

# Biomarkører i ålekvabbe

## Delrapport II



<b>Titel:</b>	<b>Biomarkører i ålekvalbe - Delrapport II</b>
<b>Resume:</b>	Biomarkører målt i ålekvalbe blev sammenholdt med forekomsten af mis-dannede ålekvalbeunger. Ålekvalbe fra områder med misdannelser havde lavere vitamin A, B og E niveauer, højere CYP1A-aktivitet og større forekomst af PAH-metabolliter. Hormonbalancen var også påvirket, men kobling til mis-dannelser er uklar.
<b>Forfatter:</b>	Jakob Strand & Ingela Dahllöf, Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet
<b>Andre bidragyder:</b>	Poul Bjerregaard, Kim Gustavson, Jette Jacobsen, Gitte Petersen, Zhanna Tairova
<b>Emneord:</b>	Ålekvalbe, biomarkører, Vitamin A, B, E, PAH-metabolliter, CYP1A, steroider, lipid, LSI
<b>URL:</b>	<a href="http://www.blst.dk">www.blst.dk</a>
<b>ISBN:</b>	978-87-92708-22-9 (PDF-udgave)
<b>Udgiver:</b>	By- og Landskabsstyrelsen
<b>Udgiverkategori:</b>	Statslig
<b>År:</b>	2010
<b>Sprog:</b>	Dansk
<b>Copyright©</b>	Må citeres med kildeangivelse. By- og landskabsstyrelsen, Miljøministeriet

By- og Landskabsstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter inden for miljøsektoren, finansieret af By- og Landskabsstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for By- og Landskabsstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at By- og Landskabsstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik

# Indhold

Forord.....	5
Sammenfatning .....	7
Summary .....	9
Introduktion.....	11
Forekomsten af fejludviklede ålekvabbeunger i 2009 .....	13
Indsamling og prøvetagning .....	17
Udvalgte lokaliteter .....	17
Prøveindsamling .....	17
Resultater .....	21
Vitamin A, E og B i æg og unger .....	21
Steroider i blod og ovarievæske fra voksne hunner .....	24
CYP1A-aktivitet i lever fra voksne hunner .....	26
PAH-metabolitter i galde fra voksne hunner .....	27
Lipid i muskel fra voksne hunner samt æg og unger .....	28
Diskussion .....	31
Konklusioner og anbefalinger.....	37
Referencer.....	39



# Forord

I forbindelse med den nationale overvågning af vandmiljøet (NOVANA) i årene 2004-2008 er der fundet forhøjede forekomster af misdannede unger i kuld fra fisken ålekvabbe i en række danske fjorde. I andre lande, herunder Tyskland og Sverige, er der gjort lignende fund af misdannede ålekvabbeunger.

Der er tidligere blevet gennemført to litteraturstudier i regi af Miljøministeriet, hvilke er afrapporteret i: 1) Misdannet ålekvabbeunger og andre biologiske effekter i danske vandområder. Litteraturudredning (Stuer-Lauridsen et al. 2008), og 2) Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk. Indkredsning af stoffer ud fra deres biokemiske virkemekanisme (Halling-Sørensen et al. 2008).

Konklusionerne fra disse udredninger var, at ålekvabbeunger med misdannelser er hyppigst forekommende i kystnære områder med menneskelig aktivitet, og at der er mistanke om, at fx klorerede organiske forbindelser, TBT, PAH, pesticider, tungmetaller, lægemidler og stoffer med hormonforstyrrende effekter er årsagen til fund af misdannelser, evt. ved additiv virkning fra flere stoffer.

FORMÅL-projektet ('Et undersøgelsesforløb til at **FOR**klare fund af **M**isdannede **Å**lekvabbeunger i danske fjorde') er en del af Miljøministeriets tilvejebringelse af viden, der er nødvendig, for at By- og Landskabsstyrelsen kan opstille evt. forslag til indsatser, der kan imødegå biologiske effekter i miljøet.

FORMÅL-projektet består af tre trin:

1. Et måleprogram, der kan tilvejebringe et fyldestgørende billede af vandmiljøets tilstand med hensyn til miljøfarlige stoffer for at indkredse årsagen til fund af misdannelser i ålekvabbeunger.
2. Laboratorieforsøg til etablering af viden om effektive niveauer for udvalgte kemiske stoffer i ålekvabber.
3. En tværgående analyse af de gennemførte aktiviteter og resultater fra andre projekter, der sammenfatter viden om årsager til forekomst og udbredelse af effekter og misdannelser i ålekvabber.

De overordnede resultater og konklusioner fra trin 1 er sammenfattet i Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe – et feltstudie. Trin 1.

Denne delrapport er den anden af tre, hvor resultaterne fra FORMÅLs første trin rapporteres, og omhandler biomarkører i ålekvabbe. De andre to delrapporter omhandler: I) Miljøfarlige stoffer i ålekvabbe samt III) Miljøfarlige stoffer i sediment og bundfauna.



# Sammenfatning

Biomarkører kan anvendes til at vurdere biologiske årsager og virkemekanismer bag fundene af forhøjede forekomster af misdannede unger i kuld fra fisken ålekvabbe.

De i denne sammenhæng anvendte biomarkører omfatter vitaminerne A, E og B, steroider, CYP1A, PAH-metabolitter og lipid. Responsniveauet af disse biomarkører i ålekvabber er undersøgt ved tre lokaliteter i 2009; ved Agersø i Storbælt, der er udvalgt som referencestation, og ved Roskilde og Frederiksværk, hvor der gennem en årrække har været en forhøjet forekomst af misdannede ålekvabbeunger. Prøvetagningen er forløbet over tre perioder i august, september og november, som repræsenterer forskellige vigtige trin i ålekvabbers udviklingen fra æg til unger.

Undersøgelsen viste, at responsniveauet for flere af biomarkørerne i ålekvabbe ved Roskilde og Frederiksværk generelt adskiller sig fra referencestationen ved Agersø. Dette gælder for niveauerne af vitaminer og steroider, CYP1A, og PAH-metabolitter. Hvilke det drejer sig om, og i hvilket omfang, afhænger dels af den enkelte biomarkør, dels af tidspunktet.

Der er indikationer på, at årsagen til den øgede forekomst af ålekvabbekulde med misdannede unger ved Roskilde og Frederiksværk kunne relateres til lavere niveauer af vitamin A, E og B. For vitamin E, som bl.a. beskytter mod oxidativ stress, var det tilfældet både i august og i november. De laveste niveauer af vitamin A fandtes gennemgående ved Frederiksværk og de laveste niveauer af vitamin B blev fundet ved Roskilde. Dette kan skyldes tilstedeværelse af forskellige typer af miljøfarlige stoffer. Tilsvarende adskiller CYP1A-aktiviteten i leveren og niveauet af PAH-metabolitter i galde fra de gravide hunner sig især i august ved Roskilde og Frederiksværk i forhold til Agersø. Dette styrker formodningen om, at de lavere vitaminniveauer var forårsaget af en øget belastning med visse grupper af miljøfarlige stoffer, og ikke forskelle i andre biotiske og abiotiske forhold.

Konklusionerne fra måleprogrammet er, at:

- der indikeres en sammenhæng mellem vitamin A, B og E samt CYP1A-aktiviteten og forekomst af misdannelser,
- PAH-metabolitter viser forskelle i PAH-eksponering, som også er koblet til misdannelsesfrekvensen,
- en endelig tolkning af de forskellige responser i steroider kræver yderligere viden om misdannelsers kobling til hormonbalancen i ålekvabbe.





# Summary

Biomarkers can be used to assess what biological mechanisms that are affected by hazardous substances and result in the observed deformities in eelpout larvae.

The biomarkers used in this study were content of vitamin A, E and B, steroids, PAH-metabolites and lipid, as well as CYP1A activity in eelpout. Eelpout were caught at three sites in August, September and November. Agersø in the Southern Belt Sea was considered a reference site, as no deformities were observed here either in September or November. Roskilde and Frederiksværk, both situated in Roskilde Fjord, were impacted sites where more than 5 % of the broods had more than 5 % deformities.

The responses of many of the biomarkers were different at the impacted sites compared to the reference site, especially for the vitamins, steroids, CYP1A and PAH-metabolites. The difference between sites varied both in time and magnitude for most of the biomarkers.

There are indications that the cause of deformities could be related to lower levels of vitamin A, E and B. For vitamin E that protects against oxidative stress the levels were lower at the impacted sites both in August and November. The lowest levels of vitamin A were found at Frederiksværk, and the lowest levels of vitamin B were found at Roskilde. These differences could be caused by differences in contamination profile between the sites. The activity of CYP1A and levels of PAH-metabolites were higher at the sites with deformities, especially in August. This strengthens the notion that the lower levels of vitamins at the sites with deformed larvae were caused by increased pressure from hazardous substances, and not by other differences in abiotic and biotic conditions at the sites such as difference in prey.

The conclusions from this study are that:

- the levels of vitamin A, B and E, as well as CYP1A-activity can be correlated with occurrence of deformities,
- PAH-metabolites show differences in PAH-exposure that is also connected to occurrence of deformities,
- more background knowledge of the hormone balance in connection with deformities in eelpout is needed before a more conclusive interpretation of the different responses for steroids can be made.



# Introduktion

Biomarkører er biologiske indikatorer, der kan anvendes til at vurdere, om miljøfarlige stoffer påvirker og derved udgør en risiko for dyrelivet i vore farvande. Biomarkører anvendes til at identificere tidlige tegn på skadelige effekter i individer, bl.a. i det Nationale Overvågningsprogram for Naturen og Vandmiljøet (NOVANA). De tidlige tegn på effekter har dog ikke nødvendigvis betydning på populationsniveau. Mange biomarkører kan anvendes som indikatorer for at vurdere både de rumlige, dvs. mellem områder, og tidlige variationer i responsniveauet, som kan være forårsaget af miljøfarlige stoffer. Nogle biomarkører er stofspecifikke, fx imposex og intersex som indikatorer for effekter af stoffet TBT i havsnegle (OSPAR 1998a; Strand et al. 2009). Andre biomarkører anses derimod som værende mere generelle stressmarkører for den samlede påvirkning af de ofte komplekse blandinger af de mange forskellige miljøfarlige stoffer, der kan forekomme i havmiljøet (OSPAR 1998b).

Afhængig af typen af biomarkør kan de forskellige typer af effekter komme til udtryk med en forsinkelse i forhold til det reelle tidspunkt, hvor påvirkningen fandt sted. Derfor kan det ikke altid forventes, at responsniveauet for alle typer af biomarkører viser de samme billeder af påvirkningsgrad. Det er nødvendigt at inddrage viden om koncentrationsniveauer af potentielt skadelige miljøfarlige stoffer og deres virkemekanismer, når uønskede effekter på dyrelivet observeres i miljøet, og årsagerne dertil skal indkredses. Ofte vil det endvidere være nødvendigt at inddrage forskellige supplerende biomarkører for at styrke afklaringen af de bagvedliggende biologiske årsager og virkemekanismer (ICES/OSPAR 2008). Forekomsten af misdannelser i fisk som ålekvabbe er et eksempel på en generel biomarkør, hvor det vil være nødvendigt med yderligere undersøgelser af både de kemiske og biologiske forhold for at sandsynliggøre årsagerne.

Det overordnede formål med undersøgelsesforløbet i FORMÅL-projektet var derfor at klargøre årsagen til observerede områdemæssige forskelle i forekomsten af misdannede unger i kuld fra den levendefødende fisk ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) i det danske vandmiljø (Strand et al. 2004; Strand 2009). Hypotesen var, at de lokalt øgede forekomster af misdannede unger i kuld fra ålekvabber er forårsaget af forurening med miljøfarlige stoffer, da det er sandsynliggjort, at en række miljøfarlige stoffer, der forekommer i det danske vandmiljø, kan medføre toksiske effekter, som kan lede til bl.a. misdannelser i fisk (Stuer-Lauridsen et al. 2008; Halling-Sørensen et al. 2008).

Test af hypotesen og opfyldelse af det overordnede formål vil forudsætte kendskab til både miljøets og de voksne ålekvabbers samt ungers belastning med miljøfarlige stoffer og sammenholdelse med effektniveauet i ålekvabber beskrevet

vet ved forekomsten af misdannede unger samt forskellige andre typer af biomarkører. Biomarkører inddrages, da de kan styrke beskrivelsen af de biologiske årsager og virkemekanismer, der kan ligge til grund for de fundne misdannelser.

De anvendte biomarkører, hvor resultaterne gennemgås i denne delrapport II, omfatter:

- vitamin A, E og B i æg eller unger
- steroider i blod eller ovarievæske fra voksne hunner
- aktivitet af CYP1A afgiftningenszymer i lever fra voksne hunner
- PAH-metabolitter i galde fra voksne hunner
- lipidindholdet i voksne hunner, æg og unger

Resultaterne fra undersøgelserne af forekomsten af forskellige grupper af miljøfarlige stoffer i ålekvabbe og deres unger samt i miljøet, dvs. sediment og muslinger ved de tre udvalgte undersøgelseslokaliteter, gennemgås i to andre selvstændige delrapporter, delrapport I og delrapport III.

I denne undersøgelse blev der valgt lokaliteter ved Roskilde og Frederiksværk i hhv. den sydlige og nordlige del af Roskilde Fjord-systemet, hvor tidligere undersøgelser i forbindelse med NOVANA-overvågningen har vist forhøjet forekomst af misdannede ålekvabbeunger (Strand et al. 2004; Stuer-Lauridsen et al. 2008). Derudover vurderes populationerne her også at være store nok til at få et tilstrækkeligt antal fisk indsamlet, og kontamineringsprofilen med miljøfarlige stoffer vurderes at være forskellig mellem de to områder. Som referencestation blev udvalgt området ved Agersø i Storebælt, da den betragtes som den generelt mindst belastede station med større vandudveksling end på de andre stationer. Stationerne i Roskilde Fjord er placeret tæt på større byer og i mere aflukkede fjordområder med lavere vandudveksling.

Undersøgelsen omfattede en udvidet prøvetagning af ålekvabber i forhold til den normale NOVANA-prøvetagning i november, idet indsamlingen forløb over tre perioder i august, september og november 2009. Indsamlingen af ålekvabber mislykkedes dog ved Agersø i september.

I august var æggene lige blevet befrugtet, men der var endnu ingen decideret embryon- eller ungeudvikling. Derimod var ungeudviklingen i fuld gang ved prøvetagningen i september (middellængde  $21,5 \pm 2,3$  mm) og november (middellængde  $30,7 \pm 2,7$  mm), og ungerne kunne derfor til disse tidspunkter undersøges for forekomsten af misdannelser og andre typer af fejludvikling.

Karakterisering af unormal udvikling hos ålekvabbeunger består af 10 typer af fejludviklede unger, som beskrevet i den tekniske anvisning for NOVANA (Strand & Dahllöf 2005) og sammenstillet i *tabel 1*.

*Tabel 1. Karakterisering af forskellige typer af fejludviklede unger i kuld fra ålekvabbe, efter Strand & Dahllöf 2005.*

0	Befrugtede æg eller embryo, der lige er klækket (< 10 mm)
A	Dødt unger uden misdannelser, < 10 mm
B	Unger med misdannelser i blommesæk eller indvolde
C	Unger med 'vinkelknæk' på rygrad
D	Unger med spiralformet rygrad
E	Unger med defekt på øjne eller manglende øjne
F	Unger med misdannelser i hovedet
G	To sammenvoksede unger, evt. som siamesisk tvilling
H	Andre abnormiteter, evt. som kalcificeret unger eller sammenfiltrede klynger
I	Signifikant mindre unger, 'dværgvækst'

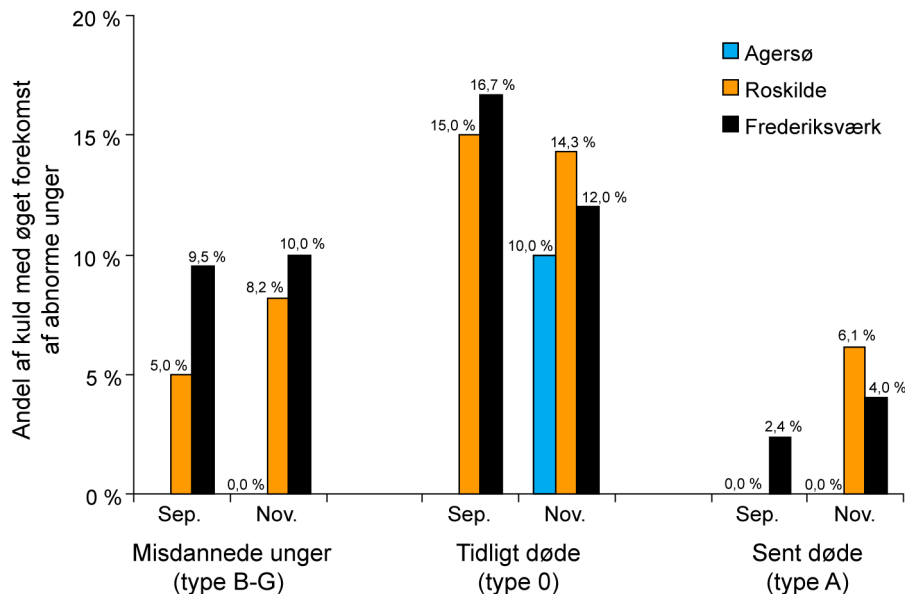
Man skal være opmærksom på, at denne karakterisering af markante synlige misdannelser ikke udelukker andre ikke umiddelbart synlige skadelige effekter på ungeudviklingen, fx i form af skader på det neurologiske system eller blodkredsløbet.

### **Forekomsten af fejludviklede ålekvabbeunger i 2009**

Undersøgelserne i 2009 viste, at ligesom tidligere år var der en forhøjet forekomst af misdannede unger i ålekvabbernes kuld på lokaliteterne ved Roskilde og Frederiksværk.

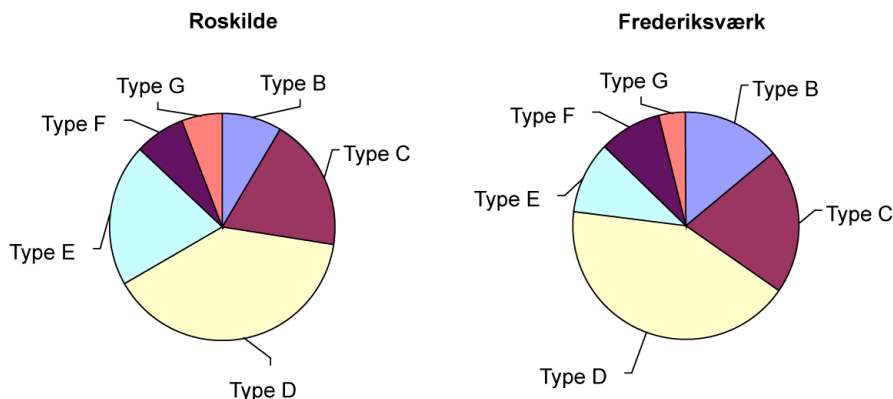
Ved Roskilde havde 5,0 % og 8,2 % af ålekvabberne i hhv. september og november en øget forekomst, dvs. mere end 5 % af misdannede unger (type B-G) i de enkelte kuld. Ved Frederiksværk var andelen af kuld med øget forekomst af misdannede unger oppe på 9,5 % og 10,0 % i hhv. september og november. Derimod havde ingen af de undersøgte kuld ved referencestationen Agersø i november mere end 5 % misdannede unger (*figur 1*).

Desuden var Roskilde og Frederiksværk i 2009 de to områder, hvor der var den højeste forekomst af ålekvabber med mere end 5 % af de andre typer af fejludviklede unger i kuldene, hhv. tidligt døde unger (type 0) og sent døde unger (type A) (*figur 1*).



Figur 1. Forekomsten af ålekvabbekuld med en øget forekomst (> 5 % pr. kuld) af misdannede unger (type B-G), tidligt døde unger (type 0) og sent døde unger (type A). Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvabber ved Agersø i september.

Fordelingen mellem de forskellige typer af misdannede unger var nogenlunde ens ved Roskilde og Frederiksværk, idet misdannelser af knoglebygningen i form af knæk (type C) eller spiralformet ryggrad (type D) var de dominerede typer. Andre typer af misdannelser forekom dog også, om end i mindre grad i disse områder.



Figur 2. Den relative fordeling mellem de forskellige typer af misdannede unger ved Roskilde (n = 69) og Frederiksværk (n = 78) i 2009. For nærmere beskrivelse af typerne B til G, se tabel 1.

Skader på eller manglende øjne (type E) var forholdsvis hyppigere ved Roskilde, hvorimod misdannede blommesække eller indre organer (type B) var lidt hyppigere ved Frederiksværk. Hoveddeformationer (type F) og siamesiske tvillinger (type G) fandtes også blandt de misdannede unger i begge områder (*figur 2*).

De efterfølgende undersøgelser af biomarkører vil blive sammenholdt med disse fund af øget forekomst af misdannede unger ved Roskilde og Frederiksværk i forhold til ved referencestationen ved Agersø i Storebælt.



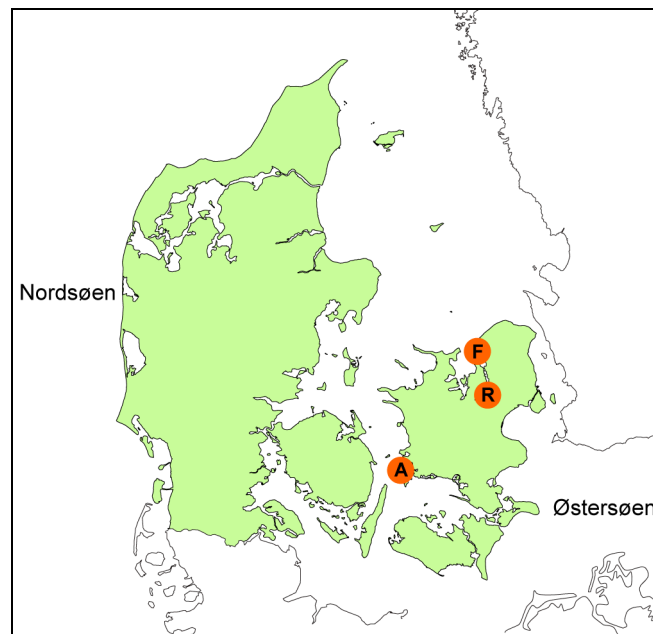


# Indsamling og prøvetagning

## Udvalgte lokaliteter

De tre undersøgelseslokaliteter i FORMÅL-projektet er kystnære områder ved hhv. Roskilde, Frederiksværk og Agersø i Storebælt (figur 3).

Lokaliteterne ved Roskilde og Frederiksværk ligger begge i Roskilde Fjord-systemet, hvor der er en række kilder fra by og industri samt en forholdsvis lille vandudskiftning. Agersø i Storebælt er udvalgt som referencestation primært pga. den forholdsvis høje vandudskiftning i området. Der findes dog potentielle forureningskilder, bl.a. i form af skibstrafik.



Figur 3. Stationskort over de 3 undersøgelseslokaliteter ved hhv. Agersø (A), Frederiksværk (F) og Roskilde (R).

## Prøveindsamling

Indsamlingen blev i alle områder udført med åleruser enten af DMU, Aarhus Universitet eller med hjælp fra lokale fritidsfiskere. Der blev i august indsamlet 20-30 hunner per station og 40-50 gravide hunner i september og november, hvor også forekomsten af misdannede ålekvabbeunger blev undersøgt. Ingen af de indsamlede fisk havde synlige ydre fysiske skader forårsaget af fangstredskaberne. I alt blev der indsamlet 307 gravide ålekvabbehunner fra de tre stationer i efteråret 2009 (tabel 2).

Tabel 2. Stationsoplysninger for de tre undersøgelseslokaliteter.

Lokalitet	Position	Dybde	Indsamlings- tidspunkter	Salinitet og temperatur	Antal indsam- lede hunner
Agersø	5512,5 ; 1111,5	2 m	20/8-09	14 ‰ ; 18°C	25
			sep-09	-	mislykket
			10/11-09	11 ‰ ; 8°C	50
Roskilde Fjord	5541,3 ; 1204,5	1 m	18 og 26/8-09	12 ‰ ; 17°C	30
			25/9 og 6/10	12 ‰ ; 14°C	40
			6/11-09	13 ‰ ; 7°C	49
Frederiksværk	5557,5 ; 1201,0	1 m	21/8-09	15 ‰ ; 19°C	21
			29/9-09	17 ‰ ; 13°C	42
			1/11-09	17 ‰ ; 8°C	50

Efter indsamlingen blev fiskene transporteret til Risø i Roskilde Fjord, hvor fiskene blev opbevaret maksimalt 24 timer i aflukkede trådbure frem til dissektion og udtagning af prøver til de forskellige delundersøgelser (tabel 3). Følgende biometriske mål blev taget på alle fisk: længde, totalvægt, vægt uden indvolde (somatisk vægt), vægt af lever, vægt af gonade (dvs. kuld hos hunner eller testikler hos hanner), antal unger i kuld, antal, længdefordeling og type af misdannede unger og anden type af fejludvikling i henhold til NOVANA teknisk anvisning (Strand & Dahllöf 2005), se også Annex 1, tabel 3.

Vævsprøver blev udtaget ved dissektion umiddelbart efter, at de voksne fisk var blevet aflivet med kraftige slag i hovedet. Først blev blod og lever udtaget, derpå æg eller unger og efterfølgende de andre vævsprøver. De udtagne prøver fra november skulle, udover at anvendes til de i dette projekt udvalgte analyser for biomarkører og miljøfarlige stoffer, også anvendes til andre supplerende undersøgelser i forbindelse med BONUS+-projekterne BALCOFISH og BEAST. Dette indebar, at flere af vævsprøverne blev opdelt i flere delprøver, fx lever og muskel der blev opdelt i henholdsvis 7 og 4 delprøver. Prøver fra august og september blev udelukkende anvendt i forbindelse med dette FORMÅL-projekt. Alle delprøver blev registeret og opbevaret separat i en biobank, så senere identifikation og analyser af individbaserede prøver kunne gennemføres.

Prøver af æg fra august og unger fra september og november blev anvendt til analyse af vitaminer A, E og B. I august, hvor æggene lige var blevet befrugtet, blev hele ovariet dissekeret ud og vejnet og derpå frosset ned med tøris i glasvials. I september og november, hvor ungeudviklingen var i fuld gang, blev kuldene først vejnet, ungerne talt, undersøgt for fejludviklede unger og længdefordelingen målt (middellængde i september:  $21,5 \pm 2,3$  mm og november:  $30,7 \pm 2,7$  mm), før de blev frosset ned med tøris i glasvials.

Ovarievæske til steroidanalyser blev i september og november frasigtet ungerne, før den videre undersøgelse af dem. Ovarievæsken blev frosset ned i glasvials på tøris.

Prøver af blod på 0,5-1 ml til steroidanalyser blev udtaget med heparin-coatet 1 ml sprøjte med kanyle. Plasma blev udtaget og frosset ned på tøris efter centrifugering i Eppendorfrør ved 2.500 rpm i 5 minutter.

Af leveren blev kun den yderste del af højre halvdel anvendt til analyse af CYP1A, som blev frosset ned i cryorør i flydende nitrogen. Leverprøver til analyse for miljøfarlige stoffer blev opbevaret i glasvials og frosset ned ved -20°C.

Prøver af galde til undersøgelse af PAH-metabolitter og muskelprøver til analyse for miljøfarlige stoffer og lipid blev frosset ned ved -20°C i henholdsvis Eppendorfrør og rilsanposer.

Prøver af lever og galde til analyse for CYP1A-aktivitet og PAH-metabolitter blev taget fra de 20 mest friskfangede fisk, der maksimalt havde været opbevaret i 24 timer efter fangsttidspunktet. De resterende fisk, der indgik i undersøgelsen af reproduktiv succes og herunder undersøgelse af forekomst af misdannede unger i kuldene, blev maksimalt opbevaret i trådbure i 3 dage.

*Tabel 3. Oversigt over de undersøgte biomarkører, udvalgt matrice, opbevaringsforhold og analysemetode.*

<b>Biomarkør</b>	<b>Matrice</b>	<b>Opbevaring af prøver</b>	
		<b>prøver</b>	<b>Analysemetode</b>
Biometri og reproduktion	Voksne gravide hunner	Undersøgt levende	Længde, vægt, antal
Vitamin A og E	Hele kuld, æg eller unger	-80°C	LC-MS
Vitamin B	Hele kuld, æg eller unger	-80°C	LC-MS
Steroider	Blod eller ovarievæske fra voksne hunner	-80°C	LC-MS
CYP1A / EROD-aktivitet	Lever fra voksne hunner	-80°C	Spektrofotometrisk enzymkinetik
PAH-metabolitter	Galde fra voksne hunner	-20°C	Fluorescens og HPLC
Lipid	Muskel fra voksne hunner	-20°C	Ekstraktion

De anvendte biomarkører blev prioriteret efter viden om relevans tilvejebragt via den videnskabelige litteratur samt mulighederne for kvalitetssikrede analyser,

der kunne opnå tilstrækkelige detektionsgrænser, som vil være relevante for analyser af biologisk materiale fra fisk. Vitamin B blev prioriteret frem for bl.a. thyroidhormoner pga. manglende muligheder for at udføre kvalitetssikrede analyser. Selenanalyser på blod blev ikke udført, da der ikke var en tilstrækkelig prøvemængde fra de sammen individer tilbage efter de udførte steroidanalyser.

Vitaminer og steroider blev analyseret i augustprøverne, hvor der endnu ikke kunne undersøges misdannelser, i 6 individer udvalgt fra de 20 hunner, hvor der også blev analyseret for PAH-metabolitter og CYP1A. Steroider blev målt i blod, eftersom der ikke er ovarievæske i august. I prøverne fra september og november blev der analyseret for vitaminer og steroider i udvalgte individer, hvor der dels forekom > 5 % misdannelser B-G per kuld (maks. 5 per station) og dels ingen misdannelser. I de tilfælde hvor der ikke var 5 kuld med høj frekvens af misdannelser, blev der udvalgt individer med den højeste grad af misdannelser (B-G).

I alt blev 68 prøver udvalgt til analyse for vitamin A, B og E, samt for steroider (progestagener, glucocortikoider, androgener og østrogener), og 100 prøver til analyse for CYP1A (inkl. protein) og PAH-metabolitter. At der ikke er et komplet sammenfald på individniveau, skyldes at det ikke var muligt at få tilstrækkelig prøvemængde fra samtlige fisk.

Lipidanalyser blev udført på de samme prøver som anvendes til analyser for miljøfarlige stoffer, se delrapport I.

# Resultater

I dette kapitel gennemgås den biologiske betydning og resultaterne for de anvendte biomarkører, som er undersøgt i ålekvabbe fra de tre lokaliteter ved Agersø, Roskilde og Frederiksværk.

Disse biomarkører er udvalgt til at styrke beskrivelsen af de biologiske årsager og virkemekanismer, der kan ligge til grund for de fundne misdannelser.

## **Vitamin A, E og B i æg og unger**

En række forskellige vitaminer har betydning for udvikling af fiskeæg og den videre vækst og udvikling af fiskeembryoner og -unger. Alle forekommende vitaminer i fisk betragtes som essentielle, men de forskellige typer af vitaminer har forskellige egenskaber, der desuden kan være afhængige af, hvilket udviklingsstadium fiskene befinder sig på (Lall & Lewis-McCrea 2007; Hamre et al. 2010).

Vitaminniveauerne samt balancen mellem forskellige vitaminer og forskellige varianter af de enkelte vitaminer er styret af en række essentielle biologiske processer dels i de voksne moderfisk, dels inde i æg og ungerne.

Vitaminindholdet i fiskeæg afhænger især af moderfiskenes fødeindtag, men en række undersøgelser har vist, at forskellige miljøfarlige stoffer kan påvirke vitaminniveauerne i fisk, bl.a. ved at påvirke genekspressionen, produktionen eller den metaboliske omdannelse af de enkelte vitaminer, fx via effekter på aryl hydrocarbon receptoren (AhR), retinoid receptorer eller cytochrom P450 (CYP)-enzymet (se fx review af Novak et al. 2008). De udvalgte vitaminer i denne undersøgelse er vitamin A, vitamin E og vitamin B (thiamin).

Vitamin A er særlig vigtig for knoglebygningen og udvikling af væv og organer i fiskeembryoner, idet det indgår som signalstof i bl.a. osteoblaster, som er celler der er ansvarlige for knoglebygning, men også i andre typer af cellers differentiering og vækst (Lall & Lewis-McCrea 2007; Hamre et al. 2010). For lave niveauer af vitamin A i moderfisk og deres æg kan derved være en direkte årsag til udvikling af misdannede ålekvabbeunger.

En række undersøgelser har påvist kobling mellem lave niveauer af vitamin A i fisk og effekter på CYP-enzymet, udvikling af oxidativt stress og forekomst af misdannelser samt belastning med miljøfarlige stoffer, herunder PAH, dioxinlignede forbindelser og pesticider (Doyon et al. 1999; Rolland 2000; Novak et al. 2008). Det tyder desuden på, at vitamin A-niveauet især har betydning for udviklingen af misdannede fiskeunger i løbet af de første to uger efter æggene er befrugtet og klækket (Villeneuve et al. 2005). Vitamin A, der i denne undersøgelse måles med LC-MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry),

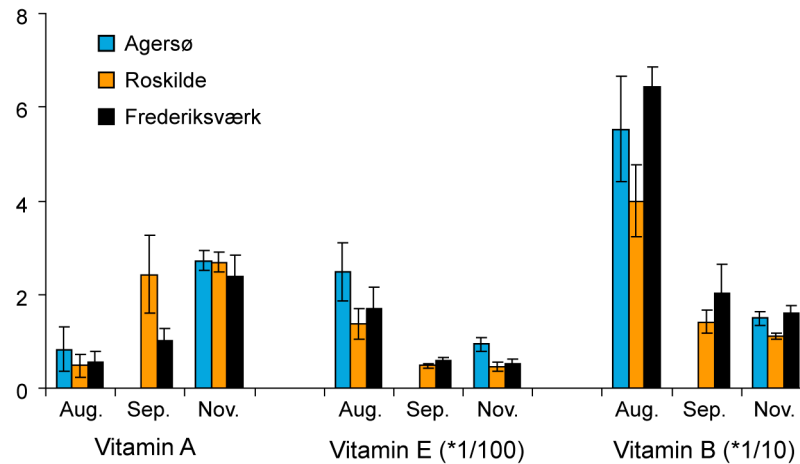
opgøres her som summen af all-trans retinol og 13-cis retinol, hvoraf 13-cis retinol udgør ca. 5-10 %.

Vitamin E er en antioxidant, der bl.a. deltager i reguleringen af redoxbalancen, og er derved vigtig for at modvirke effekter af oxidativt stress. Vitamin E virker ved at bekæmpe skadelige frie radikaler, som er dannet på grund af oxidativt stress i de knogledannende celler (osteoblaster). Vitamin E har desuden en vigtig rolle for knoglebygningen, hvilket dog mest er kendt for terrestriske hvirveldyr og i mindre grad for fisk (Lall & Lewis-McCrea 2007; Hamre et al. 2010). Derved kan et lavt niveau af vitamin E også være en årsag til udvikling af misdannelser. En undersøgelse af effekter af dioxinlignende forbindelser på udviklingen af fiskeyngel viste, at vitamin E er vigtig for at beskytte dels mod oxidativt stress, dels mod udvikling af misdannelser (Na et al. 2009). Vitamin E måles i denne undersøgelse som alfa-tocopherol ved de samme LC-MS analyser som for vitamin A.

Vitamin B, også kaldet thiamin, er ligeledes vigtig for udviklingen og vækst af fiskelarver. Lave vitamin B-niveauer i fiskeæg er bl.a. koblet til tidlig død, og det såkaldte M74-syndrom i laksefisk fra Østersøen (Amcoff et al. 2002; Vuori & Nikinmaa 2007) og de nordamerikanske søer (Fisher et al. 1998; Werner et al. 2006). Lakseyngel, der har udviklet M74-syndromet, har en meget høj dødelighed, og de typiske symptomer omfatter bl.a. neurologiske forstyrrelser og skader på blodkredsløb og indre organer (Lundstrom et al. 1999; Vuori & Nikinmaa 2007).

Mangel på vitamin B i fisk er ofte sammenkædet med et lavt niveau af antioxidant som fx vitamin E og deraf følgende oxidativt stress, som kan overføres fra moderfisk til æg. De bagvedliggende årsager til dette er endnu uafklarede og kan omfatte både biotiske og abiotiske forhold. Det er foreslået, at årsagen muligvis kan tillægges ændringer i laksens fødesammensætning pga. en høj eutrofiering og deraf ændret struktur af fødekæderne i Østersøen, men det kan ikke udelukkes, at oxidativt stress i fiskene også kan skyldes effekter fra miljøfarlige stoffer som fx dioxinlignende stoffer og andre halogenerede stoffer som fx bromerede flammehæmmere (Vuori & Nikinmaa 2007).

Vitamin B, der i denne undersøgelse også måles med LC-MS, opgøres som summen af følgende tre thiaminforbindelser: frit thiamin, thiaminmonophosphat (TMP) og thiaminpyrophosphat (TPP).



Figur 4. Indholdet af vitamin A, E og B i æg og unger fra ålekvabbe indsamlet på de tre lokaliteter i august, september og november. Enhederne for vitamin A og E er mg/kg vådvægt, og for vitamin B  $\mu\text{mol/kg}$  vådvægt. Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvabber ved Agersø i september. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelser.

Der var forskelle i vitaminniveauerne i ålekvabber fra de tre lokaliteter og på de forskellige indsamlingstidspunkter (figur 4).

Vitamin A-niveauet var noget højere ved Agersø end på de to andre stationer, og især i æggene fra august, hvilket kan tyde på, at æg fra ålekvabbe indsamlet ved Roskilde og Frederiksværk var af ringere kvalitet end dem fra Agersø. Forskellen var dog ikke signifikant. I november var niveauet generelt højere end i august og september og mere ensartet mellem de tre stationer, hvilket kan tyde på en aktiv overførsel af vitamin A fra moderfiskene til deres unger. I september, hvor der ikke var data fra Agersø, var vitamin A-niveauet i ungerne signifikant forskellige, idet de var markant højere (ANOVA;  $p < 0,01$ ) ved Roskilde end ved Frederiksværk.

For vitamin E's vedkommende ses en lignende tendens, idet indholdet i æg indsamlet i august og i unger fra november var højere i prøver fra Agersø end fra de øvrige stationer. Forskellene mellem områderne var signifikante både i august (ANOVA,  $p < 0,05$ ), september (ANOVA,  $p < 0,05$ ) og november (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Dette tyder igen på, at æg fra Roskilde og Frederiksværk har en ringere kvalitet, idet de er mindre beskyttede mod oxidativt stress. Modsat for vitamin A falder niveauet af vitamin E fra æg til unger, hvilket kan tyde på, at det i mindre grad løbende overføres fra moderfisk til ungerne.

Vitamin B-niveauerne var lavest ved Roskilde, men til gengæld var Frederiksværk højest og nogenlunde på niveau med Agersø. Roskilde var signifikant for-

skellig fra Agersø både i august (ANOVA,  $p < 0,05$ ) og november (ANOVA,  $p < 0,01$ ). I denne sammenhæng tyder det på, at æg fra Roskilde har den ringeste kvalitet. Ligesom for vitamin E falder niveauet af vitamin B fra æg til unger over tid, hvilket muligvis tilsvarende kan tyde på, at dette vitamin i mindre grad løbende overføres fra moderfisk til ungerne.

### **Steroider i blod og ovarievæske fra voksne hunner**

Ligesom for vitaminer kan en række forskellige steroider, dvs. hormoner, have stor betydning for den videre vækst og udvikling efter fiskeæg er klækket. De forskellige steroider har forskellige virkemekanismer, og de har ikke kun betydning for kønsudvikling. Steroidniveauerne samt balancen mellem forskellige steroider er styret af en række essentielle biologiske processer i både de voksne moderfisk og inde i æg og ungerne.

Mange miljøfarlige stoffer virker hormonforstyrrende og kan derved påvirke hormonbalancen i fisk, bl.a. ved at påvirke særlige receptorer for genekspression, produktionen eller den metaboliske omdannelse af de enkelte steroider, fx via effekter på cytochrom P450 (CYP)-enzymet. Nedsatte steroidniveauer kan skyldes effekter som bl.a. hæmning af processer i bl.a. steroid-producerende organer som hypothalamus eller hypofysen, nedsatte kolesterolniveauer, påvirkning af aktiviteten af de forskellige enzymer der indgår i steroidgenesen eller øget metabolisme i leveren og deraf følgende ekskretion (Kime 1995).

Steroiderne blevet analyseret i de voksne moderfisk, hhv. i blodet fra ålekvabber indsamlet i august og i ovarievæske fra ålekvabber indsamlet i september og november. De kan inddeles i følgende fire overordnede grupper:

- **Progesteroner:** Pregnenolone, progesterone og  $17\alpha$ -20  $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -P). Progesteroner indgår bl.a. ved ægløsning og graviditet. For høje niveauer kan medføre bl.a. udvikling af misdannelser hos pattedyr (Christian et al. 2007). Der er efter vores vidende ikke beskrevet tilsvarende effekter for fisk.
- **Glucocortikoider:** Cortisone og cortisol (hydrocortisone). Niveauet af glucocortikoider som cortisol i fisk øges typisk ved forskellige stress-situationer, inkl. påvirkninger af miljøfarlige stoffer (Mommsen et al. 1999).
- **Androgener:** Dehydroepiandrosterone (DHEA), Androstanediol, Androstenedione, Testosterone, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT), Ketotestosterone, 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione (11 $\beta$ -OHA) og 11 $\beta$ -hydroxytestosterone (11 $\beta$ -OHT). Androgener er de hanlige kønshormoner og har indflydelse på den tidlige vækst og udvikling af fisk (Kortner et al. 2009).
- **Østrogener:** Estrone (E1) og Estradiol (E2). Østrogener er de hunlige kønshormoner og har især indflydelse på reproduktion og kønsudvikling, men

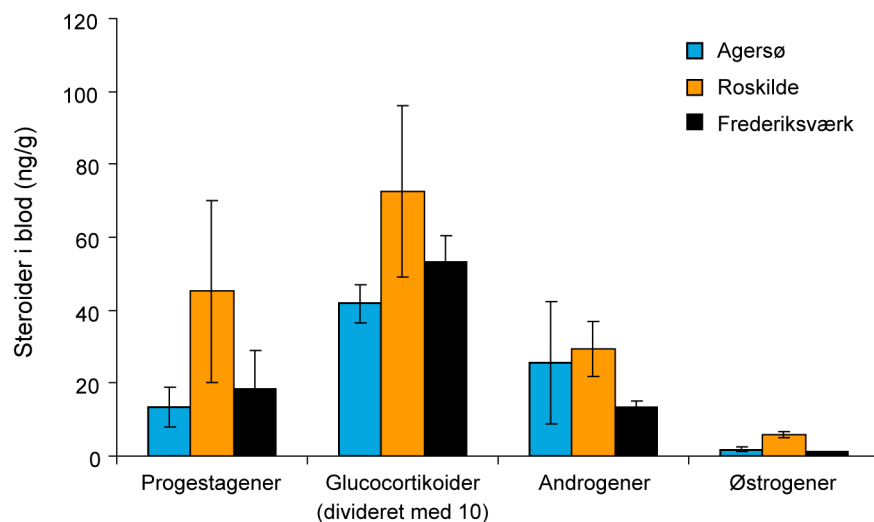


undersøgelser har også vist, at høje østrogenniveauer kan forårsage misdannelser i fisk (Urushitani et al. 2002).

I denne delrapport er tolkningen af de områdemæssige forskelle baseret på de målte koncentrationsniveauer af disse fire grupper af steroider, men det kan ikke udelukkes, at eventuelle effekter på hormonsystemet i højere grad vil vise sig som udslag i niveauerne af de enkelte specifikke steroider, eller som de relative forhold imellem de forskellige typer af steroider.

Overordnet er der betydelige områdemæssige forskelle i steroidniveauerne målt i både blod fra voksne ålekvabber ved indsamlingen i august og i ovarievæsken fra indsamlingen i september og november (*figur 5 og 6*).

Ålekvabber indsamlet ved Roskilde i august havde et generelt markant højere niveau af alle 4 grupper af steroider i blodet. Fiskene fra Agersø havde det laveste niveau af hhv. progestagener og glucocortikoider, hvorimod fiskene fra Frederiksværk havde det laveste niveau af androgener og østrogener. Kun niveauet af østrogener ved Roskilde var dog signifikant forskellig fra Agersø (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

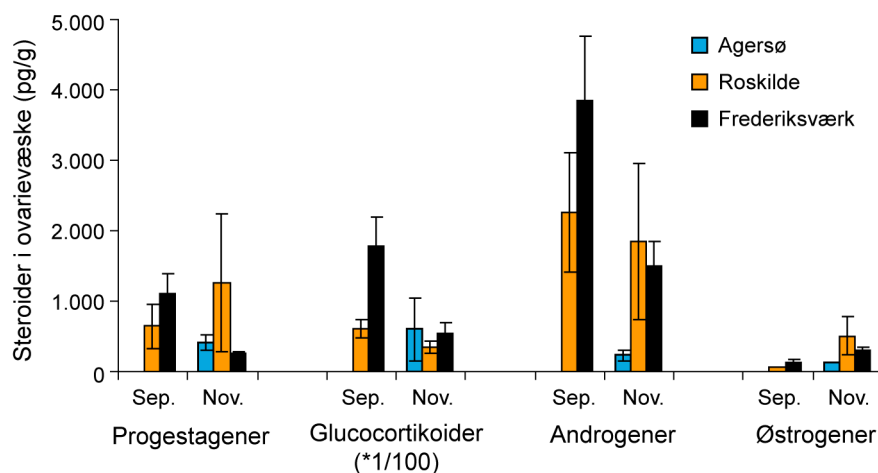


*Figur 5. Steroidniveauet i blod fra de voksne hunner indsamlet i august 2009. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelse.*

I november havde ålekvabberne indsamlet ved Roskilde stadig det højeste niveau af progestagener, androgener og østrogener målt i ovarievæsken. Niveauet af glucocortikoider var dog blevet mere udlignet mellem de tre lokaliteter, og fiskene fra Roskilde havde endda det laveste niveau. Dog var kun ni-

veauet af progestagener og østrogener ved Frederiksværk signifikant forskellig fra Agersø (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Ved indsamlingen i september, hvor der ikke forelå data fra Agersø, var niveauet af de fire grupper af steroider generelt højere i fiskene fra Frederiksværk end i fisk fra Roskilde. Niveauet af glucocortikoider og østrogener var signifikant højere (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

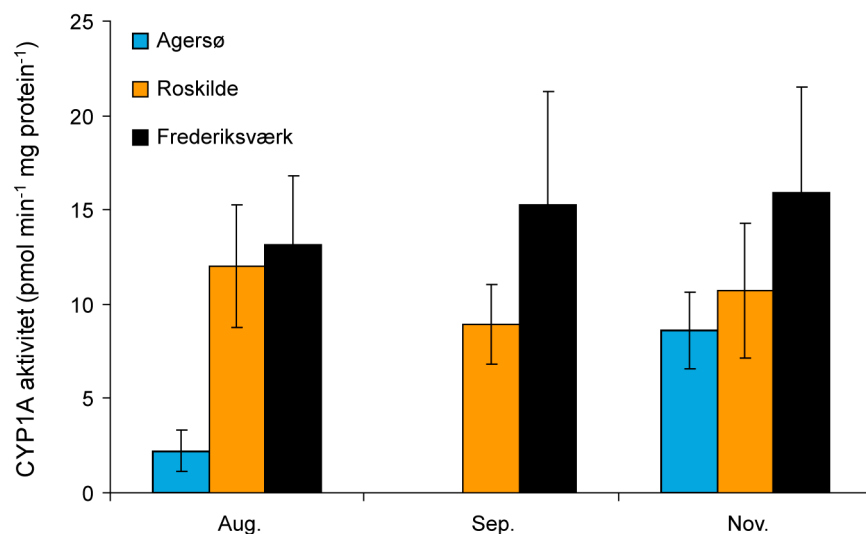


Figur 6. Steroidniveauet i ovarievæske fra de voksne hunner indsamlet i september og november 2009. Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvabber ved Agersø i september. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelser.

### CYP1A-aktivitet i lever fra voksne hunner

I alle fisk findes cytochrom P450-medierede afgiftningsevenzymer, som indgår i den oxidative metabolisme, kaldet fase-I-enzym. Udover at omdanne en del af organismens egne stoffer som vitaminer og hormoner, omdanner disse enzymer, og især enzymerne af typen CYP1A, organiske miljøfarlige stoffer såsom PAH og dioxinlignende stoffer, så de bliver mere vandopløselige og nemmere at udskille. En vigtig egenskab ved disse enzymer er, at de er inducérbare, dvs. at aktiviteten øges som respons på en stigende påvirkning. En forhøjet CYP1A-enzymaktivitet medfører bl.a. oxidativt stress i form af en øget produktion af reaktive metabolitter med særlig høj toksicitet, fx epoxider af PAH, der kan have en mutagen og kræftfremkaldende virkning ved at forvolde skader på DNA. Disse egenskaber gør CYP1A anvendelig som biomarkør. Man skal dog være opmærksom på, at sæsonmæssige variationer i enzymaktiviteten er velkendte, og forskelle kan også skyldes bl.a. kønsforskelle og reproduktiv status. Det er derfor vigtigt, at der sammenlignes grupper af fisk indsamlet under ensartede forhold.

Aktiviteten af CYP1A-afgiftningenszymer måles som EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) i S9 fraktionen af en homogeniseret lever fra de gravide ålekvabehunner og normaliseres til proteinniveauet målt ved Bradford-metoden.



Figur 7. Aktiviteten af CYP1A målt som EROD i lever fra de voksne hunner indsamlet i august, september og november 2009. Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvabber ved Agersø i september. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelser.

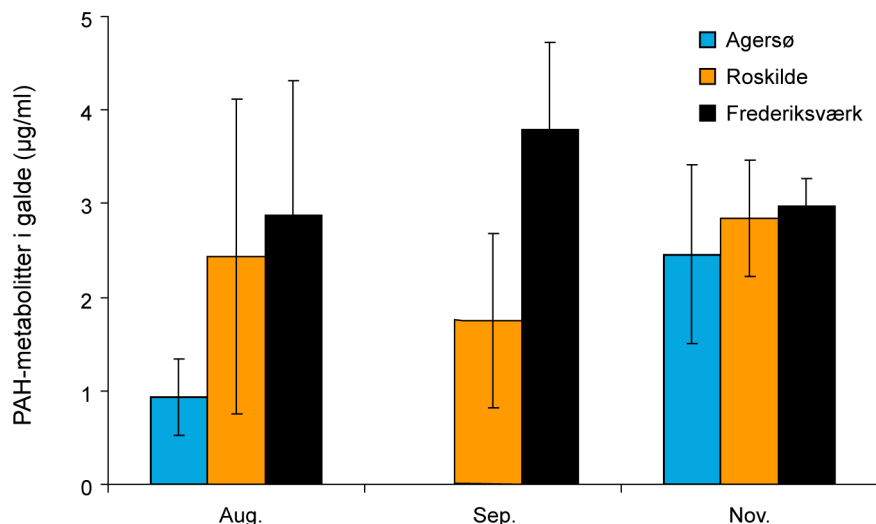
Undersøgelsen viste, at der var områdemæssige forskelle i CYP1A-enzymaktiviteten, der i nogen grad også afhang af indsamlingstidspunktet. På alle tidspunkter blev den højeste enzymaktivitet målt i fisk fra Frederiksværk, efterfulgt af fisk fra Roskilde. I august var den markant laveste enzymaktivitet ved Agersø, men her var aktiviteten steget noget ved novemberindsamlingen (figur 7). I august var CYP1A-aktiviteten både ved Roskilde og Frederiksværk signifikant forskellig fra Agersø (ANOVA,  $p < 0,01$ ), men i november var kun Frederiksværk signifikant forskellig (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Dette tyder på, at ålekvabber fra Frederiksværk efterfulgt af fisk fra Roskilde var udsat for den højeste påvirkning af miljøfarlige stoffer som PAH, dioxinlignende forbindelser eller andre flade polyaromatiske stofgrupper.

### PAH-metabolitter i galde fra voksne hunner

Skadelige PAH'er (dvs. tjærestoffer) bliver forholdsvis hurtigt omsat af CYP1A-enzymet til mere vandopløselige metabolitter (se ovenfor), som derved nemmere udskilles fra fisk, primært via galde og urin. Niveauerne af PAH-metabolitter i galde kan derfor anvendes som et mål for belastning med PAH, men det

skal ses i forhold til, i hvilken grad CYP1A-enzymet er induceret og derved i højere grad har potentiale til at danne disse metabolitter. Den primære PAH-metabolit i fiskegalde er 1-hydroxypyren.



Figur 8. Indholdet af PAH-metabolitter, angivet som 1-hydroxypyrenækvivalenter i galde fra de voksne hunner indsamlet i august, september og november 2009. Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvabber ved Agersø i september. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelser.

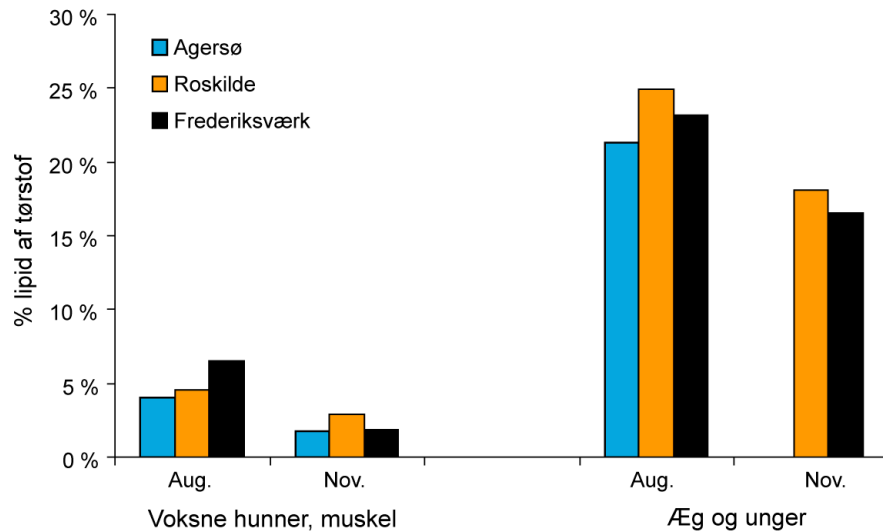
Ligesom for CYP1A-aktiviteten viser denne undersøgelse af PAH-metabolitter i fiskegalde, at der er områdemæssige forskelle, der til dels synes at afhænge af indsamlingstidspunktet. Ved alle indsamlinger blev det højeste niveau målt i fisk fra Frederiksværk, efterfulgt af fisk fra Roskilde. I august var det markant laveste niveau af PAH-metabolitter ved Agersø, men niveauet var her steget noget ved novemberindsamlingen (figur 8). Kun i august og september var forskelle mellem områderne signifikante (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### Lipid i muskel fra voksne hunner samt æg og unger

Lipidniveauet i fisk kan anvendes som et mål for fisks tilgængelige energireserver og derved, hvor god ernæringstilstand de er i (Lloret & Planes 2003). Derudover er lipider en vigtig forudsætning for dannelsen af kolesterol, der er forudsætningen for de andre steroider, der dannes via steroidgenesen (Kime 1995).

I denne undersøgelse blev det totale lipidindhold analyseret i de sammenpuljede vævsprøver af hhv. muskel fra voksne hunner og æg og unger fra august og november, hvor der også blev analyseret for miljøfarlige stoffer. Dette indebærer,

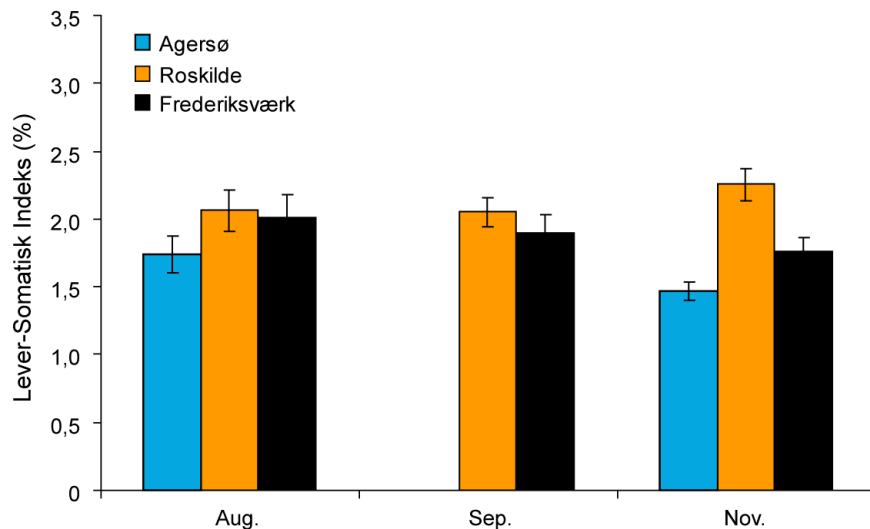
at der ikke var data fra september og ikke for unger fra Agersø i november måned.



Figur 9. Lipidindholdet i hhv. muskel fra de voksne hunner og æg og unger indsamlet i august og november 2009. Der er ikke analyseret for lipid i unger fra Agersø i november. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelse.

Undersøgelsen viste kun en mindre områdemæssig forskel i lipidindholdet i muskel fra de voksne hunner og i æg indsamlet i august, hvor lipidniveauerne var lidt lavere ved Agersø end ved Roskilde og Frederiksværk (figur 9).

De biometriske data viste ligeledes, at både det lever-somatiske indeks (LSI) og konditionsindekset (KI) var lavest i ålekvabber fra Agersø. Forskellene var signifikante både i august (ANOVA,  $p < 0,05$ ) og november (ANOVA,  $p < 0,01$ ), se figur 10. Dette kan tyde på, at fiskene fra Agersø havde mindre energireserver tilgængelige, hvilket eventuelt relaterer til et mindre eller et anderledes udvalg af foretrukne fødeemner end ved Frederiksværk og Roskilde.



Figur 10. Lever-Somatisk Indeks (LSI) hos de voksne hunner indsamlet i august, september og november 2009. Bemærk, at det ikke lykkedes at indsamle ålekvalbe ved Agersø i september. Usikkerheder er vist som  $\pm$ standardafvigelse.

På den anden side kan det ikke udelukkes, at det højere lipidniveau, ligesom højere LSI-værdier, kan være et respons på en forstyrret mobilisering, metabolisme og deraf følgende lipiddeponering (Kime 1995). LSI-værdier og/eller andre histopatologiske forandringer i leveren hos ålekvalbe indsamlet i forskellige industripåvirkede områder bl.a. i England (Stentiford *et al.* 2003) og i Sverige (Vetemaa *et al.* 1997; Sturve *et al.* 2005) og i laboratorieforsøg med ålekvalbe har man bl.a. fundet signifikante øgninger i LSI-værdier ved eksponering til PAH (Celandier *et al.* 1994). En række andre miljøfaktorer kan dog også have indflydelse på LSI-værdierne.

## Diskussion

Der var en overordnet tendens til, at ålekvabber fra Roskilde og Frederiksværk, hvor de højeste andele af kuld med en øget forekomst af misdannede unger findes, havde et afvigende responsniveau af biomarkørerne sammenlignet med referencestationen ved Agersø, hvor responsniveauet formodes at svare til en normal tilstand.

Dette gjaldt både for niveauerne af vitaminer og steroider, CYP1A, PAH-metabolitter og lipidindhold, men hvilke og i hvilket omfang afhænger dels af den enkelte biomarkør, dels af undersøgelsestidspunktet. Forskellene var især markante i august, hvor 11 ud af de 12 biomarkører i ålekvabber fra Roskilde og Frederiksværk havde et responsniveau, der afveg mere end 25 % i forhold til i fisk fra Agersø (*tabel 4*). For flere af biomarkørerne var forskellen i responsniveauet endnu større, fx var afvigelsen for 7 ud af de 12 biomarkører større end 50 %. I september og november adskilte responsniveauet for cirka halvdelen af biomarkørerne ved Roskilde og Frederiksværk sig med mere end 25 % fra niveauerne ved Agersø, se *tabel 5* og *6*.

De indbyrdes forskelle mellem Roskilde og Frederiksværk er dog ikke helt entydige, da Roskilde adskiller sig mest i august og november og Frederiksværk mest i september. I den anledning skal det nævnes, at pga. en mislykket indsamling af ålekvabbe ved Agersø i september, er vurderingen af data fra september udført relativt i forhold til data fra ålekvabbe fra Agersø indsamlet ved de to andre tidspunkter, se også bemærkning til *tabel 5*.

*Tabel 4. Sammenligning af middelværdier for responsniveauet for de forskellige anvendte biomarkører i ålekvabbe ved de tre lokaliteter i august. Farveskalaerne angiver responsniveauet i forhold til referencestationen ved Agersø på hhv. mindre end +/- 25 % (hvid), mellem +/- 25 % og > +/- 50 % (lysegrå) og større end +/- 50 % (mørkegrå).*

August	Agersø	Roskilde	Frederiksværk
KI, voksne	0,42 %	0,52 %	0,53 %
LSI, voksne	1,74 %	2,06 %	2,01 %
Lipid, voksne	1,8 %	4,5 %	6,5 %
CYP1A, voksne	2,2	12,0	13,1
PAH-metabolitter, voksne	0,93	2,43	2,87
Vitamin A, æg	0,83	0,47	0,57
Vitamin E, æg	248	137	170
Vitamin B, æg	55	40	64
Progestagener, voksne	13,4	45,2	18,3
Glucocortikoider, voksne	41,8	72,5	53,2
Androgener, voksne	25,6	29,3	13,5
Østrogener, voksne	1,8	5,9	1,1

Tabel 5. Sammenligning af middelværdier for responsniveauet for de forskellige biomarkører i ålekvabbe i september. Farveskalaerne angiver responsniveauet i forhold til referencestationen ved Agersø på hhv. mindre end +/- 25 % (hvid), mellem +/- 25 % og > +/- 50 % (lysegrå) og større end +/- 50 % (mørkegrå). Vurdering af data fra september fra Frederiksværk og Roskilde er udført relativt i forhold til enten data fra Agersø i november (\*), eller en middel af data fra Agersø i august og november (\*\*), eventuelt justeret for en relativ tidslig forandring af data fra september til november (\*\*\*)

September	Agersø	Roskilde	Frederiksværk
Type (B-G)*	-	5,0 %	8,2 %
Type 0*	-	15,0 %	16,7 %
Kuld størrelse*	-	103,9	109,5
Længde af unger***	-	22,4	20,6
KI**	-	0,49 %	0,47 %
LSI**	-	2,05 %	1,90 %
CYP1A**	-	8,9	15,3
PAH-metabolit**	-	1,75	3,80
Vitamin A*	-	2,43	1,01
Vitamin E*	-	47	58
Vitamin B***	-	14,1	20,2
Progestagener*	-	643	1118
Glucocortikoider	-	609	1783
Androgener*	-	2256	3839
Østrogen*	-	59	135



Tabel 6. Sammenligning af middelværdier for de forskellige biomarkører i ålekvabbe i november. Farveskalaerne angiver responsniveauet i forhold til referencestationen ved Agersø på hhv. mindre end +/- 25 % (hvid), mellem +/- 25 % og > +/- 50 % (lysegrå) og større end +/- 50 % (mørkegrå).

November	Agersø	Roskilde	Frederiksværk
Type (B-G)	0,0 %	9,5 %	10,0 %
Type 0	10,0 %	14,3 %	12,0 %
Kuld størrelse	89,2	102,8	82,3
Længde af unger	29,8	31,7	30,6
KI	0,41 %	0,46 %	0,40 %
LSI	1,47 %	2,25 %	1,76 %
Lipid, voksne	-	2,9 %	1,8 %
CYP1A	8,6	10,7	15,9
PAH-metabolit	2,46	2,85	2,98
Vitamin A	2,72	2,69	2,39
Vitamin E	93	45	54
Vitamin B	14,9	11,1	15,9
Progestagener	413	1251	255
Glucocortikoider	607	352	541
Androgener	230	1849	1505
Østrogener	125	508	309

De lavere niveauer af både vitamin A og E i æg ved Roskilde og Frederiksværk sammenlignet med ved Agersø i august kan være et tegn på, at disse æg er mere sårbare for at udvikle misdannede unger, når de klækkes, da både vitamin A og E vides at være vigtige for fisks knoglebygning. Niveauer af vitamin B er desuden lavere i æg fra Roskilde, men ikke ved Frederiksværk. Ved de senere undersøgelser af vitaminer i ålekvabbeunger indsamlet i september og november, var niveauet af vitamin E fortsat lavere ved disse stationer sammenlignet med Agersø. Vitamin A var stadig lavest ved Frederiksværk, og vitamin B ved Roskilde.

CYP1A-aktiviteten i leveren og niveauet af PAH-metabolitter i galde fra de gravide hunner, især i august, adskiller sig tilsvarende ved Roskilde og Frederiksværk, hvilket styrker formodningen om, at de lavere vitaminniveauer er forårsaget af en øget belastning med visse grupper af miljøfarlige stoffer og ikke forskelle i andre biotiske og abiotiske forhold så som fødegrundlaget. Flere udenlandske undersøgelser har tidligere sammenkædet lave niveauer af vitamin A i fiskeæg med effekter på CYP-enzymssystemet, udvikling af oxidativt stress og forekomst af misdannelser samt belastning med miljøfarlige stoffer, herunder PAH, men også dioxinlignede forbindelser og andre halogenerede stofgrupper

som pesticider og bromerede flammehæmmere (fx Doyon et al. 1999; Rolland 2000; Novak et al. 2008).

Ligeledes er lave niveauer af antioxidanten vitamin E blevet forbundet med en øget risiko for oxidativt stress fra miljøfarlige stoffer (fx Na et al. 2009). Niveaulet af vitamin B i ålekvabber følger dog kun ved Roskilde og ikke ved Frederiksværk de tilsvarende lavere vitamin E-niveauer. Andre udenlandske undersøgelser med laksefisk sammenkæder dog niveaulet af vitamin B med niveaulet af antioxidanter som fx vitamin E (Vuori & Nikinmaa 2007).

De markant højere niveauer af bl.a. glucocortikoider i blodet i ålekvabberne i august fra især Roskilde, men også Frederiksværk, tyder på, at disse fisk var udsat for en højere grad af stress, som muligvis kan være forårsaget af miljøfarlige stoffer. Yderligere kan det højere niveau af progestagener og østrogener i ålekvabber indsamlet ved især Roskilde muligvis udgøre en risiko for at ungerne i højere grad udvikler misdannelser. Det er umiddelbart vanskeligt at vurdere, om det højere niveau af androgener eventuelt også kan have en betydning i denne sammenhæng.

At de områdemæssige forskelle i steroidniveauerne ligesom for vitaminerne også synes at afhænge af indsamlingstidspunktet skyldes sandsynligvis, at steroidgenesen er en dynamisk proces, hvor niveauerne og balancen mellem steroider ændrer sig igennem hele den reproduktive periode, og sådanne forandringer kan ske selv inden for ganske korte tidsperioder (Kime 1995). Desuden vil de forskellige typer af steroider formentlig ikke alle i samme grad blive overført fra blod til ovariet. En anden mulig faktor kan være, at både det ydre belastningsniveau med forskellige grupper af miljøfarlige stoffer og den i ålekvabberne interne fordeling mellem forskellige organer og deraf følgende påvirkning af ålekvabberne også kan variere mellem august, september og november for de tre undersøgte lokaliteter i 2009.

Det er umiddelbart vanskeligt at vurdere, hvorvidt de områdemæssige forskelle i steroidniveauerne eventuelt kan skyldes decideret øget belastning med hormonforstyrrende stoffer, eller eventuelt beror på andre biotiske eller abiotiske forhold.

Ligeledes er de områdemæssige forskelle i lipidindholdet sammen med lever-somatisk indeks (LSI) og konditionsindekset (KI) vanskelige at vurdere i relation til en øget belastningsgrad med miljøfarlige stoffer, da disse også kan være forårsaget af andre miljøforhold som fx forskelle i udvalget af de foretrukne fødeemner.

Det skal bemærkes, at de ovennævnte vurderinger af de områdemæssige forskelle i responsniveauet for de forskellige biomarkører er baseret dels på data, som er sammenstillet på stationsniveau, dels på de totale niveauer af de overordnede grupper af både vitaminer og steroider. Det kan ikke udelukkes, at eventuelle effekter på vitamin- eller hormonsystemet bedre kan vurderes på baggrund af en mere detaljeret vurdering dels på individniveau for hver undersøgt ålekvabbe, dels af de enkelte specifikke varianter af vitaminer og/eller steroider, eller som de relative forhold imellem dem.

Den overordnede vurdering af disse biomarkørundersøgelser indikerer, at årsagen til den øgede forekomst af ålekvabbe med misdannede unger ved Roskilde og Frederiksværk i september og november kan relateres til lavere niveauer af vitamin A, vitamin E og vitamin B, og at forskelle i vitaminer mellem Roskilde og Frederiksværk skyldes forskelle i eksponering for miljøfarlige stoffer. De lavere vitaminniveauer kan skyldes effekter på CYP-enzymssystemet og/eller oxidativt stress, som er forårsaget af en øget belastning med miljøfarlige stoffer som PAH, dioxinlignede forbindelser og/eller andre halogenerede stofgrupper som pesticider og bromerede flammehæmmere. Det skal i denne forbindelse nævnes, at disse stoffer i regelen vil forekomme som komplekse blandinger i vandmiljøet, og at det ikke kan udelukkes, at andre grupper af miljøfarlige stoffer, fx tungmetaller som kobber og kviksølv, der også kan forårsage oxidativt stress i fisk (Ferreira et al. 2008), kan have effekter på niveauerne af de essentielle vitaminer, der er vigtige for knoglebygningen i fisk.



# Konklusioner og anbefalinger

Der er indikationer på, at årsagen til den øgede forekomst af ålekvabbekuld med misdannede unger ved Roskilde og Frederiksværk kan relateres til lavere niveauer af vitamin A, E og B. For vitamin E, som bl.a. beskytter mod oxidativ stress, er det tilfældet både i august og i november. De laveste niveauer af vitamin A fandtes gennemgående ved Frederiksværk, og de lavest niveauer af vitamin B blev fundet ved Roskilde. Dette kan skyldes tilstedeværelse af forskellige typer af miljøfarlige stoffer. Tilsvarende adskiller CYP1A-aktiviteten i leveren og niveauet af PAH-metabolitter i galde fra de gravide hunner sig især i august ved Roskilde og Frederiksværk i forhold til Agersø. Dette styrker formodningen om, at de lavere vitaminniveauer er forårsaget af en øget belastning med visse grupper af miljøfarlige stoffer, og ikke forskelle i andre biotiske og abiotiske forhold så som forskelle i fødegrundlaget.

Konklusionerne fra måleprogrammet er, at:

- der indikeres en sammenhæng mellem vitamin A, B og E samt CYP1A-aktiviteten og forekomst af misdannelser,
- PAH-metabolitter viser forskelle i PAH-eksponering, som også er koblet til misdannelsesfrekvensen,
- en endelig tolkning af de forskellige responser i steroider kræver yderligere viden om misdannelsers kobling til hormonbalancen i ålekvabbe.

Det anbefales, at:

1. der gennemføres kontrollerede eksponeringsforsøg, hvor de samme biomarkører måles for bedre at forstå, hvordan forskellige stofgrupper påvirker disse markører. Ved et kontrolleret forsøg fjernes eventuelle forskelle i fødetilgang.
2. prøver fra FORMÅLs biobank gøres tilgængelige for andre forskningsprojekter, hvor ålekvabben er i fokus, så kompletterende og opfølgende analyser kan foretages for at tilvejebringe et mere fyldigt billede af biomarkørrespons.



# Referencer

- Amcoff, P., Åkerman, G., Tjänlund, U., Börjeson, H., Norrgren, L., Balk, L. 2002: Physiological, biochemical and morphological studies of Baltic salmon yolk-sac fry with an experimental thiamine deficiency: relations to the M74 syndrome. - *Aquatic Toxicology* 61: 15-33.
- Celander, M., Näf, C., Bromand, D. & Förlin L. 1994: Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P450 1A and conjugating enzymes in the viviparous blenny (*Zoarces viviparus*) treated with petroleum hydrocarbons. - *Aquatic Toxicology* 29(3-4): 183-196.
- Christian, M.S., Brent, R.L. & Calda, P. 2007: Embryo-fetal toxicity signals for 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone caproate in high-risk pregnancies: A review of the non-clinical literature for embryo-fetal toxicity with progestins. - *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 20: 89-112.
- Doyon, C., Fortin, R., Spear, P.A. 1999: Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and Abitibi Region, Quebec. - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 56: 1428-1436.
- Ferreira, M., Caetano, M., Costa, J., Pousão-Ferreira, P., Vale, C. & Armanda Reis-Henriques, M. 2008: Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. - *Science of The Total Environment* 407: 638-646.
- Fisher, J.P., Brown, S.B., Wooster, G.W., Bowser, P.R. 1998: Maternal blood, egg and larval thiamin levels correlate with larval survival in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). - *The Journal of Nutrition* 128: 2456-2466.
- Halling-Sørensen, B., Petersen, G., Stuer-Lauridsen, F., Slothuus, T., Kinnberg, K., Bjerregaard, P. 2008: Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk. Indkredsning af stoffer ud fra deres biokemiske virkemekanisme. Rapport fra By- og Landskabssyrelsen 2008, 112s.  
<http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-92256-41-6/pdf/978-87-92256-42-3.pdf>
- Hamre, K., Krossøy, C., Lock, E.-J., Moren, M. 2010: Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. - *Aquaculture Research* 41: 745-750.
- ICES/OSPAR 2008: Report of the Fourth ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open Sea Areas (WKIMON IV), 5–7 February 2008, ICES, Copenhagen, Denmark, ICES CM 2008/ACOM:49, 80 pp.
- Kime, D.E. 1995: The effects of pollution on reproduction in fish. - *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5: 52-96.
- Kortner, T.M., Rocha, E. & Arukwe, A. 2003: Androgenic Modulation of Early Growth of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) Previtellogenic Oocytes and Zona Radiata-Related Genes. - *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72: 184–195.

- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M. 2007: Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. - *Aquaculture* 267: 3-19.
- Lloret, J. & Planes, S. 2003: Condition, feeding and reproductive potential of white seabream *Diplodus sargus* as indicators of habitat quality and the effect of reserve protection in the northwestern Mediterranean. - *Marine Ecology Progress Series* 248: 197-208.
- Lundstrom, J., Börjeson, H., Norrgren, L. 1999: Histopathological studies of yolk sac fry of Baltic salmon (*Salmon salar*) with the M74 syndrome. - *Ambio* 28: 16-23.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. 1999: Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. - Review in *Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268.
- Na, Y.-R., Seok, S.-H., Baek, M.-W., Lee, H.-Y., Kim, D.-J., Park, S.-H., Lee, H.-K., Park, J.H. 2009: Protective effects of vitamin E against 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) induced toxicity in zebrafish embryos. - *Ecotoxicological and Environmental Safety* 72: 714-719.
- Novak, J., Bensek, M., Hilscherova, K. 2008: Disruption of retinoid transport, metabolism and signalling by environmental pollutants. *Environment International* 34: 898-913.
- OSPAR 1998a: JAMP (Joint Assessment and Monitoring Programme), JAMP guidelines for general biological effects monitoring. Oslo and Paris Commissions, 15 pp.
- OSPAR 1998b: JAMP (Joint Assessment and Monitoring Programme), JAMP guidelines for contaminant-specific biological effects monitoring. Oslo and Paris Commissions, 38 pp.
- Rolland, R.M. 2000: A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. - *Journal of Wildlife Diseases* 36: 615-635.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. & Feist, S.W. 2003: Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. - *Marine Environmental Research* 55:137-159.
- Strand, J., Andersen, L., Dahllöf, I. & Korsgaard, B. 2004: Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. - *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 37-46.
- Strand, J. & Dahllöf, I. 2005: Teknisk anvisning for marin overvågning. 4.5 Biologisk effektmonitoring - muslinger. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter. 15 s.
- Strand, J., Dahllöf, I. & Larsen, M.M. 2009: Biologisk effektmonitoring; - I: Dahl, K. & Josefson, A.B. (red.): *Marine områder 2007*, Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. - Faglig rapport fra DMU nr. 707. s. 62-63.



- Stuer-Lauridsen, F., Gustavson, K., Møhlenberg, F., Dahllöf, I., Strand, J., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Rasmussen, T.H., Halling-Sørensen, B. 2008: Misdannet ålekvabbeyngel og andre biologiske effekter i danske vandområder. Litteraturudredning. Miljøministeriet, By- og Landskabsstyrelsen. 208 s. <http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-7052-384-4/html/default.htm>
- Sturve, J., Berglund, A., Balk, L., Broeg, K., Bohmert, B., Massey, S., Sav-va, D., Parkkonen, J., Stephensen, E., Koehler, A. & Forlin, L. 2005: Effects of dredging in Goteborg Harbor, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). - Environmental Toxicology and Chemistry 24: 1951-1961.
- Urushitani, U., Shimizu, A., Katsu, Y., Iguchi, T. 2002: Early estrogen exposure induces abnormal development of *Fundulus heteroclitus*. Journal of Experimental Zoology 293: 693-702.
- Vetemaa, M., L. Förlin, and O. Sandström. 1997. Chemical industry effluent impacts on reproduction and biochemistry in a North Sea population of viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 33-41.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambino-Infante, J., Quazuguel, L., Cahu, P. 2005: Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implications of 12 retinoid receptors. British Journal of Nutrition 94: 83-89.
- Vuori, K.M., Nikinmaa, M. 2007: M74 syndrome in Baltic salmon and the possible role of oxidative stresses in its development: Present knowledge and perspectives for future studies. Ambio 36: 168-172.
- Werner, R.M., Rook, B., Greil, R. 2006: Egg-thiamine status and occurrence of early mortality syndrome (EMS) in Atlantic salmon from St. Marys River, Michigan. J. Great Lakes 32: 293-303.



Miljøministeriet  
By- og Landskabsstyrelsen  
Haraldsgade 53  
2100 København Ø

Telefon 72 54 47 00  
[blst@blst.dk](mailto:blst@blst.dk)  
[www.blst.dk](http://www.blst.dk)