 15 viser ingen, eller svært liten endring i lipidprosent i de ulike gruppene

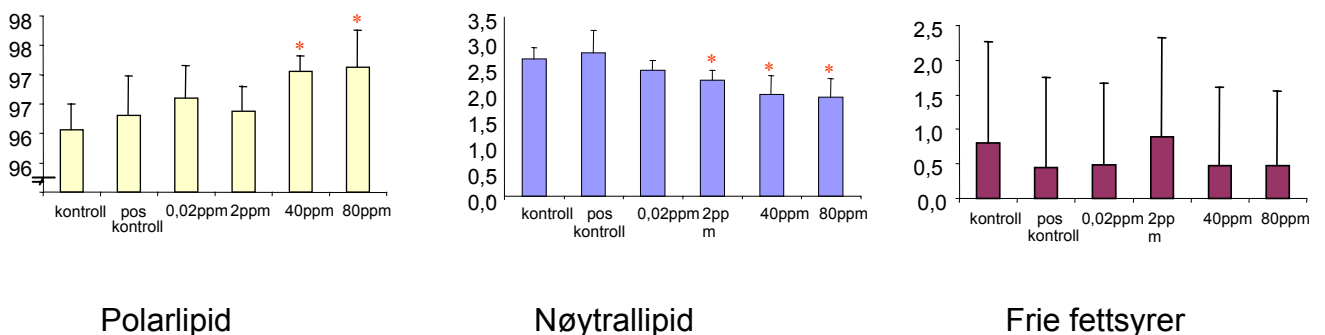


Figur 15. Lipidinnholdet i torskهجjerne (%). Grafen viser snittverdiene for de ulike gruppene, der feilgrensen er standardavviket.

7.2 Lipidklassefordeling i forskehjerne

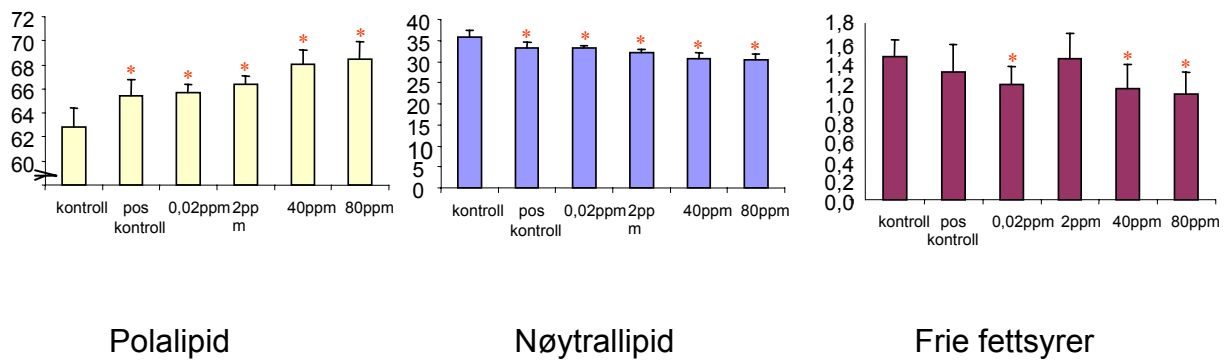
Etter GC analysen ble lipidklassefordelingen regnet ut. Det ble ikke gjort GC analyse på polarlipid, da det skulle brukes i videre analyser, men fettsyreprofilen til polarlipid ble regnet ut ved å subtrahere nøytrallipid og frie fettsyrer fra totalt lipid. Figur 16 viser at over 90 % av fettsyrene finnes i polarlipid, det vil si at polarlipid og totallipid vil ha tilnærmet lik fettsyreprofil. Det ble vist at disse er like ved å sammenligne fettsyreprofilen for polarlipid og totallipid fra hannfisk (appendiks B4).

Ved å se nærmere på fettsyreinnholdet ser man enkelte endringer i fettsyrefordelingen i de tre lipidklassene. Figur 16 viser at det er antydning til økning i fettsyreinnholdet i polarlipid, mens fettsyreinnholdet i nøytrallipid ser ut til å gå noe ned. Det er vanskelig å si noe om eventuelle endringer i frie fettsyrer, da standardavviket er så stort.



Figur 16. Fettsyrefordelingen i forhold til lipidklasser regnet relativt til total mengde fettsyrer (%). Merk at grafen til polare lipider har en y-akse fra 96-98. Grafen viser snittverdiene til i gruppene. Feilgrensen er standardavviket. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er merket med rød stjerne (*).

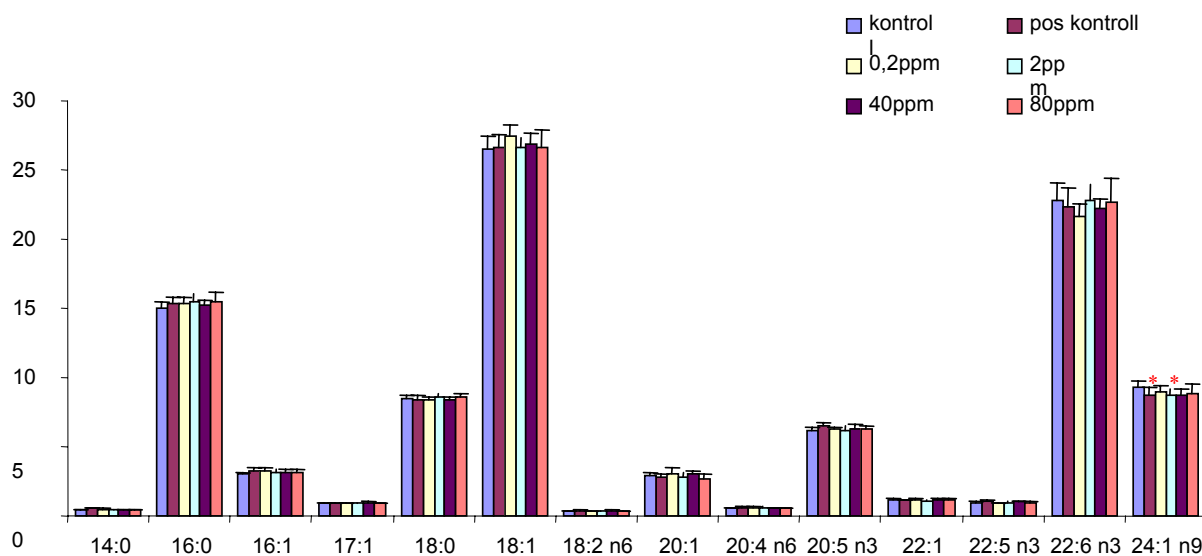
Figur 17 viser oppgang i lipidprosenten i polarlipid, men viser nedgang i lipidprosenten i nøytrallipid. Dette er ventet, da kolesterolinnholdet i de eksponerte gruppene viste senkning, Figur 24.



Figur 17. Figuren viser prosenten av lipid i de ulike lipidklassene. Merk at grafen til polare lipider har en y-akse som går fra 60-72. Verdiene er snittverdiene til gruppene. Feilgrensen er standardavviket i gruppene. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er merket med rød stjerne (*).

7.3 Fettsyreprofil

Etter GC analysene ble data normalisert ut fra den totale mengde fettsyrer. De normaliserte data ble sammenlignet for å finne eventuelle endringer i fettsyreprofilen som følge av alkylfenoleksponering. Totallipid sin fettsyreprofil vil være tilnærmet lik polarlipid sin fettsyreprofil. Totallipid sin fettsyreprofil er vist i Figur 18.

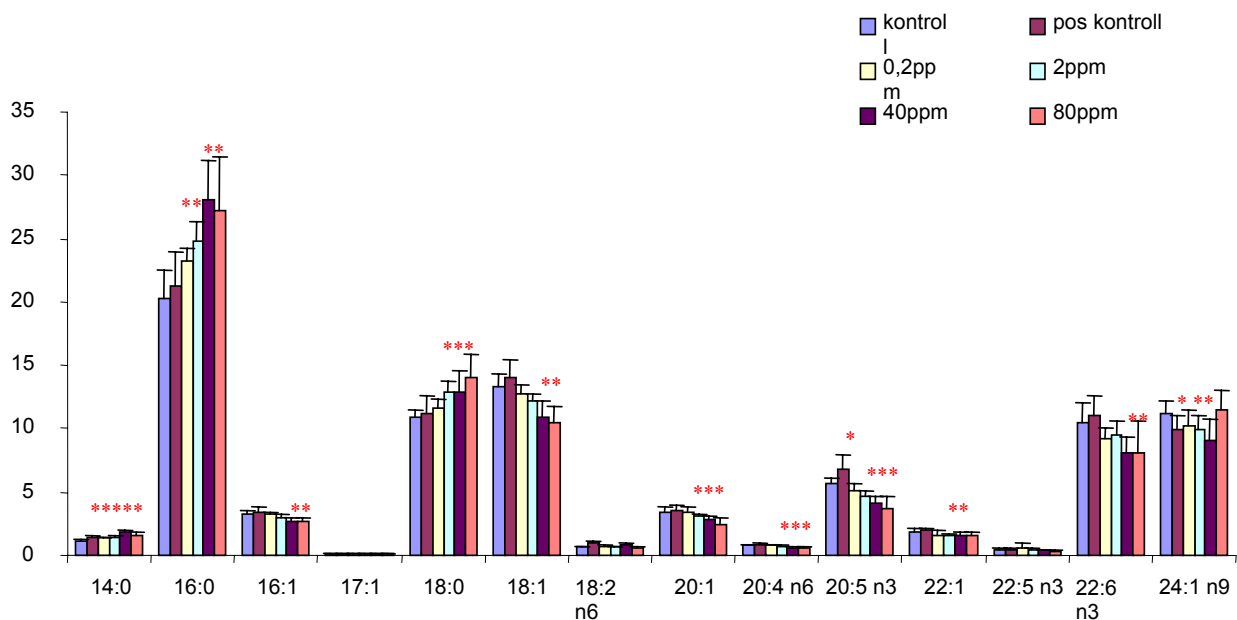


Figur 18. Fettsyreprofilen til totallipid vist som prosent av total mengde fettsyrer. Grafen viser snittverdier for de ulike gruppene, der feilgrensen er standardavviket. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er markert med rød stjerne (*).

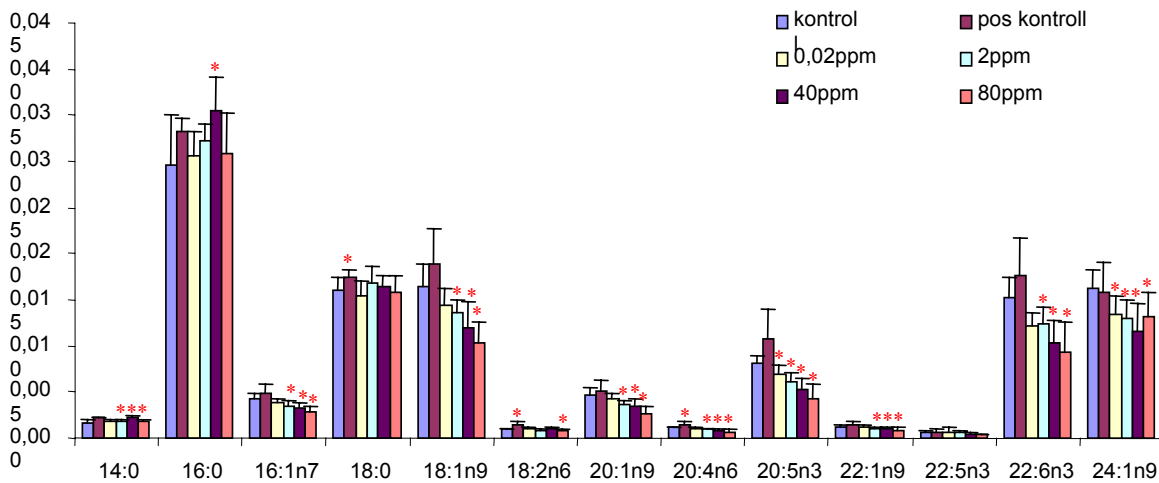
I nøytrallipidet er fettsyrene kun en liten del av lipidklassen. Det er steroider som dominerer denne gruppen, og de fleste av fettsyrene kommer fra kolesterolestere. Det ble gjort undersøkelse av nøytrallipid på HPLC for å kunne finne andel kolesterol, kolesterolestere og triacylglyserid i torskehjerne. Dette arbeidet ble utført av Meier og Mjøs (2003). Dette arbeidet viste at fettsyrene i nøytrallipid i hovedsak kommer fra kolesterolderivater.

I fettsyreprofilen til nøytrallipid (Figur 19) er det noen endringer i fettsyrenivået. Det ser ut til å være en doserelatert endring med økning av mettede fettsyrer, spesielt i 16:0 og 18:0, og senkning av umettede fettsyrer 20:5n3 og 22:6n3. Av de monoumettede fettsyrene er det mest nedgang i 18:1n9, som er den monoumettede fettsyren det er mest av. PCA modellen, Figur 21, bekrefter tendensen med

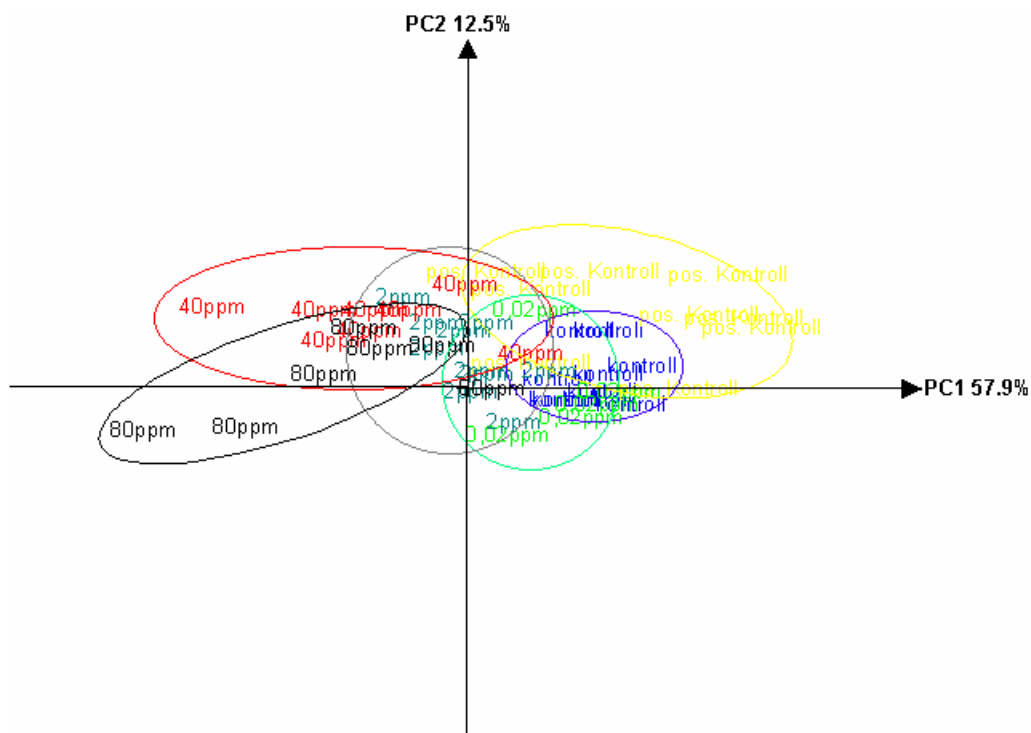
doserelaterte endringer. Figur 21 viser de ulike gruppene. Hver gruppe ligger for seg og de mest eksponerte gruppene ligger lengst fra kontrollgruppen. Positiv kontrollgruppen grupperes også bort fra kontrollgruppen. Det kan tyde på at det er snakk om en østrogeneffekt. Positiv kontroll ser ut til å ligge i en litt annen retning enn de alkylfenoleksponerte gruppene. Dette kan tyde på at det kan være andre effekter i de alkylfenoleksponerte gruppene. Figur 22 viser ladningsplottet til nøytrallipid. Her vises to klare grupperinger, mettede fettsyrer og umettede fettsyrer. Dette stemmer godt overens med den økningen fettsyreprofilen til nøytrallipid viser i 16:0 og 18:0, samt nedgangen i 18:1, 20:5 og 22:6.



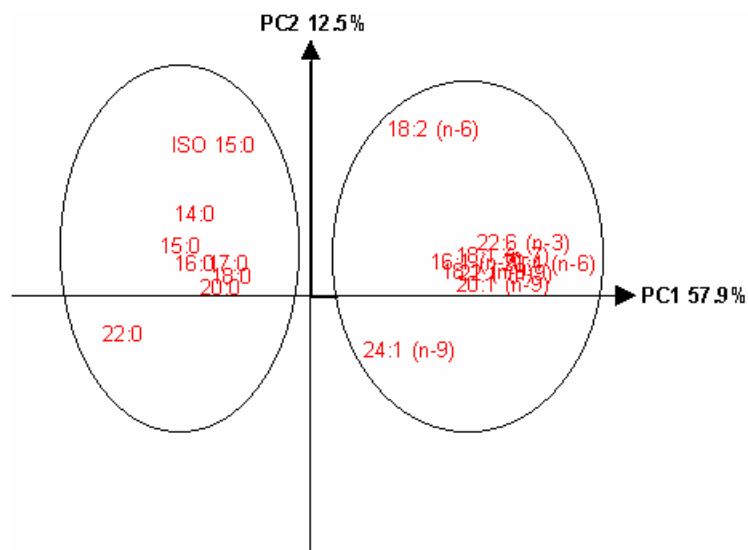
Figur 19. Fettsyreprofilen til nøytrallipid som prosent av total mengde fettsyrer. Grafen viser snittverdiene for de ulike gruppene, der feilgrensen er standardavviket. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er markert med rød stjerne ().*



Figur 20. Fettsyreprofilen til nøytrallipid som mg fettsyre per 100 mg våtvekt hjerneprøve. Grafen viser snittverdiene for de ulike gruppene, der feilgrensen er standardavviket. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er markert med rød stjerne (*).



Figur 21. PCA skåreplott til nøytrallipid. Prinsipal komponent 1 (PC1) forklarer 57,9 % av spredningen, prinsipal komponent 2 (PC2) forklarer 12,5 %. Til sammen forklarer PC1 og PC2 70,4 % av variasjonen i data. De ulike gruppene er markert med ulike farger.

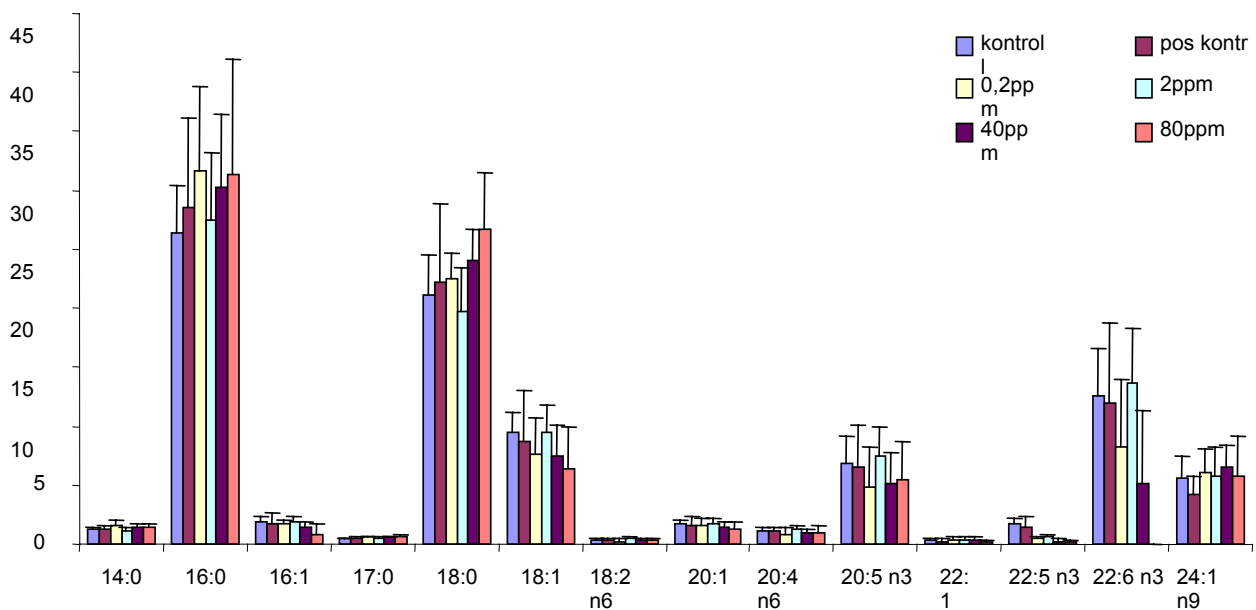


Figur 22. Ladingsplott til nøytrallipid. PC1 og PC2 forklarer 70,4 % av variasjonen i data.

For frie fettsyrer ble resultatet noe påvirket av ødeleggelse av enkelte prøver. Frie fettsyrer ble separert på NH₂ kolonner og eluert med 2% eddiksyre i dietyler, deretter ble løsningsmiddelet dampet bort og prøven transesterifisert.

Fettsyrerprofilen til frie fettsyrer viser kun resultatet av de prøvene som ikke ble ødelagt. Det er allikevel store standardavvik, noe som kan tyde på at enkelte av disse prøvene også ble skadet.

På grunn av det høye standardavviket er det vanskelig å si om det har skjedd endringer i fettsyreprofilen for frie fettsyrer.



Figur 23. Fettsyreprofilen til frie fettsyrer vist som prosent av total mengde fettsyrer. Grafen viser snittverdiene for de ulike gruppene, der feilgrensen er standardavviket.

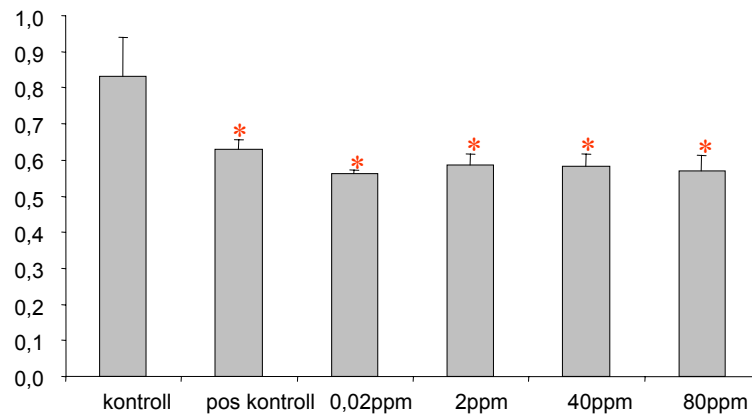
Fullstendig fettsyreprofiler av totallipid (C1i), nøytrallipid (C1ii) og frie fettsyrer (C1iii) finnes i appendiks C1.

Dimetylacetalene ble kvantifisert og profilen til dimetylacetalene for totallipid er vist i appendiks C3. Det er ingen endringer i den prosentvise fordelingen av disse og den totale mengden er heller ikke endret. Produksjonen av dimetylacetaler fra plasmalogener er ikke kvantitativ og indikerer bare at plasmalogen er tilstede i prøven.

7.4 Kolesterol

Kolesterol elueres sist i det GC programmet vi brukte, og krever en temperaturøkning i forhold til det fettsyrene gjør. Kolesterol ble kvantifisert på samme måte som fettsyrene, med fettsyre 19:0 som intern standard. Kolesterolderivater som er degraderingsprodukt av kolesterol og kolesterolestere fra analysen ble summert. For å finne total mengde kolesterol, ble alle kolesteroltoppers mengde langt sammen, samt korrigert for tap med Formel 6. Jeg har valgt å vise kolesterol fra totallipid fraksjonen, da den store mengden kolesterol i nøytrallipid førte til noe overbelastning

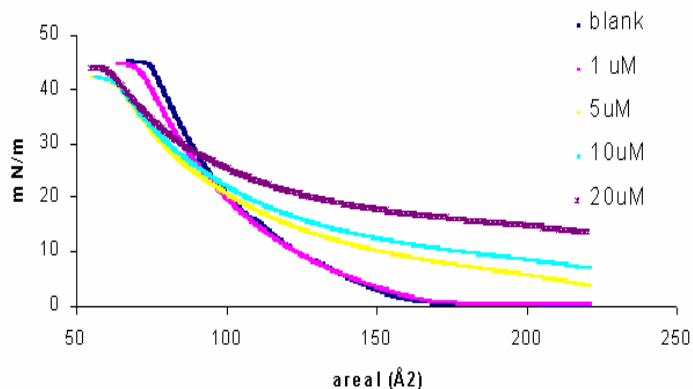
av kolonnen. Figur 24 viser mg kolesterol per 100 mg våtvekt hjerne. Det er en signifikant senkning ($p < 0,05$) av kolesterolet fra kontrollgruppen til de andre gruppene. Senkningen i kolesterol er ikke doseavhengig, og den tilsvarende endring i positiv kontroll som i alkylfenol eksponerte grupper kan tyde på at dette er en østrogen effekt.



Figur 24. Kolesterolnivå i totallipid, som mg kolesterol per 100 mg våtvekt. Signifikante endringer ($p < 0,05$) er markert med rød stjerne (*).

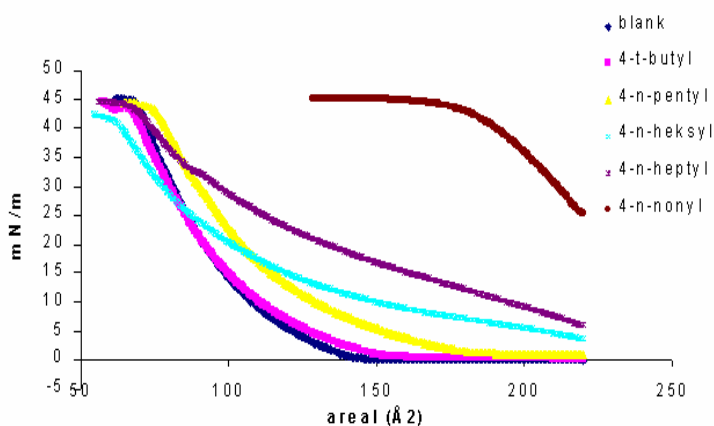
7.5 Langmuir monolagsstudier

For å teste om alkylfenoler kunne påvirke lipidmonolag (polarlipid fra torskehjerne), ble Langmuir monolagsstudier utført. Det ble kjørt konsentrasjonsserier, Figur 25, for å finne hvilken konsentrasjon som var egnet for å sammenligne de ulike alkylfenolers innvikning på et lipidlag. Konsentrasjonsserien ble kjørt på polarlipid fra torskehjerne, og vi testet 5 ulike konsentrasjoner. Det ble kjørt konsentrasjonsserier på fenol, 4-n-metylfenol, 4-n-etylfenol, 4-n-propylfenol, 4-t-butylfenol, 4-n-pentylfenol, 4-n-heksylfenol, 4-n-heptylfenol, 4-n-oktylfenol og 4-n-nonylfenol. For fenol og de alkylfenolene med alkylkjeder kortere enn 4 karbon ble det ingen endring i overflatespenningsisotermen og disse er ikke vist. For de øvrige alkylfenolene var det endring i overflatespenningsisotermen for alle fra 5 μM konsentrasjon av alkylfenol. Utgangskonsentrasjonen til alkylfenol løsningsene gjorde det vanskelig å teste konsentrasjoner over 10 μM på flere av alkylfenolene. Derfor valgte vi å sammenligne de ulike alkylfenolenes påvirkning på overflatespenningsisotermen ved en konsentrasjon på 5 μM alkylfenol i vannet. Figur 25 viser at økt konsentrasjon av alkylfenoler påvirket lipidlaget i større grad.

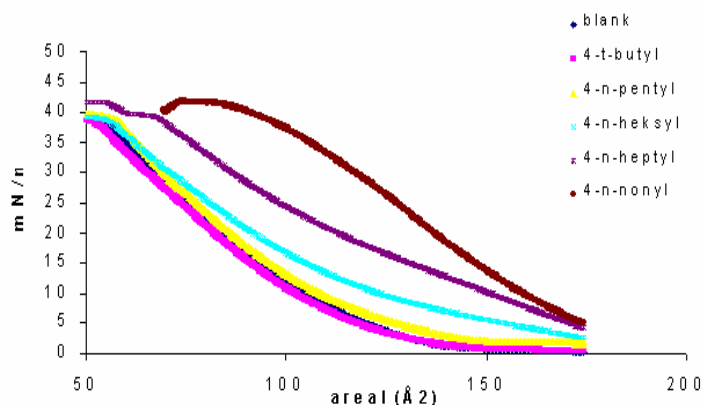


Figur 25. Konsentrasjonsserie med 4-n-heksylfenol, lipidlaget er polarlipid fra torskehjerne (kontrollgruppen).

For å kunne sammenligne effekten av de ulike alkylfenolene valgte vi å bruke 5 µM som konsentrasjon av alkylfenolene. Figur 26 viser effekten av de ulike alkylfenolene på polarlipid fra torskehjerne (kontrollgruppe). Sammenhengen mellom lengde på alkylkjeden og endring i overflatespenningsisotermen til lipidlaget synes å være at økt påvirkning med økt kjedelengde.

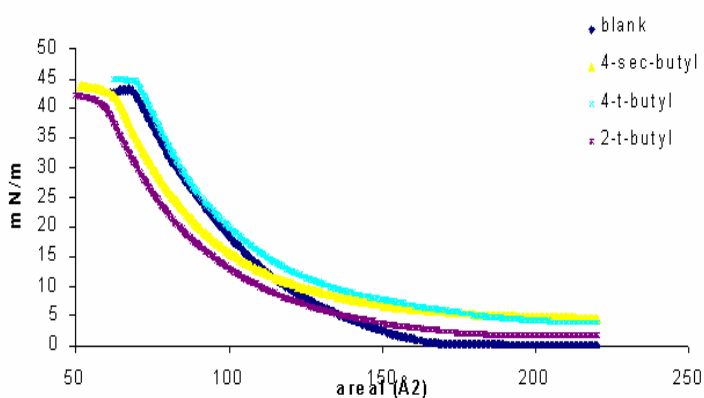


Figur 26. Grafen viser ulike alkylfenolers innvirkning på lipidlag. Konsentrasjonen av alkylfenol var i alle 5 µM. Lipidlaget er polarlipid fra torskehjerne (kontrollgruppen).



Figur 27. Grafen viser ulike alkylfenolers innvirkning i lipidlaget. Konsentrasjonen av alkylfenol var i alle $5 \mu\text{M}$. Lipidlaget var 16:0/22:6 PC.

Effekten av ulik plassering av alkylkjeden og ulik forgreinger i alkylkjeden ble også analysert. Vi kjørte forsøk på ulike butylfenoler, med konsentrasjonen $80 \mu\text{M}$ for å kunne se endring fra kontrollkjøringen. Resultatet (Figur 28) viser at det er noe ulik påvirkning av overflatespenningsisotermen for de ulike isomere.



Figur 28. Grafen viser påvirkningen av ulike butylfenoler på polarlipid fra torskehjerne (kontrollgruppen). Konsentrasjonen av alkylfenolene var $80 \mu\text{M}$ for de ulike butylfenolene.

8 Diskusjon

8.1 Lipidinnhold og lipidklassefordeling i torskehjerne

Det er ingen endringer i det totale lipidinnholdet i torskehjerne som er eksponert for alkylfenoler. I leveren på samme fisk ble det imidlertid observert økning i den totale mengden lipider. Dette kan forklares med forsinket utvikling av gonadene, noe som ikke er forventet å påvirke hjernen (Andersen 2003). Lipidinnholdet i torskehjernen på 9 % (Figur 15) ligger noe over det Tocher og Harvie (1988) fant i hjerne på torsk. Ulikt matinntak vil kunne resultere i små endringer i lipidinnhold. Jeg har funnet lipidinnholdet gravimetrisk, men det ser ut som om Tocher og Harvie har funnet lipidinnholdet etter kvantifisert data fra GC. Dette kan forklare noe av forskjellen i lipidinnhold.

Fettsyrefordelingen viser at over 96 % av fettsyrene foreligger i polarlipid. Lignende resultat er funnet i regnbueørret av Tocher og Sargent (1990).

Det har skjedd en omfordeling i fettsyrepresenten fra nøytrallipid til polarlipid, men det er ingen endring i det totale lipidinnholdet.

For å finne hvor den reelle endringen i de normaliserte data kom fra ble fettsyrenivå i nøytrallipid undersøkt som mg fettsyre per 100 mg våtvekt torskehjerne (appendiks B3). Det viser seg at det er skjedd en liten endring i nøytrallipid, men endringen er ikke stor nok til å kunne forklare den prosentvise nedgangen i de normaliserte data. Dette tyder på at det er en reell økning i fettsyrenivået i polarlipid.

Nedgangen i fettsyrenivået i nøytrallipid kan komme av tap av kolesterolestere, det er ca 2 % kolesterolester i torskehjernen (Upubliserte observasjoner, Meier & Mjøs 2003). Kolesterolestere vil under transesterifiseringen frigi fettsyrer og disse vil da utgjøre mesteparten av fettsyrene i nøytrallipid.

En økning i fettsyrenivået i polarlipid kan være kompensasjon for tap av membrankomponenten kolesterol. Kolesterol er et membranaktivt stoff og er kjent for å øke fluiditeten i membranen (Gennis 1989). Nedgangen i kolesterol kan gjøre at fisken må kompensere for tapet av membrankomponenter ved å øke fosfolipidfraksjonen. Dette er diskutert nærmere under avsnitt 7.2.

Endringen i lipidklassefordelingen (Figur 17) vil domineres av nedgangen i kolesterolnivå. Det er derfor som ventet at nøytrallipid har en prosentmessig nedgang, mens polarlipid da har en tilsvarende økning.

8.2 Fettsyreprofilen i torskkehjerne

I totallipid er over 96 % fettsyrene fra polart lipid. Det er ventet av selv små endringer i polart lipid ville komme til syne i fettsyreprofil til totallipid. For hannfisk har jeg sammenlignet kontrollgruppens fettsyreprofil i totallipid og polarlipid, og disse er forholdsvis like (appendiks B4). Jeg har derfor valgt bare å kommentere fettsyreprofilen i totallipid.

Det er liten endring i fettsyreprofilen i totallipid. Økning i fettsyrenivået i polarlipid sammen med ingen endring i fettsyreprofilen, tyder på at det er skjedd en generell økning av alle fettsyrene i polarlipid. Den generelle økningen i fettsyrer kan tyde på at det er en mekanisme som øker fettsyresyntesen eller økt opptak av lipider fra plasma når kolesterolnivået minsker. Jeg har ikke funnet litteratur som beskriver en slik mekanisme.

Det totale lipidinnholdet i torskkehjernen har ikke endret seg, selv om det har vært en betydelig nedgang i kolesterol. Dette er med på å underbygge teorien om at det har vært kompensasjon for tap av membrankomponenter ved å øke mengden fosfolipider. Andersen (2003) fant også økning i polarlipid fraksjonen i torskeleveren fra de samme fiskene. Vår arbeidshypotese var at alkylfenoler inkorporeres i membranen og dermed øker fluiditeten, og at fisken har en mekanisme som kan kompensere for dette ved endringer i lipidsammensetningen. Andersen har sett endring av fettsyreprofilen i polarlipid i leveren, slike endringer er det ikke er i hjerneprøvene. Andersen (2003) fant økning i mettede fettsyrer i polarlipid. Noe som kan være en mulig forklaring er økt fettsyresyntese. Økt syntese av fettsyrer i leveren og da spesielt mettede fettsyrer, vil kunne føre til økt fettsyrenivå i hjernen. Det kan tenkes at det vil gi økning i fettsyrenivået, spesielt i polarlipid. Tapet av kolesterol i hjerne kan ha gjort membranen mer ordnet, og da er det ikke behov for ekstra mettede fettsyrer. Det kan resultere i at det ikke vil bli en spesifikk økning i mettede fettsyrer, men en generell økning i fettsyrenivået.

PCA analysene av fettsyrene i totallipid viser ingen grupperinger, det er heller ikke ventet da det ikke er endringer i fettsyreprofilen.

Endringen i fettsyreprofilen i nøytralt lipid kan, som nevnt over, forklares ved tap av kolesterolestere. Hvis det er kolesterolestere med umettede fettsyrer som er tapt, vil tap av disse kolesterolestere forklare nedgang i umettede fettsyrer. Tocher og Harvie (1988) fant at nøytrallipid består av 93 % fritt kolesterol, 4,5 % kolesterolestere og bare 0,8 % triglyserider. Resultatene fra undersøkelsene på den eksponerte torsk viste et kolesterolinhold på ca 98 %, og et kolesterolesterinnhold på ca 2 %. Mengden triacylglyserider lå under deteksjonsgrensen (Upubliserte observasjoner, Meier & Mjøs 2003). Dette betyr at fettsyreprofilen i nøytrallipid i hovedsak vil domineres av fettsyrer fra kolesterolestere.

Studier på pattedyr tyder på at kolesterolestere i plasma er dannet fra PC (fosfatidylcholin) og fritt kolesterol ved overførelse av fettsyren i 2-posisjon fra PC til kolesterol (Dave et al. 1974). Det vil si at fettsyrene som er festet til kolesterol med esterbinding vil i stor grad være umettet. Andersen (2003) fant endringer i polarlipid i leveren til den eksponerte torsk, med noe nedgang i de umettede fettsyrene i PC. Hvis torsk ikke syntetiserer fettsyrer i hjernen, vil fettsyrene antakeligvis komme fra leveren. Det betyr at fettsyrene i kolesterolestere kan endres som følge av endringer i fettsyrene i PC fra leveren. Det kan være en endring i fettsyrene fra kolesterolestere som gir endringen i fettsyreprofilen i nøytrallipid.

En nedgang i kolesterolestere vil vises som nedgang i umettede fettsyrer i nøytrallipid hvis det er triacylglyserid tilstedet. Det er imidlertid ikke mye triacylglyserider tilstede i nøytrallipid fra torsk hjernen. Det er derfor tvilsomt om en nedgang i kolesterolestere alene kan forklare endringen i fettsyreprofilen i nøytrallipid.

Fettsyreprofilen i nøytrallipid (Figur 20) som mg fettsyre per 100 mg våtvekt hjerne viser at det er reell nedgang i umettede fettsyrer. Den økningen som synes å være i mettede fettsyrer fra normalisert data, ser ikke ut til å være reell med unntak av 16:0. Nedgangen i umettede fettsyrer i positiv kontrollgruppen vist i normalisert data, ser ikke ut til å være reell. Dette tyder på at nedgangen i umettede fettsyrer ikke er en østrogeneffekt.

Det er funnet endringer i forholdet mellom fritt kolesterol og esterifisert kolesterol i plasma som følge av fasting. Der det totale kolesterolinnholdet har sunket, ble det først observert nedgang i kolesterolestere (Dave et al. 1974). Det kan tyde på at kolesterolestere lettere blir påvirket enn fritt kolesterol. Holmberg et al. (1972) fant endringer i forholdet mellom kolesterol og kolesterolestere i plasma som følge av pentaklorfenoleksponering.

Endringene i fettsyreprofilen i nøytrallipid ser ut til å være doseavhengige med hensyn på alkylfenoleksponering. Det er ikke senkningen i kolesterolnivået.

Endringen i kolesterolnivået viser senkningen i total mengde kolesteroler, men det er mulig at det skjuler en doserelatert nedgang i kolesterolestere. Dette ville i så fall forklare sammenhengen mellom nedgang i total kolesterol og nedgang i umettede fettsyrer i nøytrallipid.

Endringen i fettsyreprofilen i nøytrallipid ligner på endringer i membranen ved tilpasning til varmere vann. Farkas et al. (1994) fant at fisk fikk økt innhold av 18:1 og 20:5 fettsyrer i membranene ved lavere temperatur. Ved varmere vann ble 18:0 og 20:4 fettsyreinholdet økt. Fettsyreprofilen til nøytrallipid viser nedgang i nivået av fettsyrene 18:1 og 20:5, samt økning i 18:0, men det ser ut til å være en nedgang i nivået av fettsyren 20:4. Det er her noe økning i nivået til alle mettede fettsyrer. Jeg har ikke funnet litteratur som omtaler økning i alle mettede fettsyrer som et ledd i tilpasning til endringer i membranfluiditet. Andersen (2003) fant lignende endringer i polarlipid i leveren til den eksponerte fisken. Da det er fosfolipider som er hovedkomponenter i membranen, er det ikke ventet å finne en slik endring i nøytrallipid uten å finne denne i polarlipid. Det er heller ikke ventet at fettsyreprofilen til nøytrallipid, som i hovedsak består av fettsyrer fra kolesterolestere, vil ha slike endringer.

Endringene i fettsyreprofilen til nøytrale lipider ser ikke ut til å forklares ved membrantilpassinger tilsvarende tilpasning til temperaturendring.

Det er mulig at det har skjedd endringer i enzymer i tilknytning til fettsyresyntesen på grunn av alkylfenolers påvirkning på membranen. Det er skjedd en økning i nivået av alle de mettede fettsyrerene. Figur 8 i innledningen viser at hvis desaturasene hemmes og fettsyresyntesen opprettholdes, vil det bli en økning i nivået av mettede

fettsyrer. Dette vil da gi økt nivå av 16:0 og andre mettede fettsyrer, men ikke gi like stor økning i de andre fettsyrene som er avhengig av desaturase for dannelse. Slike endringer ville ha vist seg i større grad i frie fettsyrer og polarlipid, noe det ikke gjør.

PCA analysen av nøytrallipid viser klart grupperingen og doserelaterte endringer. Det er også to klare grupperinger av fettsyrene i mettet og umettet. Biplottet viser at økt metning korrelerer med økt dose alkylfenol.

Økning i nivået av mettede fettsyrer kan komme fra oksidasjon av de umettede fettsyrene. Okai et al (2000) har vist at alkylfenoler kan generere hydroksylradikaler. De kan bidra til økt auto-oksidering av fettsyrene. Det er ikke noen gode forklaringer for hvorfor dette bare skulle skje i nøytrallipid, og ikke i polarlipid som er hovedkomponenten i membranen.

Fettsyreprofilen til frie fettsyrer bygger på et færre antall prøver enn de andre lipidklassene. Endringer i fettsyreprofilen i frie fettsyrer skulle allikevel komme til syne hvis det var noen. Det synes å være en økning i nivået til 16:0, 18:0 og 24:1n9, og nedgang i 18:1n9 og 22:6n3, men det store standardavviket gjør det vanskelig å tolke disse dataene. Resultatet fra de frie fettsyrene kan allikevel brukes til å si noe om graden av hydrolyse i prøvene. Det er forventet at det skal være lite frie fettsyrer i hjernen til torsk, et høyere nivå av frie fettsyrer kan tyde på hydrolyse under lagring. Nivået av frie fettsyrer er som forventet. De ulike fettsyreprofilene i totallipid og frie fettsyrer tyder også på at det ikke har skjedd hydrolyse av prøvene.

8.3 Kolesterol

Endringer i kolesterolnivå kan komme av endringer i kolesterolsyntesen, endring i oksideringen av kolesterol, endringer som tilpasning til temperatur eller sesongvariasjoner i kolesterolnivå. Det er en signifikante nedgang ($p < 0,05$) i kolesterolnivået i torskkehjerne der torskene ble eksponert for alkylfenoler. Den tilsvarende nedgangen i den positive kontrollgruppen (som ble eksponert for østrogen) som i de alkylfenoleksponerte gruppene, tyder på at det er en østrogeneffekt.

Holmberg et al. (1972) fant at ål eksponert for pentaklorfenol fikk en liten økning i totalt kolesterolnivå i plasma. Hvis ikke kolesterolsyntesen har blitt endret vil det si at det må være en nedgang i kolesterolnivået i vevene. Økning i kolesterol i plasma vil altså gi nedgang i kolesterolinnhold i vevene (Dave et al. 1974).

Det ble funnet en økning i kolesterolnivået i plasma til den eksponerte torsken (ikke publiserte resultater, Meier 2002). Dette kan skje ved økning av kolesterolsyntesen eller omfordeling av kolesterol fra vev til plasma. En endring i kolesterolsyntesen ville antagelig ha vist seg som endringer i kolesterolnivå i leveren, men det ble ikke funnet (Andersen 2003). Senkning av kolesterolnivået i hjernen kan være et resultat av omfordeling av kolesterolet i kroppen til fisken.

Nedgangen i kolesterol ser ikke ut til å være doseavhengig. Der tyder på at selv de minste doser alkylfenol er nok til å gi denne endringen, og overskudd fører ikke til ytterligere endringer. Påvirkning av enzymaktiviteter vil kunne gi denne type endring. Enzymene kan aktiveres eller inhiberes av for eksempel østrogenhermere. Når alle de aktive setene på enzymene er opptatt vil ikke økt konsentrasjon av stoff føre til ytterligere aktivering.

Et enzym som kan påvirkes er HMG-CoA reduktase. Reguleringen av HMG-CoA reduktase er en kompleks prosess, der man ikke er klar over alle komponenter som kan virke inn.

Philipp og Shapiro (1981) undersøkte effekten av østrogen på HMG-CoA reduktase, og viste at østrogen kunne indusere HMG-CoA reduktase og kolesterolsyntese. De gav østrogen til hannfrosk og fant at østrogen førte til 40-100 ganger økning av reduktaseaktiviteten. Økt reduktaseaktivitet fører til økt kolesterolnivå. Kolesterolet i torskehjerne gikk imidlertid ned som følge av alkylfenoleksponering. Meier et al. (2002) fant nedgang i østrogennivået i plasma i den eksponerte torsken. Det er mulig at nedgangen i østrogen kan gi mindre reduktaseaktivitet. Gruppen med positiv kontroll, som har fått tilført østrogen skulle etter denne teorien ha fått høyere kolesterolnivå. Positiv kontrollgruppen har i likhet med de alkylfenoleksponerte gruppene nedgang i kolesterolnivået. Det er derfor ikke sannsynlig at endringer i østrogennivå i fisken fører til den nedgang i kolesterolnivå som er påvist her.

Det er mulig at alkylfenoler ikke aktiverer alle de hormonreseptorer som østrogen gjør, eller hvis alkylfenol er en antagonist vil den kunne blokkere enkelte enzymer slik

at de ikke aktiveres. Dette ville forklare hvorfor de alkylfenoleksponerte gruppene kan ha ulikt kolesterolnivå som det kontrollgruppen har. Jeg har ikke funnet litteratur som kan bekrefte eller avkrefte slike virkeområder for alkylfenoler, og eventuelt om noen av disse da virker inn på kolesterolsyntesen.

I 1991 fant Roitelman at Ca^{2+} er med på å regulere degraderingen av HMG-CoA til mevalonat, via enzymet HMG-CoA reduktase.

Alkylfenoler påvirker Ca^{2+} nivået (Ruehlmann et al. 1998) i ER (endoplasmatisk retikulum), og alkylfenoler kan derfor, via Ca^{2+} , være med på å regulere kolesterolnivået. Østrogen kan også påvirke Ca^{2+} , og derfor vil den samme nedgangen kunne skje i positiv kontrollgruppen. Det er gjort lite forskning på dette, og det gjør det vanskelig å trekke klare konklusjoner om alkylfenolers innvirkning på Ca^{2+} balansen kan påvirke kolesterolsyntesen i særlig grad.

Kolesterol har flere ulike derivater, og oksysteroider er en slik gruppe. Oksysteroider er kolesterol som har en ekstra hydroksylgruppe. Disse blir i hovedsak dannet på to måter, ved auto-oksidasjon av kolesterol eller ved enzymatiskaktivitet på kolesterol. Enkelte av disse oksygenerte kolesterolderivatene kan gi inhibering av steroidsyntesen, og senkning av HMG-CoA reduktaseaktiviteten. Dette er blant annet vist i cellekulturer med muselever (Kandutsch & Chen 1978). 24-OH kolesterol og 26-OH kolesterol er svært aktive i senkningen av HMG-CoA reduktase. Disse kommer ikke fra auto-oksidering men fra enzymatisk påvirkning på kolesterol. Alkylfenoler som kan gi endret membranfluiditet, vil kunne gi endringer i funksjonene til disse enzymene. Det kan føre til økt nivå av disse, som kan gi senkning i kolesterolsyntesen. 25-OH kolesterol er en av de auto-oksiderte oksysterolene som kan senke HMG-CoA reduktaseaktiviteten (Schroepfer 2000).

Okai et al. (2000) viste at alkylfenoler kan bidra til å danne OH radikaler, disse kan øke oksidasjonen av kolesterol til oksysteroider. Obata og Kubota (2000) fant at nonylfenol stimulerer hydroksylradikaldannelse, men at denne kan hemmes med tilførsel av anti-østrogen, noe som tyder på at dette er en effekt via østrogenreseptorene. Dette kan forklare hvorfor også den positive kontrollgruppen får senkning i kolesterolnivået.

Inkorporering av alkylfenoler i membranen kan gi økt fluiditet, som nevnt i innledningen. Kolesterol har en tilsvarende effekt i membranen. Det er derfor mulig at

økt fluiditet som følge av alkylfenol inkorporering vil føre til nedgang i kolesterolnivå i membranen. I sitt sammendrag om temperaturrelaterte endringer i membranen til fisk antyder Williams og Hazel (1994) andre mekanismer enn endringer i polarlipid som tilpasningsmekanisme. Endring i kolesterolnivå kan være en slik mekanisme. Den fysiske rollen til LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase, et enzym som katalyserer transformasjonen av kolesterol til kolesterolestere) er en regulatormekanisme for kolesterolinnholdet i cellemembranen (Dave et al. 1974). Det er mulig at LCAT er med på å nedregulere kolesterolnivået i membranen når membranen har for stor uorden. Endring i fluiditeten som følge av alkylfenoleksponering kan ikke forklare hvorfor positiv kontrollgruppen har nedgang i kolesterolnivået. En membranrelatert endring i kolesterolnivået ville antagelig vist seg som en doserelatert påvirkning, men endringen i kolesterolnivået er ikke doserelatert. Det er mulig at alkylfenoler gjennom endring i fluiditeten til membranen, kan hemme aktiviteten til enzymer som HMG-CoA. HMG-CoA reductase er et transmembranprotein som inneholder syv membranassosierte deler (Skalnik et al. 1988), noe som kan gjøre dette enzymet svært sårbart for endringer i membranstrukturen.

Steroidproduksjonen reguleres etter hvor i gytesesongen fisken er, og kolesterol er utgangspunktet for steroidsyntesen. En økt steroidsyntese ville kunne gi en senkning i kolesterolnivået. Østrogennivået i plasma til fiskene minsket med alkylfenoleksponering, så det tyder ikke på økt steroidsyntese.

Det er vist at det er sesongvariasjoner i det totale kolesterolinnholdet i plasma hos torsk (Larsson & Fange 1977). For å se om det var sammenheng mellom andre sesongvariasjoner i torsken ble kolesterolnivået i hjernen og østrogennivået i plasma sammenlignet (appendiks B5). Det er liten korrelasjon mellom disse endringene. Sammenligning av endringen i kolesterolnivå i hjerne og endringen i den gonadosomatiske indeksen, viser liten korrelasjon. Både østrogennivå og den gonadosomatisk indeksen endres naturlig i sesongen. Hvis den endringen jeg har sett i kolesterolnivået i hjernen hadde vært en sesongvariasjon er det sannsynlig at det ville være større korrelasjon med en av disse. Dette peker i retning av at endringen i kolesterolnivået ikke kommer som følge av den naturlige endringen i sesongen. Se grafer i appendiks B5.

8.4 Langmuir monolagsstudier

Tilstedeværelse av alkylfenoler førte til økning i det tilsynelatende molekylarealet til polarlipid fra torskehjerne. Dette kan tyde på at alkylfenoler er blitt inkorporert mellom molekylene i monolaget.

Fra konsentrasjonsserien observerte vi at høyere konsentrasjon av alkylfenoler gir økt påvirkning av lipidlaget (Figur 25). Fra de kortkjededede alkylfenolene så vi at det skal forholdsvis store mengder alkylfenol ($>80\mu\text{M}$) til for å gi endring i overflatespenningen. De alkylfenolene med lenger kjeder viste påvirkning av lipidlaget selv i små mengder.

Figur 26, der det var tilsatt $5\mu\text{M}$ av flere ulike alkylfenoler, viser en klart forholdet mellom kjedelengden og endringen i overflatespenningsisotermen for lipidlaget. Dette er som ventet, da det er alkylkjeden som er hydrofob, og en lengre kjede vil bidra til bedre tilpassing i den hydrofobe delen av lipidene. Dette vises også på Figur 27 med 18:0/22:6 PC som lipidlag.

Forsøket med de ulike butylfenolene viser at også plasseringen av kjede og eventuelle forgreninger på denne, gir ulik påvirkning av overflatespenningsisotermen (Figur 28). Meta butylfenolen gir større endring i overflatespenningsisotermen enn orto butylfenolen, begge er tertiære. Dette er ventet da 2-t-butylfenol har den hydrofobe alkylkjeden ved siden av den hydrofile OH gruppen. Dette vil vanskeliggjøre en eventuell inkorporering i lipidlaget. Med butylkjeden i meta stilling sammenlignet vi en sekundær butylfenol og en tertiær butylfenol. Den sekundære butylfenolen viste større endring i overflatespenningsisotermen enn den tertiære. Dette kan komme av at en tertiær butylfenol har en meget kort kjede, og vil derfor ikke kunne penetrere lipidlaget på en god måte.

Resultatet viser at alkylfenoler kan endre overflatespenningsisotermen til et lipidmonolag. Dette kan tyde på at alkylfenoler inkorporeres i membranen, og at økt kjedelengde gir økt inkorporering. Ulik plassering av alkylkjeden vil gi ulik påvirkning av lipidmonolaget, og vårt forsøk viser at para stilling er den som gir størst endring i overflatespenningsisotermen. Dette kan tyde på at en para substituert kjede

inkorporeres best i lipidmonolaget. Vårt resultat viser også at en sekundær alkylkjede gir større endring i overflatespenningsisotermen enn en tertiær alkylkjede.

Resultatene fra Langmuir monolagsstudiene kan ikke overføres direkte til en cellemembran. Monolagsstudiene forteller kun hva som skjer i et fosfolipidmonolag. Cellemembranen består av to monolag og vil påvirkes av interaksjoner mellom monolagene og tilstedeværelsen av proteiner og kolesterol. Monolagsstudiene viser at alkylfenoler kan påvirke fosfolipidmonolag, og da membranen i hovedsak består av fosfolipider kan det trolig forventes noe påvirkning av cellemembranen.

9 Videre arbeid

Det ble ikke observert endringer i fettsyreprofilen i torskehjerne, men undersøkelse av molekylærformforedelingen samt å undersøke om det har vært spesifikk oppregulering nedregulering av spesielle fettsyrepar vil kunne gi svar på om det skjer andre tilpasninger i membranen som følge av alkylfenoleksponering.

Undersøkelse av kolesterolnivå i flere vev vil kunne bekrefte eller avkrefte teorien om omfordeling av kolesterol i torsken. Det vil også være hensiktsmessig med undersøkelse av sesongvariasjoner i kolesterolnivå, samt undersøkelser av hannfisk.

Videre arbeid med kolesterolestere og deres funksjoner i hjernen vil være interessant med hensyn til hvilke konsekvenser endringer i nivået av kolesterolestere har.

Undersøkelser av om kolesterol syntetiserende enzymer aktivitet påvirkes av alkylfenoleksponering vil kunne gi svar på om nedgangen i kolesterolnivå skjer som følge av endringer i aktiviteten til slike enzymer.

Feltarbeid med undersøkelser av fisk fra områder med alkylfenoleksponering for å se om de samme effektene forekommer i det naturlige habitatet, samt vannprøver i områdene vil være interessante. Vannmålinger av alkylfenolinnhold vil kunne gi svar på hvilken eksponering fisk er utsatt for. Prøver tatt av fisk i bur i nærheten av oljeplattformer vil kunne gi svar på om denne eksponeringen gir skadelige effekter.

10 Konklusjon

Eksposering av hunntorsk med mikromolare konsentrasjoner av alkylfenoler påvirker hjernen til torsken. Det ble funnet signifikant ($p < 0,05$) nedgang i kolesterolnivå i hjernen på eksponert fisk. Det var ikke en doserelatert nedgang.

Det ble funnet en økning i fettsyrenivået i polarlipid, men ingen endringer i fettsyreprofilen. I nøytrallipid viste fettsyreprofilen nedgang i de umettede fettsyrene, mens det var noe oppgang i mettede fettsyrer. Nedgangen i umettede fettsyrer kan komme fra nedgang i nivået eller endring i sammensetningen av kolesterolesterne. Endringene i fettsyreprofilen til nøytrallipid var doserelaterte. Det ble ikke funnet endringer i fettsyreprofilen til frie fettsyrer.

Monolagsstudiene tyder på at alkylfenoler øker overflatespenningsisotermen i monolag dannet av fosfolipider fra torskehjerne. Studiene viste at økt kjedelengde fører til økt påvirkning av overflatespenningsisotermen, og at ulike isomerer har ulik evne til å påvirke overflatespenningsisotermen.

11 Referanseliste

- Ackman R.G. 1972.
The analyses of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography.
Progress in the chemistry of fats and other lipids. Vol. 12, p 165-284
- Ackman, R.G., and McLeod, C. 1988.
Totallipids and nutritionally important fatty acid of some Nova Scotia fish and shellfish food products.
Canadian institute of food science and technology journal. Vol. 21, p 390-398
- Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A.P., Haworth, S., Feist, S., and Thain, J.E. 1999.
The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments -further surveys of flounder.
Science of the total environment. Vol. 233, p 5-20
- Andersen, T.C. 2003.
Alkylfenolers innvirkning på glyserofosfolipider og kolesterol i torskelever.
Hovedfagsoppgave. Biokjemisk institutt, Universitetet i Bergen.
- Apon, J.M.B., and Nicholaides, N. 1975.
The determination of the position isomers of the methyl branches fatty acid methyl esters by capillary GC/MS.
Journal of chromatographic science. Vol. 13, p 467-473
- Arduini, A., Peschechera, A., Dottori, S., Sciarroni, A.F., Serafini, F., and Calvani, M. 1996.
High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies.
Journal of lipid research. Vol. 37, p 684-689
- Arukwe, A., Forlin, L., and Goksøyr, A. 1997.
Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol.
Environmental toxicology and chemistry. Vol.16, p 2576-2583
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A., and Cravedi, J-P. 2000.
In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon.
Aquatic toxicology. Vol. 49, p 289-304
- Bell, M.V og Dick J.R 1991.
Molecular species composition of the major diacyl glycerophospholipids from muscle, liver, retina and brain of cod.
Lipids. Vol. 26, p 565-573
- Bell, M.V, and Toucher, D.R. 1989.
Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout.
Journal of biological chemistry. Vol. 264, p 909-915
- Bell, M.V., and Dick, J.R. 1993.
1-O-Alk-1'-enyl-2-acyl-glycerolphosphoethanolamine content and molecular species composition in fish brain.
Lipids. Vol. 28, p 19-22
- Bell, M.V., Henderson ,R.J., and Sargent, J.R. 1986.
The role of polyunsaturated fatty acids in fish.
Comparative biochemistry and physiology. Vol. 83B, p 711-719

- Blodgett, K.B, and Langmuir, I. 1937.
Built up films of barium stearate and their optical properties.
Physical review. Vol. 51, p 964-982
- Bortolomeazzi, R., de Zan, M., Pizzale, L., and Conte, L.S. 2000.
Identification of new steroidal hydrocarbons in refined oils and the role of hydroxyl sterols as possible precursors.
Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 48 p 1101-1105
- Brakstad, F. 1993.
Accurate determination of double-bond position in monounsaturated straight-chain fatty-acid ethyl-esters from conventional electron-impact mass-spectra by quantitative spectrum structure modelling.
Chemometrics and intelligent laboratory systems. Vol. 19, p 87-100
- Brauner, A., and Budzikiewicz, H. 1982.
Studies in chemical ionization mass spectrometry.
Organic mass spectrometry. Vol. 17, p 161-164
- Brosche, T., Platt, D., and Vostrowsky, O. 1985.
Methyl enol ethers as artefacts in capillary gas chromatographic profiles of aldehyde dimethyl acetals.
Journal of chromatography. Vol. 345, p 219-227
- Buda, C., Dey, I., Balogh, N., Horvath, L.I., Maderspach, K., Juhasz, M., Yeo, Y.K, and Farkas, T. 1994.
Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization.
Proceeding of national academy of science (USA) Vol. 91, p 8234-8238
- Cascorbi, I., and Ahlers, J. 1989.
Correlation between the lipophilicity of substituted phenols and their inhibition of the Na⁺/K⁺-ATPase of chinese hamster ovary cells.
Toxicology. Vol. 58, p 197-210
- Courcelles, C. D., Roevens, P., and van Belle, H. 1984. 1
2-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulates inositol lipid phosphorylation in intact human platelets.
FEBS letters. Vol. 173, p 389-393*
- Christiansen K., Mahadevan, V., Viswanathan, C.V., and Holman, R.T. 1968.
Mass spectrometry of long-chain aliphatic aldehydes, dimethyl acetals and alk-1-enyl ethers.
Lipids. Vol. 4, p 420-427
- Christie W.W. 1993a.
Preparation of lipid extracts from tissues.
Advances in lipid methodology two. chapter 6 p 195-213 The Oily Press, Dundee Scotland
- Christie W.W. 1993b.
Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis.
Advances in lipid methodology two, chapter 2 p 69-111. The Oily Press, Dundee Scotland
- Christie, W.W. 1989a.
Gas Chromatographic analysis of fatty acid derivatives.
Gas chromatography and lipids, chapter 5, p 84-127. The Oily Press, Dundee Scotland

- Christie, W.W. 1989b.
Gas-Chromatography-Mass Spectrometry and fatty acids.
Gas chromatography and lipids, chapter 7, p 163-184. The Oily Press, Dundee Scotland
- Christie, W.W. 1989c.
Some Miscellaneous Separations of Lipids by Gas Chromatography.
Gas chromatography and lipids, chapter 10, p 253-379. The Oily Press, Dundee Scotland
- Dave, G., Johansson-Sjøbeck, M-L., Larsson, Å., Lewander, K., and Lidman, U. 1974.
Metabolic and haematological effects of starvation in the European eel.
Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism.
Comparative biochemistry and physiology. Vol. 52A, p 423-430
- Dey, I., Buda, C., Wiik, T., Halver, J.E., and Farkas, T. 1993.
Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature.
Proceeding of national academy of science (USA). Vol. 90, p 7498-7502
- Farkas T., Dey, I., Buda, C., and Halver, J.E. 1994.
Role of phospholipid molecular species in maintaining lipid membrane structure in response to temperature.
Biophysical chemistry. Vol. 50, p 147-155
- Fellenberg A.J., Johnson D.W., Poulos A., and Sharpe, P. 1986.
Simple mass spectrometric differentiation of the n3,n6 and n9 series for methylene interrupted polyenoic acids.
Biomedical and environmental mass spectrometry. Vol. 14, p 127-128
- Folch J., Less M., and Stanley H.S. 1957.
A simple method for the isolation and purification of totallipids from animal tissues.
Journal of biological chemistry. Vol. 226, p 497-509
- Gennis, R.B. 1989
Biomembranes, molecular structure and function.
The structure and properties of membrane lipids, chapter 2.42 p 70-75. Springer-Verlag New York
- Ghioni, C., Tocher, D.R, Bell, M.V., Dick, J.R., and Sargent, J.R. 1999.
Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of steridonic acid, 18:4n3, to 20:5n3 in cell line from turbot.
Biochimica et biophysica acta. Vol. 1473, p 170-181
- Gimeno, S., Komenb, H., Joblingc, S., Sumpterc, J. and Bowmera, T. 1998.
Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis.
Aquatic toxicology. Vol. 43, p 93-109.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Taylot, T., and Zaman, N. 1997.
Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout.
Environmental toxicology chemistry. Vol. 16, p 534-542
- Harris, C.A., Santos, E.M, Janbakhsh, A., Pottinger, T.G., Tyler, R.C., and Sumpter, J.P. 2001.
Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout.
Environmental science and technology. Vol. 35, p 2909 - 2916

- Holmberg, B., Jensen, S., Larsson, Å., Lewander, K., and Olsson, M. 1972.
Metabolic effects of technical pentachlorophenol on the eel.
Comparative biochemistry and physiology. Vol. 43B, p 171-183
- Hughes, P.J., McLellan, H., Lowes, D.A., Khan, S.Z., Bilmen, J.G., Tovey, S.C.,
Godfrey, R.E., Michell, R.H., Kirk, C.J., and Michelangeli, F. 2000.
Estrogenic alkyl phenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum
Ca²⁺ pumps.
Biochemical and biophysical research communications. Vol. 277, p 568-574.
- Jobling, S.B., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., and Sumpter, J.P. 1998.
Widespread sexual disruption in wild fish.
Environmental science and technology. Vol. 32, p 2498-2506
- Jørgensen K., Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G., Bennett, D., and Zuckermann, M.J. 1991.
A general model for the interaction of foreign molecules with lipid membranes:
drugs and anaesthetics.
Biochimica et biophysica acta. Vol. 1062, p 227-238
- Kaluzny M.A., Ducan L.A., Merritt M.V., and Epps D.E. 1985.
Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.
Journal of lipid research. Vol. 26, p 135-144
- Kandutsch, A.A., and Chen, H.W. 1978.
Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols.
Lipids. Vol. 13, p 704-707
- KSV minitrough, Instruction Manual (2001).
KSV instruments LTD.
Helsinki, Finland.
- Larsson, Å., and Fange, R. 1977.
Cholesterol and free fatty acids in the blood of marine fish.
Comparative biochemistry and physiology. Vol. 57B p 191-196
- Lee, R.F. 1975.
Lipids of Arctic zooplankton.
Comparative biochemistry and physiology. Vol. 51B, p 263-266
- Lee, A.G. 1977.
Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids.
Biochimica et biophysica acta. Vol.472 p 285-344
- Lie Ø., and Lambertsen G. 1991.
Fatty acid composition of glycerophospholipids in seven tissues of cod,
determined by combined high-performance liquid chromatography and gas chromatography.
Journal of chromatography. Vol. 565 p 119-129
- Lie, Ø., Lied, E., and Lambertsen, G. 1989.
Haematological values and fatty acid composition of erythrocyte phospholipids in cod fed
at different water temperatures.
Aquaculture. Vol. 79, p 137-144
- Livingstone, D.R. 2001.
Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in
aquatic organisms.
Marine pollution bulletin. Vol. 42, p 656-666

- Mathews, C.K., van Holde, K.E., and Ahern, K.G. 2000.
Biochemistry, 3rd edition Chapter 18 and 19, p 627-706
- Meier, S. 1997.
Variationer i fedtsyresammensætningen hos sild.
Hovedfagsoppgave, Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen.
- Meier, S., Andersen, T.E., Hasselberg, L., Kjesbu, O.S., Klungsoyr, J., and Svardal, A. 2002.
Hormonal effects of C4-C7 alkylphenols on cod.
www.imr.no
- Meier, S. 2002
Ikke publisert, personlig samtale med Meier januar 2003
- Meier, S., og Mjøs, S.A. 2003
Ikke publisert, personlig samtale med Meier mars 2003
- Miwa, T.K., Mikolajczak, K.I., Fontaine, R.E., and Wolf, I.A. 1960.
Gas chromatographic characterization of fatty acids, identification constants for mono and dicarboxylic methyl esters.
Analytical chemistry. Vol. 32, p 1739-1742
- Mjøs, S.A, and Pettersen, J. 2003.
Determination of trans double bonds in polyunsaturated fatty acid methyl esters from their electron impact mass spectra.
European journal of lipid science and technology. Vol. 105, p 1-9
- Mueller, G.C., and Kim U.H. 1978.
Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols.
Endocrinology. Vol. 102, p 1429-1435
- Myher J.J., Marai I., and Kuksis A. 1974.
Identification of fatty acids by GC-MS using polar siloxane liquid phases.
Analytical biochemistry. Vol. 62, p 188-203
- Nakagawa, Y., and Waku, K. 1986.
Improved procedure for the separation of the molecular species of dimethylphosphatidate by high-performance liquid chromatography.
Journal of chromatography. Vol. 381, p 225-231*
- Nimrod, A.C., and Benson, W.H. 1996.
Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates.
Critical reviews in toxicology. Vol. 26, p 335-364
- Obata, T., and Kubota, S. 2000.
Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum.
Neuroscience letters. Vol. 296, p 41-44
- Odham G., and Stenhagen E. 1972.
Fatty Acids.
Biochemical applications of mass spectrometry (Red G.R., Wallace Wiley New York)
kap 8, p 211-228
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, k., Nakamura, H., Nakayama, K., Fijita, K., Tanaka, T., and Taniguchi, M. 2000.
Protective effects of a-tocopherol and b-carotene on para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth, cellular respiration and glucose-induced proton extrusion of bacteria.
FEMS microbiology letters. Vol. 187, p 161-165

- Owen J.M., Adron J.W., Middleton C., and Cowey C.B. 1975.
Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot and rainbow trout.
Lipids. Vol. 10, p 528-531
- Philipp, B. W., and Shapiro, D. J. 1981.
Estrogen regulation of HMG CoA and Acetyl-CoA carboxylase in *xenopus laevis*.
Journal of biological chemistry. Vol. 256, p 2922-2927
- Roitelman, J., Bar-Nun, S., Inoue, S., and Simoni, R.D. 1991.
Involvement of calcium in the mevalonate-accelerated degradation of
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.
Journal of biological chemistry. Vol. 266, p 16985-16091
- Routledge, E.J and Sumpter J,P. 1997.
Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity.
Journal of biological chemistry. Vol. 272, p 3280-3288.
- Ruehlmann, D., Sterinert, J.R., Valverde, M.A., Jacob, R., and Mann, G.E. 1998.
Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting
L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells.
The FASEB Journal. Vol. 12, p 613-619
- Rye, H., Reed, M., Slagstad, D., Melbye, A., and Johnson, S. 1996.
Modelling transport and dilution of produced water and the resulting uptake and
biomagnification in marine biota.
Journal of society of petroleum engineers SPE. Vol. 35911, p 231-246
- Ryhage R., and Stenhagen E. 1959.
Variation in the fatty acid composition of pacific herring oil in Alaska during 1964 and 1965.
Research chemists. Vol. 63, p 143-150
- Røe, T.I. 1998.
Produced water discharges to the North Sea -A study of bioavailability of organic produced
water compounds to marine organisms.
Dr. scient.thesis. Norwegian University of Science and Technology.
Faculty of Chemistry and Biology. Trondheim ,Norway
- Sastry. P.J 1985.
Lipids of nervous tissue: composition and metabolism.
Progress in lipid research. Vol. 24, p 69-176
- Schroepfer ,G.J. 2000.
Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes.
Physiological reviews Vol. 80, p 361-554
- Servos, M.R. 1999.
Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols
and alkylphenol polyethoxylates.
Water quality research journal of Canada. Vol. 34, p 123-177
- Sikkerma, J., de Bont, J., and Poolman, B. 1995.
Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons.
Microbiological reviews. 1995, p 201-222
- Sikkerma, J., Weber, F.J., Heipieper, H.J., and de Bont, J. 1994.
Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations.
Biocatalysis. Vol. 11, p 113-122

- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. 1972.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science. Vol. 175, p 720-731
- Skalnik, D.G., Narita, H., Kent, C., and Simoin, R.D. 1988.
The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto b-galactosidase.
The journal of biological chemistry. Vol. 263, p 6836-6841
- Soto, A.M, Justicia, H., Wray, J.W., and Sonnenschein, C. 1991.
p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene.
Environmental health perspective. Vol. 92, p 167-173
- Statens forurensningstilsyn, SFT 2000.
Utslipp på norsk kontinentalsokkel 1999.
<http://www.sft.no/publikasjoner/vann/1762/ta1762.htm>
- Stubbs, C.D and Smith, A.D. 1984.
The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.
Biochimica et biophysica acta. Vol. 779, p 89-137
- Sumpter, J. and Jobling, S. 1995.
Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of aquatic environment.
Environmental health perspective. Vol. 103, p 173-178
- Tocher, D.R., and Ghioni, C. 1999.
Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl d5 desaturase in gilthead sea bream cells.
Lipids. Vol. 34 no 5, p 433-440
- Tocher, D.R., and Harvie, D.G. 1988
Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) Polyunsaturated fatty acids in rainbow trout and cod brains and retinas.
Fish physiology and biochemistry. Vol. 5, p 229-239
- Tocher, D.R., and Sargent, J.R. 1990.
Incorporation into phospholipid classes and metabolism via desaturation and elongation of various ¹⁴C-labelled (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in trout astrocytes in primary culture.
Journal of neurochemistry. Vol. 54 no 6 1990, p 2118-2124
- Tollefsen, K.E., Ingebrigtsen, K., Olsen, A.J., Zachariassen, K.E., and Johnsen, S. 1998.
Acute toxicity and toxicokinetics of 4-heptylphenol in juvenile Atlantic cod.
Environmental toxicology and chemistry. Vol. 17, p 740-746
- Toomey, B.H., Monteverdi, G.H. and Giulio, R. 1999.
Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes.
Environmental toxicology and chemistry. Vol. 18 4, p 734-739.
- Touchstone J.C., Levin, S.S., Dobbins, M.F., and Beers, P.C. 1983.
Analysis of saturated and unsaturated phospholipids in biological fluids.
Journal of liquid chromatography. Vol. 6(1), p 179-192
- Tyler, C.R. and Routledge, E.J. 1998.
Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation.
Pure and applied chemistry. Vol. 70, p 1795-1804

- Tyler, C.R., Jobling, S., and Sumpter, J.P. 1998.
Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence.
Critical review in toxicology. Vol. 28(4), p 319-361
- van Aerle R, Nolan TM, Jobling S, Christiansen LB, Sumpter JP, and Tyler CR. 2001.
Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish in United Kingdom freshwaters.
Environmental toxicology chemistry. Vol. 20, p 2841-2847
- Vance, D.E., and Vance, J. 1996.
Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.
3rd edition Chapter 4-6 and 8, p 101-180 and p 211-235
- Volin, P. 2001.
Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography.
Journal of chromatography A. Vol. 935, p 125-140
- Wezel, A.P. and Opperhuizen, A, 1995.
Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms.
Critical reviews in toxicology. Vol. 25, p 255-279
- Williams, E.E., and Hazel, J.R 1994.
Thermal adaptation in fish membranes: temporal resolution of adaptive mechanisms.
Temperature adaptation of biological membranes chapter 7, p 91-106
- Woodford F. P., and van Gent C. M. 1960.
Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters: the "carbon-number" as a
parameter for comparison of columns.
Journal of lipid research. Vol. 1, p 188-190

Referansene i kursiv er referanser til litteratur brukt i appendiks A.

12 Appendiks

A	Identifisering av topper i revers fase HPLC	side 77
B1	Lipidinnhold	side 84
B2	Lipidklassefordelingen	side 85
B3	Fettsyrenivå NL som mg fettsyre per 100 mg våtvekt	side 86
B4	Sammenligning TL, PL fra hanntorsk	side 87
B5	Sammenligning kolesterolnivå og sesongvariasjoner	side 88
C1	Fettsyreprofil, TL (C1i), NL (C1ii), FA (C1iii)	side 89
C2	Profilen til steroider	side 93
C3	Profilen til dimetylacetaler	side 94
D	MS kromatogram	side 95
E1	Normalisert data TL	ikke vist
E2	Normalisert data NL	ikke vist
E3	Normalisert data FA	ikke vist

13 Identifisering av topper i revers fase HPLC

I oppgaven min ønsket jeg å undersøke om det var skjedd endringer i sammensetningen av fettsyrer i PE og PC. For separering av fettsyreparene skulle jeg bruke en reversfase HPLC med acetonitril:isopropanol:metanol:vann som drivvæske. Da jeg ønsket å se på forskjellen i PE og PC måtte lipidene separeres i de ulike lipidklassene, og jeg brukte HPLC til dette. Da PE og PC er ca 80% av mitt materiale, valgte jeg å bare se på disse to. Etter separasjonen benyttet jeg PLD (fosfolipiase D) til å fjerne hodegruppen til lipidet og diazometan til å metylere halen. Det var et nytt reversfase HPLC system, så toppene måtte identifiseres før videre arbeid kunne utføres. Jeg samlet opp toppene og kjørte dette på GC og GC-MS for identifikasjon.

13.1 Kjemikalier

Alle kjemikalier ble levert av Merck dersom annet ikke er angitt. Etanol og Isopropanol ble levert av Arcus.

Alle kjemikalier var av kvaliteten "pro analysis" dersom annet ikke er angitt.

13.2 Utstyr

Sentrifuge KUBOTA KS-8000 (rotor: radius 12 cm)

Heraeus Christ Minifuge GL (rotor: radius 12 cm)

FARMASIA LKB HPLC, vwm 2141

Transsonic 310 sonikeringsbad, 50-60 Hz

Mikser Vortex

13.3 HPLC

Oppløsningen av separasjonen på kolonner øker med økt kolonnелengde og med økt antall fastfasepartikler per enhetlengde. Kromatografi som har kolonner med veldig små partikler, trenger et høyt trykk for å få mobilfasen igjennom. Det er dette som kalles høytrykkskromatografi ("high performance liquid chromatography", HPLC). Det

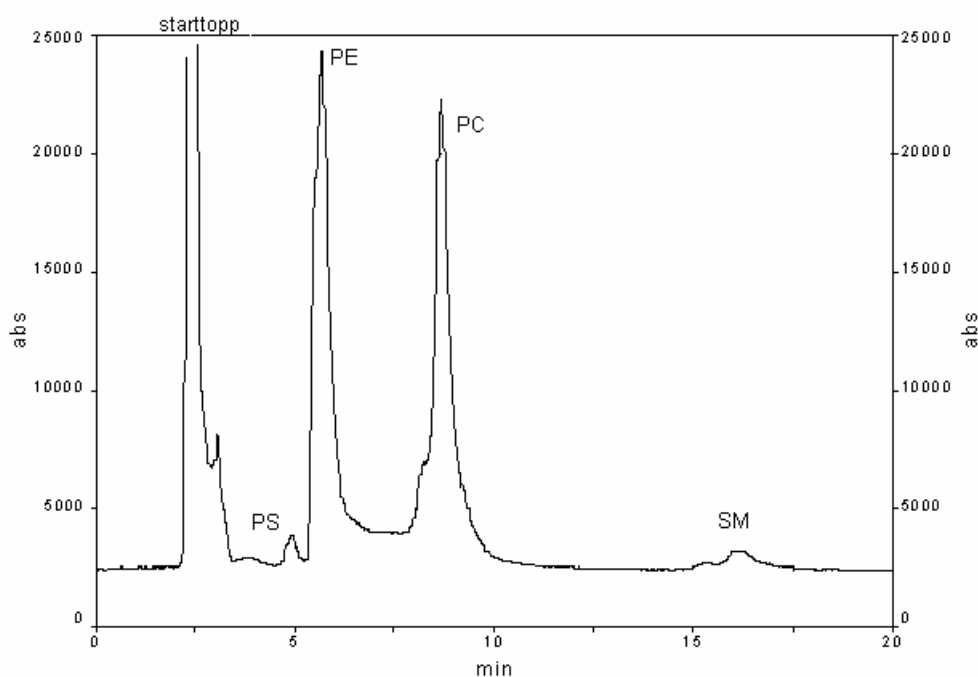
finnes i hovedsak to typer HPLC; normalfase og reversfase. I normalfase er stasjonærfasen polar og mobilfasen upolar, mens det er omvendt i reversfase. Normalfase vil eluere de mest polare lipidene først, mens i reversfase vil de upolare lipidene elueres først.

13.4 Kiselsyre HPLC

Arduini et al. kom i 1996 med en metode for å separere de ulike fosfolipid klassene ved bruk av en isokratisk HPLC metode, med kort resolusjonstid, og god separasjon. Det brukes en kiselsyre kolonne og en UV detektor. Metoden gir UV profilen til de store fosfolipid klassene. Lipidklassene elueres i denne rekkefølgen PI, PS, PE og PC (Arduini et al. 1996).

13.4.1 Eksperimentelt

Kolonne: NUCLEOSIL 100-7 (porestørrelse 100, partikkelstørrelse 7 mikron) (250x4)mm . Drivvæsken som ble brukt var acetonitril:hexan:metanol:H₃PO₄ (konsentrert) (920:30:30:8). Polariteten til drivvæsken ble justert med mengde H₃PO₄ når separasjonen på kolonnen ikke var god. Det ble injiserte 10 µl lipid løst i CHCl₃:CH₃OH (2:1), og kjørt med flow 1,25 ml/min. og kolonnetemperatur 28 °C. Det ble brukt en UV detektor ved 206 nm. Et eksempel på et kromatogram kan sees i Figur 29.



Figur 29. Kromatogram fra kiselsyre HPLC med bruk av UV detektor ved 206 nm. Den første toppen er starttoppen, og i den vil også fosfatidylinositol komme. Fosfatidylserin (PS), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylcholin (PC) og sfingomylin (SM).

13.5 Tynnsjiktskromatografi

Tynnsjiktskromatografi (TLC) blir utført på en stasjonærfase. En passende flat overflate som settes ca 2 cm ned i væskefasen. Kapillærkreftene vil så drive væskefasen opp tynnsjiktsplaten.

13.5.1 Eksperimentelt

Det ble brukt TLC aluminiumsark (20x20 cm) med silicagel 60 fra Merck.

Lipidene ble løst i ca 30 ml CHCl_3 og applisert på platen med en Hamilton-pipette i 2 cm avstand fra bunnen på platen.

Som drivvæske ble det brukt en metylaminløsning, som bestod av CHCl_3 :MeOH:Metylamin:H₂O i forholdet 60:36:5:5. Platen ble stående i drivvæsken til væskefronten var ca 2 cm fra toppen av platen, etter ca 1,5-2 timer (Courcelles et al.

1984). Deretter ble platen hensatt for å tørke, før den ble holdt i et jod-kammer ($I_{2(s)}$) for fremkalling.

Identifisering av flekkene ble gjort ved å kjøre standardlipider og finne R_f (retardasjonsfaktor) verdiene for disse og sammenligne med R_f verdiene for mine lipider.

13.5.2 Forkulling:

(Touchstone et al. 1983)

Etter at platene var tatt ut av drivvæsken (som over) ble de tørket i luften og ved 180 °C i 2 min. for å fjerne alle løsninger. Platen ble så dyppet i $CuSO_4(aq)$ og løftetørket.

Deretter ble platen satt i ovnen ved 180°C i ca 10 min.. Karbonet i lipidene ble da forkullet, og tettheten til det forkullede karbonet målt med et densitometer.

13.6 Fjerning av fosfat

I drivvæsken vi brukte for å skille PC og PE, var det fosforsyre, og den ønsket vi ikke å ha med videre. Det var to ulike metoder for fjerning av fosfat: Fjerning av fosfat med $CaAc_2$ (benytter at fosfat og kalsium er tungt løselig) og med kloroform/vann ekstraksjon (benytter at organisk materiale vil gå i kloroformfasen og ikke organisk materiale, som fosfat, vil gå i vannfasen). Jeg testet disse ved å applisere de på en tynnsjiktplate, og forkulle denne. På kiselsyre HPLCen hadde jeg injisert 10 μ l polarlipidløsning (10 mg/ml) og samlet opp PE og PC toppene. Jeg fjernet fosfatet i fraksjonene på tre ulike måter: Ekstraksjon med kloroform/vann, felling med ekvivalent mengde $CaAc_2$ og PO_4^- og ved overskudd av $CaAc_2$. Etter fjerning av fosfat dampet jeg inn og løste i 30 μ l kloroform. For å kunne sammenligne, appliserte jeg disse på en tynnsjiktplate sammen med 10 μ l polarlipid og forkullet platen. Ved sammenligning av tettheten til de forkullede flekkene mot tettheten til flekken fra 10 μ l polarlipid, konkluderte jeg med at ekstraksjon med kloroform og vann var beste metode. Ekstraksjon med kloroform og vann gav betraktelig bedre utbytte av lipidet enn felling med fosfat.

13.6.1 Eksperimentelt

13.6.1.1 *Fjerning av fosfat med kloroform/vann fase*

Etter oppsamling ble prøvene ekstrahert, først med 3 ml CHCl_3 og 3 ml H_2O og etterfulgt av sentrifugering (2500 rpm, isotoprom, romtemperatur, 8 minn). Nederste fase ble tatt vare på, mens øverste fase ble tilsatt 2 ml CHCl_3 og sentrifugert (2500 rpm, romtemperatur, 5 min.). Nederste fase fra den siste ekstraksjonen ble slått sammen med den nederste fasen fra første ekstraksjon og dampet inn til tørrhet under argonatmosfære. Til slutt ble de løst i et kjent volum CHCl_3 :metanol (2:1) og oppbevart på -20°C .

13.6.1.2 *Fjerning av fosfat med CaAc_2*

Jeg måtte gange opp oppskriften etter mengde fraksjon fra kiselsyre HPLC. Jeg tok 500 μl oppsamlet fraksjon og overførte det til spissrør. Tilsatte deretter 300 μl $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1) og blandet på automatiskmikser. Tilsatte 90 μl (for 8 ml H_3PO_4) 1M CaAc_2 og blandet på automatisk mikser før sentrifuge ved 2500 rpm i 8 min. Overførte deretter suspensjonen til glassrør. Bunnfallet ble tilsatt 500 μl H_2O som måtte røre med glasstav for å få løsnet bunnfall og 600 μl CHCl_3 . Blandet deretter i $\frac{1}{2}$ min før sentrifugering ved 2500 rpm i 5 min. Jeg fjernet vannlaget og overførte den organiske fasen (kloroform) med hamilton-pipette til glassrøret.

13.7 PLD-behandling av lipid

I reversfase HPLC benyttet jeg PA, og måtte derfor transformere PC og PE til PA. PLD benyttes for å kutte hodegruppene på lipidet. Deretter esterifiseres fettsyrene i PA med diazometan.

13.7.1 Eksperimentelt

13.7.1.1 *PLD-behandling av lipid*

(Christie 1993b)

Til glassrør med tørt lipid ble det tilsatt 1 ml dietyleter, 0,25 ml 100 mM CaCl₂, 0,25 ml 100 mM Hepes buffer pH 7 og 20 µl PLD (streptomyces, Sigma). Deretter rørt i 15 minutter i romtemperatur, med magnetrører. For å stoppe reaksjonen tilsatte jeg 0,8 ml 100 mM EDTA, 0,2 ml 1N HCl, og 2 ml dietyleter. Dette ble blandet på automatiskmikser og sentrifugeres ved 1000 rpm i 3 minutter.

Eterfasen (øverste fase) ble overført til ett nytt glass og dampet inn. Jeg tilsatte ca 2 dråper eter og 1-2 dråper diazometan (til gul farge) for å esterifisere. Lot det stå i noen minutter før jeg dampet ned. Prøvene ble løst i kloroform og holdt under argonatmosfære ved -18°C til injisering i HPLC.

Før injisering i HPLC ble stoffene løst i drivvæske og rørt i ultralydbad for å få en homogen løsning, og deretter overført til HPLC rør.

13.8 Reversfase HPLC

Jeg brukte en Shimadzu reversfase HPLC, med UV detektor ved 206 nm, og Evaporative Light Scattering Detector (Alltech ELSD 2000). Kolonnen var en Beckman Ultrasphere C-18 5µm 4,6x25mm, kolonnetemperatur 28°C. Drivvæsken var acetonitril:isopropanol:metanol:vann (1250:675:450:193), etter en modifisert metode av Nakagawa og Waku (1986). Den PLD behandlede prøven ble løst i drivvæske og injisert. Jeg brukte en blandingsprøve for identifikasjon av flest mulig topper. Først ble det kjørt en fraksjon for å få et bilde av toppene. Deretter en fraksjon til fra samme prøve, der jeg samlet opp toppene etter UV detektoren. Alle fraksjonene ble analysert på GC, for å kunne identifisere dem.

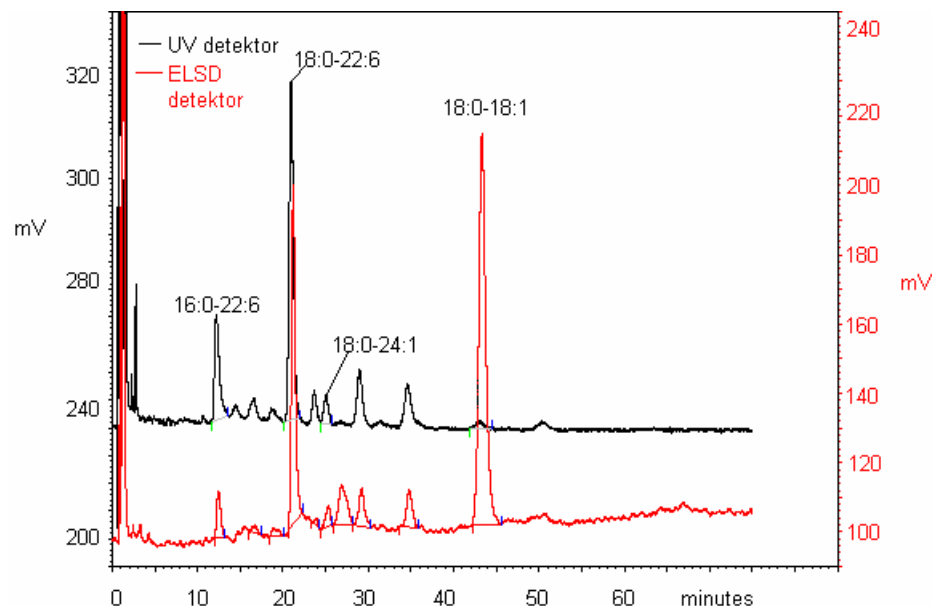
13.9 Resultat

Resultatet fra GC analysen viste ikke entydig resultat med to fettsyrer for hver topp. Blank prøven viste også store mengder 18:0 og 16:0 som muligens kom fra vaskemiddelet. Ved å sammenligne resultat fra GC og standard kjøring ble de fleste store topper identifisert i samarbeid med Aleksander Stæffler.

Starttoppen var noe stor, og hadde dermed en del store topper integrert.

Tidsmessige forhold gjorde at det ikke ble jobbet videre for å få bedre separasjon.

Resultatet av identifiseringen blir brukt for analyse av prøver som ikke kommer fra marine organismer. Problemet i forhold til mine prøver var at i fisk er det forholdsvis stor andel av lange, flerumettede fettsyrer som ble eluert i starttoppen. Jeg valgte derfor ikke å bruke reversfase HPLC for å identifisere fettsyreporene mine.



Figur 30. Kromatogram fra reversfase HPLC av fosfatidylserin fra grisehjerne. Det ble brukt to detektorer, UV-206 nm og ELSD.

kontroll	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml	Tabellen viser vekten til de ulike fiskene (g), vekten til hjernen (g), innholdet i hjernen (%) og konsentrasjonen av lipidekstraktet (mg/ml)
58FE	0,59	592	8,89	8,14	
12BA	0,49	607	8,56	9,41	
6F62	0,47	639	8,00	8,37	
Ø7AA	0,58	711	9,99	8,96	
ØAB8	0,48	752	9,74	7,73	
1D34	0,60	675	9,62	8,81	
Ø55C	0,60	750	9,27	8,55	
Ø1CC	0,66	784	10,02	8,26	
1B33	0,51	851	9,97	7,87	
A652	0,49	515	8,93	7,90	

Snitt 9,30
SD 0,69

pos kontroll	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml
D81Ø	0,52	469	9,57	8,26
ØE7E	0,60	619	8,91	8,22
Ø9EA	0,50	644	9,79	8,14
Ø598	0,53	669	9,41	8,29
ØCED	0,55	662	9,24	7,84
2ØED	0,54	662	8,16	8,04
ØBC9	0,51	618	9,56	8,11
4C31	0,49	691	10,01	8,16
28FF	0,44	706	9,13	8,09

Snitt 9,31
SD 0,54

0,02ppm	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml
1717	0,58	690	9,67	7,98
4ECØ	0,49	731	10,37	7,85
69Ø7	0,53	700	9,20	8,09
Ø14F	0,58	779	9,69	8,01
ØBCE	0,59	780	10,88	8,03

Snitt 9,96
SD 0,66

2ppm	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml
5Ø99	0,54	493	9,67	8,06
D982	0,49	504	9,42	8,32
ØDA5	0,50	603	9,27	8,42
B14Ø	0,53	637	9,80	7,99
AFAD	0,51	633	8,68	8,07
Ø85A	0,56	741	9,32	7,99
674E	0,51	740	9,73	7,64
ØCC2	0,62	979	10,48	8,07
D85E	0,52	751	8,42	7,91
4C35	0,48	515	8,80	7,65

Snitt 9,36
SD 0,61

40ppm	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml
ØØ7A	0,58	544	8,91	7,97
ØAC7	0,65	599	9,30	8,11
A634	0,45	483	9,56	7,90
2177	0,55	641	9,80	8,27
Ø31B	0,49	649	8,89	7,93
DBE4	0,62	709	8,96	7,93
ØE7Ø	0,69	714	9,29	7,99
A6B3	0,64	720	9,33	7,90

Snitt 9,26
SD 0,32

80ppm	vekt hjerne (g)	vekt torsk (g)	lipid%	kons mg/ml
D8CF	0,60	682	9,54	8,13
27A5	0,49	706	8,34	7,44
4CF3	0,48	689	9,81	7,77
NO MARK	0,55	718	9,12	8,31
1Ø32	0,57	742	9,79	7,91
1ØCB	0,60	769	9,00	8,28
11C3	0,55	828	10,43	8,23

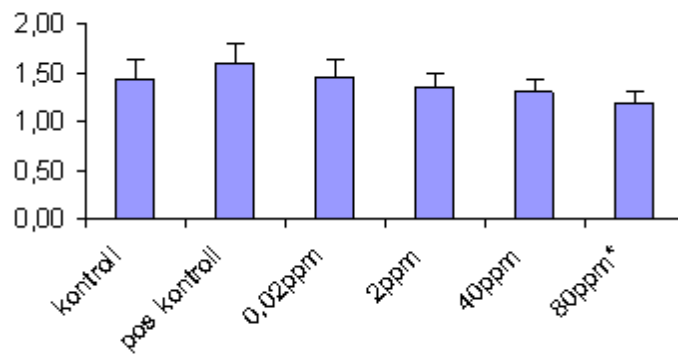
Snitt 9,43
SD 0,68

Tabellen viser den prosentmessige endringen i lipidklasseforedeling regnet fra fettsyrer og sterodier. Verdiene er snittverdiene for gruppene +/- standardavviket. De røde verdiene er signifikante endringer ($p < 0,05$)

	PL	NL	FA
kontroll	62,79 ± 1,64	35,76 ± 1,75	1,46 ± 0,17
pos kontroll	65,43 ± 1,39	33,27 ± 1,40	1,30 ± 0,28
0,02ppm	65,67 ± 0,74	33,15 ± 0,72	1,18 ± 0,18
2ppm	66,35 ± 0,70	32,21 ± 0,83	1,44 ± 0,26
40ppm	68,06 ± 1,19	30,80 ± 1,34	1,13 ± 0,25
80ppm	68,47 ± 1,46	30,46 ± 1,31	1,07 ± 0,23

Tabellen viser den prosentmessige endringen i fettsyrefordelingen mellom de ulike lipidklassene.

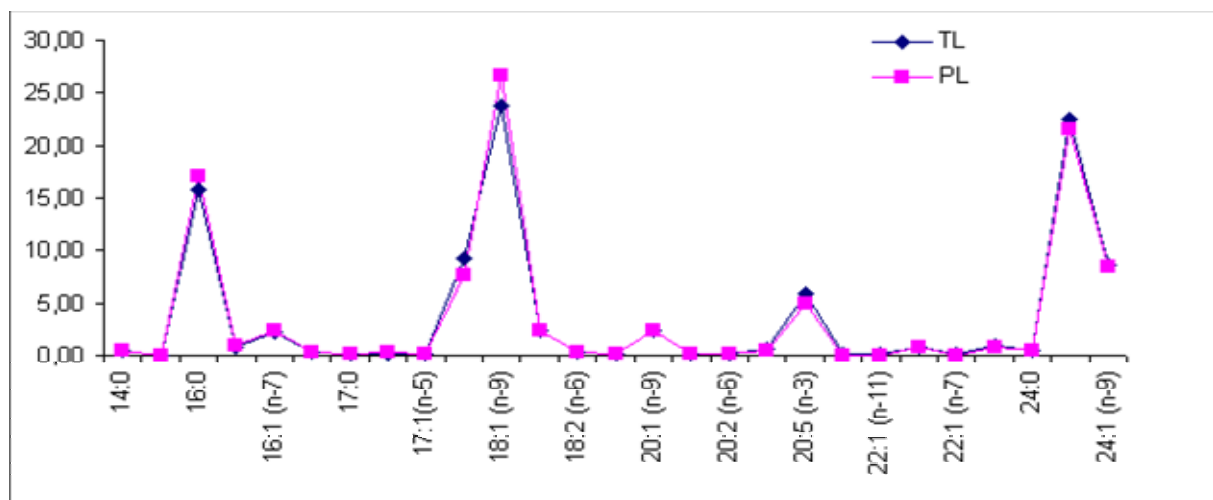
	PL	NL	FA
kontroll	96,56 ± 0,44	2,63 ± 0,21	0,81 ± 0,43
pos kontroll	96,80 ± 0,67	2,75 ± 0,44	0,45 ± 0,52
0,02ppm	97,10 ± 0,56	2,41 ± 0,20	0,49 ± 0,39
2ppm	96,88 ± 0,42	2,23 ± 0,19	0,89 ± 0,44
40ppm	97,56 ± 0,26	1,96 ± 0,36	0,48 ± 0,39
80ppm	97,63 ± 0,62	1,89 ± 0,36	0,47 ± 0,36



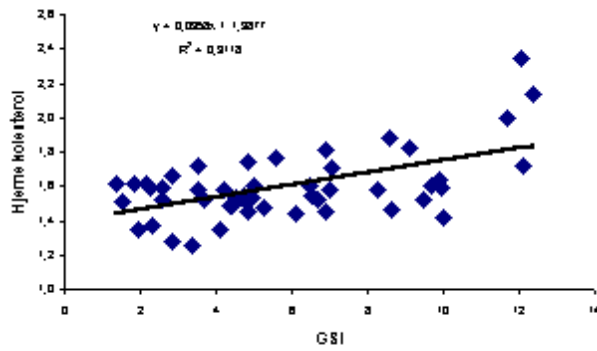
Figuren viser endringen i fettsyrenivået i nøytrallipid regnet som mg fettsyre per 100 mg våtvekt
Grafen viser snittverdier for gruppene med standardavvik som feilgrense
For 80 ppm er endringen signifikant ($p < 0,05$)

Sammenligning av total lipid og polar lipid fra hanntorskjerne

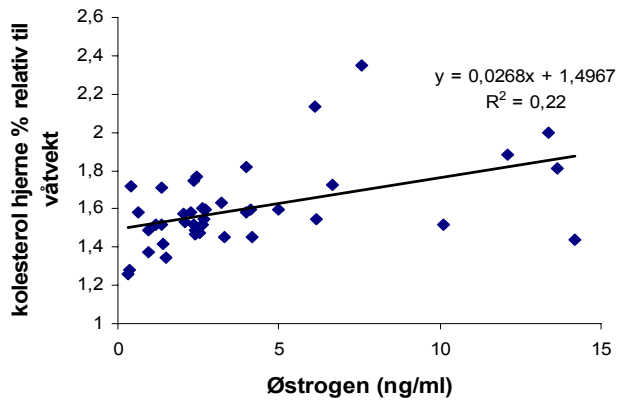
	Total lipid	Polar lipid		Total lipid	
14:0	0,47± 0,05	0,54± 0,06	18:3 (n-3)	0,00±	0,00
ISO 15:0	0,00± 0,00	0,00± 0,00	20:3 (n-3)	0,00±	0,00
15:0	0,06± 0,01	0,06± 0,01	20:4 (n-3)	0,00±	0,00
Iso 16:0	0,00± 0,00	0,00± 0,00	20:5 (n-3)	5,94±	0,24
16:0	15,78± 1,16	17,07± 0,69	22:2(n-3)	0,00±	0,00
17:0	0,12± 0,01	0,11± 0,01	22:6 (n-3)	22,53±	0,80
18:0	9,33± 0,49	7,64± 0,42	22:5 (n-3)	0,94±	0,05
20:0	0,16± 0,01	0,12± 0,05	24:2(n-3)?	0,00±	0,00
22:0	0,16± 0,07	0,05± 0,07	n3	29,59±	0,77
23:0	0,00± 0,00	0,00± 0,00	18:2 (n-6)	0,30±	0,01
24:0	0,47± 0,07	0,49± 0,08	20:2 (n-6)	0,17±	0,01
sum mettede	26,36± 1,37	26,08± 0,52	22:2(n-6)	0,10±	0,16
14:1 (n-5)	0,16± 0,01	0,22± 0,03	20:4 (n-6)	0,63±	0,02
16:1 (n-5)	0,00± 0,00	0,00± 0,00	n6	1,23±	0,17
16:1 (n-7)	2,31± 0,19	2,41± 0,24	sum polyumettet	30,82±	0,83
16:1(n-9)+18:1AME	0,81± 0,03	0,96± 0,05			
17:1(n-7)	0,00± 0,00	0,05± 0,13			
iso 17:0&17:1	0,10± 0,06	0,10± 0,09			
17:1(n-9)	0,19± 0,15	0,28± 0,11			
17:1(n-7)	0,31± 0,03	0,31± 0,03			
17:1(n-5)	0,15± 0,02	0,19± 0,04			
17:1&iso 18:0	0,10± 0,02	0,10± 0,06			
18:1 (n-9)	23,80± 0,55	26,68± 0,69			
18:1 (n-7)	2,44± 0,10	2,44± 0,10			
18:1 (n-5)	0,06± 0,00	0,05± 0,03			
20:1 (n-11)	0,06± 0,05	0,08± 0,05			
20:1 (n-9)	2,46± 0,15	2,35± 0,16			
20:1 (n-7)	0,14± 0,02	0,13± 0,02			
22:1 (n-11)	0,08± 0,07	0,03± 0,06			
22:1 (n-9)	0,85± 0,07	0,82± 0,07			
22:1 (n-7)	0,18± 0,08	0,05± 0,07			
24:1 (n-9)	8,63± 0,62	8,44± 0,57			
summonoumettet	42,82± 0,97	45,54± 0,91			



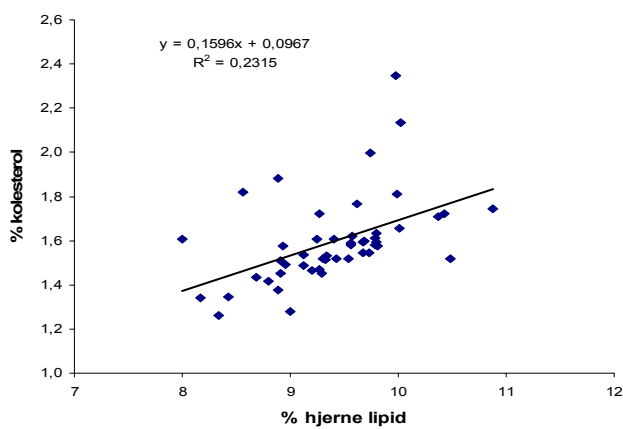
Sammenligning av polarlipid (PL) og totallipid (TL) for kontrollgruppen av hannfiskjerne
Data er snittverdier av de normaliserte verdiene til de ulike fettsyrene



Kolesterolnivå i torskkehjerne (regnet som mg per 10000 mg våtvekt) plottet mot gonadosomatisk indeksen til torskene



Kolesterolnivå i torskkehjerne (regnet som mg per 10000 mg våtvekt) plottet mot østrogennivå i torskeplasma



Kolesterolnivå i torskkehjerne (regnet som mg per 10000 mg våtvekt) plottet mot lipidinnholdet i torskkehjerne

Fettsyreprofilen i totallipid fra torskehjerne

Tabellen viser snitt og standardavvik. De røde verdiene er signifikante endringer ($p < 0,05$).

	kontroll	pos. Kontroll	0,02 ppm	2 ppm	40 ppm	80 ppm
	10 hunntorsk	9 hunntorsk	5 hunntorsk	10 hunntorsk	8 hunntorsk	7 hunntorsk
14:0	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,03
ISO 15:0	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02
15:0	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,03
16:0	15,03 ± 0,48	15,29 ± 0,55	15,37 ± 0,49	15,42 ± 0,68	15,24 ± 0,30	15,42 ± 0,76
17:0	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
18:0	8,45 ± 0,24	8,43 ± 0,29	8,34 ± 0,26	8,59 ± 0,25	8,34 ± 0,29	8,65 ± 0,20
20:0	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02
22:0	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,02
24:0	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
sum mettede	24,60 ± 0,51	24,92 ± 0,64	24,86 ± 0,32	25,14 ± 0,44	24,67 ± 0,29	25,17 ± 0,81
16:1 (n-5)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
16:1 (n-7)	2,25 ± 0,13	2,43 ± 0,24	2,41 ± 0,23	2,38 ± 0,15	2,38 ± 0,16	2,39 ± 0,24
16:1(n-9)+18:1AM	0,73 ± 0,04	0,80 ± 0,06	0,84 ± 0,04	0,78 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,77 ± 0,04
17:1(n-7)	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,03
iso 17:0&17:1	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,02
17:1(n-9)	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,03
17:1(n-7)	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,03
17:1(n-5)	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02
17:1&iso 18:0	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01
18:1 (n-9)	23,90 ± 0,86	23,96 ± 0,87	24,69 ± 0,64	23,99 ± 0,67	24,08 ± 0,88	23,90 ± 1,22
18:1 (n-7)	2,51 ± 0,11	2,58 ± 0,12	2,64 ± 0,17	2,53 ± 0,11	2,65 ± 0,09	2,60 ± 0,09
18:1 (n-5)	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00
20:1 (n-11)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,04
20:1 (n-9)	2,59 ± 0,28	2,57 ± 0,20	2,72 ± 0,46	2,54 ± 0,24	2,79 ± 0,20	2,44 ± 0,29
20:1 (n-7)	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02
22:1 (n-11)	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,06	0,08 ± 0,06
22:1 (n-9)	0,88 ± 0,11	0,84 ± 0,08	0,89 ± 0,15	0,81 ± 0,08	0,90 ± 0,08	0,86 ± 0,11
22:1 (n-7)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02
24:1 (n-9)	9,30 ± 0,46	8,75 ± 0,56	8,93 ± 0,49	8,68 ± 0,53	8,77 ± 0,36	8,82 ± 0,70
sum monoumett	44,12 ± 1,53	43,84 ± 1,91	45,00 ± 1,28	43,60 ± 1,32	44,33 ± 1,07	43,60 ± 2,55
20:4 (n-3)	0,14 ± 0,06	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02
20:5 (n-3)	6,16 ± 0,24	6,53 ± 0,20	6,22 ± 0,14	6,22 ± 0,33	6,29 ± 0,30	6,30 ± 0,25
22:2(n-3)	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00
22:6 (n-3)	22,82 ± 1,23	22,33 ± 1,40	21,64 ± 0,95	22,80 ± 1,19	22,23 ± 0,73	22,65 ± 1,80
22:5 (n-3)	0,97 ± 0,06	1,04 ± 0,07	0,93 ± 0,05	0,97 ± 0,06	1,00 ± 0,06	0,97 ± 0,10
n3	30,11 ± 1,08	30,05 ± 1,28	28,95 ± 0,95	30,12 ± 0,98	29,70 ± 0,83	30,05 ± 1,76
18:2 (n-6)	0,30 ± 0,06	0,38 ± 0,06	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,38 ± 0,02
20:2 (n-6)	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02
22:2(n-6)	0,09 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,04
20:4 (n-6)	0,61 ± 0,01	0,62 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,61 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,61 ± 0,02
n6	1,16 ± 0,08	1,19 ± 0,05	1,18 ± 0,04	1,14 ± 0,05	1,30 ± 0,07	1,18 ± 0,05
sum polyumettet	31,27 ± 1,04	31,24 ± 1,28	30,13 ± 0,97	31,26 ± 0,96	31,00 ± 0,84	31,23 ± 1,76

Fettsyreprofilen i nøytrallipid fra torskehjerne

Tabellen viser snitt og standardavvik. De røde verdiene er signifikante endringer ($p < 0,05$).

	kontroll 10 hunntorsk	pos. Kontroll 9 hunntorsk	0,02 ppm 5 hunntorsk	2 ppm 10 hunntorsk	40 ppm 8 hunntorsk	80 ppm 7 hunntorsk
14:0	1,14 ± 0,13	1,37 ± 0,17	1,36 ± 0,11	1,44 ± 0,17	1,79 ± 0,20	1,69 ± 0,17
ISO 15:0	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,08
15:0	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,05
Iso 16:0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,04
16:0	20,25 ± 2,22	21,27 ± 2,68	23,20 ± 1,04	24,87 ± 1,47	28,11 ± 3,11	28,23 ± 4,29
17:0	1,53 ± 0,14	1,50 ± 0,17	1,74 ± 0,10	1,76 ± 0,12	1,89 ± 0,17	1,98 ± 0,20
18:0	10,96 ± 0,53	11,20 ± 1,35	11,65 ± 0,73	12,92 ± 0,82	12,95 ± 1,64	14,46 ± 1,85
20:0	0,62 ± 0,03	0,59 ± 0,07	0,68 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,74 ± 0,07	0,81 ± 0,07
22:0	0,49 ± 0,04	0,44 ± 0,07	0,50 ± 0,08	0,52 ± 0,06	0,66 ± 0,12	0,83 ± 0,17
23:0	0,61 ± 0,29	0,75 ± 0,28	0,84 ± 0,14	1,02 ± 0,15	1,23 ± 0,11	0,88 ± 0,34
24:0	2,92 ± 0,99	2,24 ± 0,13	2,75 ± 0,33	2,32 ± 0,24	1,73 ± 0,31	1,81 ± 0,32
sum mettete	38,99 ± 2,07	39,85 ± 4,85	43,19 ± 1,53	46,13 ± 2,05	49,74 ± 4,71	49,77 ± 6,60
14:1 (n-5)	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,10	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,08	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,02
16:1 (n-5)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16:1 (n-7)	2,87 ± 0,30	3,08 ± 0,33	2,97 ± 0,11	2,68 ± 0,21	2,47 ± 0,29	2,36 ± 0,28
16:1(n-9)+18:1AM	0,37 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,02
17:1(n-7)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,05
iso 17:0&17:1	0,05 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,04
17:1(n-9)	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,05
17:1(n-7)	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
17:1(n-5)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
17:1&iso 18:0	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03
18:1 (n-9)	11,31 ± 0,92	11,83 ± 1,15	10,84 ± 0,58	10,40 ± 0,57	9,31 ± 1,06	8,97 ± 1,06
18:1 (n-7)	1,94 ± 0,15	2,16 ± 0,20	1,93 ± 0,11	1,75 ± 0,11	1,62 ± 0,18	1,52 ± 0,19
18:1 (n-5)	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,04	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:1 (n-11)	0,12 ± 0,08	0,17 ± 0,07	0,11 ± 0,11	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,10	0,04 ± 0,09
20:1 (n-9)	3,16 ± 0,37	3,24 ± 0,42	3,16 ± 0,42	2,84 ± 0,17	2,63 ± 0,34	2,37 ± 0,38
20:1 (n-7)	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,04
22:1 (n-11)	0,36 ± 0,08	0,49 ± 0,11	0,40 ± 0,12	0,41 ± 0,08	0,57 ± 0,13	0,48 ± 0,19
22:1 (n-9)	0,90 ± 0,08	0,88 ± 0,12	0,87 ± 0,10	0,79 ± 0,09	0,73 ± 0,11	0,65 ± 0,34
22:1 (n-7)	0,56 ± 0,22	0,62 ± 0,06	0,27 ± 0,24	0,31 ± 0,17	0,25 ± 0,14	0,33 ± 0,14
24:1 (n-9)	11,16 ± 1,08	9,92 ± 1,13	10,19 ± 1,34	9,95 ± 1,13	9,07 ± 1,69	11,32 ± 1,55
sum monoumett	33,06 ± 2,10	33,16 ± 3,03	31,60 ± 1,30	30,05 ± 1,99	27,47 ± 3,26	28,90 ± 3,20
18:3 (n-3)	0,12 ± 0,07	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,07	0,16 ± 0,10	0,14 ± 0,11	0,12 ± 0,18
20:3 (n-3)	0,53 ± 0,20	0,43 ± 0,05	0,58 ± 0,07	0,44 ± 0,17	0,04 ± 0,07	0,00 ± 0,00
20:4 (n-3)	0,02 ± 0,05	0,10 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,03	0,01 ± 0,04	0,02 ± 0,04
20:5 (n-3)	5,61 ± 0,55	6,73 ± 1,27	5,15 ± 0,57	4,68 ± 0,42	4,05 ± 0,66	3,73 ± 1,07
22:2(n-3)	0,18 ± 0,24	0,15 ± 0,23	0,13 ± 0,25	0,08 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:6 (n-3)	10,50 ± 1,47	11,06 ± 1,60	9,17 ± 0,84	9,52 ± 1,12	8,14 ± 1,22	7,44 ± 2,48
22:5 (n-3)	0,36 ± 0,25	0,42 ± 0,18	0,55 ± 0,38	0,44 ± 0,17	0,36 ± 0,05	0,30 ± 0,08
24:2(n-3)?	1,16 ± 0,21	0,92 ± 0,04	1,08 ± 0,13	0,48 ± 0,36	0,08 ± 0,09	0,00 ± 0,00
n3	18,48 ± 1,94	19,96 ± 2,89	16,76 ± 0,68	15,80 ± 1,27	12,82 ± 1,98	12,26 ± 3,41
18:2 (n-6)	0,66 ± 0,11	0,93 ± 0,14	0,73 ± 0,18	0,69 ± 0,08	0,87 ± 0,12	0,65 ± 0,14
20:2 (n-6)	0,23 ± 0,10	0,25 ± 0,15	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,13 ± 0,11
22:2(n-6)	0,20 ± 0,15	0,05 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,15	0,42 ± 0,08	0,12 ± 0,18
20:4 (n-6)	0,80 ± 0,08	0,89 ± 0,14	0,80 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,59 ± 0,09	0,60 ± 0,14
n6	1,89 ± 0,21	2,11 ± 0,36	1,73 ± 0,20	1,68 ± 0,18	2,10 ± 0,15	1,50 ± 0,25
24 pufa?	7,58 ± 1,51	4,92 ± 1,16	6,71 ± 1,41	6,34 ± 1,46	7,87 ± 0,51	7,08 ± 1,29
sum polyumettet	27,95 ± 2,76	27,00 ± 2,61	25,21 ± 0,89	23,82 ± 2,01	22,79 ± 1,86	21,32 ± 4,14

Fettsyreprofilen i frie fettsyrer fra torskehjerne

Tabellen vise snitt og standardavvik.

	kontroll	pos. Kontroll	0,02 ppm	2 ppm	40 ppm	80 ppm
	8 hunntorsk	4 hunntorsk	4 hunntorsk	9 hunntorsk	6 hunntorsk	6 hunntorsk
14:0	1,20 ± 0,20	1,27 ± 0,23	1,58 ± 0,46	1,15 ± 0,29	1,40 ± 0,32	1,40 ± 0,31
ISO 15:0	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,02
15:0	0,26 ± 0,06	0,26 ± 0,05	0,32 ± 0,08	0,27 ± 0,09	0,33 ± 0,08	0,35 ± 0,08
Iso 16:0	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,09	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01
16:0	26,38 ± 4,06	28,63 ± 7,54	31,58 ± 7,17	27,41 ± 5,80	30,31 ± 6,21	31,39 ± 9,74
17:0	0,45 ± 0,07	0,50 ± 0,16	0,57 ± 0,08	0,47 ± 0,12	0,60 ± 0,09	0,61 ± 0,13
18:0	21,11 ± 3,47	22,25 ± 6,65	22,48 ± 2,21	19,71 ± 3,76	24,11 ± 2,57	26,71 ± 4,77
20:0	0,23 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,27 ± 0,05
22:0	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,20	0,31 ± 0,11	0,21 ± 0,08	0,39 ± 0,12	0,38 ± 0,10
23:0	0,63 ± 0,40	0,82 ± 0,75	1,32 ± 0,97	0,71 ± 0,55	1,08 ± 0,66	0,37 ± 0,65
24:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,92 ± 4,98	8,53 ± 5,18
sum mettete	50,58 ± 8,16	54,32 ± 15,53	58,71 ± 11,08	50,31 ± 10,40	62,61 ± 11,47	70,21 ± 10,09
14:1 (n-5)	0,11 ± 0,21	0,04 ± 0,07	0,05 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,07
16:1 (n-5)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16:1 (n-7)	1,89 ± 0,38	1,78 ± 0,84	1,69 ± 0,39	1,85 ± 0,43	1,45 ± 0,46	0,76 ± 0,91
16:1(n-9)+18:1AM	0,35 ± 0,04	0,31 ± 0,13	0,24 ± 0,17	0,33 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,51 ± 0,80
17:1(n-7)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
iso 17:0&17:1	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02
17:1(n-9)	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,08	0,04 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,01 ± 0,03
17:1(n-7)	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
17:1(n-5)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
17:1&iso 18:0	0,17 ± 0,21	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,17	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:1 (n-9)	9,47 ± 1,68	8,75 ± 4,25	7,62 ± 3,03	9,41 ± 2,39	7,50 ± 2,59	6,39 ± 3,59
18:1 (n-7)	1,70 ± 0,36	1,60 ± 0,76	1,36 ± 0,64	1,79 ± 0,48	1,45 ± 0,56	1,28 ± 0,75
18:1 (n-5)	0,06 ± 0,07	0,07 ± 0,08	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,03 ± 0,03
20:1 (n-11)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:1 (n-9)	1,72 ± 0,34	1,55 ± 0,75	1,62 ± 0,59	1,74 ± 0,49	1,37 ± 0,49	1,17 ± 0,71
20:1 (n-7)	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,00
22:1 (n-11)	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,14	0,09 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,30
22:1 (n-9)	0,36 ± 0,11	0,22 ± 0,26	0,30 ± 0,36	0,36 ± 0,21	0,31 ± 0,27	0,10 ± 0,25
22:1 (n-7)	0,04 ± 0,11	0,01 ± 0,03	0,03 ± 0,06	0,06 ± 0,09	0,06 ± 0,10	0,09 ± 0,09
24:1 (n-9)	5,56 ± 1,84	4,24 ± 1,43	5,99 ± 2,06	5,78 ± 2,41	6,53 ± 1,85	5,74 ± 3,45
sum monoumett	21,75 ± 4,03	18,89 ± 8,30	19,36 ± 6,32	21,85 ± 6,10	18,97 ± 6,11	16,55 ± 9,56
18:3 (n-3)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:3 (n-3)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:4 (n-3)	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:5 (n-3)	6,78 ± 2,30	6,53 ± 3,52	4,74 ± 3,44	7,47 ± 2,49	5,20 ± 2,56	5,36 ± 3,35
22:2(n-3)	0,86 ± 0,26	0,66 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,13
22:6 (n-3)	12,53 ± 4,14	11,97 ± 6,79	8,24 ± 5,67	13,63 ± 4,70	5,13 ± 6,23	0,00 ± 0,00
22:5 (n-3)	1,71 ± 0,41	1,32 ± 0,93	0,40 ± 0,29	0,55 ± 0,26	0,21 ± 0,23	0,10 ± 0,21
24:2(n-3)?	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,86 ± 1,03	0,13 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
n3	21,88 ± 6,28	20,50 ± 11,21	14,25 ± 8,20	21,82 ± 7,16	10,54 ± 8,18	5,51 ± 3,51
18:2 (n-6)	0,38 ± 0,07	0,30 ± 0,21	0,22 ± 0,25	0,39 ± 0,15	0,32 ± 0,17	0,31 ± 0,17
20:2 (n-6)	0,03 ± 0,06	0,07 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:2(n-6)	0,35 ± 0,22	0,48 ± 0,46	0,60 ± 0,34	0,42 ± 0,25	0,66 ± 0,25	0,63 ± 0,32
20:4 (n-6)	1,13 ± 0,30	1,04 ± 0,36	0,82 ± 0,50	1,22 ± 0,35	0,94 ± 0,37	0,97 ± 0,55
n6	1,89 ± 0,20	1,89 ± 0,19	1,64 ± 0,41	2,17 ± 0,26	1,93 ± 0,30	1,91 ± 0,43
24 pufa?	3,91 ± 2,16	4,41 ± 3,98	6,04 ± 3,72	3,86 ± 2,87	5,96 ± 3,01	5,81 ± 3,38
sum polyumettet	27,68 ± 4,33	26,80 ± 7,45	21,93 ± 4,93	27,84 ± 4,58	18,42 ± 6,11	13,24 ± 9,56

Det prosentmessige innholdet av steroider i forhold til total mengde fettsyrer i totallipid og nøytrallipid
 Tabellen viser snitt og standardavvik. De røde verdiene er signifikante endringer ($p < 0,05$).

Steroidinnholdet i totallipid i torskhejerne

	kontroll 10 hunntorsk	pos. Kontroll 9 hunntorsk	0,02 ppm 5 hunntorsk	2 ppm 10 hunntorsk	40 ppm 8 hunntorsk	80 ppm 7 hunntorsk
cholesta-diene	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
cholesta-diene	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
sterol ?	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00
sterol ?	0,17 ± 0,24	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,05
sterol ?	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00
cholesta-diene	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
cholesta-diene	0,39 ± 0,09	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,02
cholesta-diene	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01
cholesta-diene	0,46 ± 0,08	0,46 ± 0,05	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02
cholesta-diene	0,25 ± 0,02	0,12 ± 0,11	0,18 ± 0,10	0,07 ± 0,11	0,15 ± 0,09	0,11 ± 0,11
cholesta-diene	0,13 ± 0,11	0,06 ± 0,10	0,04 ± 0,08	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,07	0,00 ± 0,00
cholesta-diene	3,44 ± 0,21	3,12 ± 0,19	3,30 ± 0,04	2,96 ± 0,47	3,16 ± 0,05	3,11 ± 0,15
cholesta-diene	9,39 ± 0,57	8,42 ± 0,42	8,79 ± 0,16	8,47 ± 0,13	8,50 ± 0,14	8,38 ± 0,30
kolesterol metyle	0,11 ± 0,13	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,06 ± 0,11
cholesta-triene?	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
klorert kolesterol	3,37 ± 0,29	2,73 ± 0,18	2,97 ± 0,09	2,66 ± 0,13	2,75 ± 0,08	2,72 ± 0,16
sterol ?	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
sterol m 2 d.b.?	0,94 ± 0,21	0,75 ± 0,13	0,71 ± 0,12	0,81 ± 0,05	0,78 ± 0,06	0,82 ± 0,06
sterol ?	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kolesterol	15,08 ± 1,25	11,13 ± 0,32	10,62 ± 0,36	10,73 ± 0,30	10,66 ± 0,69	10,65 ± 0,62
sum kolesterol	34,06 2,34	27,54 0,64	27,83 0,64	26,90 0,67	27,17 0,81	26,93 1,30

Steroidinnholdet i nøytrallipid i torskhejerne

cholesta-diene	2,09 ± 0,95	1,69 ± 0,17	2,28 ± 0,35	2,19 ± 0,16	1,73 ± 0,26	1,83 ± 0,35
cholesta-diene	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
sterol ?	0,04 ± 0,11	0,15 ± 0,20	0,36 ± 0,21	0,18 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,24
sterol ?	0,35 ± 0,13	0,20 ± 0,10	0,28 ± 0,02	0,37 ± 0,07	0,54 ± 0,10	0,30 ± 0,07
sterol ?	1,29 ± 0,51	1,51 ± 1,32	1,85 ± 0,32	3,03 ± 0,79	5,04 ± 1,77	5,46 ± 2,27
cholesta-diene	0,61 ± 0,22	0,67 ± 0,19	1,15 ± 0,14	0,93 ± 0,15	0,73 ± 0,10	0,84 ± 0,13
cholesta-diene	4,27 ± 0,79	2,87 ± 0,49	2,78 ± 0,42	2,51 ± 0,42	2,19 ± 0,54	1,89 ± 0,45
cholesta-diene	6,73 ± 1,49	5,74 ± 1,16	6,89 ± 0,46	7,02 ± 0,46	7,03 ± 1,25	8,28 ± 1,19
cholesta-diene	15,23 ± 3,56	11,80 ± 0,48	13,46 ± 1,41	11,86 ± 0,87	9,62 ± 1,40	10,72 ± 1,26
cholesta-diene	6,94 ± 0,94	6,37 ± 1,14	8,19 ± 0,65	9,15 ± 1,53	9,76 ± 1,73	9,51 ± 2,19
cholesta-diene	5,47 ± 1,29	4,27 ± 0,44	4,23 ± 0,46	3,67 ± 0,46	3,01 ± 0,52	3,30 ± 0,37
cholesta-diene	103,25 ± 14,43	81,44 ± 2,92	91,47 ± 9,44	85,78 ± 5,44	75,12 ± 7,06	76,84 ± 8,53
cholesta-diene	274,33 ± 37,13	215,89 ± 8,04	239,17 ± 23,52	224,96 ± 15,17	196,89 ± 19,12	201,03 ± 23,21
kolesterol metyle	9,77 ± 1,44	8,76 ± 4,86	10,99 ± 2,25	13,38 ± 1,73	17,26 ± 3,26	20,11 ± 5,17
cholesta-triene?	18,53 ± 4,98	13,69 ± 10,18	21,04 ± 3,61	27,67 ± 4,17	38,10 ± 10,08	42,69 ± 12,14
klorert kolesterol	106,53 ± 19,07	74,96 ± 3,32	89,73 ± 13,78	83,39 ± 7,03	73,92 ± 6,76	70,97 ± 11,26
sterol ?	26,36 ± 7,44	18,49 ± 14,11	28,78 ± 5,03	38,56 ± 6,12	53,60 ± 14,67	59,20 ± 17,23
sterol m 2 d.b.?	46,89 ± 5,62	34,43 ± 2,30	37,01 ± 3,07	36,87 ± 2,36	32,28 ± 2,71	32,98 ± 3,49
sterol ?	16,67 ± 6,19	11,62 ± 10,81	18,52 ± 3,97	25,73 ± 4,36	36,71 ± 10,93	42,06 ± 13,65
Kolesterol	533,85 ± 86,96	398,16 ± 24,09	404,54 ± 35,27	389,65 ± 28,49	349,05 ± 26,30	360,49 ± 37,45
sum kolesterol	1179,21 141,10	892,70 48,89	982,74 88,85	966,91 59,73	912,58 50,09	986,34 73,06

Tabellen vise snitt og standardavvik. De røde verdiene er signifikante endringer ($p < 0,05$).

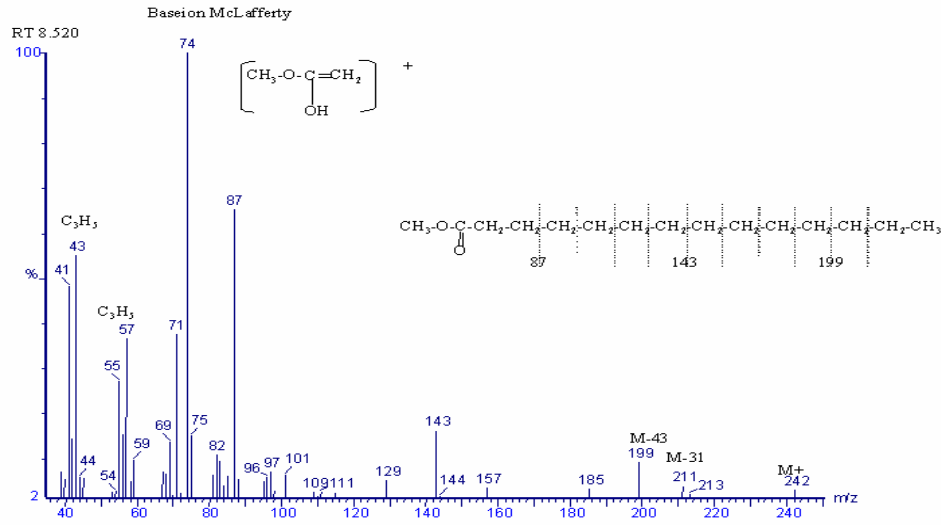
Profilen til dimetylacetal i totallipid

TL	kontoll	pos. Kontroll	0,02 ppm	2 ppm □	40 ppm	80 ppm
	10 hunntorsk	9 hunntorsk	5 hunntorsk	10 hunntorsk	8 hunntorsk	7 hunntorsk
16:0 AME	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16:0 DMA	1,00±0,04	0,99±0,05	1,02±0,08	1,02±0,09	1,00 ± 0,08	1,02 ± 0,08
18:0 AME	0,30±0,04	0,37±0,04	0,39±0,04	0,34±0,03	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,05
18:0 DMA	1,68±0,17	1,57±0,16	1,58±0,09	1,60±0,11	1,63 ± 0,14	1,56 ± 0,19
18:0 AME	0,22±0,03	0,25±0,04	0,28±0,04	0,25±0,02	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,03
18:1 DMA	2,09±0,15	1,90±0,13	2,01±0,04	1,99±0,09	2,02 ± 0,19	2,03 ± 0,15
18:1 DMA	1,10±0,09	1,02±0,07	1,06±0,05	1,04±0,07	1,08 ± 0,05	1,05 ± 0,10
18:1 AME	0,48±0,05	0,61±0,07	0,67±0,06	0,58±0,04	0,53 ± 0,05	0,56 ± 0,05
18:0 AME	0,34±0,04	0,40±0,04	0,45±0,04	0,39±0,03	0,34 ± 0,04	0,36 ± 0,04
sum dimetylacetal	7,21±0,44	7,10±0,34	7,46±0,26	7,23±0,28	7,12 ± 0,45	7,10 ± 0,45

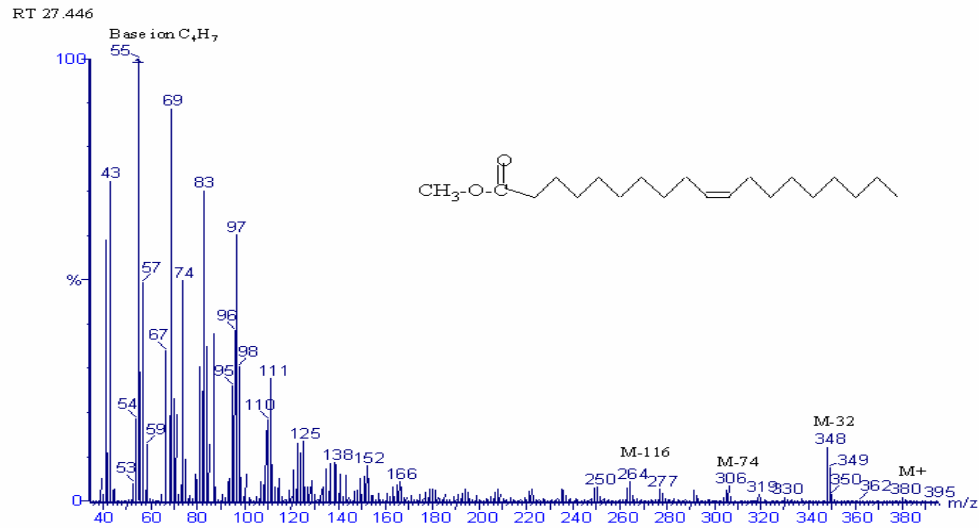
DiMetylAcetal (DMA)

Metylalk-1-1enyl eter (AME)

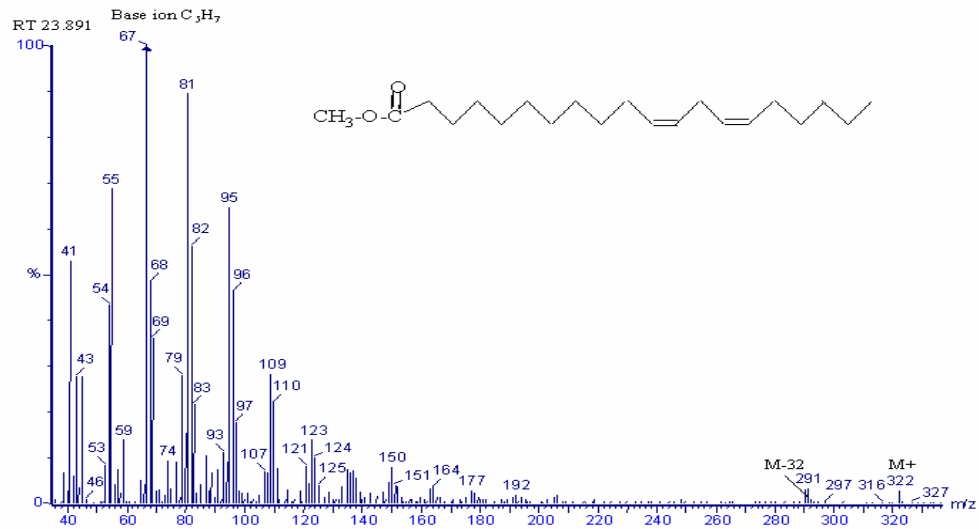
14:0



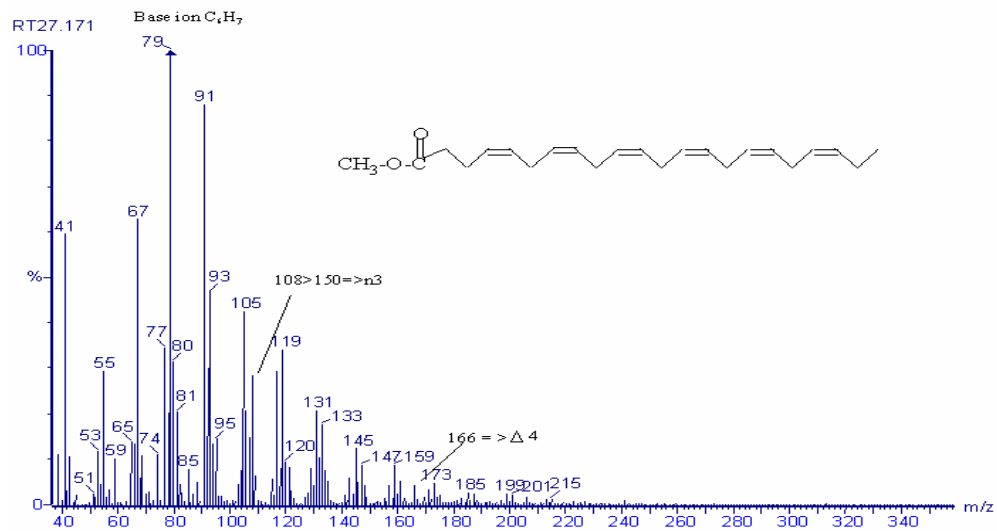
24:1n9



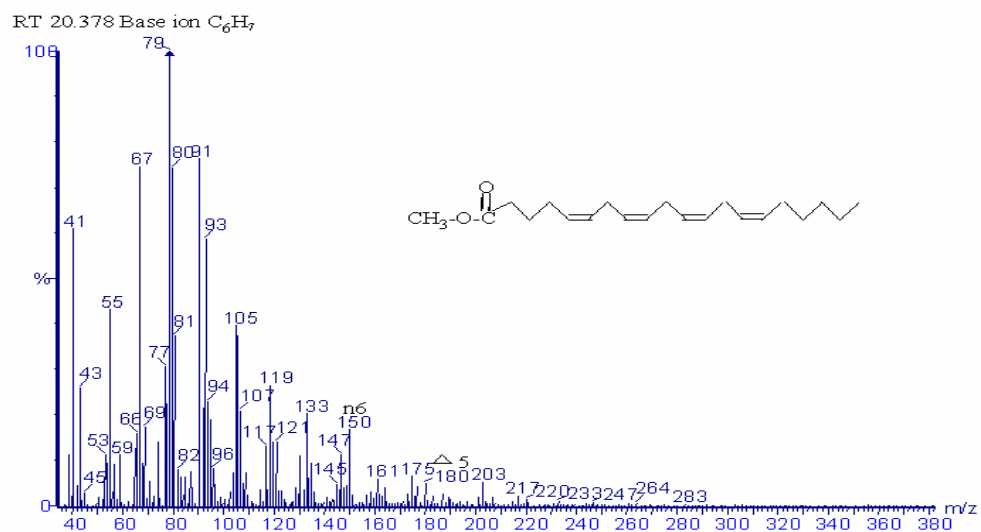
20:2n6



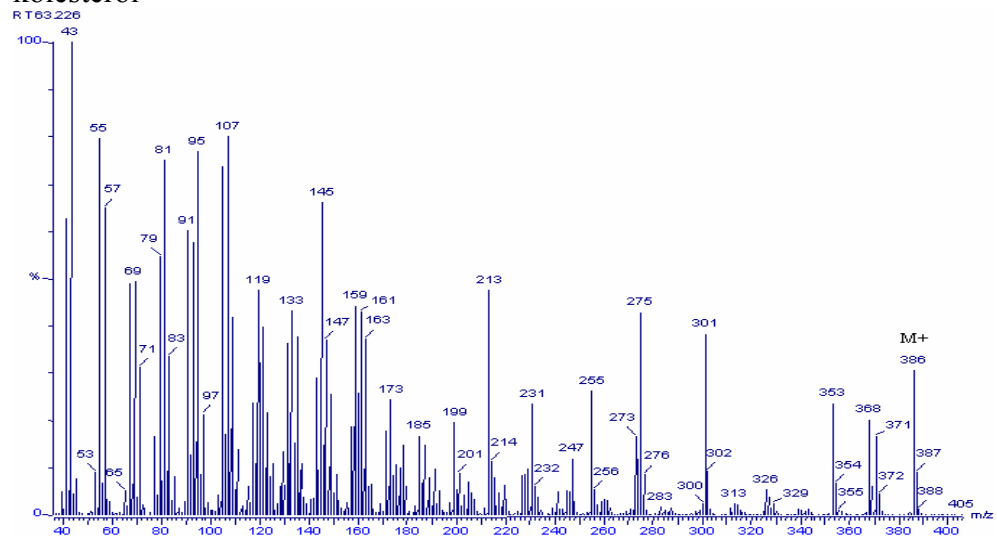
22:6n3



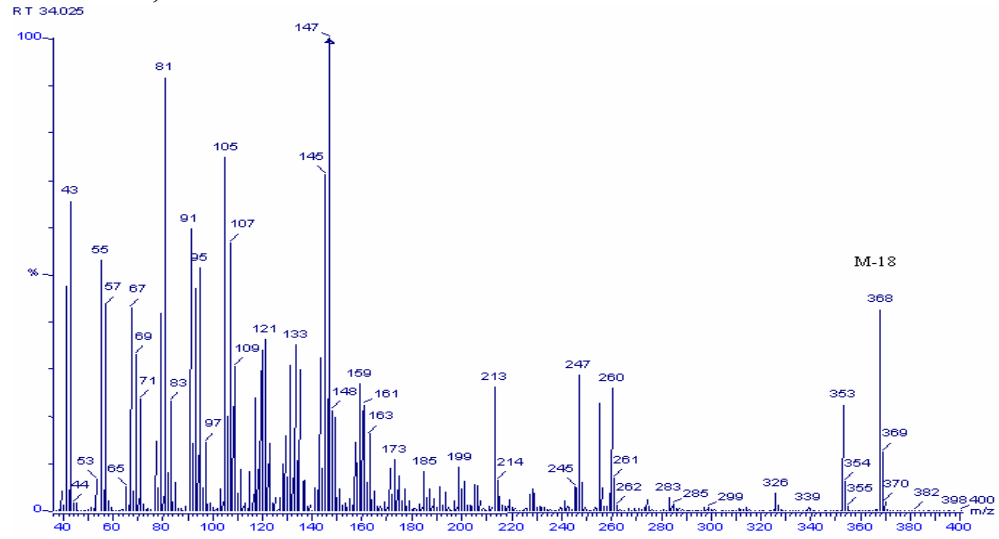
20:4n6



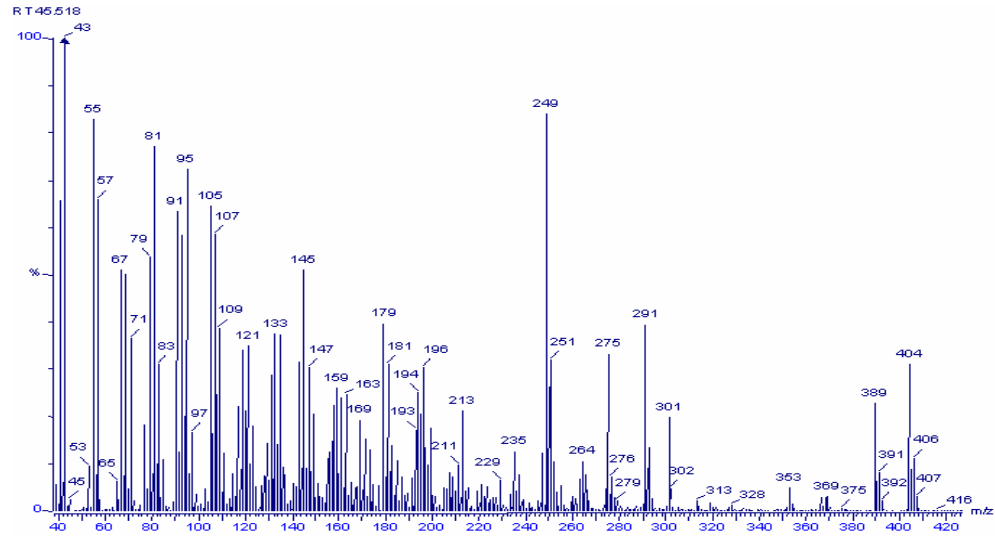
kolesterol



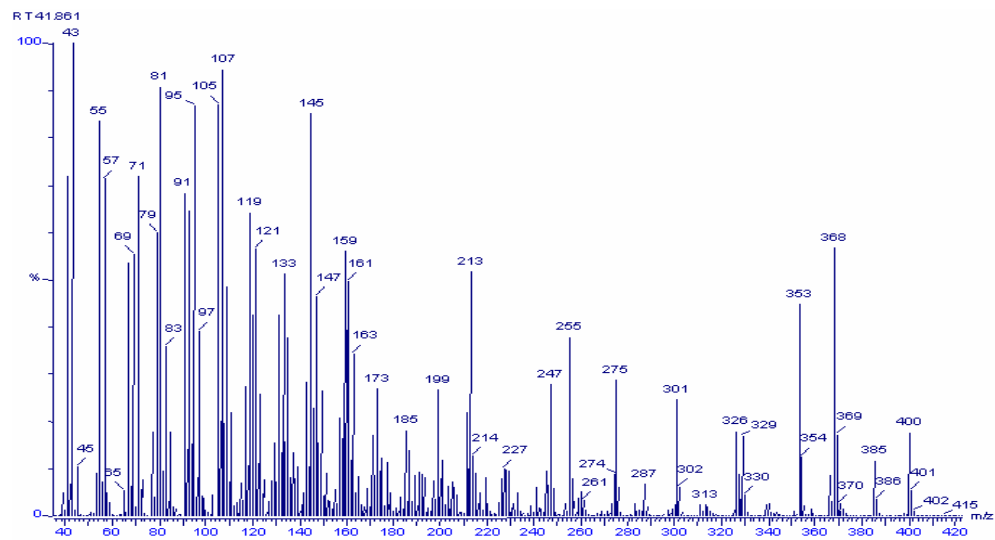
Cholesta-3,5-diene



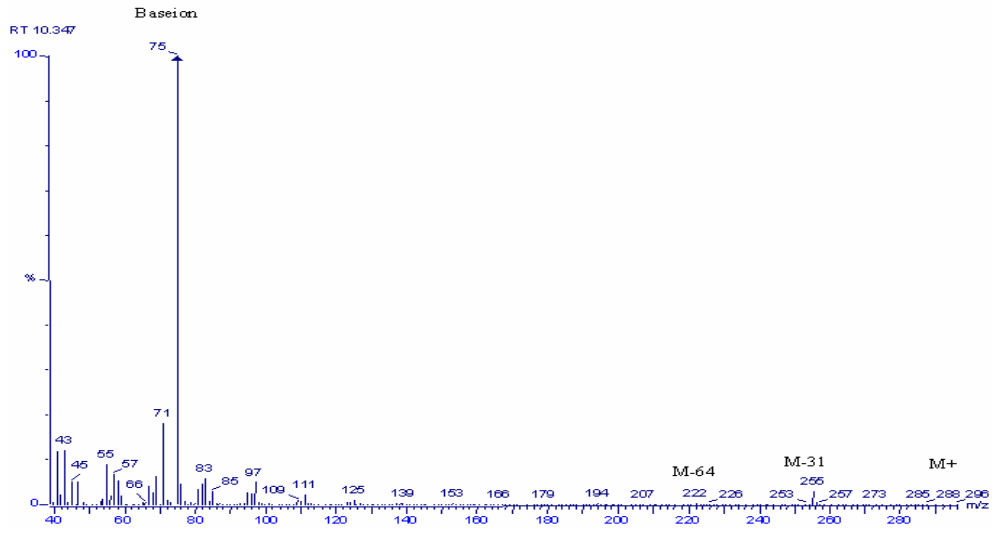
Kolesterol med klor



metyleterkolstertrol



16:0 dimethylacetal



18:1 AME

