

Eugen Gravningen Sørmo, Tomasz
Maciej Ciesielski, Ida Beathe
Øverjordet, Grethe Stavik Eggen,
Bjørn Munro Jenssen

Effekter av metaller på metallothionein i ørret fra Mjøsa og Losna

Trondheim, 4 mai, 2010



Forsiden: Mjøsørret klar for prøvetakning (Foto, Per Harald Olsen, Institutt for biologi NTNU)

Forord

Denne studien er et spinn-off av et pågående forskningsprosjekt ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) på nivåer og effekter av miljøgifter i ørret fra Mjøsa og Losna (TROUTTOX). TROUTTOX er finansiert av Norges forskningsråd (NFR) gjennom forskningsprogrammet Miljø2015 (NFR-prosjekt 183923/S30). Sommeren 2009 ble det opprettet kontakt med daværende Statens forurensningstilsyn (SFT), nåværende Klima og forurensningsdirektorat (KLIF), for muligheten for også å inkludere analyser av metaller og metallothionein inn i prosjektet. KLIF innvilget søknad fra Institutt for biologi (IBI) om et økonomisk tilsagn til en slik studie (SFT-prosjekt 5009124). Denne rapporten presenterer hovedfunnene i metall/element og metallothionein undersøkelsene muliggjort av tilsagnet. Hovedfokuset i rapporten er presentasjon av metall/element konsentrasjoner i ørret fra Mjøsa og Losna, og om metallothionein kan brukes som biomarkør for eksponering for metaller i ørret fra disse to økosystemene. Vi presenterer også kort noen av funnene hvor dataene fra tilsagnet er brukt i TROUTTOX prosjektet (finansiert av Forskningsrådet) til å undersøke sammenhenger mellom metall nivåer og plasma thyroide nivåer i ørretene. NTNU ved biologisk institutt takker KLIF ved sjefsingeniør Jon L. Fuglestad for den økonomiske støtten til dette prosjektet. Stor takke rettes også til lokale kjentmenn og fiskere i Losna og Mjøsa for levering av fisk og nytting rådgivning. Takk til Professor Ole Kristian Berg, Institutt for biologi, NTNU for veiledning om ørretens biologi samt utlån av utstyr og for å hjelpe oss med å komme i kontakt med lokale kjentmenn. Forfatterne skylder også en stor takk til avdelingsingeniør Per Harald Olsen, Institutt for biologi, NTNU for stor innsats i felt, denne gangen også under sene nattetimer med fiske og transport av fisk inn til land. Vi takker også overingeniør Syverin Lierhagen, Institutt for Kjemi, NTNU for assistanse med metallanalysene.

Økonomiske bidragsytere:



Innholdsfortegnelse:

FORORD	Side 3
INTRODUKSJON	Side 5
Metallothionein (MT)	Side 5
Metaller og toksisitet	Side 5
MATERIALE OG METODE	Side 5
Prøvetaking	Side 5
Metaller og elementer	Side 6
Metallothionein (MT)	Side 6
Databehandling og statistiske analyser	Side 6
RESULTATER OG DISKUSJON	Side 7
Metallothionein (MT).....	Side 7
Metaller og elementer	Side 7
Korrelasjoner mellom MT og metaller/elementer	Side 9
KONKLUSJON	Side 11
FORSLAG TIL OPPFØLGINGSSTUDIER	Side 11
TABELLER OG FIGURER	Side 14
Tabell 1: Konsentrasjoner av metaller og elementer i ørret fra Losna og Mjøsa	Side 14
Figur 1: Relativt bidrag av metaller og elementer i ørretene	Side 15
Figur 2: Sammenheng mellom kvikksølv og kroppslengde	Side 16
Figur 3: Sammenhenger mellom MT og metaller/elementer	Side 17
Figur 4: Sammenhenger mellom MT og metaller/elementer og og plasma thyroïd hormon nivåer	Side 19
KORRESPONDANSE/KONTAKT INFORMASJON	Side 20

Introduksjon

Metallothionein (MT):

MT er et protein som har kapasitet til å binde både fysiologiske viktige elementer/metaller (sink, kobber og selen) samt ikke-essensielle elementer/metaller som kvikksølv, kadmiium, arsen med flere. Den biologiske funksjonen til MT er ikke helt kjent, men det antas at MT ved å binde opp metaller gir beskyttelse mot potensielle skader induisert av disse. Videre antas det at MT inngår i reguleringen av fysiologiske viktige metaller som sink (Zn) og kobber (Cu). MT gir også beskyttelse mot oksidativt stress (eksempelvis induisert av metaller eller andre miljøgifter). På grunn av at MT øker ved metall-eksponering brukes MT i dag som biomarkør for eksponering for metaller i organismer.

Metaller og metalltoksisitet:

Metaller deles inn i essensielle og ikke-essensielle metaller. Ikke-essensielle metaller er ofte toksiske med ingen biologiske funksjon. Ikke-essensielle metaller kan forekomme i skadelige doser i miljøet som følge av menneskeskapte aktiviteter/ utslipp. Det samme gjelder de essensielle metallene hvis dosene blir høye nok. Blant de mest kjente toksiske metallene i miljøet regnes blant andre kvikksølv (Hg), kadmiium (Cd), bly (Pb) og aluminium (Al). Halvmetallet arsen (As) inkluderes også i gruppen toksiske metaller. Disse metallene kan være skadelige for organismer ved at de etterligner funksjonen til essensielle metaller, eller ved å påvirke/forstyrre kroppens andre funksjoner (eks enzymsystemer). Mange metaller genererer også vevsskader ved at de induserer oksidativt stress. Metaller som danner organiske forbindelser er særlig toksiske og biotilgjengelige, mest kjente av disse er metyl-kvikksølv (Me-Hg) og tetraetylbley (begge neurotoksiske). Problemet med kvikksølv i miljøet forsterkes ved at elementært kvikksølv særlig i ferskvann omdannes til Me-Hg. Metyl-kvikksølv tas opp mer effektivt i organismene og har lengre halveringstid sammenlignet med elementært kvikksølv. I fisk akkumuleres Me-Hg i særlig grad i muskel, mens elementært kvikksølv utgjør en betydelig andel av kvikksølvet i lever og nyre.

Blant de essensielle metallene har en jern (Fe), sink (Zn), kobber (Cu), mangan (Mn) og kobolt (Co) med flere. For eksempel inngår et eller flere av disse metallene som kofaktorer i ulike enzymsystemer. Jern er også viktig som oksygen-bærer (eks hemoglobin). Et annen viktig essensielt element er ikke-metallet selen (Se). Selen inngår som viktig kofaktor i en rekke enzymsystemer. Selen har også antagonistiske (beskyttende) egenskaper mot toksiske effekter induert av kvikksølv. Denne beskyttende effekten av selen ved eksponering for kvikksølv antas å skyldes at det dannes Hg-Se komplekser som er toksisk/biologisk immobile. Adekvate mengder med selen regnes derfor som vel så viktig som MT som forsvarsmekanisme ved eksponering for kvikksølv. Blant annet er det vist at selen er viktig for utskillelsen av kvikksølv i organismene. Denne interaksjonen mellom kvikksølv og selen er ikke bare positiv for organismene. For eksempel vil økt forbruk av selen som følge av eksponering for kvikksølv redusere tilgjengeligheten for selen til kroppens selen-avhengige enzymsystemer. Dette er særlig et problem når eksponering for kvikksølv kombineres med en selen-fattig diett.

Materiale og metode:

Prøvetaking: 34 ørreter fra Mjøsa og 16 ørreter fra Losna inngår i studien. Losna ligger i Gudbrandsdalslågen ca 50 km oppstrøms for Mjøsa. I Mjøsa ble det fisket utenfor Lillehammer Camping. Ørretene ble tatt på slukredskaper, holdt levende i ombord i

fiskebåtene for deretter å bli avlivet for prøvetaking ved ankomst på land. Nivåer med metaller ble analysert i muskel, mens MT ble analysert i lever. Muskel ble fosset ned i til -20 °C, mens lever ble frosset ned på flytende nitrogen i felt og senere oppbevart ved -80 °C etter ankomst til NTNU.

Metaller og elementer: Omtrent 1 gram muskel ble tilført i HNO₃ (4.2 g) og ultrarent vann (2.3 g) i 18 mL teflon rør. Prøvene ble overført og oppløst i et lukket mikrobølge system (UltraClave). Etter denne behandlingen ble prøvene fortynnet i ultrarent vann til 60 mL (0.6 M HNO₃). Metall nivåene i muskelprøvene ble målt med induktiv koplet plasma kombinert med et høyoppløselig massespektrometer (HP-ICP-MS) (Thermo Finnigan, Bremen, Germany). Prøven ble injisert med et SC-FAST flow system (ca. 0.25 mL/min). Argon gjennomstrømmingen ble justert for gi maksimalt signal for nuklidene ⁷Li, ¹¹⁵In and ²³⁸U. Metan ble brukt for å minimalisere interferens fra karbon og for å forsterke sensitiviteten spesielt for selen and arsen. Instrumentet ble kalibrert med 0.6 M HNO₃ multielement løsninger (standardkurve med 5 konsentrasjoner). For å kontrollere for drift ble standard multielementløsninger analysert etter hver tiende prøve. Nøyaktigheten ble verifisert med standard referansemateriale (SRM 1566b, østers) (National Institute of Standards and Technology NIST, USA). Konsentrasjonene for alle elementene i referanseprøvene hadde recovery på 90-115 %, unntakene var tinn (Sn) (80 %) and antimon (Sb) (84 %). Blank prøver med HNO₃ og ultrarent vann ble opparbeidet og analysert på samme måte som miljøprøvene. Da de fleste blank-prøvene var rene ble instrumentet deteksjonsgrenser brukt for å kalkulere metodens deteksjonsgrenser. HP-ICP-MS gjør det mulig å bestemme mer enn 50 grunnstoffer/elementer samtidig, og deteksjonsgrensene er bedre enn for de fleste andre metoder. Nivåer for 14 metaller og elementer inngår i studien; kvikksølv (Hg), jern (Fe), sink (Zn), kobber (Cu), selen (Se), aluminium (Al), mangan (Mn), arsen (As), kobolt (Co), nikkel (Ni), krom (Cr), bly (Pb), kadmium (Cd) og gull (Au).

Metallothionein (MT): Leverprøvene ble homogenisert i Tris-buffer ved hjelp av Potter-Elvehjem teknikk, før innholdet av metallothionein ble målt ved bruk et kadmium-saturasjonsassay. Den radioaktive isotopen ¹⁰⁹Cd ble benyttet for å kvantitativt måle innholdet av metallothionein, basert på at alle bindingssteder for Cd²⁺ på MT mettes, før overskuddet av kadmiumioner (¹⁰⁹Cd²⁺ og Cd²⁺) fjernes med ionebytteren Chelex-100 resin. Aktiviteten av ¹⁰⁹Cd i prøven målt i CPM etter fjerning av Chelex vil dermed være representativt for innholdet av metallothionein i vevet. Innholdet av MT i prøvene (nmol MT/g våtvekt) beregnes som vist i likning A. Dersom det antas at molekylvekten for MT er 7000 dalton, vil en ved å multiplisere konsentrasjonen i nmol/g med 7, få konsentrasjonen av MT i µg/g våtvekt.

$$\text{nmol MT/g ww.} = \frac{\text{CPM}_{\text{Prøve}} - \text{CPM}_{\text{Bg}}}{\text{CPM}_{\text{Total}}} \cdot 263 \text{ nmol/mL} \cdot \frac{1}{7} \cdot 10 \cdot 1,49. \quad \text{Likning A}$$

CPM_{Prøve} = aktivitet i prøven (telling pr. minutt)

CPM_{Bg} = aktivitet i blankprøven

CPM_{Total} = aktivitet i totalprøven uten tilsatt Chelex

1/7 = 7 Cd-atomer bindes til hvert MT

10 = fortynning under homogeniseringen

1,49 = metodefortynningen

Data behandling og statistiske analyser: Partial Least Squares regresjon (PLS) er den minst restriktive multivariate oppfølgerne til multivariate regresjonsmodeller. PLS sin fleksibilitet

gjør denne metoden spesielt egnet når de tradisjonelle multivariate metodene har begrensninger, for eksempel når det er mange prediktor-variabler i et materiale med få observasjoner (prøver). I PLS kartlegger en hvilke prediktorer (X-variabler) som har effekt på en eller flere Y variabler. Videre kan PLS brukes som analytisk redskap til å velge ut potensielle variabler for bruk i mer klassiske regresjonsanalyser som univariate GLM (General Linear Modell) benyttet i denne undersøkelsen. All data ble log-transformert for bedre normalfordeling. Kun PLS modeller som ble validert å være signifikante (CV-ANOVA, $p < 0.05$) ble benyttet. PLS analysene ble utført i SIMCA P+ (versjon 12), mens GLM analysene ble utført i SPSS (versjon 15).

Resultater og diskusjon:

Metallothionein (MT): Nivåer med MT i lever viste ingen forskjeller mellom populasjonene ($p=0.25$) (Mjøsa 43.16 nmol MT/ g våtvekt, min-max: 33.80-85.70; Losna 47.16 nmol MT/g våtvekt, min-max: 34.20-76.30).

Metaller og elementer: Konsentrasjoner av 12 metaller, halvmetallet arsen (As) og elementet selen (Se) i muskel fra ørretene fra Mjøsa og Losna er gjengitt i Tabell 1. De essensielle metallene domineres av jern (Fe), sink (Zn) og kobber (Cu). Konsentrasjoner av ikke-essensielle metaller/elementer domineres av kvikksølv (Hg), aluminium (Al) og arsen (As). Relativt bidrag av de ulike forbindelsene er illustrert i Figur 1. Andre toksiske metaller som kadmium (Cd) og bly (Pb) påvises i relativt lave konsentrasjoner sammenlignet med mange av de andre toksiske metallene. Til det kan det sies at nivåene for bly og kadmium ofte forekommer i betydelige høyere nivåer i organer som lever og nyrer sammenlignet med muskel analysert i denne studien.

Da særlig kvikksølv detekteres i høye konsentrasjoner presenteres funn rundt dette metallet i mer detalj sammenlignet med de andre metallene. Det var ingen statistiske forskjeller i nivåer av kvikksølv i ørretene fra de to lokalitetene, eller mellom hann- og hunnfisk (ingen av metallene viste forskjeller mellom kjønnene). Nivåer av kvikksølv i muskel i Mjøsørreten varierte fra 0.33 til 1.81 mg/kg våtvekt (median 0.64 mg/kg), mens nivåene av kvikksølv i ørret fra Losna varierte fra 0.16 til 1.46 mg/kg våtvekt (median 0.56 mg/kg). Det var en klar positiv sammenheng mellom nivåer av kvikksølv og ørretenes kroppslengde ($R^2=0.53$, $F_{1,48} = 56.30$, $p < 0.0001$) (Figur 2). Denne sammenhengen uttrykkes med følgende ligning (gjelder for ørret fra begge lokalitetene):

Kvikksølv (mg/kg våtvekt) konsentrasjon i muskel = $0.021 \times \text{kroppslengde (cm)} - 0.761$

Grenseverdier for tiltak med hensyn til kostholdsråd er satt til 0.5 mg/kg våtvekt. Likning over gir at ørret fra begge lokalitetene overskrider denne grensen ved kroppslengder over 60 cm (Figur 2). Median kvikksølvnivå i ørret fra begge lokalitetene i denne studien overskrider denne grenseverdien på 0.5 mg/kg våtvekt.

Selen (Se), arsen (As), aluminium (Al), mangan (Mn), bly (Pb), nikkel (Ni), kobolt (Co) og krom (Cr) detekteres i høyere og til dels langt høyere konsentrasjoner i ørretene fra Losna (Gudbrandsdalslågen) (Tabell 1). Disse forskjellene gir at metall/element sammensetning i Mjøsørret skiller seg fra det en ser i ørret fra Losna.



Lillehammer by night (lokaliteten for fiske utenfor Lillehammer Camping) (Foto Per Harald Olsen, IBI, NTNU)



Typisk dorgeoppsett for fiske etter ørret på Mjøsa (Foto Per Harald Olsen, IBI, NTNU)



Disseksjon av ørret (Foto Per Harald Olsen, IBI, NTNU)

Korrelasjoner mellom MT og metaller/elementer

Begge populasjonene samlet: I Figur 3a presenteres hvilke metaller som i PLS modellen korrelerer med MT når en slår sammen ørret fra begge lokalitetene til et prøveutvalg. Variabler med stolper som går oppover i diagrammet indikerer en positiv korrelasjon med MT, mens variabler med stolper som går nedover i diagrammet indikerer en negativ korrelasjon med MT. De potensielt sterkeste bidragsyterne i modellene har ofte de lengste stolpene, men "error-barene" bør også være så små som mulige og helst ikke krysse null-linjen. Parametrene VIP verdier i modellene bør også være > 1 (ikke vist). I Figur 3a identifiseres jern (Fe), kadmium (Cd), bly (Pb) og kvikksølv (Hg) som kilder for økte nivåer med MT i dette prøveutvalget med ørret. Disse fire metallenes samlede effekt på MT ble testet i en GLM analyse. Tilsammen forklarte disse metallene 28 % av variasjonen i MT nivåene ($F_{4,43} = 4.37, p=0.005$). Kun jern ble funnet å ha signifikant effekt på nivåene med MT ($F_{1,43}=6.36, p=0.015$) i denne GLM analysen. En skal være forsiktig med å sammenligne resultatene fra GLM direkte opp mot resultatene fra PLS analysene. Dette da det må forventes at noe informasjon om sammenhengene mellom de ulike parametre tapes i de univariate GLM analysene sammenlignet med de mer komplekse multivariate PLS analysene. På den andre siden forenkler GLM analysene ofte tokningen og identifiser/ bekrefter de parametrene som har de sterkeste sammenhengene i materialet.

Mjøsa: I Figur 3b presenteres hvilke metaller/elementer som i PLS modellen korrelerer med MT når kun ørret fra Mjøsa utgjør prøveutvalget. Modellen indikerer jern (Fe), kadmium (Cd) og kvikksølv (Hg) som kilde for økte nivåer med MT, og selen (Se) og kobber (Cu) som kilde til reduserte nivåer med MT i Mjøsørret. Videre ser en kroppslengde medfører økte nivåer med MT i ørretene fra Mjøsa (trolig som følge av at nivåene av flere av de toksiske metallene øker med fiskenes kroppslengde/alder). Den kombinerte effekten av kvikksølv (Hg), jern (Fe), kadmium (Cd), selen (Se), kobber (Cu) og kroppslengde på MT testes i en GLM analyse. Denne analysen ga at disse parameterne forklarer 67 % av variasjonen i nivåene med MT i Mjøsørreten ($F_{6,27}=10.90, p<0.0001$). Av disse var det selen ($F_{1,27}=20.84, p<0.0001$) og kvikksølv ($F_{1,27}=4.39, p=0.046$) som hadde statistisk signifikant effekt på MT. GLM analysen ble også foretatt med kun kvikksølv og selen som "kovariater" i analysen. I denne modellen forklarte selen ($F_{1,30}=36.32, p<0.0001$) og kvikksølv ($F_{1,30}=28.51, p<0.0001$) 64 % av variasjonen i nivåene med MT ($F_{2,30} = 26.47, p=0.0001$). Dataene indikerer at i Mjøsørreten ga kvikksølv økte nivåer med MT, mens selen synes særlig å redusere behovet for MT.

Losna: I Figur 3c presenteres hvilke metaller som i PLS modellen korrelerer med MT-nivåene når kun ørret fra Losna utgjør prøveutvalget. For denne lokaliteten ble modellen validert signifikant med jern (Fe), sink (Zn), aluminium (Al), mangan (Mn) og kvikksølv (Hg) som prediktorer i modellen. Jern og aluminium ga økt MT, mens sink (Zn) og mangan (Mn) ga redusert behov for MT. I GLM-analysen forklarte disse metallene (Fe, Al, Zn, Mn, Hg) 69 % av variasjon i nivåene med MT i ørretene fra Losna ($F_{5,9}=4.16, p=0.030$). Av disse hadde jern (Fe) ($F_{1,9}=6.90, p=0.027$) og sink (Zn) ($F_{1,9}=4.90, p=0.054$) sterkest effekt på MT i GLM-analysen. Med andre ord var det til forskjell fra i Mjøsørreten ingen sterke effekter av selen og i mindre grad også av kvikksølv på nivåene med MT i ørreten fra denne lokaliteten. Dette til tross for at eksponering for kvikksølv synes å være lik mellom lokalitetene.

Som forventet finner en relativt høye konsentrasjoner med kvikksølv i ørretene fra Mjøsa. Ørret med kroppslengder på ca. 60 cm eller lengre overskrider tiltaksgrensen på 0.5 mg/kg. Interessant er at kvikksølv-nivåene i muskel er like høye i utvalget fra Losna (også når det er korrigert for kroppslengde). Dette antyder at Mjøsørreten ikke er mer forurensset med

kvikksølv sammenlignet med ørret fra Gudbrandsdalslågen/Losna. Faktisk for de fleste metaller og elementer finner en høyere konsentrasjoner i ørreten fra Losna sammenlignet med ørret fra Mjøsa, spesielt gjelder dette for elementet selen (Se) og metallene aluminium (Al), bly (Pb), mangan (Mn), arsen (As), nikkel (Ni) og krom (Cr) (Tabell 1). I tillegg til mulige forskjeller i menneskeskapte kilder mellom lokalitetene kan disse forskjellene ha årsak i forskjellige geologiske forhold mellom lokalitetene; eksempelvis økt utvasking/erosjon av metaller/elementer fra berggrunn /jordsmonn til vannmassene i Losna.

Det var interessant at effekten av de ulike metaller/elementer på MT varierer med hvor ørreten var fisket. Vi finner at kvikksølv ga særlig økte MT-nivåer i Mjøsørreten. Likedan ser vi kun negativ korrelasjon mellom MT og selen i ørret fra Mjøsa og ikke i ørreten fra Losna. Denne effekten av selen på MT begrenset til utvalget fra Mjøsa kan skyldes de lavere bakgrunnsnivåene med selen fra miljøet til Mjøsørreten sammenlignet med ørretene fra Losna. Som nevnt innledningsvis er selen en viktig antagonist mot kvikksølv (beskytter med skader indusert av kvikksølv). Observasjonene i denne studien kan tyde på at de lavere nivåene med selen i ørretene fra Mjøsa gir økt behov for MT som respons til eksponering for kvikksølv. Dette til tross for at nivåene med kvikksølv i Mjøsørret var lik de i ørret fra Losna. Betydningen av selen som kvikksølv antagonist kan derfor forklare hvorfor effekten av selen på MT ikke detekteres i prøveutvalgene hvor ørret fra begge lokalitetene undersøkes samlet eller når en undersøker Losna lokaliteten isolert. Dette antyder at de høyere nivåene med selen i Losna gjør ørret fra denne lokaliteten mer motstandsdyktig mot effekter forårsaket av kvikksølv.

Den underliggende mekanismen for den antagonistiske (beskyttende) interaksjonen mellom selen og kvikksølv er ikke fullstendig kjent, men er dokumentert både ved eksponering for metallisk kvikksølv og for metylkvikksølv. En vet at selen binder opp metallisk/elementært kvikksølv i biologisk inaktive Hg-Se komplekser. Videre er adekvate mengder selen viktig i prosesser for demetylering av metylkvikksølv til elementært kvikksølv i leveren. Dette gir at eksponering for kvikksølv er potensielt mer toksisk for organismer/populasjoner med selenfattige dietter (eks. Mjøsørreten).

Som det fremkommer i PLS modellene synes også en rekke andre metaller og elementer i tillegg til kvikksølv og selen å ha effekt på nivåene med MT ørretene, noen som agonister (øker MT) og andre som antagonister (reduserer MT). I PLS modellene til alle test-utvalgene ser at en særlig at jern (Fe) gir økt MT (i Mjøsa er effekten av kvikksølv sterkere). Selv om jern er et av kroppens viktigste essensielle metaller, underlegges jern en streng regulering i organismene da dette metallet har et stort potensial for biologisk toksisitet ved å katalysere produksjon av frie radikaler (oksidativt stress). Denne studien synes å indikere at MT kan være en beskyttelse mekanisme mot skadevirkninger forårsaket av jern i ørret. Når det gjelder de andre essensielle metallene som sink, kobber og mangan ser en at disse (som selen) gjennomgående har dempende effekt på MT behovet (hvilke av disse metallene som korrelerer negativt med MT varierer i prøveutvalgene). Dette kan trolig forklares med at kobber, sink og mangan har viktige roller som kofaktorer i rekke enzymer som inngår i organismenes antioksidant beskyttelsessystemer. Disse systemene inkluderer blant andre enzymer som glutathion peroxidase, katalase og superoksid dismutase. Blant disse er verdt å nevne at særlig glutathion peroxidase er selen-avhengig. Med andre ord kan kvikksølv-indusert reduksjon av tilgjengelig selen bidra til økt oksidativt stress i organismene ved å hemme selen-avhengige antioksidantsystemer. Disse antagonistiske effektene av selen og en rekke av de essensielle metallene (kobber, sink og mangan) på behovet for MT påvist i denne studien antyder disse metallenes viktige rolle for helsestatusen til ørretene. For eksempel kan

det tenkes at høy forekomst av toksiske metaller kan hemme regulering og tilgjengelighet for disse viktige sporstoffene i ørretene.

I ørret fra Losna ser en også at aluminium (Al) gir økte nivåer med MT (se PLS modellen), noe som kan forklares med den høyere eksponering for dette toksiske metallet ved denne lokaliteten (Tabell 1). Mange av de toksiske effektene til aluminium er knyttet til effekter på mitokondriene, noe som kan forklare hvorfor særlig mangan (Mn) synes å ha antagonistisk effekt på MT i utvalget fra Losna. Dette da mangan er særlig viktig for antioksidant systemer i mitokondriene. Videre ser at de toksiske metallene kadmium og bly gir økte nivåer med MT i flere av utvalgene. Dette til tross for at nivåene som måles i muskel for disse metallene er forholdsvis lave. Disse observasjonene samsvarer med disse metallenes kjente evne til å inducere økte nivåer med MT (spesielt gjelder dette kadmium). Disse metallene identifiseres derimot ikke som signifikante påvirkere på MT i GLM analysene (det utelukker ikke at de til en viss grad påvirker MT nivåene i ørretene).

I TROUTTOX tester vi også de potensielle effektene eksponeringen for metaller har på andre fysiologiske parametre i ørretene. Vi presenterer her kort effekten metallene har på plasma thyroid hormon nivåene i ørretene fra Losna og Mjøsa¹. Thyroid hormoner er kritisk i reguleringen av stoffskiftet, utvikling, reproduksjon og vekst i hele dyreriket. For eksempel kan hjerneutviklingen og kognitive ferdigheter være mangelfulle ved redusert nivåer med thyroid hormoner. Det er interessant at vi i denne undersøkelsen fant at økt MT sammenfalt med reduserte plasma thyroksin (T4) konsentrasjoner i ørretene. MT hadde sterkere effekt på T4 i PLS og GLM analysene sammenlignet med metallene enkeltvis (Figur 4a). Med andre ord synes det som om at det er totaleksponering for MT-agonister, hvor bidraget av de enkelte metallene eller andre MT agonister er vanskelig å identifisere, som hadde sterkest effekt på T4 i ørretene.

Triiodothyronin (T3) er det biologisk mest aktive thyroid hormonet og omdannes perifert ute i vevene fra T4. Med hensyn til effekter av metallene og MT på T3 (Figur 4b) ser vi et noe annet mønster sammenlignet med effektene metallene hadde på T4. Kvikksølv og i noen mindre grad MT reduserer T3 konsentrasjonene, mens selen og kobolt gir økning i T3. De positive effektene av selen og kobolt skyldes trolig at begge er essensielle sporstoffer for normal thyroid-hormon funksjon. For eksempel er selen en viktig kofaktor i en rekke enzymsystemer. Et slikt enzymsystem er dejodinasene som omdanner T4 til T3. I GLM testes effekten av Hg, MT, Se og Co på nivåene med T3 i ørretene. Disse parameterne forklarer 31 % av variasjonene i nivåene med T3 i ørretene ($F_{4,42}=4.37$, $p=0.003$). Kvikksølv ($F_{1,42}=4.37$, $p=0.043$) og i noe mindre grad selen ($F_{1,42}=3.22$, $p=0.080$) var de sterkeste bidragsyterne i analysen. Kjøres analysen kun med kvikksølv og selen som "kovariater" forklarer modellen 27 % av variasjonen i nivåene med T3 i ørretene ($F_{2,44}=8.05$, $p=0.001$), hvor både kvikksølv ($F_{1,44}=8.15$, $p=0.007$) og selen ($F_{1,44}=8.37$, $p=0.006$) har signifikant effekt på T3. Dette er interessante funn og støtter antakelser om at underskudd for selen (eksempelvis forårsaket av kvikksølv eksponering) kan gjøre ørretene mer mottakelig for toksiske effekter (hormon forstyrrelser) ved eksponering for metaller. Det at T3 reduseres av kvikksølv samtidig som selen gir økning i T3 kan skyldes at ørretenes selen-avhengig dejodinase-aktivitet hemmes med økt eksponering for kvikksølv. Dette vil vi undersøke videre i TROUTTOX. De lavere nivåene av selen i Mjøsa kan også forklare hvorfor vi i TROUTTOX finner lavere nivåer av T3 nivåer i Mjøsørreten sammenlignet med ørreten fra Losna. At thyroidhormon-systemet til frittlevende ørret påvirkes av miljøgifter støttes f.eks av utbredte observasjoner i forstyrrede thyroidkjertler i ørret fra The Great Lakes i USA (kjent for sine høye miljøgiftbelastninger).

Vår studie foreslår at eksponering for metaller og potensielt særlig for kvikksølv kan være en mulig kilde for slike hormon forstyrrende effekter i innlandsfisk.

Konklusjon

Denne studien viser at det å måle nivåer av MT gir god indikasjon ikke bare for eksponering, men også mulig toksiske effekter (hormonforstyrrelser), induert av den samlede metall eksponeringen som ørretene utsettes for i miljøene de lever i. Videre viser denne studien hvor viktig det er å se eksponering for metaller og nivåer med MT i sammenheng med ørretenes selen status. Pågående studier i TROUTTOX synes også å indikere at metall induerte effekter på ørretenes plasma thyroid hormon nivåene bør/må sees i sammenheng med ørretenes selen status. Også andre essensielle metaller/elementer som kobolt, mangan, kobber og sink synes å ha positive helseeffekter hos ørretene.

Forslag til oppfølgings studier (i prioritert rekkefølge):

Et av hovedfunnene i denne studien er de signifikante effektene av kvikksølv og selen på MT nivåene i ørretene fra Mjøsa (kvikksølv og selen synes også å ha effekt på ørretenes thyroid funksjon). Disse funnene bør følges opp med kartlegging av årsaken til de lavere nivåene med selen i Mjøsørreten sammenlignet med ørretene fra Losna. For eksempel er alle mageprøver tatt vare på slik en kan analysere for nivåer av metaller og selen i disse for å avdekke om tilskuddet med selen er lavere i dietten til Mjøsørreten. Dette er viktig informasjon som gi kunnskap om ørretene fra disse to lokalitetene kan ha forskjellig mottakelighet for toksiske effekter for kvikksølv for ellers lik eksponering for dette metallet.

Den klare induksjonen av MT som følge av eksponering for metaller reiser også spørsmål om mulige toksiske effekter forårsaket av denne eksponeringen. Dette inkluderer problemstillinger om hvorvidt økt MT også er et mål på økt oksidativt stress og skade i ørretene. Slike sammenhenger er vist tidligere. Like viktig som mulig økt oksidativt stress med eksponering for toksiske metaller er undersøkelser om de essensielle metallene/elementene har beskyttende effekt mot oksidativt stress/skade i ørretene. For eksempel reiser den påviste hemmende effekten av selen på MT nivåene i Mjøsa ørreten spørsmål om selen-avhengig enzymer i antioksidant prosessene påvirkes ved eksponering for kvikksølv. Følgende oppfølgingsstudier foreslås med hensyn til mulig økt forekomst av oksidativt stress i ørretene. En bør undersøke graden av lipidperoksidering i leverprøver fra ørretene ved hjelp av et TBARS assay (Thiobarbituric acid reactive substances assay). Denne testen gir et mål på omfanget av skade forårsaket av oksidativt stress. En bør også måle leveren sin totale oksygen scavenging kapasitet (TOSC - total oxyradical scavenging capacity assay), det vil si hvor mye oksidativt stress som tåles i prøvene fra de ulike individene. Ut av en slik test kan en få informasjon om for eksempel denne kapasitet er redusert hos individer med lavere nivåer med selen. Videre kan en måle raten mellom glutathione (GSH) og glutathione disulfid (GSSG) (GSH/GSSG ratio) i leveren. Dette er et viktig mål på graden av oksidativt stress i organismene. GSH er en endogen antioksidant som oksideres til GSSG ved oksidativt stress. Videre bør en også måle nivåer/aktiviteter av antioksidant enzymer som katalase, glutathione reduktase (tilbakedanner GSSG til antioksidanten GSH) og glutathione peroksidase. De to siste er selen-avhengige enzymsystemer som kan særlig tenkes hemmet ved lave nivåer med selen. Alle disse testene kan utføres ved NTNU.

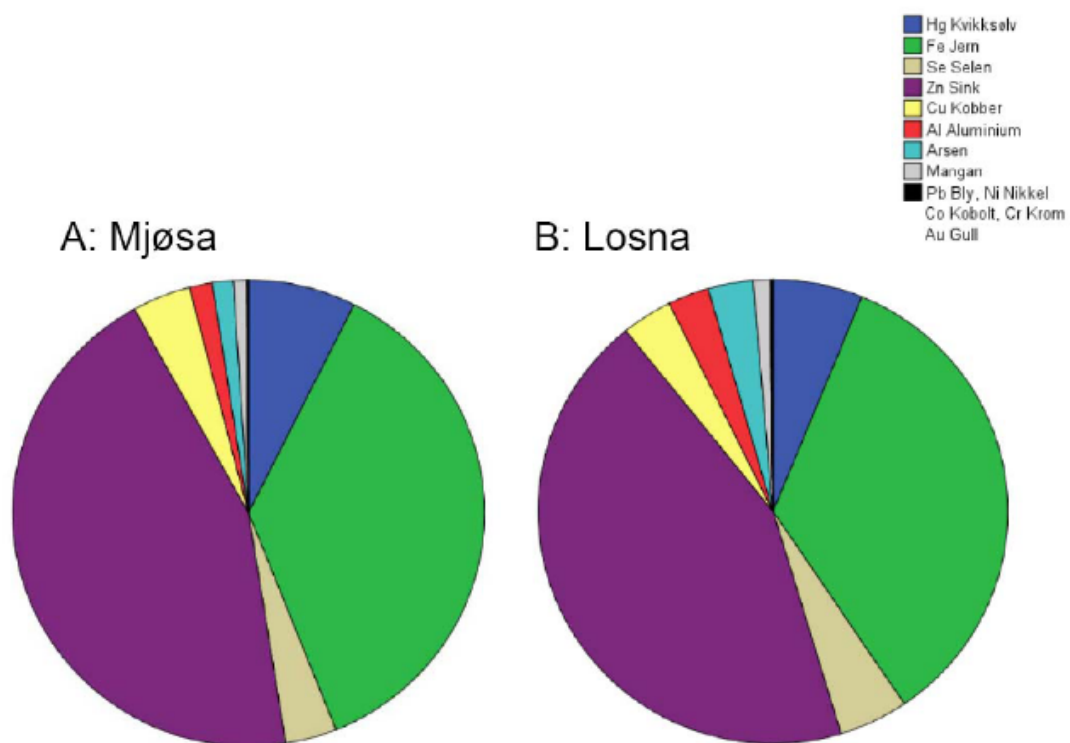
Induksjon av MT foregår i all hovedsak i leveren. Dette medfører at interaksjonen mellom metaller og MT også i all hovedsak foregår i dette organet. I denne studien har vi analysert metaller i muskelvev. Så for å få en enda bedre kartlegging av interaksjonene mellom MT og

metallene og selen, bør også nivåene med selen og metaller kartlegges i leveren til ørretene. Dette er spesielt viktig da akkumulering av enkelte metaller (kvikksølv, bly og kadmium) øker relativt mer i leveren sammenlignet med i muskel med økende eksponering for metaller. Med andre ord er nivåer med metaller målt i leveren toksikologisk mer relevant sammenlignet med nivåer analysert i muskel. Nivåene målt i muskel har derimot høyere relevans opp mot human eksponering.

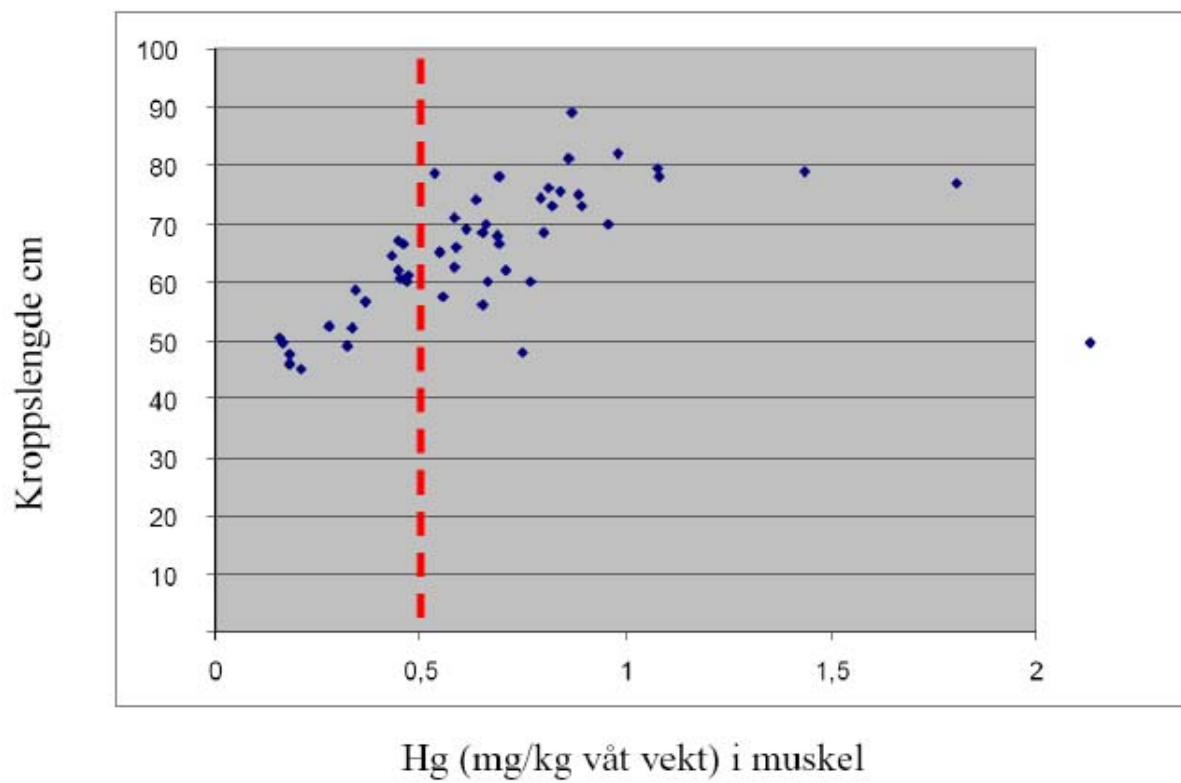
¹Sørmo EG, Ciesielski TM, Øverjordet IB, Eggen GS, Mulder PJ, Jenssen BM. 2010. Effects of mercury and other metals, and selenium on metallothionein and plasma thyroid hormone levels in free-ranging brown trout (*Salmon trutta*) from Lake Mjøsa and an upstream reference population. Abstract, 3rd Norwegian Environmental Toxicology Symposium. Emerging solutions for emerging challenges, April 14-16, 2010, Bergen, Norway

Tabell 1: Gjennomsnitt $\pm$ SD (min-max) konsentrasjoner av metaller og elementer i muskel prøver i ørret fra Mjøsa og Losna. $p < 0.05$ ved ulike konsentrasjon mellom lokalitetene.

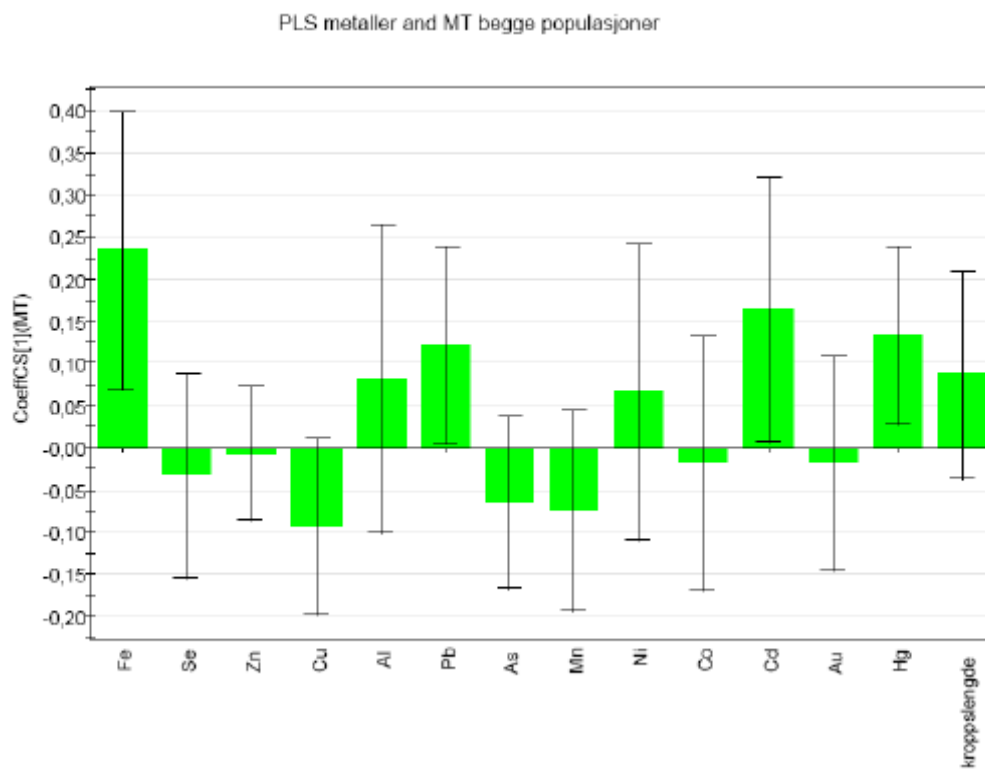
	Losna	Mjøsa	<i>p</i> -verdi
Kvikksølv (Hg) mg/kg	0.58 $\pm$ 0.39 (0.16 -1.43)	0.67 $\pm$ 0.27 (0.33-1.81)	ns
Jern (Fe) mg/kg	3.11 $\pm$ 1.25 (1.78 – 6.78)	3.29 $\pm$ 1.36 (1.76 – 8.02)	ns
Selen (Se) mg/kg	0.41 $\pm$ 0.13 (0.22-0.68)	0.23 $\pm$ 0.04 (0.17-0.35)	$p < 0.0001$
Sink (Zn) mg/kg	3.78 $\pm$ 0.41 (3.29 – 4.80)	3.76 $\pm$ 0.84 (2.97-6.85)	ns
Kobber (Cu) mg/kg	0.30 $\pm$ 0.007 (0.20 -0.48)	0.35 $\pm$ 0.84 (0.19-0.68)	ns
Arsen (As) mg/kg	0.25 $\pm$ 0.29 (0.008-0.91)	0.05 $\pm$ 0.03 (0,024-0.156)	$p = 0.008$
Aluminium (Al) mg/kg	0.25 $\pm$ 0.26 (0.06 – 0.27)	0.07 $\pm$ 0,06 (0.01-0.25)	$p < 0.0001$
Mangan (Mn) mg/kg	0.10 $\pm$ 0.09 (0.01 – 0.19)	0.053 $\pm$ 0.024 (0.04-0.13)	$p = 0.008$
Kadmium (Cd) $\mu\text{g/kg}$	0.26 $\pm$ 0.09 (0.12 – 0.45)	0.28 $\pm$ 0.15 (0.12 – 0.97)	ns
Bly (Pb) $\mu\text{g/kg}$	1.07 $\pm$ 0,90 (0,31-3,76)	0.37 $\pm$ 0.22 (0.16-1.10)	$p < 0.0001$
Nikkel (Ni) $\mu\text{g/kg}$	3.78 $\pm$ 2.56 (1.5-10.0)	1.70 $\pm$ 1.06 (0.78-5.60)	$p = 0.0001$
Kobolt (Co) $\mu\text{g/kg}$	4.53 $\pm$ 2.17 (1.20-8.70)	2.75 $\pm$ 1.10 (0.80-6.70)	$p = 0.001$
Krom (Cr) $\mu\text{g/kg}$	4.83 $\pm$ 4.32 (0.92-15.48)	1.20 $\pm$ 1.13 (0.30-4.93)	$p < 0.0001$
Gull (Au) $\mu\text{g/kg}$	0.033 $\pm$ 0.023 (0.01-0.96)	0.032 $\pm$ 0.026 (0.01-0.11)	ns



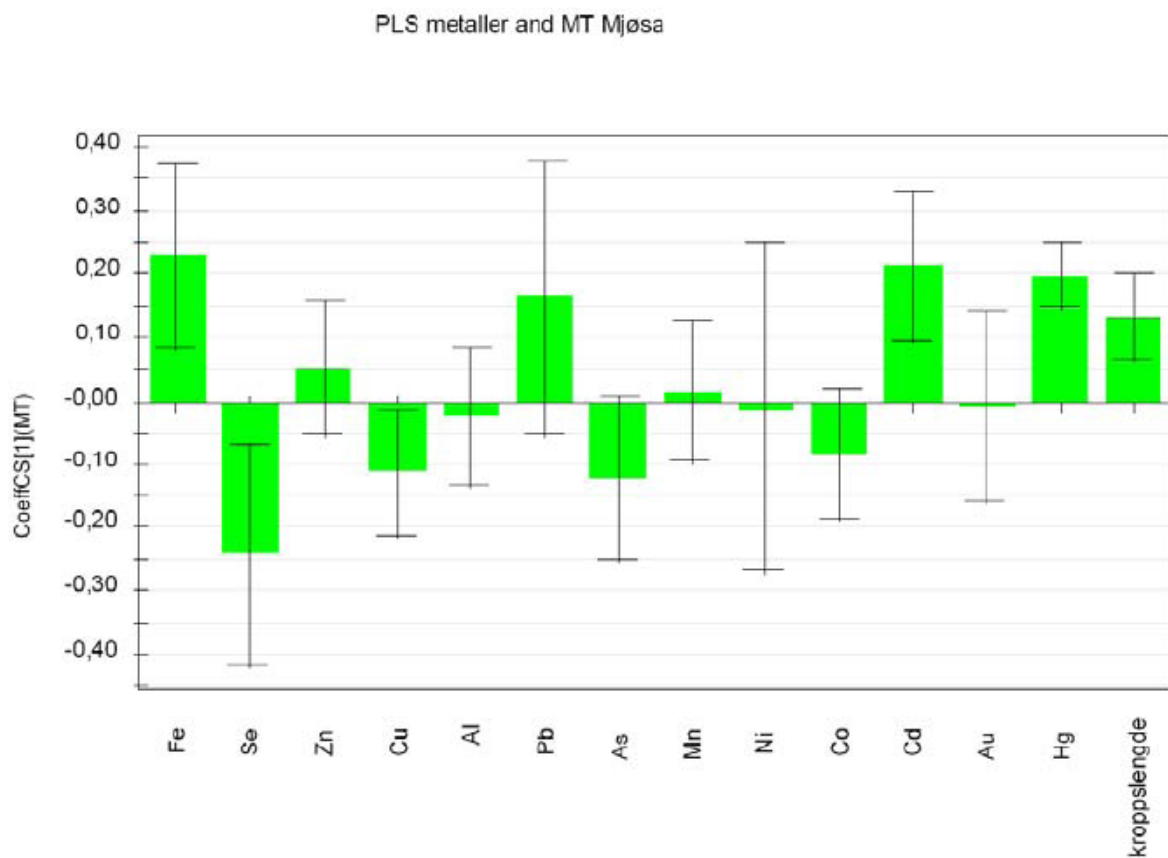
Figur 1: Relativt bidrag av metaller og elementer i muskelprøver fra ørret



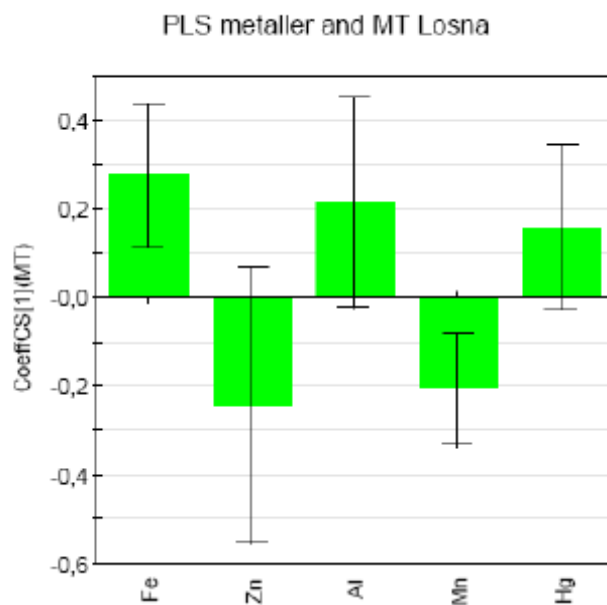
Figur 2: Sammenheng mellom kvikksølv og kroppslengde i ørret fra Mjøsa og Losna. Rød stiplet linje viser konsentrasjon for kostholdsrad.



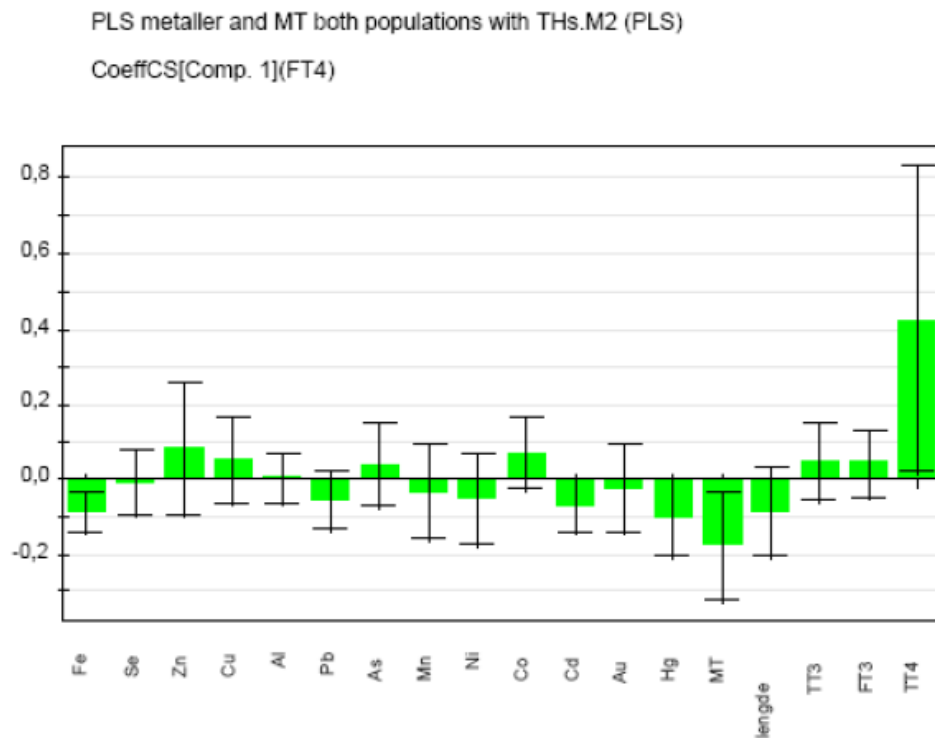
Figur 3a: PLS koeffisient plott som viser sammenhengen mellom MT og metaller nivåer i ørret fra Mjøsa og Losna.



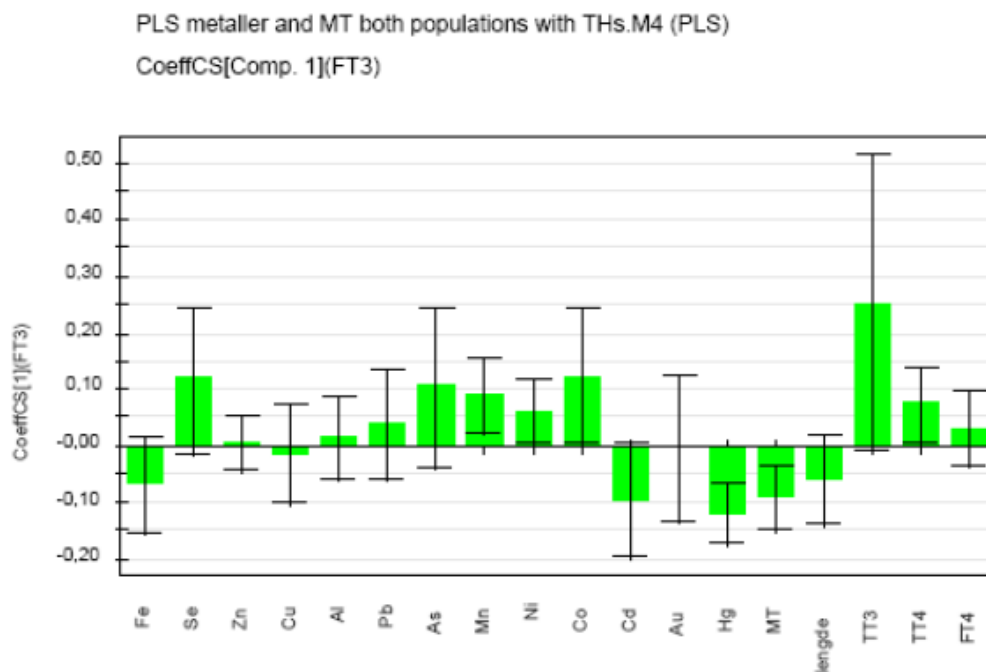
Figur 3b: PLS koeffisient plott som viser sammenheng mellom MT og metall nivåer i ørret fra Mjøsa



Figur 3c: PLS koeffisient plott som viser sammenhengen mellom MT og metall nivåer i ørret fra Losna



Figur 4a: PLS koeffisient plott som viser sammenhengen mellom fritt T4 i plasma, og metall og MT nivåer i ørret fra Mjøsa og Losna. FT4 = fritt thyroksin, TT4 = total thyroksin, FT3 = fritt triijodthyronin, og TT3 = total triijodthyronin



Figur 4b: PLS koeffisient plott som viser sammenhengen mellom fritt T3 i plasma, og metall og MT nivåer i ørret fra Mjøsa og Losna. FT4 = fritt thyroksin, TT4 = total thyroksin, FT3 = fritt triijodthyronin, og TT3 = total triijodthyronin

Korrespondanse:
Eugen Gravningen Sørmo,
Dr scient, Forsker

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi
Realfagsbygget,
Høgskoleringen 5,
7491 Trondheim

e-mail: eugen.sormo@bio.ntnu.no
Telefon: 7359-0579 / 9156-0551

ISBN 00-0000-000-0

