

Biomarkører i miljøovervåkning

Av Karl Erik Zachariassen

Forfatteren er professor ved Laboratorium for økofysiologi og toksikologi, Institutt for biologi, NTNU

Sammendrag

Miljøovervåkningens målsetting er å se hvordan naturmiljøet påvirkes av antropogent betingede endringer av miljøforholdene, blant annet det kjemiske miljø. Tradisjonelt har kjemiske forurensninger i vann stått sterkt i fokus, og ulike former for overvåkning er satt i gang i utsatte lokaliteter. Ønsket om å komme en lokal miljøkatastrofe i forkjøpet har skapt oppmerksomhet omkring såkalte biomarkører.

En biomarkør er en biokjemisk, cellulær eller fysiologisk endring som inntreffer før effekter kan sees på populasjonsnivå, og som kan brukes til såkalt tidlig varslings ("early warning") av forurensning.

Blant de hyppigst brukte biomarkørene er cytokeratin P450 og metallothionein. Det er behov for biomarkører med større evne til å indikere toksisk påvirkning, og ikke minst evne til å detektere akutt forurensning på et tidligst mulig stadium. *The Trondheim Biomonitoring System* (TBS) er utviklet for å imøtekomme behovet for et mer differensiert og presist system av biomarkører. Det tar utgangspunkt i en fysiologisk tenkemåte, idet vi vet at fysiologiske pro-

sesser opprettholder livsviktige fysiologiske parametre på et optimalt nivå. Miljøforurensninger virker skadelig ved at de forstyrrer disse prosessene og truer med å forskyve de regulerte parametrene utover det organismene kan tåle. Det opereres her med tre kategorier av biomarkører: Sensitive eksponeringsmarkører, toksisitetsmarkører som indikerer om skade er i ferd med å utvikles, samt fingerprintmarkører for identifikasjon av ukjente forurensninger.

Innledning

Menneskelig aktivitet påvirker naturmiljøet på forskjellige måter, og de fleste av effektene oppfattes som negative for naturmiljøet. Omfanget av disse påvirkningene har økt med verdens befolkningsvekst, og det er i dag betydelig bekymring for de negative effektene. Det er særlig virkningene av kjemiske forurensninger og klimaendringer som har stått i fokus.

Dette har reist behovet for å følge utviklingen i naturen gjennom ulike former for miljøovervåkning. Overvåkingen har i stor utstrekning vært rettet mot populasjonsstørrelser, men ønsket om tidlig varslings av miljø-

forstyrrelser har ført til at man også har benyttet seg av subletale forandringer av biokjemiske og fysiologiske prosesser, det vil si såkalte biomarkører.

Hva er miljøovervåkning?

Bekymringen for skadelige effekter av miljøforandringer dreier seg først og fremst om effekter på populasjoner av organismer i naturen, og populasjonsstørrelse er nødvendigvis et meget relevant overvåkningstema. En rekke metoder har blitt utviklet for å oppnå mest mulig presise populasjonsestimater.

Det knytter seg imidlertid flere begrensninger til populasjons-basert miljøovervåkning. Ett problem er tolkningen av endringer i populasjoner. Ofte blir en nedgang i en populasjon oppfattet som et faresignal, mens en stigende populasjon blir tolket som et sunnhetstegn. Men populasjonsstørrelse påvirkes av en rekke forhold, og naturlige populasjoner har alltid vist svingninger uten at disse nødvendigvis kan tilskrives menneskelige aktiviteter.

Selv der det er kjent at en populasjonsnedgang er forårsaket av menneskelig aktivitet, vil denne formen for miljøovervåkning være retrospektiv og i mange situasjoner vil den arte seg som en kvantitativ registrering av en miljøskade som allerede har funnet sted. Ønsket om å komme en antropogent induisert miljøskade i forkjøpet har reist behovet for en miljøovervåkning som gjør det mulig å detektere en skadelig utvikling på et tidlig stadium, før en forstyrrelse kan

sees på populasjonsnivå eller økologisk nivå. Tidlig varslings ("early warning") er blitt et viktig tema for miljøovervåkingen. Det er heller ikke mulig å si ut fra en populasjonsendring og kjemikalieinnholdet i vev, mat eller medium hva en slik endring kan skyldes. Det vil som regel være tilstede en lang rekke såkalte miljøgifter i høyere eller lavere konsentrasjoner, men det er ikke nødvendigvis de stoffene som foreligger i høyest konsentrasjon som forårsaker skaden. Dette innebærer også at overvåkning basert på kjemiske analyser av mediet alene blir inkonklusive med hensyn på biologiske effekter. En overvåkning basert på kjemiske analyser av en lang rekke mulige forurensningsformer vil dessuten gjerne kreve et betydelig teknisk apparat og bli meget kostbare.

For å få et enklere og mer biologisk relevant overvåkningssystem har man forsøkt å dra fordel av det faktum at en enkelt biokjemisk eller fysiologiske prosess i en organisme kan reagere på nærvær av en rekke ulike substanser, selv når disse stoffene forekommer i lave konsentrasjoner. Ved å følge en eller noen få slike funksjonsrelaterte endringer, kan man fange opp nærvær av et bredt spekter av potensielt miljøfarlige stoffer.

Ved bruk av slike funksjonsrelaterte endringer kan nærværet av miljøfremmede stoffer dessuten detekteres før det oppstår konsekvenser på økologisk nivå. De indre funksjonsrelaterte biologiske parametre man måler i denne formen for miljøovervåkning har fått betegnelsen *biomarkører*.

Hva er en biomarkør?

En biomarkør er et cellulært, biokjemisk eller fysiologisk parameter, som endrer seg som følge av eksponering for et potensielt giftig kjemikalium (Depledge et al. 1993). Bakgrunnen for bruk av biomarkører er at man ønsker å detektere forurensningsbetingede miljøforstyrrelser på et tidligst mulig stadium, før skade har oppstått på populasjonsnivå.

Miljøovervåkning basert på biomarkører har det vært satset på kanskje særlig når det gjelder akvatiske miljøer.

De etablerte biomarkører

En rekke ulike biomarkører har vært introdusert. Disse omfatter skalllukningsmønster og veksthastighet hos muslinger, aktivering av ulike typer avgiftingsenzymer og metallbindende protein hos en rekke ulike akvatiske organismetyper.

Biomarkører må imidlertid benyttes med forsiktighet og innsikt. Blant de mest brukte biomarkører er Cytokrom P₄₅₀ og metallothioneiner. Begge disse typene biomarkører er fra tid til annen benyttet på en lite adekvat måte, idet utslag av disse parametrene blir tolket som skadelig effekt. Dette er en feilaktig tolkning, da både P₄₅₀ og metallothioneiner er involvert i avgiftning av potensielt toksiske stoffer. Cytokrom P₄₅₀ aktiveres når organismen utsettes for potensielt giftige organiske stoffer, og enzymet overfører giftige fettløselige organiske stoffer til en ugiftig, ofte vannløselig form, som kan skilles ut gjennom nyrene eller andre ekskresjonsorganer for stoffer oppløst i vann. Metallo-

thoinein binder potensielt toksiske spormetaller, slik at man får en reduksjon i mengden fritt spormetall, som kan binde seg til funksjonelt protein som for eksempel enzymer. Metallothoinein kan produseres i store mengder når organismen eksponeres for spormetaller, og bindingen gjør at metallene kan akkumuleres til svært høye nivåer i organismene. Men i de fleste tilfelle er hverken aktivering av P₄₅₀ eller produksjon av metallothionein i seg selv skadelig for en organisme, og disse endringene må snarere oppfattes som et uttrykk for at organismen har et apparat til å håndtere det potensielt toksiske stress, og at de dermed skulle være ganske tolerante for slikt stress.

Et annet forhold er at disse systemene ikke er utviklet som respons på antropogen forurensning. Både potensielt giftige spormetaller og organiske forbindelser har forekommet naturlig siden livet oppsto, og organismene må antas å ha hatt beskyttelsesmekanismer like lenge. Naturlig eksponering for potensielt toksiske metaller og et enormt antall organiske forbindelser (Gribble 1994) forekommer også i dag, og aktivering av avgiftningssystemene kan skyldes stoffer som er produsert i naturen. Det er på denne bakgrunn også viktig å avgjøre om en eventuell aktivering av disse mekanismene har naturlige eller antropogene årsaker.

Behov for et differensiert system

Når en organisme får aktivert avgiftningssystemer som P₄₅₀ og metallothioneiner innebærer det at

organismen er eksponert for potensielt giftige stoffer, men det innebærer ikke at organismene på noen måte er skadet. Dette reiser behovet for å utvikle et mer nyansert system med biomarkører. Dagens innsikt i biokjemi og fysiologi hos organismer i naturen gjør det mulig å utvikle et system med flere biomarkører som gir differensiert informasjon.

Minst tre kategorier av biomarkører er aktuelle:

1. Markører for eksponering for potensielt toksiske stoffer ("Eksponeringsmarkør" eller "Alarm-markør").
2. Markører for toksisk stress, det vil si markører som indikerer at en organisme er i ferd med å få alvorlige funksjonsforstyrrelser ("Toksisitetsmarkør").
3. Sett av biomarkører, som samlet påvirkes på en måte som er spesifikk for vedkommende bioaktive forurensningstoffer, og som kan brukes til å identifisere stoffet ("Fingerprint-markør").

Etter dette systemet er biomarkører som Cytokrom P₄₅₀ og metallothionein godt egnet til å fungere som eksponeringsmarkører.

The Trondheim Biomonitoring System

The Trondheim Biomonitoring System (TBS) er utviklet for å dra nytte av det faktum at det skjer en rekke subletale forandringer i en forurensningseksponert organisme før effekter viser seg på populasjonsnivå. Ved å se endringene i et fysiologiske perspektiv er det mulig å oppnå et

system av biomarkører med et differensiert budskap, tuftet på en forståelse av hvordan ulike målbare fysiologiske og biokjemiske parametre fungerer sammen som et funksjonelt hele. Dette gjør det i prinsippet mulig å etablere biomarkører som skiller mellom eksponering og toksisk effekt, og som også kan gi en kjemikaliespesifikk respons.

Den fysiologiske tenkemåten innebærer at man betrakter organismens funksjonelle maskineri som et samspill mellom regulerte fysiologiske parametre og homeostatiske reguleringsmekanismer, som opprettholder de regulerte parametre på et optimalt nivå. Hvis en toksisk substans på en eller annen måte får det regulerte parameter til å bevege seg bort fra det optimale område, vil en eller flere homeostatiske mekanismer aktiveres.

Dersom det toksiske stress ikke er sterkere enn at de regulerende mekanismene kan kompensere, vil det regulerte parameter forbli innenfor det optimale området, og endringen i aktiviteten av de regulerende mekanismene vil være den eneste respons som kan observeres.

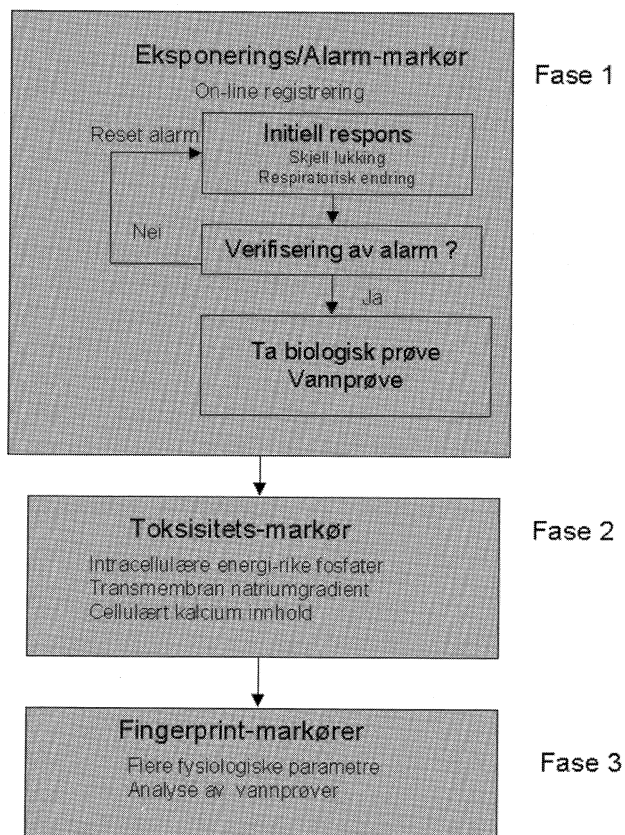
Dersom det toksiske stress overstiger de regulerende mekanismers kapasitet til å kompensere, vil det regulerte parameter etterhvert forskyves ut over det optimale området, og funksjonelle forstyrrelser vil inntre. Endringen i det regulerte parameter er en indikasjon på dette.

Ulike toksiske stoffer griper inn i de funksjonelle forholdene gjennom sine kjemiske og fysiske egenskaper, og ulike stoffer vil i det minste i mange tilfelle gripe inn på forskjel-

lige måter. Dette innebærer at forskjellige kjemiske stoffer vil ha forskjellige effektspektre, det vil si at det samlede sett av parametre vil endres på en måte som er spesifikk for de ulike toksiske stoffer. Dette kan danne grunnlag for etablering av et effekt-kartotek som kan brukes til å identifisere det bioaktive stoff i situasjoner der dette ikke er kjent eller er omstridt.

TBS er beskrevet i detalj av Aunaas og Zachariassen (1994). Trinnene i overvåkningsmetoden i TBS er fremstilt i diagrammet i figur 1.

TBS er basert på aktiv biomonitorering, det vil si at man følger responsene til en organisme som er kunstig utplassert i miljøet som skal overvåkes. Organismene holdes i et kammer der vannet som skal overvåkes strømmer gjennom og der man lett kan ta prøver av vev eller følge organismens biologiske funksjoner på annen måte, for eksempel on line på en oppkoblet computer. I testene som er utført hittil er blåskjell (*Mytilus edulis*) brukt som overvåkningsorganisme, men en hvilken som helst organisme av passelig størrelse kan benyttes.



Figur 1. Faser i The Trondheim Biomonitoring System

Biomarkører i TBS

Biomarkørene som benyttes i TBS er sammenstilt i Figur 1. De er beskrevet i detalj av Aunaas og Zachariassen (1994) og av Børset et al. (1995).

Eksponeringsmarkør (Fase 1)

Den perfekte eksponeringsmarkør bør reagere på nærvær av lave konsentrasjoner av et bredt spektrum av miljøforurensninger. Poenget med denne type markør er følsomhet, og utslag vil ikke være uttrykk for at organismen er i ferd med å bli skadet.

En lang rekke organiske substanser og spormetaller er toksiske fordi de hemmer metabolismen og/eller ionepumper. Ionepumpene forbruker en betydelig andel av det ATP cellene produserer. En hemming av en eller flere av disse prosessene vil derfor føre til et redusert oksygenopptak, og av denne grunn er oksygenopptaket benyttet som eksponeringsmarkør i TBS.

Oksygenopptaket kan også endres som følge av en rekke trivielle påvirkninger, kanskje særlig ved skalllukking som følge av en salinitetsendring. Betydningen av et utslag i oksygenopptaket må derfor verifiseres gjennom måling av saliniteten.

Toksisitetsmarkør (Fase 2)

Dersom utslaget i eksponeringsmarkøren blir verifisert, er det aktuelt å evaluere påvirkningens toksisitet ved å ta en vevsprøve som kan analyseres for innholdet av aktivt regulerte ioner. En hemming av metabolismen eller ionepumpene vil føre til en reduksjon i livsviktige gradienter av metallioner over cellemembranene. Dette gjelder

særlig for gradientene av natrium og kalsium. Natriumgradienten er viktig fordi den er energikilde for en lang rekke cellulære transportmekanismer, mens kalsium i cellene må holdes på et lavt nivå for å unngå at cellene dør av kalsiumforgiftning. Natriumgradienten og cellenes innhold av kalsium er av denne grunn brukt som markører for toksisk stress.

Fingerprintmarkører (Fase 3)

Avhengig av hvorvidt et toksisk stoff hemmer ionepumper eller energimetabolismen vil det oppstå ulike effekter på andre parametre som for eksempel cellulære nivåer av energirikt ATP. Hemming av en ionepumpe vil føre til at reduksjonen i ionegradienten skjer samtidig med at nivået av ATP er høyt. En hemming av energimetabolismen vil gi reduserte ionegradienter gjennom en reduksjon i mengden av ATP, som følgelig vil være lav. Det kan samtidig forekomme effekter på cellenes natrium-avhengige opptaksmekanismer for frie aminosyrer. Det finnes i alt mer enn 20 forskjellige aminosyrer og aminosyrelignende forbindelser som opptas gjennom flere forskjellige opptaksmekanismer. I tillegg til proteinsyntese er aminosyrene involvert i en rekke forskjellige cellulære prosesser som cellulær volumregulering og aerob og anaerob metabolisme. Dette gir store muligheter for spesifikke reaksjoner på toksisk belastning, og aminosyrene fremstår som et lovende element i et sett av fingerprintmarkører.

Ikke alle toksiske stoffer er metabolske gifter eller hemmere av ionepumper. Andre toksiske stoffer virker

gjennom andre mekanismer, og det må da velges andre typer markører. De tre faser som er etablert i TMS kan være aktuelle for et hvilken som helst potensielt toksisk stoff.

Overvåkningsinstrument

Instrumentet er konstruert som en bølge, som kan utplasseres i vannet som skal overvåkes. Instrumentet er beskrevet i detalj av Nordtug og Olsen (1993). Organismene holdes i eksponeringskamre med gjennomstrømmende vann, der vannet fra kamrene i tur og orden pumpes gjennom et sentralt plassert kammer med en oksygenelektrode. Oksygenelektroden er via kabler koblet opp til en computer, der signalet fra elektroden registreres kontinuerlig. Computeren bør fortrinnsvis stå på land i rimelig nærhet til bøyen.

Organismenes oksygenforbruk bestemmes ved at oksygentensjonen i vannet fra kamre med dyr blir sammenholdt med tensjonen i vann fra tomme kamre, og differansen benyttes som et mål på hva organismene har forbrukt.

Instrumentet gir mulighet for at organismene kan tas ut av kammeret slik at en vevsprøve eller blodprøve kan tas.

Instrumentet er bygget i flere versjoner, og en versjon er en bølge som skulle være egnet for industriell produksjon.

Referanser

Aunaas T. og Zachariassen K.E. 1993. Physiological Biomarkers and the Trondheim Biomonitoring System. I KJM Kramer: Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. CRC Press, Inc. pp. 107-130.

Børseth J.F., Aunaas T., Denstad J.-P., Nordtug T., Olsen A.J., Schmid R., Skjærvø G. og Zachariassen K.E. 1995. Transmembrane sodium gradient and calcium content in the adductor muscle of *Mytilus edulis* L. in relation to the toxicity of oil and organic chemicals. *Aquatic Toxicology* 31, 263-276.

Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S. Kloepper-Sams P., Moore M.N. og Peakall D.B. 1993. Biomarker. NATO ASI Series Vol H68, 15-29.

Gribble G.W. 1994. Natural Organohalogen – Many More Than You Think! *J. Chemical Education* 71, 907-911.

Nordtug T. og Olsen A.J. 1993. A method for long term multiple-channel recording of oxygen consumption in aquatic animals. *J. exp. Biol.* 185, 357-365.