

387

OPPDRAKSMELDING

Kadmium og bly i lirype:
akkumulering
og cellulære effekter

Hans Chr. Pedersen (red.)

NATURENS 
TÅLEGRENSER

Miljøverndepartementet

Fagrapport 71



NINA • NIKU

NINA Norsk institutt for naturforskning

Kadmium og bly i lirype: akkumulering og cellulære effekter

Hans Chr. Pedersen (red.)


NATURENS
TÅLEGRENSER

Miljøverndepartementet
Fagrapport 71

Naturens Tålegrenser

Programmet Naturens Tålegrenser ble satt igang høsten 1989 i regi av Miljøverndepartementet.

Programmet skal blant annet gi innspill til arbeidet med Nordisk Handlingsplan mot Luftforurensninger og til pågående aktiviteter under Konvensjonen for Langtransporterte Grenseoverskridende Luftforurensninger (Genève-konvensjonen). I arbeidet under Genève-konvensjonen er det vedtatt at kritiske belastningsgrenser skal legges til grunn ved utarbeidelse av nye avtaler om utslippsbegrensning av svovel, nitrogen og hydrokarboner.

En styringsgruppe i Miljøverndepartementet har det overordnede ansvar for programmet, mens ansvaret for den faglige oppfølgingen er overlatt en arbeidsgruppe bestående av representanter fra Direktoratet for naturforvaltning (DN), Norsk polarinstitutt (NP) og Statens forurensningstilsyn (SFT).

Arbeidsgruppen har følgende sammensetning:

Gunnar Futsæter	-	NP
Tor Johannessen	-	SFT
Else Løbersli	-	DN
Steinar Sandøy	-	DN

Styringsgruppen i Miljøverndepartementet består av representanter fra avdelingen for naturvern og kulturminner, avdelingen for vannmiljø, industri- og avfallssaker og avdelingen for internasjonalt samarbeid, luftmiljø og polarsaker.

Henvendelse vedrørende programmet kan rettes til:

Direktoratet for naturforvaltning
Tungasletta 2
7005 Trondheim
tel: 73 58 05 00

eller

Statens forurensningstilsyn
Postboks 8100 Dep
0032 Oslo 1
Tel: 22 57 34 00

NINA•NIKUs publikasjoner

NINA•NIKU utgir følgende faste publikasjoner:

NINA Fagrapport NIKU Fagrapport

Her publiseres resultater av NINAs og NIKUs eget forskningsarbeid, problemoversikter, kartlegging av kunnskapsnivået innen et emne, og litteraturstudier. Rapporter utgis også som et alternativ eller et supplement til internasjonal publisering, der tidsaspekt, materialets art, målgruppe m.m. gjør dette nødvendig.

Opplag: Normalt 300-500

NINA Oppdragsmelding NIKU Oppdragsmelding

Dette er det minimum av rapportering som NINA og NIKU gir til oppdragsgiver etter fullført forsknings- eller utredningsprosjekt. I tillegg til de emner som dekkes av fagrapportene, vil oppdragsmeldingene også omfatte befaringsrapporter, seminar- og konferanseforedrag, årsrapporter fra overvåkningsprogrammer, o.a.

Opplaget er begrenset. (Normalt 50-100)

Temahefter

Disse behandler spesielle tema og utarbeides etter behov bl.a. for å informere om viktige problemstillinger i samfunnet. Målgruppen er "almenheten" eller særskilte grupper, f.eks. landbruket, fylkesmennenes miljøvern-avdelinger, turist- og friluftlivskretser o.l. De gis derfor en mer populærfaglig form og med mer bruk av illustrasjoner enn ovennevnte publikasjoner.

Opplag: Varierer

Fakta-ark

Hensikten med disse er å gjøre de viktigste resultatene av NINA og NIKUs faglige virksomhet, og som er publisert andre steder, tilgjengelig for et større publikum (presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivåer, politikere og interesserte enkeltpersoner).

Opplag: 1200-1800

I tillegg publiserer NINA og NIKU-ansatte sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler, gjennom populærfaglige tidsskrifter og aviser.

Pedersen, H.C. (red.).1995. Kadmium og bly i lirype: akkumulering og cellulære effekter. - NINA Oppdragsmelding 387: 1-34.

Trondheim, november 1995

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0639-0

Forvaltningsområde:
Forurensning
Pollution

Rettighetshaver ©:
Stiftelsen for naturforskning og kulturminneforskning
NINA•NIKU

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

Redaksjon:
Kjetil Bevanger

Design og layout:
Synnøve Vanvik

Sats: NINA•NIKU

Kopiering: Norservice

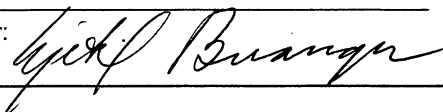
Opplag: 250

Kontaktadresse:
NINA•NIKU
Tungasletta 2
7005 Trondheim
Tel: 73 58 05 00
Fax: 73 91 54 33

Tilgjengelighet: Åpen

Prosjekt nr.: 12720 & 12721 Forurensning lirype

Ansvarlig signatur:



Oppdragsgiver:

Direktoratet for naturforvaltning

Referat

Pedersen, H.C. (red.). 1995. Kadmium og bly i lirype: akkumulering og cellulære effekter. - NINA Oppdragsmelding 387: 1-34.

Som en del av forskningsprogrammet "Naturens tålegrenser" har tungmetallbelastninger (Cd, Pb og Hg) i lirype blitt undersøkt mhp. 1) forskjeller mellom akkumulering av Cd og Pb i nyre, lever, brystmuskel og hjerne (Hg); 2) forholdet mellom belastningsnivå av Pb og Cd, og eventuelle histologiske endringer i nyre- og hjernevev; og 3) forekomster av metallothioneiner (MT) i lever- og nyrevev fra liryper forskjellig naturlig Cd-belastning.

Det påvises en klar sammenheng mellom Pb-konsentrasjoner i nyre og i lever, og en noenlunde lik akkumulering av Pb i disse organene. Innen det aktuelle belastningsnivået for Pb (lever < 8 mg kg⁻¹, tørrvekt (tv)) overføres svært lite Pb til muskel og hjernevev. Cd har en betydelig høyere akkumulering i nyre enn i lever (> 10 x), men en klar sammenheng mellom Cd-innhold i nyre og lever påvises. Høyt Cd-innhold i nyre gir forhøyet Cd-innhold i muskel, men muskelverdiene er relativt lave (< 1 mg kg⁻¹ (tv)), selv ved meget høye Cd-konsentrasjoner i nyret. Cd-innholdet i hjernevev er betydelig lavere enn i muskel (< 0.1 mg kg⁻¹ (tv)), men det høyeste Cd-innhold i hjerne finnes i området med høyest Cd-belastning i nyre. Bare ei rype hadde Hg-innhold i hjernen over deteksjonsgrensa.

Langtids lavdoseeksponering av liryper for Pb som gir Pb-belastninger i lever og nyre i området 4-6 mg kg⁻¹ (tv) medfører ikke vevsendringer som kan dokumenteres med lysmikroskopi. For individer fra området med høyest Cd-belastning (Kongsvoll) (nyre: 178-446 mg kg⁻¹ (tv)) dokumenteres regelmessige forandringer i nyret i samtlige fugler, sannsynligvis forårsaket av rypenes høye inntak av Cd.

Undersøkelsen av MT-innhold i lever og nyre ble foretatt på liryper fra Kongsvoll (høy Cd-belastning) og Essand (lav Cd-belastning). Cd-verdiene i såvel lever som nyre i liryper fra Kongsvoll var signifikant høyere enn i ryper fra Essand. Også MT-innholdet i begge vev var høyeste i ryper fra Kongsvoll. Det var en klar sammenheng mellom MT-nivå i lever og nyre, men nyrenivået var 2x levernivået. MT-nivået i begge typer vev varierte sterkt gjennom sesongen, med høyest innhold i mai. Totalmaterialet viste en signifikant lineær sammenheng mellom Cd- og MT-nivå i både lever og nyre. MT i liryper kan være en viktig mekanisme for detoxifisering av Cd, og høybelastede populasjoner "svarer" ved å øke MT-produksjonen. Det er lite som indikerer at ryper fra Kongsvoll har nådd en grense for MT-syntese hverken i lever eller nyre.

Emneord: Terrestrisk miljø - tålegrenser - lirype - Cd -Pb - Hg - metallothionein - histologi.

Hans Chr. Pedersen, Norsk institutt for naturforskning, Tungasletta 2, 7005 Trondheim.

Abstract

Pedersen, H.C. (ed.). 1995. Cadmium and lead in willow ptarmigan: accumulation and cellular effects. - NINA Oppdragsmelding 387: 1-34.

As part of the research programme, "Critical loads in Nature", the heavy metal (Cd, Pb and Hg (only brain)) loads in willow ptarmigan have been studied to throw light upon, 1) differences between accumulation of Cd and Pb in kidneys, liver, pectoral muscles and brain of willow ptarmigan, 2) the relationship between the load levels of Pb and Cd and possible damage (histological changes) to kidney and brain tissues, and 3) the occurrence of metallothioneines (MT) in liver and kidney tissues of willow ptarmigan that have been exposed to different natural loads of Cd.

A clear relationship was found between Pb concentrations in kidneys and liver and an approximately equivalent accumulation of Pb in these organs. Within the relevant load range for Pb (liver < 8 mg kg⁻¹, dry weight (dw)), extremely small amounts of Pb are transferred to muscle and brain tissues. Cd accumulates far more in kidneys than in livers (> 10 x), but a clear relationship is found between the Cd contents in kidneys and livers. A high Cd content in kidneys results in increased Cd in muscles, but muscle values are relatively low (< 1 mg kg⁻¹ (dw)), even when Cd concentrations in kidneys are very high (450 mg kg⁻¹ (dw)). The Cd content in brain tissue is significantly lower than in muscles (< 0.1 mg kg⁻¹ (dw)), but the highest Cd contents in brains are found in the area with the highest Cd load in kidneys. Only one willow ptarmigan had more Hg in its brain than the detection limit.

Long-term, low-dose exposure of willow ptarmigan to Pb which gives Pb loads in livers and kidneys within the range of 4 - 6 mg kg⁻¹ (dw) does not lead to tissue changes in kidneys and brains that can be proved by light microscopy. All individuals from the area with the highest Cd load (Kongsvoll) (kidney: 178 - 446 mg kg⁻¹ (dw)) were found to show regular changes in their kidneys in the shape of formation of connective tissue in the interstitia, probably as a consequence of high intake of Cd.

Investigation of the MT content in livers and kidneys was undertaken on willow ptarmigan from Kongsvoll (naturally high Cd load) and Essand (naturally low Cd load). Cd values in both livers and kidneys in willow ptarmigan from Kongsvoll were significantly higher than in willow ptarmigan from Essand. The MT content in both tissues was also highest in willow ptarmigan from Kongsvoll. There was a significant relationship between the MT level in livers and kidneys, but the level in kidneys was twice that in livers. The MT level in both livers and kidneys varied greatly through the season, with the highest content in May. The variation was greatest in livers. The total material showed a significant linear relationship between Cd and MT levels in both livers and kidneys, but a breakdown of the material into seasons and areas gave a varying degree of significance. MT in willow ptarmigan may be an important mechanism for detoxifying

Cd, and high-load populations "answer" to the loads by increasing their MT production. Other metals (Zn, Cu) may contribute to the production of MT and there is little to indicate that willow ptarmigan from areas with high natural Cd loads have reached a limit for MT synthesis in either livers or kidneys.

Key words: Terrestrial environment - critical loads - willow ptarmigan - Cd - Pb - Hg - metallothioneine - histology.

Hans Chr. Pedersen, Norwegian Institute for Nature Research, Tungasletta 2, N-7005 Trondheim, Norway.

Forord

I forbindelse med forskningsprogrammet om "Naturens tålegrenser" i regi av Direktoratet for naturforvaltning (DN), Statens forurensningstilsyn (SFT) og Norsk Polarinstitutt (NP) har det blitt fokusert på undersøkelser i forbindelse med langtransportert forurensning. I 1993 ble Norsk institutt for naturforskning (NINA) bevilget midler fra programmet bl.a. til undersøkelse av tungmetaller i lirype. John Atle Kålås og Hans Chr. Pedersen (NINA) har vært prosjektansvarlige, mens Morten Fjølstad, Statens veterinære laboratorium i Trondheim (SVLT) og Ketil Hylland, Norsk institutt for vannforskning (NIVA) har vært prosjektmedarbeidere.

Flere personer har enten deltatt i felt eller på laboratoriet og vi vil få takke T. Andersen, T. Bretten, S. Dahl, P. Fiske, T.G. Heggberget, S. Lagård, V. Moi, T. Naustvik, K.A. Rusdal, I. Skregelid, O. Steinberg og S. Svartaas for bistand med innsamlingen av ryper. S. Lierhagen har hatt ansvaret for de kjemiske analysene, mens snitting og farging av vevsprøver er utført av Norges veterinærhøgskole, Institutt for morfologi, genetikk og akvatisk biologi. Vi vil også få takke H. Matheson, Thomas Angells Stiftelse for tillatelse til å felle ryper ved Essand i Tydal. Vi vil videre takke Else Løbersli, Ivar Myklebust og Signe Nybø for verdifulle kommentarer til et tidlig utkast av rapporten. Richard Binns takkes for kommentarer til engelsk tekst.

Trondheim, november 1995

Hans Chr. Pedersen

Innhold

Referat	3
Abstract	3
Forord	4
1 Innledning	5
2 Effekter av kronisk eksponering for bly (Pb) og kadmium (Cd) i nyre- og hjernevev hos lirype John Atle Kålås og Morten Fjølstad	6
2.1 Innledning	6
2.2 Materiale og metoder	7
2.2.1 Feltprosedyrer	8
2.2.2 Kjemiske analyser	9
2.2.3 Prosedyrer for histologiske undersøkelser	10
2.2.4 Statistiske prosedyrer	11
2.3 Resultater	11
2.3.1 Akkumulering av Pb og Cd i lever-, nyre-, muskel- og hjernevev	11
2.3.2 Histologi av nyre- og hjernevev	14
2.4 Diskusjon	14
2.4.1 Akkumulering av Cd og Pb i lever-, nyre-, muskel- og hjernevev	14
2.4.2 Histologi av nyre- og hjernevev	16
2.4.3 Forholdsregler ved framtidige histologiske undersøkelser	17
3 Metallotionein hos lirype med forskjellig naturlig kadmiumbelastning Hans Chr. Pedersen og Ketil Hylland	18
3.1 Innledning	18
3.2 Materiale og metoder	18
3.2.1 Feltprosedyrer	19
3.2.2 Analyse av cellulær fordeling av Cd	19
3.2.3 Analyse av metallotionein	19
3.2.4 Kjemiske analyser	20
3.2.5 Statistiske prosedyrer	20
3.3 Resultater	20
3.3.1 Cellulær fordeling av Cd	20
3.3.2 Metallotionein i relasjon til Cd-innhold	21
3.4 Diskusjon	23
3.4.1 Cellulær fordeling av Cd	23
3.4.2 Metallotionein i relasjon til Cd-innhold	25
4 Sammenstilling av delresultater	28
5 Sammendrag	29
6 Summary	30
7 Litteratur	32

1 Innledning

Metaller er en naturlig del av miljøet og inngår i alle biologiske systemer. Mange av metallene er absolutt nødvendige for at ulike prosesser i en organisme skal kunne fungere. Disse benevnes essensielle metaller. Dyr har utviklet fysiologiske mekanismer som styrer opptak, fordeling og ekskresjon av disse metallene. Dette gjør at innholdet av essensielle metaller i kroppen hos friske dyr er godt regulert innenfor et relativt snevert konsentrasjonsområde.

De fleste såkalte tungmetaller tilhører den gruppen av metaller som benevnes ikke-essensielle. Disse har ingen nødvendig funksjon i en organisme og dyr har ikke utviklet fysiologiske mekanismer slik at opptak og ekskresjon blir regulert i forhold til hverandre. Dette medfører at disse metallene kan akkumuleres i kroppen, og etterhvert oppnå konsentrasjoner som gir en toksisk virkning. Selv om ikke-essensielle metaller ikke er regulert har allikevel dyr utviklet mekanismer for å takle normale, naturlige belastninger av disse stoffene. De viktigste tungmetallene i toksikologisk sammenheng er bly (Pb), kadmium (Cd) og kvikksølv (Hg). Disse kan ha giftvirkninger selv ved svært lave konsentrasjoner. For en gjennomgang av tungmetallenes toksiske virkninger henvises det til Nybø (1991) og Espelien (1993).

Det er kjent at flere faktorer har innvirkning på akkumulering av metaller i dyr. Metallkonsentrasjoner kan variere mellom ulike organer, mellom kjønn og med dyrenes alder (Flick et al. 1971, Myklebust 1992). Når det gjelder ikke-essensielle metaller har enkelte av disse en klar tendens til akkumulering i lever og nyrevev med økende alder. Dette gjelder spesielt Cd. Kritiske nivåer av dette elementet kan derfor oppstå selv ved lavdoseeksponering, forutsatt at eksponeringsperioden er lang nok (Scheuhammer 1987).

I Norge har undersøkelser av effekter av langtransportert forurensning i første rekke vært knyttet til vegetasjon i skog og dyr fra det akvatiske miljø. I forbindelse med opptrapping av undersøkelsene på den terrestriske faunaen er det ønskelig å fremskaffe mer viten om belastningsnivå og effekter på en del nøkkelarter. Tradisjonelt har man i Norge i første rekke foretatt analyser av tungmetaller i fallvilt og jaktbare arter felt under ordinær jakt. De analyseresultatene som foreligger, tyder på at belastningsnivået er relativt moderat med unntak av kadmium og bly (Pedersen & Nybø 1990). Tidligere undersøkelser på såvel lirype *Lagopus lagopus* som fjellrype *L. mutus* har vist tildels høye verdier fra de sørlige delene av landet (Herredsvela & Munkejord 1988), noe som indikerte en påvirkning fra langtransportert forurensning. Imidlertid har senere undersøkelser vist tildels svært høye verdier av kadmium fra ryer også fra andre deler av landet (Kålås & Lierhagen 1992, Myklebust 1992).

I forbindelse med programmet "Naturens tålegrenser" har det vært etterlyst undersøkelser av effekter av tungmetallbelastning på terrestre dyr. Som tidligere påpekt av Pedersen & Nybø (1990) mangler slik informasjon fra naturlige bestander i Norge. Hos liryper er det allerede et

faktum at kadmiumbelastningen i enkelte områder er over det nivå (13-15 ppm våtvekt) hvor man forventer å kunne finne negative effekter (Eisler 1985, Pedersen & Nybø 1990).

Høyt inntak av Pb og Cd kan medføre morfologiske endringer i nyrevev (Pb og Cd) og hjernevev (Pb) som dersom det blir omfattende nok kan virke negativt inn på overlevelse og reproduksjon. Eksempler på slike endringer i nyreev er flekkvis (fokalt) dødt vev (nekrose) i de proximale tubuli, oppsvulmede mitokondrier, endringer i tubulicellenes cytoplasma (økning i antall lysosomer, dannelse av hyaline dråper), bindevevsdannelse i interstitiene og fortykkede glomerul membraner Cain et al. 1983, Nicholson et al. 1983, Vesselinova et al. 1985, Whitehead et al. 1988, Roa et al. 1989a, Roa et al. 1989b, Chishti & Rotkiewicz 1993). Syrefaste inklusjoner i proksimale tubuli i nyre er et eksempel på en spesifikk effekt av Pb. Dette er påvist i flere eksperimentelle studier (Kendall & Scanlon 1981, Kendall, Scanlon & Veit 1983, Kendall & Scanlon 1985, Birkhead et al. 1982, Dicheva & Stanchev 1988, Rao et al. 1989a, Rao et al. 1989b), for villlevende duer fra byområder (DeMent et al. 1987, Garcia & Vazquez 1988), og også ved Pb-forgiftning hos husdyr og mennesker.

I vev hvor en finner akkumulering av Cd synes dette alt vesentlig å være bundet til lavmolekylære, sulfhydroksylrike proteiner, de såkalte metallotioneiner (MT) (Cherian & Goyer 1978). Alle typer vev kan sannsynligvis syntetisere MT, men denne kapasiteten synes å variere fra vev til vev. Hos pattedyr er det vist at lever, nyre og milt har den høyeste kapasiteten for å syntetisere MT (Elinder & Nordberg 1985). Det er vist at MT også har evnen til å binde flere andre metaller og dette proteinet er sannsynligvis viktig for detoksifisering og lagring av flere toksiske metaller (Richard & Cousins 1975, Brady et al. 1982, Webb & Cain 1982).

I denne rapporten vil vi presentere resultater fra en undersøkelse som belyser forholdet mellom de belastningsnivå av Pb og Cd, som er påvist hos liryper i Norge, og eventuelle skader (histologiske endringer) i de organ som forventes å være mest sensitive for tungmetaller (nyre og hjernevev) (kap. 2). Vi vil videre presentere resultater fra en undersøkelse av MT i lever- og nyrevev fra liryper som har blitt eksponert for forskjellig naturlig Cd-belastning. Vi presenterer også resultater vedrørende sesongmessige variasjoner i Cd-innhold i lever og nyrevev i forhold til MT-nivå (kap. 3). Denne siste undersøkelsen er en videreføring av arbeid som ble startet opp i 1990 under programmet «Naturens tålegrenser» (Pedersen et al. 1991, 1992).

2 Effekter av kronisk eksponering for bly (Pb) og kadmium (Cd) i nyre- og hjernevev hos liryper

John Atle Kålås og Morten Fjølstad

2.1 Innledning

Mange villlevende dyrearter eksponeres for Pb og Cd gjennom føden (se Eisler 1985, 1988). For hønsefugler er det i de sørligste deler av Norge funnet relativt høyt innhold av Pb i lever, og i enkelte områder er det registrert svært høye konsentrasjoner av Cd i nyrevev (Herredsveia & Munkejord 1988, Kålås & Lierhagen 1992, Myklebust 1992). De dokumenterte Pb-verdiene i lever i hønsefugler fra Norge ligger imidlertid klart under de grenser som gir direkte død eller reproduksjonssvikt ($> 20 \text{ mg kg}^{-1}$, tørrvekt (tv)). Disse grenseverdiene er imidlertid ikke særlig godt dokumentert (Eisler 1988). Blant annet skilles det ikke mellom akutte høye doser og langtids lavere doser.

I en landsomfattende kartlegging av tungmetallnivåer i hønsefugl (Kålås & Lierhagen 1992) hadde enkelte liryper fra de sørligste delene av Norge Pb-konsentrasjoner i lever opp mot 10 mg kg^{-1} (tv). Dersom Pb-innholdet i nyret er høyere enn det som er funnet i lever nærmer vi oss her nivåer der en ut fra tidligere undersøkelser kan forvente endringer i nyrevevet (Kendall & Scanlon 1985, DeMent et al. 1987, Garcia & Vazquez 1988). For Cd inneholdt nyreprøver fra voksne liryper fra Kongsvoll innsamlet i 1990-91 i gjennomsnitt 135 mg kg^{-1} (tv) (Myklebust 1992). For tilsvarende Cd-nivåer i pelagiske sjøfugler som havhest *Fulmarus glacialis* og havlire *Puffinus puffinus* er det påvist flere typer endringer i nyrevev (Nicholson et al. 1983). De høyest registrerte konsentrasjonene av Pb og Cd i voksne liryper er derfor på nivåer der endringer i nyrevevet kan forekomme. I denne sammenheng kan det nevnes at hos mennesker oppstår skader ved Cd-konsentrasjoner i nyret på omkring 200 mg kg^{-1} , (våtvekt (vv)) (Goyer 1986).

Det meste av den toksikologiske forskningen som er utført på Cd og Pb har vært konsentrert om organismer som er utsatt for akutte høye doser (blyhagiforgiftning eller eksperimentell belastning). For Pb er de mest omfattende undersøkelsene utført i forbindelse med inntak av blyhagl hos våtmarksfugl (f.eks. Mudge 1983), samt forskning på atferds-forstyrrelser og intelligens hos barn eksponert for organiske blyforbindelser i eksos (f.eks. Marlowe 1986, Rabinowitz et al. 1992). Andre kjente effekter av eksperimentelle doser av Pb er redusert vekst (Burger & Gochfeld 1988) og svekket immunforsvar (Koller & Kovacic 1974, Rocke & Samuel 1991). Kunnskapen om subletale effekter av kronisk lavdoseeksponering av Pb og Cd er imidlertid mangelfull (se Eisler 1985, 1988).

Ved kronisk Cd- og Pb-eksponering er nyrene særlig utsatt ved at parenchymcellene skades. Det er særlig reabsorpsjonsprosessene i de proksimale tubuli som rammes. Skader som kan observeres i nyret av slik eksponering er blant annet degenerasjon og død (nekrose) av tubuliceller og bindevevsdannelse i det interstitielle vev (Schulz 1991). En godt dokumentert morfologisk indikasjon på Pb-belastning er dessuten forekomsten av syrefaste intranukleære inklusjonslegemer i cellene i de proksimale tubuli. Celler som inneholder inklusjonslegemer er vanligvis oppsvulmede og inneholder endrede mitokondrier. Det er påvist at nyreskadene blir mer omfattende ved samtidig eksponering for både Pb og Cd (additiv respons) (Rao et al. 1989b). De morfologiske endringer som oppstår i hjerne ved Pb-belastning er uspesifikke, og forståelsen av hvordan Pb induserer skader i hjernen er begrenset (Goyer 1986). Hjernesyntomer har vært satt i sammenheng med forandringer i vegger av blodårene, perivaskulære væskedannelser (ødemer), skader på nerveceller (neuroner) og bløtgjøring av vev (malaci) (Hunter & Wobeser 1980, Narbaitz et al. 1985). Histologiske undersøkelser av nyre- og hjernevev vil være nyttige ved vurdering av kritiske konsentrasjoner (tålegrenser). Med kritisk konsentrasjon menes i denne sammenheng den laveste konsentrasjon av Pb og Cd som medfører skader i nyre- og hjernevev.

Målet med denne studien er å undersøke om de høyeste konsentrasjonene av Pb og Cd som er påvist i lirype i Norge medfører skader (histologiske endringer) i de organ som forventes å være mest følsomme for tungmetaller (nyre- og hjernevev (Cd, Pb), hjernevev (Pb)). Andre påvirkninger enn Cd og Pb kan imidlertid også gi tilsvarende vevsendringer. Det kan derfor være vanskelig å påvise at morfologiske endringer i nyre- og hjernevev direkte er forårsaket av bestemte tungmetaller. En komparativ undersøkelse av fugl fra områder med ulik metallbelastning vil imidlertid kunne gi økt innsikt i dette problemkomplekset. Her undersøker vi derfor ved hjelp av lysmikroskopi omfang av histologiske endringer i nyre og hjernevev i lirype fra tre områder med forskjellige belastningsgrader av Pb og Cd. Områdene som benyttes er valgt ut på grunnlag av resultater fra en landsomfattende kartlegging av tungmetaller i småvilt (Kålås & Lierhagen 1992), samt undersøkelser av forekomst av Cd i liryper ved Kongsvoll (Myklebust 1992). Den høye Pb belastningen i Sirdal/Lund er forårsaket av langtransporterte luftforurensninger (Kålås & Lierhagen 1992, Steinnes et al. 1993), mens alt tyder på at de høye belastningene av Cd i Kongsvoll-området har naturlige årsaker (Myklebust et al. 1993).

Det er kjent at konsentrasjoner av Cd i nyre hos lirype er 7-10 ganger høyere enn i lever, mens brystmuskel hos lirype har svært lave Cd-konsentrasjoner (Myklebust 1992). For Pb er dette forholdet ikke klarlagt. Dette kan ha betydning for menneskers utnytting av lirype, og selv om konsentrasjonene av Pb i brystmuskel sannsynligvis er lave, bør dette dokumenteres. Denne undersøkelsen inkluderer derfor også informasjon om forskjeller mellom belastninger av Pb og Cd i nyre, lever, brystmuskel og hjerne hos lirype. Forholdet mellom konsentrasjoner i lever og nyre med

hensyn på av disse metallene gir forøvrig viktig informasjon om eksponeringsgrad (Scheuhammer 1987).

2.2 Materiale og metoder

Det er samlet inn liryper fra tre områder med forskjellig belastningsgrad av Cd og Pb. Ett område med mye Pb og lite Cd (Sirdal/Lund, n = 8), ett område med mye Cd og lite Pb (Kongsvoll, n = 9) og to kontrollområde med lite Cd og lite Pb (Singsås/Essand, n = 15) (tabell 1). Fuglene fra Sirdal/Lund er felt i området mellom nordlige delen av Sirdalsvatnet og Østerdalsvatnet i grenseområdene mellom Sirdal, Lund og Bjerkreim kommuner. Fuglene fra Kongsvoll er felt i området like øst for Kongsvold Fjeldstue, Oppdal kommune. Fuglene fra Singsås er felt i området like nord for Singsås sentrum i Midtre-Gauldal kommune og fuglene fra Essand er felt like øst for Nesjøen/Essandsjøen i Tydal kommune (figur 1).

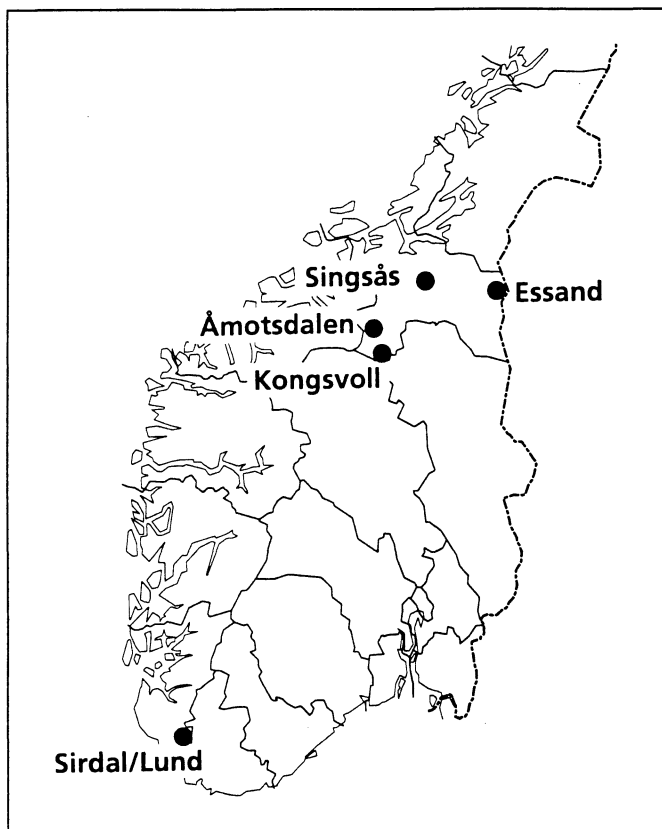
Skader i nyret forårsaket av Cd opptrer vanligvis først etter minst 6 mnd eksponering (Richardson et al. 1974). For Pb anser vi også mulighetene for å påvise eventuelle effekter på vev til å være størst for individer som har vært utsatt for belastninger i lengre tid. Vi har derfor i all hovedsak benyttet voksne liryper (> 14 mnd) innsamlet i perioden september-oktober i denne undersøkelsen. Det var imidlertid ikke mulig å skaffe tilveie mer enn tre voksne liryper fra Sirdal/Lund innen vanlig jakttid. Det ble derfor søkt om dispensasjon for supplerende felling av ryper i Sirdal i april 1994. Ytterligere fem individer ble da felt (to voksne (> 22 mnd) og tre fugler fra sist sommer's produksjon (ca 10 mnd)). Alle disse er inkludert i denne undersøkelsen.

For det innsamlede materialet er det utført målinger av innhold av Pb og Cd i nyre og lever. For hjerne er det i tillegg utført analyser av innhold av Hg da dette metallet også kan medføre endringer i hjernevev. Det er utført histologiske undersøkelser av nyre og hjernevev for å se etter eventuelle vevsendringer for de aktuelle prøvene.

For å belyse sammenhenger mellom belastningsgrad av Pb og Cd i lever- og nyre- og hjernevev inkluderer vi også data fra liryper innsamlet i forbindelse med den landsomfattende kartleggingen av metaller i småvilt som ble utført i perioden 1990-91 i regi av DN's "Program for terrestrisk naturovervåking" (Kålås & Lierhagen 1992), og i forbindelse med kartleggingen av metallforurensning i grenseområdene mot Russland i 1990-91 i regi av "Ekspertgruppen for studier av effekter i terrestriske økosystemer" under den felles Norsk-Russiske kommisjonen for Miljøsamarbeid (Kålås et al. 1995). Totalt inngår det her data fra 218 unge og voksne liryper for Pb og 219 voksne liryper for Cd.

Tabell 1. Gjennomsnittlig innhold av Cd og Pb i nyre, lever, muskel og hjernevev samt Hg i hjernevev for individer eldre enn 9 mnd fra de tre undersøkelsesområdene. (tall i parentes gir material størrelse, \bar{x} - gjennomsnitt, sd - standardavvik, dersom $> 75\%$ av prøvene har verdier under deteksjonsgrensen gis verdi som $<$ deteksjonsgrense, χ^2 - verdi fra Kruskal-Wallis ANOVA, korrigert for like verdier, P - toalet sansynlighet, ^a - viser at 2-veis χ^2 tester er benyttet ved at antall prøver henholdsvis under og over deteksjonsgrensen er testet for Cd-belastet område mot resterende prøver og for Pb-belastet område mot resterende prøver). - Mean concentrations of Cd and Pb in kidney, liver, pectoral muscle and brain, and Hg in brain for birds > 9 months from the three study areas.

Metall/ Organ	Sirdal/Lund (8)		Kongsvoll (9)		Singsås/Essand (15)		χ^2	P
	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd		
Bly (Pb)								
Lever/Liver	4,55	3,87	0,64	0,77	0,66	0,93	13,1	$< 0,001$
Nyre/Kidney	4,79	1,06	1,06	0,50	0,85	0,42	14,8	$< 0,001$
Muskel/Muscle	$< 0,15$		$< 0,15$		$< 0,15$			
Hjerne/Brain ^a	0,28	0,13	$< 0,30$		$< 0,30$		0,93	$> 0,1$
Kadmium (Cd)								
Lever/Liver	9,88	4,56	23,6	11,7	5,84	3,62	17,6	$< 0,001$
Nyre/Kidney	61,3	22,6	255	82,0	55,1	34,9	19,5	$< 0,001$
Muskel/Muscle	0,35	0,37	0,48	0,13	0,13	0,14	12,4	$< 0,005$
Hjerne/Brain ^a	$< 0,015$		0,023	0,010	$< 0,015$		7,95	$< 0,01$
Kvikksølv (Hg)								
Hjerne/Brain	$< 0,03$		$< 0,03$		$< 0,03$			



Figur 1. Lokalisering av områdene der det er samlet inn liryper - Location of the areas where the willow ptarmigan have been collected.

2.2.1 Feltprosedyrer

Det ble søkt bistand fra lokale jegere for innsamling av ryper. Vi ba om at rypene ble felt med stålhagl som også ble delt ut til aktuelle jegere. Det viste seg imidlertid at ikke alle jegere ville benytte stålhagl. Derfor er alle fuglene fra Essand og Kongsvoll samt tre av fuglene fra Singsås og en fra Sirdal/Lund felt med blyhagl. For områdene Sirdal/Lund og Singsås/Essand ble fuglene lagt i papirpose like etter felling. Etter dagens jakt ble disse fuglene åpnet med skalpell, og prøvene som skulle benyttes for histologiske undersøkelser ble tatt ut. Ett nyre ble tatt ut og delt i to like deler (hver del ca 0.8 g våtvekt) hvorav den ene delen ble oppbevart i ca 12 ml Bouin fikseringsvæske (pikrinsyre, formalin, eddiksyre) og den andre delen i ca 12 ml 10 % formalin (nøytral bufret). Videre ble hodet kappet av, delt på langs og oppbevart i ca 75 ml formalin. For disse prøvene tok det fra 1 - 10 t fra felling til prøver var lagt i fikseringsvæske. For åtte av rypene fra referanseområdet i Essand var hodene ikke kløyd i to før de ble lagt på formalin. Etter at prøvene var tatt ut ble

resterende innvoller lagt på plass, fuglen ble lukket, lagt tilbake i papirposen og frosset ned så snart som mulig. Ved felling av fugler ved Kongsvoll (i forbindelse med jakthundprøver) hadde vi utsendt eget personell for ivaretagelse av prøver. Her ble fuglene åpnet umiddelbart etter felling og prøver av nyre og hjerne ble lagt i fikseringsvæske fra 10-30 min etter felling. Forøvrig ble samme prosedyre fulgt som for de andre områdene.

2.2.2 Kjemiske analyser

Laboratorieprosedyrer

Ved uttak av prøver for kjemiske analyser av metallinnhold ble fuglene tint til ca 0 °C. For lever, brystmuskel og nyre ble det tatt ut ca 1,5 g (våttvekt) prøve for analysering av metallinnhold. For nyre utgjorde dette ett helt nyre (det som ikke ble benyttet for histologiske undersøkelser), mens det for lever ble tatt et snitt gjennom levera og for brystmuskel ble tatt ut en prøve fra midt i brystmuskelen (*Pectoralis major*). For hjerneprovne ble restene fra det formalinikserte materialet som var preparert for histologiske undersøkelser benyttet. For 4 av disse individene var det ikke tilstrekkelig med materiale til kjemiske analyser og for de øvrige ble prøvemengder ned til 1, g (våttvekt) benyttet. Ved uttak av prøver ble det brukt kniver og pinsetter av titan. Dette utstyret ble rensert mellom hver prøve i 1 mol HNO₃ g skylt i destillert vann.

Analyseprosedyrer

Følgende rutiner er fulgt ved analysering for forekomst av metaller i de innsamlede prøvene:

- Prøvene ble tørket i frysetørrer (Christ LDC-1) i ca 17 timer.
- for nyre, lever og muskel ble ca 0,4 g prøve (tv) veid opp, for hjerne var det for enkelte prøver mindre prøvemateriale tilgjengelig og prøvemengder fra 0.2-0,35 g (tv) ble benyttet.
- Prøvene ble oppsluttet ved bruk av konsentrert HNO₃ og inndamping i mikrobølgeovn (Milestone MLS 1,200) i beholdere av perfluoralkohol (PFA).
- Konsentrasjoner av metaller ble bestemt ved hjelp av atomabsorpsjonsspektroskopi (Perkin Elmer, modell 1100B) med grafittovn (HGA 700) og hydridsystem (FIAS 200) som tilleggsutstyr.

Alle mål på konsentrasjoner av metaller er gitt som mg kg⁻¹ tørrvekt (tv).

Nøyaktigheten av analyseprosedyrene ble kontrollert ved hjelp av internasjonale standarder (NBS): Bovine liver (1577B), Dogfish muscle (DORM-2) and Dogfish liver (DOLT-2) og våre analyser viste et godt samsvar med de sertifiserte verdiene (tabell 2). Som test på kvalitet av både laboratorieprosedyrer og analyseprosedyrer ble leverprøvene fra rypene fra Kongsvoll (n = 9) delt i to like deler og separat håndtert av forskjellige personer ved uttak og innveing av prøve for kjemiske analyser. Analysene av disse prøvene viste et svært godt samsvar både for Cd (Regressjonskoeffisienten, r = 0,99, F = 289,0, p < 0,001; repeterbarhet, R = 0,95) og for Pb (Regressjonskoeffisient, r = 0,97, F = 132,8, p < 0,001; repeterbarhet, R = 0,87). Regressjonskoeffisienten er beregnet ved hjelp av lineær regresjon, og repeterbarhet er beregnet etter Harper (1994)

Tabell 2. Analyserte referansestandarder for kontroll av analysekvalitet. Alle verdier gitt som mg kg⁻¹ (tv). - International reference standards analysed (National Bureau of Standards). All values given as mg kg⁻¹ (dry weight).

Standard/Element	Sertifisert verdi Certified value			Denne studien Present work		
	x	min	max	x	sd	n
Bovine liver (1577B)						
Kadmium (Cd)	0,50	0,47	0,53	0,52	0,03	11
Dogfish-liver (DOLT-2)						
Kadmium (Cd)	20,8	20,3	21,1	22,6	0,7	10
Kvikksølv (Hg)	1,99	1,89	2,09	2,07	0,1	17
Bly (Pb)	0,22	0,20	0,24	0,17	0,09	8
Dogfish-muscle (DORM-2)						
Kadmium (Cd)	0,043	0,035	0,051	0,048	0,003	18

der verdier i området 0.7-0.9 viser høy repeterbarhet og verdier > 0,9 viser svært høy repeterbarhet. Andre studier har også vist liten variasjon i innhold av Cd og Pb i repeterte uttak fra forskjellige deler av levera (Lücker et al. 1993).

De aktuelle prosedyrene gav følgende deteksjonsgrenser for lever, nyre og muskel (alle verdier er gitt som mg kg⁻¹ (tv)): Cd = 0,01 (0,007), Pb = 0,15 (0,1). For hjerne var innveiet prøvemengde lavere enn for lever og nyre. Deteksjonsgrensen er derfor noe høyere for dette organet: Cd = 0,015 (0,1), for Hg = 0,03 (0,02), og for Pb = 0,3 (0,2). Tallene i parentes viser verdier benyttet ved statistiske analyser dersom konsentrasjonen av et metall var lavere enn deteksjonsgrensen.

For hjerneprøvene registrerte vi mange prøver med verdier under deteksjonsgrensene (Cd - 63 %, Pb - 86 % og Hg - 93 %). For muskel og lever hadde også enkelte av prøvene innhold under deteksjonsgrensen (lever: Pb - 9 %; muskel: Pb - 73 %, Cd - 3 %). Alle prøvene fra nyre hadde konsentrasjoner over deteksjonsgrensene.

En del av fuglene ble felt med blyhagl. Dette medfører muligheter for kontaminering av prøver ved at et blyhagl har passert eller er blitt liggende i nærheten av den prøven som tas ut. Selv om bare tilsynelatende uskadde organ ble benyttet, ble det for noen av prøvene funnet tydelige tegn på blykontaminering. For muskel, lever og nyre ble det totalt funnet 9 prøver (ca 10 % av totalt antall prøver analysert) med Pb verdier over 15 mg kg⁻¹ (tv), og alle disse var fra fugler skutt med blyhagl. Disse er utelatt fra beregninger og statistiske analyser.

For de aktuelle prøvene har vi følgende tørrvektprosent (n = 32): lever 30,1 ± 1,3(SD); nyre 25,0 ± 1,7(SD); muskel 28,9 ± 0,9(SD);

2.2.3 Prosedyre for histologiske undersøkelser

Alle snittene ble undersøkt i et Leitz lysmikroskop (ortho-plan) ved 100 x, 400 x, 630 x og 1000 x forstørrelse. Det ble gjort en vanlig histologisk undersøkelse av nyre og hjernevev der det generelt ble undersøkt for avvik fra en "normal-situasjon". I tillegg ble det sett spesielt etter forandringer som er beskrevet for forgiftninger/belastninger med Pb, Cd og Hg. For hjerneprøvene var dette: i) endringer i nerveceller og ii) blodårer. For nyresnittene var det: i) forekomster av ekstra bindevevsdannelse i interstitiet (fokal proliferasjon av bindevev), ii) endringer i tubuliepitheelcellenes iii) syrefaste intranukleære inklusjonslegemer i proksiale tubuli celler (**tabell 3**).

Følgende prosedyrer ble fulgt ved preparering av prøver for histologiske undersøkelser. Etter fiksering i ca 1 år ble en hjernehalvdel tatt ut og det ble tatt et lengdesnitt av hele hjernen langs midtlinjen og et tverrsnitt av storehjernen; hvert preparat ca 2 mm tykt. Tilsvarende tykke preparater ble tatt av de fikserte nyrene. De aktuelle preparatene ble kjørt i en vevsprepareringsmaskin (Tissue - Tek. VIP 1 000) støpt inn i parafinvoks og skåret i ca 5 µm tykke snitt. Det ble laget 4 snitt av hvert preparat og snittene ble farget i en av følgende fargemetoder: i) Hematoxylin og eosin (H.E.), ii) Elastin van Gieson (E.v.G), iii) Periodic acid Schiff (P.A.S.), iv) Toluidinblått. Undersøkelsene for forekomster av syrefaste intranukleære inklusjoner i de proksimale tubuli som er en spesifikk respons på Pb belastning krever spesiell preparering. Det ble derfor laget ekstra snitt av 6 prøver fra Lund og 4 prøver fra referanseområdene som ble farget etter Ziehl-Nielsen metoden. For Lund-prøvene ble det her benyttet tre ca 10 mnd gamle individer (Pb i nyre: 3,9, 5,0 og 5,9) og tre individer > 14 mnd (Pb i nyre: 3,9, 5,5 og 6,0). For referanseområdene (mht Pb belastning) ble det benyttet to fugler > 14 mnd fra henholdsvis Kongsvoll (Pb i nyre: 0,36 og 0,84) og Singsås (Pb i nyre: 0,57 og 0,58). Både klargjøring av preparater, snitting og farging av alle prøver ble utført av Institutt for morfologi, genetik og akvatisk biologi, Norges veterinærhøgskole.

Tabell 3. Histologiske forandringer i nyret som vi har dokumentert eller sett spesielt etter med lysmikroskop (100X - 1000X forstørrelse). - Histological changes in the kidney documented or searched for by light microscopy examination (100X - 1000X).

Histologisk karakterer	Effekt av Cd	Effek av Pb
Bindevevsdannelse i interstitiet	+	+
Syrefaste inklusjoner i proksimale tubuliceller	-	+
Hydraline dråper, vakuolisering av cytoplasma	+	+
Infiltrater av mononukleære celler (betennelsesceller)	-	-

2.2.4 Statistiske prosedyrer

Ved alle korrelasjonsanalysene er det benyttet Spearman's rang korrelasjoner. For å undersøke sammenhenger mellom nyre og lever for innhold av Cd og Pb og samtidig kontrollere for forskjeller mellom kjønn, alder og/eller tid på året er det benyttet en Covariansanalyse med rangerte verdier av Cd og Pb (Canover & Iman 1981). Videre er det benyttet χ^2 -tester ved vurdering av forskjeller mellom områder i forekomster av de forskjellige typene vevsendringene.

2.3 Resultater

Leverprøvene fra de tre områdene viste som ventet klare forskjeller med hensyn på belastningsgrad av Cd og Pb. Rypene fra Sirdal/Lund hadde Pb-belastninger i lever omkring 5 mg kg⁻¹ (tv) noe som er ca 7-8 ganger høyere enn belastningsnivået i de to øvrige områdene, mens rypene fra Kongsvoll hadde Cd-belastninger i lever omkring 25 mg kg⁻¹ (tv) noe som er 3-4 ganger høyere enn i de to øvrige områdene (**tabell 1**). For referanseområdene Singsås/Essand ble det som ventet funnet lave verdier både for Cd og Pb.

2.3.1 Akkumulering av Pb og Cd i lever-, nyre-, muskel- og hjernevev

Bly

For Pb ble det funnet klare sammenhenger mellom konsentrasjoner i nyre og konsentrasjoner i lever ($r_s = 0,87$, $p < 0,001$, $n = 25$ (**figur 2A**); landsomfattende data: $r_s = 0,70$, $p < 0,001$, $n = 218$ (**figur 2B**)). Det er små forskjeller mellom disse to organtypene i belastningsnivå av Pb. Regresjonslinjene indikerer imidlertid litt høyere verdier i nyre enn i lever (landsomfattende data: lever = $0,89 \times$ nyre + $0,20$, $n = 218$). For materialet innsamlet direkte for denne studien blir regresjonslinjen sterkt påvirket av en rype med særlig høyt innhold av Pb i levera. Dersom denne fuglen utelates gir dette datasettet tilsvarende resultat som det landsomfattende materialet (lever = $0,89 \times$ nyre - $0,47$, $n = 24$). For det landsomfattende materialet viser en covariansanalyse med rangerte verdier av Pb i nyre og lever ingen effekter av alder (yngre enn 6 mnd $n = 36$, eldre enn 14 mnd $n = 179$: $F = 2,82$, $df = 1$, $p = 0,10$) eller kjønn (hanner $n = 126$, hunner $n = 89$: $F = 1,07$, $df = 1$, $p = 0,30$). Det var her heller ingen signifikant interaksjon mellom alder og kjønn ($F = 0,08$, $df = 1$, $p = 0,78$).

For hjernevev er konsentrasjonene av Pb lave og det er bare registrert fire verdier over deteksjonsgrensen (0,3 mg kg⁻¹ (tv)). Tre av disse er fra det mest Pb-belastede området (antallet prøver for lite til at andel prøver over deteksjonsgrensen gir signifikante forskjeller mellom dette området og de øvrige områdene) (**tabell 1**).

For muskelprøvene ligger også hovedandelen av prøvene under deteksjonsgrensen (0,15 mg kg⁻¹ (tv)). Fra alle områdene finnes det likevel enkeltprøver med verdier over

deteksjonsgrensen. Det er imidlertid ingen sammenheng mellom konsentrasjoner i muskel og konsentrasjoner i nyre eller lever.

Kadmium

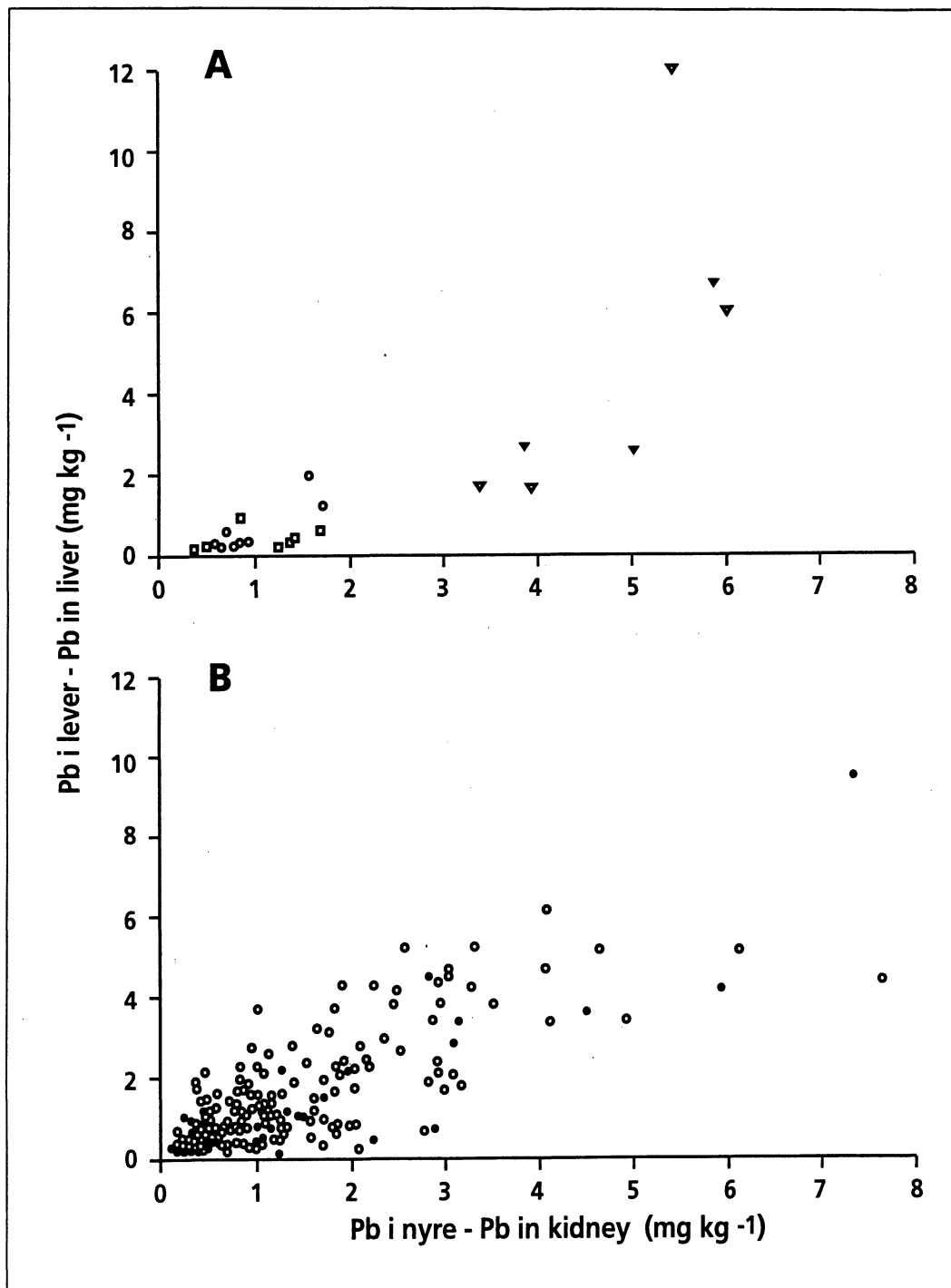
Også for Cd er det en klar sammenheng mellom konsentrasjoner i nyre og konsentrasjoner i lever ($r_s = 0,77$, $p < 0,001$, $n = 32$ (**figur 3A**); landsomfattende data, fugler > 14 mnd: $r_s = 0,70$, $p < 0,001$, $n = 219$ (**figur 3B**)). For materialet fra Kongsvoll og Singsås/Essand er Cd-innholdet i nyre i størrelsesorden 10 ganger høyere enn i lever. Regresjonslinjene indikerer også omtrent det samme forholdet (lever = $0,090 \times$ nyre + $1,70$, $n = 32$; landsomfattende data: lever = $0,083 \times$ nyre + $1,94$, $n = 219$). Målingene fra Sirdal/Lund indikerer et noe lavere forhold. Det relative forholdet mellom Cd-innhold i lever og i nyre kan imidlertid påvirkes av Cd-konsentrasjoner i føden i perioden før felling og vil dermed kunne variere med årstidene. Det landsomfattende materialet viser da også et relativt høyere innhold i lever sammenlignet med nyre i vintermånedene desember-februar enn i høstmånedene september-november (covariansanalyse med rangerte verdier av Cd i nyre og lever, effekter av årstid (høst $n = 175$, vinter $n = 41$: $F = 24,01$, $df = 1$, $p < 0,001$) (**figur 3B**). Det ble her ikke funnet noen effekt av kjønn (hanner $n = 129$, hunner $n = 87$: $F = 1,96$, $df = 1$, $p = 0,16$) og det var ingen signifikant interaksjon mellom årstid og kjønn ($F = 0,22$, $df = 1$, $p = 0,64$). Prøvene som ble samlet inn i april 1994 fra Sirdal har også relativt høye verdier i lever sammenlignet med nyre og ser ut til å være påvirket av effekten av økning i Cd innhold i lever vinterstid (**figur 3A**).

For hjernevev er konsentrasjonene av Cd relativt lave med bare en verdi over 0,05 mg kg⁻¹ (tv). Imidlertid er det en klar sammenheng med at fugler med høyest innhold av Cd i lever og nyre også har det høyeste Cd-innholdet i hjernevev (nyre - hjerne: $r_s = 0,52$, $p < 0,005$, $n = 29$; lever - hjerne: $r_s = 0,55$, $p < 0,002$, $n = 29$), og området med høyest Cd-belastning i lever og nyre har også de høyeste Cd-belastningene i hjernevev (**tabell 1**).

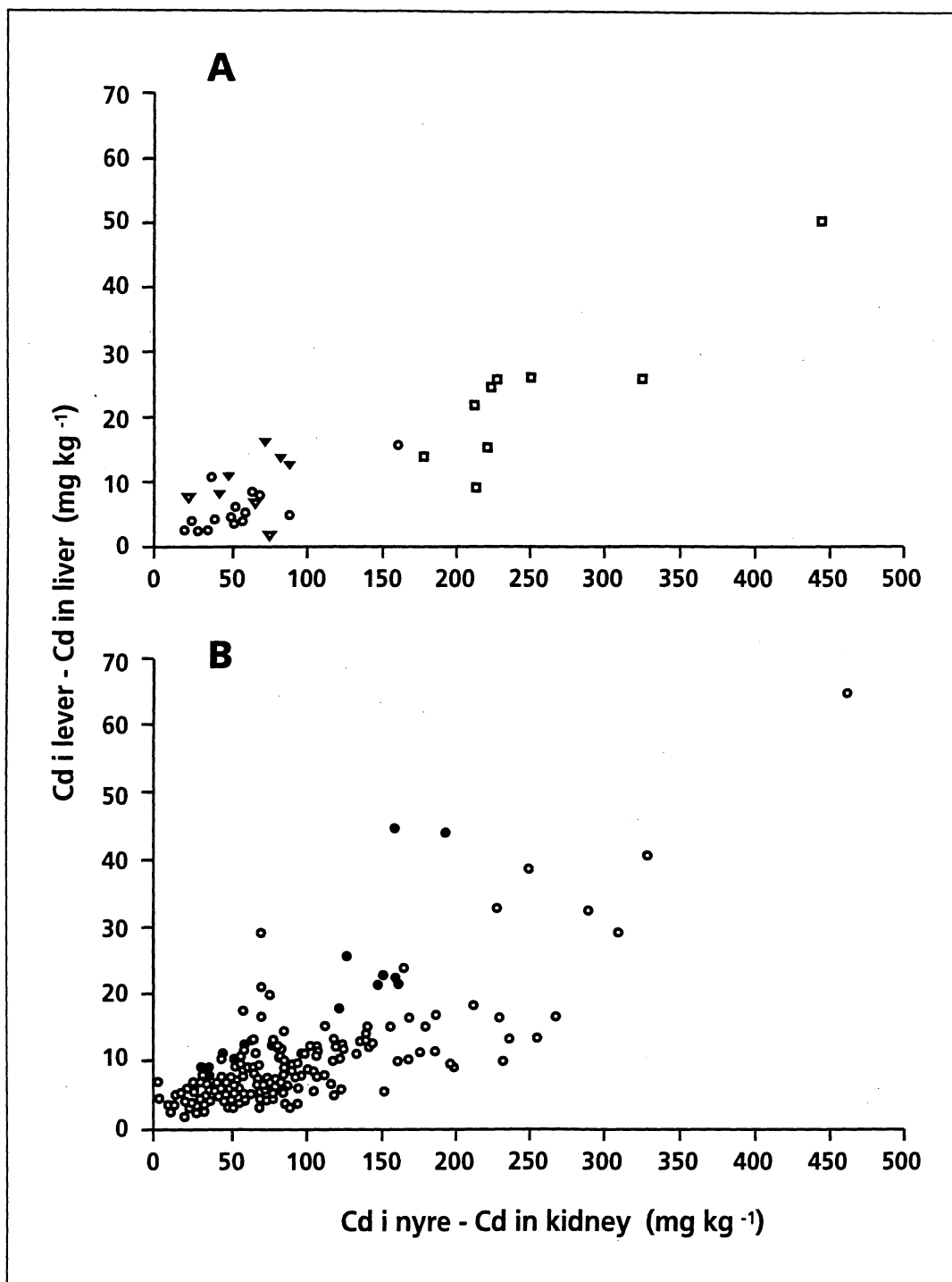
Muskelprøvene viser mye det samme mønster som hjerneprøvene. Verdiene i muskel er imidlertid betydelig høyere enn i hjerne, men lave sett i forhold til lever og nyre. Alle unntatt en prøve har verdier under 0,8 mg kg⁻¹ (tv). Det er en klar sammenheng med at fugler med høyest innhold av Cd i lever og nyre også har det høyeste innholdet i muskelvev (nyre - muskel: $r_s = 0,74$, $p < 0,001$, $n = 32$ (**figur 4**); lever - muskel: $r_s = 0,63$, $p < 0,001$, $n = 29$). Området med høyest Cd-belastning i lever og nyre har også de høyeste Cd-belastningene i muskelvev (**tabell 1**). Imidlertid har enkelte av fuglene fra Sirdal/Lund et relativt høyt Cd-innhold i muskel. Disse er alle fugler felt i Sirdal i april 1994 som også hadde relativt høyt innhold av Cd i lever sett i forhold til innholdet i nyre.

Kvikksølv

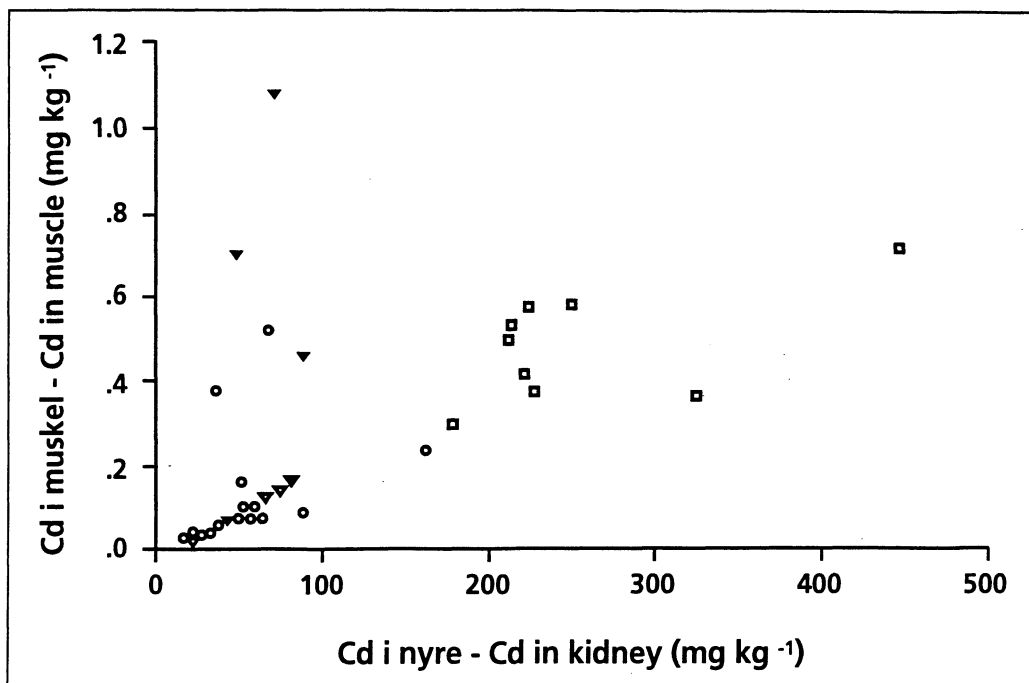
Bare en av rypene hadde Hg innhold i hjernevev som var over vår deteksjonsgrense (0,03 mg kg⁻¹ (tv)). Dette var en rype fra Essand der vi målte 0,096 mg Hg kg⁻¹ hjernevev.



Figur 2. Sammenheng mellom innhold av Pb i nyre og i lever fra lirype. **A)** fugler innsamlet for denne undersøkelsen. Triangler - Sirdal/Lund, firkanter - Kongsvoll og sirkler - Singsås/Essand. **B)** Fugler innsamlet i perioden 1990-92 i forbindelse med andre undersøkelser (Kålås & Lierhagen 1992, Kålås et al. 1995), (fylte symbol - individer < 8 mnd, åpne symboler - individer > 15 mnd.) - Relationship between concentrations of Pb in willow ptarmigan kidneys and livers. **A)** Birds collected for this study. Triangles - Sirdal/Lund, squares - Kongsvoll, circles - Singsås/Essand. **B)** Birds collected in 1990-92 for other studies (Kålås & Lierhagen 1992, Kålås et al. 1995). (Filled symbols - birds < 8 months, open symbols - birds > 15 months.)



Figur 3. Sammenheng mellom innhold av Cd i nyre og i lever fra voksne liryper. **A)** fugler innsamlet for denne undersøkelsen. Triangler - Sirdal/Lund, firkanter - Kongsvoll og sirkler - Singsås/Essand (åpne symboler - fugler felt i september-oktober, fylte symboler - fugler felt i april). **B)** Fugler innsamlet i forbindelse med andre undersøkelser (Kålås & Lierhagen 1992, Kålås et al. 1995), (åpne symboler - fugler felt i perioden september-november, fylte symboler - fugler felt i perioden desember-februar). - Relationship between concentrations of Cd in kidneys and livers of adult willow ptarmigan. **A)** Birds collected for this study. Triangles - Sirdal/Lund, squares - Kongsvoll, circles - Singsås/Essand. **B)** Birds collected in 1990-92 for other studies (Kålås & Lierhagen 1992, Kålås et al. 1995) (Filled symbols - birds collected during Dec. - Feb., open symbols - birds collected during Sept. - Dec.)



Figur 4. Sammenheng mellom innhold av Cd i nyre og i muskel fra lirype (Triangler - Sirdal/Lund, firkanter - Kongsvoll og sirkler - Singsås/Essand. Åpne symboler - fugler felt i september-oktober, fylte symboler - fugler felt i april). - Relationship between concentrations of Cd in kidneys and pectoral muscles of willow ptarmigan. (Filled symbols - birds collected in April, open symbols - birds collected in Sept. - Oct.)

2.3.2 Histologi av nyre- og hjernevev

Omkring 25 % av hjernene hadde postmortale forandringer på grunn av dårlig fiksering og/eller lang lagringstid før snitting. De var derfor noe vanskelig å vurdere histologisk. Dette gjaldt særlig prøver fra rypehodene som ikke var delt i to før fiksering i formalin. Eventuelle karforandringer ville en likevel sannsynligvis kunne påvise.

Mange av nyresnittene hadde uklare cellegrensener og delvis avstøtte epithelceller. Dette kan skyldes at det gikk noe tid (opp til 10 timer) fra fuglene ble felt til organene ble lagt på fikseringsvæske og den relativt lange lagringstiden vi hadde før snittene ble preparert. Disse endringene påvirket mulighetene for å påvise celledegenerasjoner og nekrose, men har ingen betydning for påvisning av dannelse av ekstra bindevev, og forekomster av syrefaste inklusjonslegemer og infiltrater av mononukleære celler.

Bouin's fikseringsvæsken viste seg kun å være brukbar for farging med PAS og E.v.G, mens formalin var egnet for alle fargemetodene.

I hjernepreparatene ble det ikke konstatert sikre forandringer for noen av prøvene. Fuglene viste heller ingen tegn på kliniske Pb-forgiftning.

Ved den generelle histologiske undersøkelsen ble det dokumentert fokale (oftest små) infiltrater av mononukleære celler i interstitiet hos samtlige fugler fra Singsås/Essand og Kongsvoll, men ikke i noen av fuglene fra Sirdal/Lund (tabell 4). Av skader som kan være forårsaket av belastninger av Cd og/eller Pb ble det i nyrevev påvist økt bindevevsmasse (små fokale proliferasjoner av bindevev i interstitiene, figur 5) i samtlige 9 prøver fra Kongsvoll i to

prøver fra Sirdal/Lund og i tre prøver fra Singsås/Essand (tabell 4). De to nyrene med slike vevsendringer fra Sirdal/Lund var begge fra voksne individer felt om høsten. Forøvrig ble det funnet forandringer i tubuliepitheelcellenes cytoplasma (hyaline dråper og vakuolisering) hos enkelte fugler fra alle de tre undersøkelsesområdene (tabell 4). Syrefaste inklusjonslegemer ble ikke påvist i noen av de 10 undersøkte ryperne.

2.4 Diskusjon

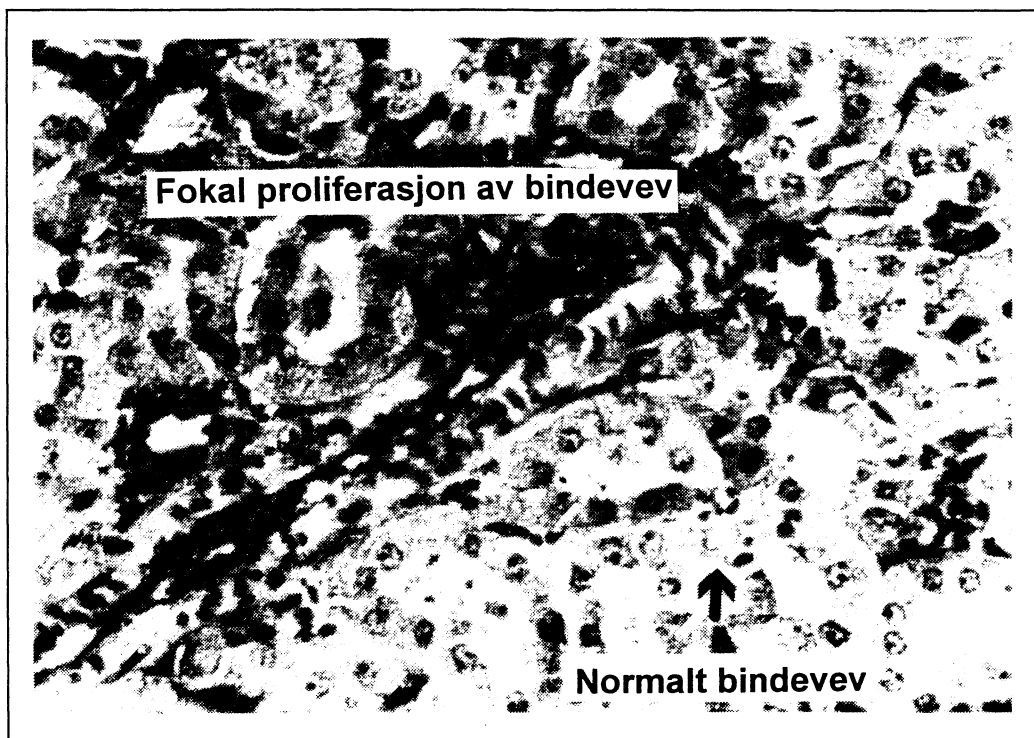
2.4.1 Akkumulering av Cd og Pb i lever-, nyre-, muskel- og hjernevev

Denne undersøkelsen viser en klar sammenheng mellom Pb-konsentrasjoner i nyre og i lever, og samtidig en noenlunde lik akkumulering av Pb i disse to organene. Videre viser vi at det innen det aktuelle belastningsnivået for Pb (lever < 8 mg kg⁻¹ (tv)) overføres svært lite Pb til muskel og hjernevev. Dette viser at det økte opptaket av Pb i ryper fra de sørligste delene av landet har små kostholdsmessige konsekvenser for mennesker (Coleman et al. 1992). Tidligere studier har påvist akkumulering av Pb i både i hjerne- og i muskelvev hos fugl (Clausen & Wolstrup 1979, Wojcik 1980, Kendall & Scanlon 1982, Gjerstad & Hanssen 1984, Hirai et al. 1991, Havera et al. 1992, Dmowski 1993). For alle disse tilfellene var imidlertid Pb-konsentrasjonene i lever/nyre svært høye sammenlignet med de konsentrasjoner vi har funnet i våre liryper, og samtlige av disse studiene viser relativt lave konsentrasjoner av Pb både i hjerne- og muskelvev.

Tabell 4. Antall prøver med histologiske forandringer i nyrevev fra liryper for de tre undersøkelsesområdene. *n* - totalt antall prøver undersøkt. For oversiktens skyld oppgis også gjennomsnittlig innhold og (standardavvik) for Cd og Pb i nyre. Redusert antall prøver for undersøkelsen av forekomster av syrefaste inklusjonslegemer (*n* = 6, 2 og 2) - Number of willow ptarmigan samples with histological changes in the kidney. Mean concentrations of Cd and Pb in kidney and (SD) are also given. *n* - gives total sample size.

Område/Area	Sirdal/Lund (n = 8)	Kongsvoll (n = 9)	Singsås/ Essand (n = 15)	χ^2 -test
Cd i nyre/Cd in kidney	61 (23)	255 (82)	55 (35)	
Pb i nyre/Pb in kidney	4,8 (1,1)	1,1 (0,5)	0,9 (0,4)	
Fokale proliferasjoner av bindevev i interstitiet	2	9	3	$\chi^2 = 16,1, p < 0,001$
Fokale infiltrasjoner av mononukleære celler i interstitiet	0	9	15	$\chi^2 = 31,0, p < 0,001$
Endringer i tubuliepithelcellenes cytoplasma	4	1	4	$\chi^2 = 3,24, p > 0,1$
Syre-faste inklusjonslegemer	0	0	0	

Figur 5. Snitt av lirype-nyrevev (ca 400 X forstørret) fra et sterk Cd-belastet område med eksempler på ekstra bindevevsdannelse (fokale proliferasjoner av bindevev) i interstitiet og område med normalt bindevev. - Light microscopy examination (ca 400 X) of willow ptarmigan kidney tissue from a strongly Cd contaminated bird. Focal



For Cd finner vi som tidligere dokumentert en betydelig høyere akkumulering i nyre enn i lever ($> 10 \times$) og en klar sammenheng mellom Cd-innhold i nyre og i lever (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Videre har vi vist en klar sammenheng mellom høyt Cd-innhold i nyre og forhøyet Cd-innhold i muskel, noe som også er dokumentert av Myklebust (1992). Muskelverdiene er imidlertid relativt lave ($< \text{mg kg}^{-1}$ (tv)), selv ved meget høye Cd-konsentrasjoner i nyret (450 mg kg^{-1} (tv)), og de fleste muskelverdiene verdiene ligger i størrelsesordenen 1-2 % av nyreverdiene. Imidlertid synes dette forholdet å variere noe og særlig viser rypene felt i Sirdal/Lund i april et høyt Cd-innhold i muskel sett i forhold til innholdet i nyre. Dette skyldes trolig at de har spist Cd-rik føde i perioden like før (se Myklebust 1992). Det kan imidlertid også skyldes at disse rypene, som kommer fra et område med relativt lav naturlig Cd-belastning, har utviklet dårligere evner til å binde Cd (f.eks. lavere matalotionein produksjon). De relativt få studiene som tidligere har undersøkt Cd-innhold i muskelvev fra fugl viser også at det er liten overføring av Cd til slikt vev (Lande 1977, Hulse et al. 1980, Dmowski 1993).

Vi måler et betydelig lavere Cd-innhold i hjernevev enn i muskel ($< 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv)). Imidlertid finner vi også for dette organet en sammenheng med høyest Cd-innhold i hjerne i området med de høyeste Cd-belastning i nyre. Vi kjenner bare til en studie som har målt Cd innhold i hjernevev fra fugl (Dmowski 1993). Dette er en studie av stær *Stumus vulgaris* der Cd konsentrasjonene i lever var relativt lave og her ble ingen Cd-akkumulering i hjernevev dokumentert.

Opptak, ekskresjon og skadeomfang av høyt inntak av Cd og Pb påvirkes forøvrig av annet innhold i føden. Av viktige faktorer som reduserer opptak og omfang av skadelige effekter av økt inntak av Pb og/eller Cd kan nevnes Ca (Barton et al. 1978, Rowland & Bray 1980), Se (McGowan & Donaldson 1987), Fe (Fox et al. 1980), C-vitaminer (Richardson et al. 1974, Fox et al. 1980) og benzosyre (Richardson et al. 1974). Lirypa spiser blant annet mye blader og skudd av blåbær *Vaccinium myrtillus* som har et høyt C-vitamin innhold. Slike forhold kan påvirke både opptak og omfang av negative effekter av et høyt inntak av Pb og Cd.

2.4.2 Histologi av nyre- og hjernevev

Et av hovedmålene med denne studien var å undersøke om de konsentrasjoner av Pb og Cd som er påvist i lirype i enkelte deler av Norge medfører histologiske endringer i organer og vev som antas tidlig å skades ved forhøyet inntak av tungmetaller. For å øke innsikten i dette problemkomplekset sammenligner vi her omfanget av vevsendringer i hjerne- og nyrevev i liryper fra områder med ulike belastninger av Cd og Pb.

De valgte områdene viste som ventet store forskjeller i forekomst av Pb og Cd. For Sirdal/Lund var gjennomsnittlig Pb-konsentrasjon i lever fra lirype blant de aller høyeste konsentrasjoner registrert for denne arten i Norge (ca 5 mg

kg^{-1} (tv)) (Kålås & Lierhagen 1992). For de to øvrige områdene var Pb-konsentrasjonene i lever i all hovedsak $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv), noe vi betrakter å være i nærheten av bakgrunnsnivå. Nyre hadde omtrent tilsvarende Pb-belastninger som lever og for dette organet var Pb-konsentrasjonene i det Pb-belastede området i størrelsesorden 5 ganger høyere enn i de to øvrige områdene. I det forventet sterkest Cd-belastede området på Kongsvoll hadde lirypelever Cd-konsentrasjoner på høyde med tidligere høyest registrerte Cd-belastninger i lirype i Norge (gjennomsnitt ca 25 mg kg^{-1} (tv)) (Kålås & Lierhagen 1992). Hoveddelen av leverprøvene fra de to øvrige områdene hadde relativt lave Cd-konsentrasjoner i lever ($< 10 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv)). Konsentrasjonene av Cd i nyre for disse to områdene ligger i all hovedsak i området $30-80 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv), mens konsentrasjonene i det Cd-belastede området er i størrelsesordenen 5 ganger høyere ($200-450 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv)). Med dette som bakgrunn inngår det i denne undersøkelsen både prøver som er representative for dagens høyeste belastninger av Pb og Cd i Norge og prøver som representerer lave belastninger (bakgrunnsnivå). Materialet gir også grunnlag for å skille mellom effekter forårsaket av Cd og Pb, i og med at vi kan sammenligne prøver med høy belastning av Cd og lav belastning av Pb med prøver som har lav belastning av Cd og høy belastning av Pb.

Denne undersøkelsen viser at langtids lavdoseeksponering av liryper for Pb som gir Pb-belastninger i nyre i området $4-6 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv) ikke medfører vevsendringer i nyre og hjerne som kan dokumenteres med lysmikroskopi. For nyret har vi her særlig sett etter forekomster av syrefaste inklusjonslegemer i de proximale tubuli. Tidligere studier har da også vist at man vanligvis må overskride nivåer på minst 20 mg kg^{-1} (tv) i nyret før slike fenomener opptrer (DeMent et al. 1987, Garcia & Vazquez 1988).

For rypene fra området med høyest Cd-belastning ($178 - 446 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv)) dokumenterer vi forandringer i nyret i form av bindevevsdannelse i interstitiene for samtlige individer (fokale proliferasjoner av bindevev). Cd forårsaker slike forandringer (Cain et al. 1983, Nicholson et al. 1983, Vesselinova et al. 1985, Whitehead et al. 1988, Roa et al. 1989a, Roa et al. 1989b, Chishti & Rotkiewicz 1993). Denne type forandringer er imidlertid ikke spesifikke for Cd-belastning, da skader av tubuliepitelceller av andre årsaker (f.eks. Pb) kan gi tilsvarende forandringer (Kendall & Scanlon 1981, Kendall & Scanlon 1985, Kendall, et al. 1983, Birkhead et al. 1982, Dicheva & Stanchev 1988, Rao et al. 1989a, Rao et al. 1989b). Vi påviste imidlertid ikke overrepresentasjon av slike endringer i nyrevev fra fugler innsamlet fra områder med høyest Pb-belastning (nyreverdier i størrelsesorden $4-6 \text{ mg kg}^{-1}$ (tv)). Det er derfor ingen ting som tyder på at den Pb-belastningen vi har i Kongsvoll området (ca 1 mg kg^{-1} (tv)) skal medføre slike skader. Zn og Cu kan også forårsake degenerasjon og nekrose i nyrenes tubuliceller (Schulz 1991). De konsentrasjoner vi har av disse to elementene i ryper fra Kongsvoll (Myklebust 1992) ligger imidlertid betydelig under de grenser der slike effekter vanligvis oppstår (se Rao et al. 1989b). Tilsvarende nyreskader som de vi her har doku-

mentert er også funnet for sjøfugler fra St. Kilda med gjennomsnittlige Cd-konsentrasjoner i nyre mellom 100 og 200 mg kg⁻¹ (tv) (Nicholson et al. 1983). Vi finner det derfor rimelig å anta at det høye omfang av bindevevsdannelse i interstitiene i lirypene fra Kongsvoll skyldes deres høye inntaket av Cd.

Vi dokumenterer her endringer i nyrevev i liryper fra Kongsvoll som etter all sannsynlighet kan tilskrives den høye Cd-belastningen vi finner i dette området. Den høye Cd-belastningen i liryper fra Kongsvoll området ser imidlertid ut til å være et naturlig fenomen, forårsaket av en høy andel vier (*Salix* spp.) (med naturlig høyt Cd-innhold) i føden (Myklebust 1992, Myklebust et al. 1993). Lirypene i dette området har dermed trolig vært utsatt for det høye inntaket av Cd i svært mange generasjoner og vi skulle forvente at det har blitt utviklet mekanismer som gjør at skader i organer forårsaket av Cd ikke oppstår. Slike mekanismer kan eksempelvis være redusert inntak av vier eller utvikling av mekanismer som reduserer Cd's skadeeffekter. Mulige avgiftende mekanismer ser da også ut til å være utviklet (f.eks. metallothionein, se side 18), men disse er tydeligvis ikke tilstrekkelige til å hindre endringer i nyrevevet. Et slikt system kan imidlertid tenkes å bli opprettholdt dersom kostnadene i form av reduksjon av "fitness" på grunn av nyreskader forårsaket av mye vier i føden er mindre enn økningen i "fitness" på grunn av andre næringskvaliteter vier har. Kostnaden av de aktuelle nyreskadene er da også trolig relativt lave på grunn av lirypa's korte levetid (2-3 år) (Pedersen et al. upubl.).

Vi finner infiltrater av betennelsesceller i nyrene fra samtlige ryper fra Kongsvoll og Singsås/Essand, men ikke i rypene fra Lund/Sirdal. Dannelse av betennelsesceller i nyret kan ha forskjellige årsaker (f.eks infeksjoner), og er ikke en spesifikk reaksjon på tungmetallbelastning. De undersøkelser vi har gjort gir ikke noe grunnlag for en nærmere vurdering av årsakene til den omfattende forekomsten av infiltrater av betennelsesceller i rypene fra Kongsvoll og Singsås/Essand.

Selv ved høye konsentrasjoner av Cd og Pb i nyre og lever finner vi svært lave konsentrasjoner av disse tungmetallene i hjernevevet. Vi har heller ikke kunnet påvise histologiske endringer i hjernevevet. Tidligere er det dokumentert skader på hjernevev som forandringer i vegger av blodårene, perivaskulære væskedannelser (ødemer), skader på nerveceller (neuroner) og bløtgjøring av vev (malaci) ved høy belastning av Pb (Hunter & Wobeser 1980). Slike forandringer har oftest vært dokumentert i forbindelse med klinisk tegn på Pb-forgiftning. I disse sammenhenger har konsentrasjonene av Pb i hjernevev ikke blitt undersøkt. Våre undersøkelser gjelder fugler uten kliniske tegn på Pb-forgiftning, men som har vært utsatt for relativt lave Pb doser over lang tid.

2.4.3 Forholdsregler ved framtidige histologiske undersøkelser

Det er tidligere utført svært få histologiske undersøkelser av villlevende dyr som er tungmetallbelastet (Hunter & Wobeser 1979, Nicholson et al. 1983, DeMent et al. 1987, Garcia & Vazquez 1988). Slike undersøkelser krever særlige tiltak i forbindelse med innsamling og fiksering av vevsprøver. I denne undersøkelsen baserte vi oss i hovedsak på innsamling av prøver fra tradisjonell jakt. Dette medførte at uttak og fiksering av vevsprøver ikke kunne utføres umiddelbart etter felling, men måtte avvendes til jakt dagen var over. Denne undersøkelsen viser imidlertid at en må være særdeles påpasselig ved fiksering av vevsprøver og disse må fikseres umiddelbart etter felling for at en skal få fullt utbytte av histologiske undersøkelser. Ved eventuell framtidig innsamling av prøver for histologisk granskning anbefaler vi derfor at det blir benyttet spesialopplært personell for håndtering av fuglene like etter felling. Organprøver må fikseres umiddelbart (< 15 min) etter at fugler er skutt. For å sikre hurtig fiksering bør det tas ut to tverrsnitt av nyrene, ca 2-3 mm brede, som fikseres. Videre bør bare halve hjernen tas ut av hjerneboksen før den legges i fikseringsvæsken. Preparering av prøver for snitting bør utføres så snart som mulig etter innsamling og vevsprøvene bør ikke bli liggende i fikseringsvæske mer enn 14 dager.

Bruk av lysmikroskop gir muligheter for dokumentasjon av strukturendringer i nyre og hjerne. Elektronmikroskop må imidlertid benyttes dersom man ønsker en mer detaljert beskrivelse av slike endringer som f.eks. reduksjon og forandringer av mitokondriene (Nicholson 1981, Chishti & Rotkiewicz 1993). Andre aktuelle metoder for å undersøke transportveier og lokalisere opphopninger av tungmetaller er bruk av røntgen (Birkhead et al 1982, Nicholson et al. 1983) eller radioaktive isotoper av metaller. Bruk av slike metoder bør vurderes ved framtidige undersøkelser av effekter av tungmetaller i nyre- og hjernevev.

3 Metallotionein hos lirype med forskjellig naturlig kadmium-belastning

Hans Chr. Pedersen og Ketil Hylland

3.1 Innledning

Såvel tidligere som nye undersøkelser av lirype fra Dovrefjell viser svært høye verdier av kadmium i nyre og tildels lever hos voksenfugl (Myklebust et al. 1993, Pedersen & Myklebust 1993, Wren et al. 1994). Siden området neppe kan sies å være påvirket gjennom langtransportert forurensning, tyder dette på at ryper fra dette området blir utsatt for en *naturlig* høy kadmiumeksponering (Pedersen et al. 1992). Området har gjennom alle tider vært kjent som et svært godt rypeterreng. Dette indikerer at rypene her er tilpasset en høy Cd-belastning. En slik tilpasning kan skje gjennom produksjon av metallotioneiner (MT), som kan detoksifisere kadmium. Dette er funnet hos flere dyrearter som har blitt eksponert for naturlig høye Cd-belastninger (Brown et al. 1977). Hos lirype kan man derfor tenke seg en tilpasning ved at høye nivå av MT binder Cd og reduserer metallens toksiske virkning.

Metallotionein er et lav-molekylært protein som binder og induseres av både essensielle (Cu, Zn) og ikke-essensielle (Cd, Hg) metaller (Kägi & Schäffer 1988). Proteinets finnes i alle vertebrater og har vært beskrevet fra ulike fuglearter som due (Lin & Huang 1990a), ender (Lin & Huang 1990b) og hønefugler (Shartzet et al. 1993). Både hos pattedyr og fugl vil Cd akkumulere til høye nivåer i nyrene. Hos pattedyr har nyretoksiske effekter av Cd vært knyttet til overskridelse av en grense for nyrets evne til å produsere MT (Fowler et al. 1991). Det har altså vært antatt at proteinet har en "beskyttende" funksjon og at skader først oppstår når produksjons-kapasiteten overskrides og Cd kan interagere med andre cellulære komponenter.

Fordi økt Cd-belastning i dyr fører til økt produksjon av MT (Brown et al. 1977) er det sannsynlig at forskjellige individer gjennom naturlig seleksjon har utviklet forskjellig evne til å produsere MT. Det er derfor grunn til å tro at MT-nivået er mindre i dyr som normalt er tilpasset lave Cd-belastninger enn dyr som er tilpasset høye belastninger. For å belyse dette forholdet har vi foretatt en undersøkelse av liryper fra to områder med høyst forskjellig nivå av *naturlig* Cd-belastning. Dette er bl.a. av stor betydning for en vurdering av eventuelle negative effekter av økt Cd-belastning gjennom langtransportert forurensning til forskjellige deler av landet.

På bakgrunn av ovenfornevnte forhold mellom MT/Cd-nivå og av tidligere undersøkelser på lirype som viser sesongmessige variasjoner i Cd-innhold, spesielt i lever (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993), vil vi forvente at; 1) MT-nivået i

nyre er høyere enn i lever; 2) MT-nivået i lever og nyre er høyere i liryper fra et naturlig høybelastet område enn i et lavbelastet område; 3) MT-nivået i lever og nyre er høyere om våren enn ellers i året i liryper fra samme lokalitet; og 4) MT-nivået gjennom sesongen er mer stabilt i nyre enn i lever.

3.2 Materiale og metoder

Tidligere undersøkelser mhp MT i fugl er relativt begrenset, men i laboratorie-situasjoner er MT påvist hos flere fuglearter (Scheuhammer 1988, Scheuhammer & Templeton 1990). Undersøkelser på frittlevende fugler er såvidt vi vet hittil bare foretatt på enkelte sjøfuglarter (Elliott et al. 1992), mens hønefugl kun er undersøkt under laboratorieforhold (Shartzet et al. 1993). I Norge er det først og fremst marine invertebrater som har blitt benyttet i forskningen omkring spørsmål knyttet til MT. Siden ingen norske forskningsmiljø tidligere har arbeidet med MT i fugl, ble det valgt å benytte allerede innsamlet materiale for å utvikle analyseprosedyrer for lever og nyrevev fra lirype.

Fordi unge liryper skutt i september-desember fortsatt har et vesentlig lavere Cd-innhold i lever og nyre enn voksne individer (Pedersen & Myklebust 1993), ble det for denne perioden bare benyttet voksne liryper (> 14 mnd). I materiale innsamlet i perioden februar-mars og i mai er det også hovedsakelig benyttet voksne fugler, men fordi det var vanskelig å skaffe tilstrekkelig antall voksne ryper benyttes også noen få unge fugler (hhv 7 og 10 mnd gamle). Akkumuleringen av Cd i lever og nyre foregår imidlertid svært hurtig og unge individer har omtrent samme nivå som eldre ryper allerede ved 7-8 måneders alder (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993).

Det er samlet inn liryper fra tre lokaliteter med forskjellig naturlig Cd belastning (**tabell 5**). Ryper fra Kongsvoll ble brukt fordi denne lokaliteten representerer en naturlig høybelastet lirypepopulasjon (Pedersen et al. 1992). Det ble her samlet inn ryper i 1990, 1991, 1993 og 1994. Rypene ble felt i området øst for Kongsvold Fjellstue, Oppdal kommune, hovedsakelig i Knutshømrådet. Liryper fra Åmotsdalen, Oppdal kommune, har lave Cd-nivåer (Kålås & Lierhagen 1992) og representerer en lavbelastet lokalitet. Det ble her samlet inn fugl i 1990 og 1991. Disse inngikk også i kartleggingsarbeidet av metallbelastninger i hare *Lepus timidus*, orrfugl *Tetrao tetrix* og lirype i forbindelse med DN's "Program for terrestrisk naturovervåking" (TOV). Åmotsdalen er et av de faste TOV-områdene. Fordi rypebestanden var svært lav i Åmotsdalen ble det i tillegg valgt et annet område, Essand i Tydal kommune, som eksempel på en lokalitet med lav naturlig Cd-belastning. Tidligere undersøkelser herfra viste lave Cd-belastninger (Kålås & Lierhagen 1992). Innsamling av ryper til MT-undersøkelse ble foretatt i området umiddelbart vest for Nesjøen/Essand-sjøen (**figur 1**).

Tabell 5. Liryper innsamlet på forskjellige lokaliteter i 1990-1994 for undersøkelse mhp cellulær fordeling av Cd og metallothionein (MT). Ad - voksen. Juv - ung.- Willow ptarmigan collected in different locations during 1990-1994 to be analysed for cellular distribution of Cd and content of metallothionein (MT). Ad - adult. Juv - juvenile.

Område/area	År/year	Måned/month	Antall/no. ad/juv	Analyse/analysis
Kongsvoll	1990	9	8/0	Cd-fordeling/distribution
Kongsvoll	1991	9	6/0	"
Åmotsdalen	1990/91	10-2	8/0	"
Kongsvoll	1993	9-10	9/0	MT-innhold/content
Kongsvoll	1994	2	8/2	"
Kongsvoll	1994	5	4/2	"
Essand	1994	2-3	8/2	"

For utarbeiding av analyseprosedyrer og for å undersøke den cellulære fordeling av Cd i lever og nyrevev ble det benyttet voksne liryper innsamlet i 1990 og 1991. Dette materialet består av 14 ryper fra Kongsvoll og 8 ryper fra Åmotsdalen. For å undersøke om lirypepopulasjoner med ulik naturlig Cd-belastning har ulike nivå av MT ble ryper innsamlet i 1993-1994 fra Kongsvoll og Essand benyttet. Til undersøkelse av eventuelle sesongvariasjoner i produksjon av MT og undersøkelse av sesongavhengig stabilitet i MT-nivå i lever og nyre brukte vi rypene fra Kongsvoll som ble samlet inn høsten 1993 og vinteren og våren 1994.

3.2.1 Feltprosedyrer

Liryper fra Kongsvoll ble i 1990 og 1991 innsamlet i forbindelse med fuglelundprøver i september. De felte rypene ble lagt i kjølebagg med tørris umiddelbart etter felling og lever og nyre ble tatt ut samme ettermiddag. Prøvene ble deretter lagret ved -20 °C inntil analysene ble utført. Fire av rypene fra Åmotsdalen ble skutt av lokale jegere. Disse ble hengt kjølig 3-4 dager før de ble frosset ned hele. Disse rypene ble tint opp til ca 0 °C og lever og nyre tatt ut. Deretter ble prøvene oppbevart i -20 °C inntil analyser ble foretatt. Fire av rypene fra Åmotsdalen ble behandlet som rypene innsamlet på Kongsvoll.

Lagring i ufrosset tilstand samt frysing/tinging av vevsprøver kan ha negativ innvirkning på proteiner og derfor også metallothioneiner. For å utelukke disse mulige negative faktorer ble det i 1993 og 1994 tatt ut prøver av lever og nyre umiddelbart etter at fuglene var skutt. Prøvene ble deretter lagt i frysebagg med tørris inntil de ble lagret i -80 °C fram til analysene kunne utføres.

I forbindelse med jaktprøver på Kongsvoll høsten 1993 ble det samlet inn 9 voksne ryper. Disse rypene skulle sammenlignes med ryper fra Essand, men det lot seg ikke gjøre

å få ryper fra dette området som ble behandlet på ønsket måte. Det ble derfor foretatt ny innsamling av materiale fra Kongsvoll i slutten av februar (8 voksne og 2 ungfugl) og fra Essand i månedsskiftet februar/mars (8 voksne og 2 ungfugl). En siste innsamling av fire voksne og to ungfugler ble foretatt på Kongsvoll i første uke av mai 1994.

3.2.2 Analyse av cellulær fordeling av Cd

Lever- og nyrevev ble innveid og homogenisert i 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 med 5 mM 2-merkaptoetanol med en Potter-Elvehjem homogenisator. Homogenatet ble deretter sentrifugert ved 10 000 g i 30 min (4 °C) for å skille "partikulær fraksjon" (pellet), i hovedsak mitokondrier, kjerner og andre organeller, fra membraner/cytosol (supernatant). Supernatanten ble videre sentrifugert ved 105 000 g i 60 min (4 °C) for å skille "mikrosomal fraksjon" (pellet), i hovedsak endoplasmatiske retikulum, eventuelt andre membraner og cytosol (supernatant). Alle tre fraksjonene ble oppløst med ultrapur HNO₃ og analysert for innhold av Cd med et Varian SpectraAA 10 instrument (atomabsorpsjon spektroskopi) med grafitt-ovn og deuterium bakgrunnskorreksjon.

3.2.3 Analyse av metallothionein

Vevet ble homogenisert som ovenfor og sentrifugert ved 10 000 g i 30 min (4 °C). En del av supernatanten (mikrosomer og cytosol) ble tatt av til protein-bestemmelse ifølge en metode modifisert fra Bradford (1976), en del til gel-filtrering (se nedenfor), resten blandet 1 : 10 med 0,15 M NaCl. Den siste løsningen ble varmet i 5 min ved 95 °C, deretter sentrifugert ved 10 000 g i 15 min. Denne varme-denaturerte supernatanten ble brukt til bestemmelse av MT etter metoden beskrevet av Olafson & Olsson (1994), modifisert fra Brdicka (1933). Metallothionein fra hestenyre (Sigma,

USA) ble brukt som standard, derfor er resultatene rapportert som MT-ekvivalenter. For å forsikre oss om at vi virkelig målte MT ble både opprinnelig og varmedenaturert supernatant separert på en 1.6 cm x 40 cm Superdex G-75 kolonne (Pharmacia, Sverige). Fraksjoner ble samlet og målt for innhold av Cd og polarografisk aktivitet.

3.2.4 Kjemiske analyser

Lever og nyreprøver fra Kongsvoll og Essand innsamlet i 1993 og 1994 er analysert mhp innhold av Cd. Alle mål på konsentrasjoner av Cd er gitt som mg kg⁻¹ tørrvekt (tv).

For analysemetodikk henvises det til kap. 2.2.2

3.2.5 Statistiske prosedyrer

For å undersøke forskjeller mellom to grupper av data (år, områder, sesonger, organ) ble det benyttet t-tester, vanlig og parvis. Ved test av sammenhengen mellom cellulær fordeling av Cd i partikulær fraksjon og cytosol ble det benyttet vanlig korrelasjonsanalysene. Sammenhengen mellom Cd og MT ble testet med lineær regresjonsanalyse, mens alle tester for variasjon ble utført med ANOVA. Alle tester oppgir to-halet p-verdi og forskjeller betraktes som signifikante når p<0,05.

3.3 Resultater

3.3.1 Cellulær fordeling av Cd

Lirypene fra Kongsvoll skutt i september 1990 (8 stk) og september 1991 (6 stk) ble behandlet hver for seg for de to årene. Rypene fra Åmotsdalen ble skutt fra oktober 1990 til februar 1991. Disse rypene behandles som en gruppe fordi vi fra tidligere vet at Cd-nivået i nyrevev fra voksne ryper fra denne perioden er relativt likt (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Det ble bare tatt ut leverprøver fra ryper skutt i Åmotsdalen i 1990.

Det alt vesentligste av Cd i både lever og nyre ble funnet i cytosol-fraksjonen (75-90 %). Som det vil framgå av tabell 6 var Cd fordelt på samme måte mellom de tre subcellulære fraksjonene i nyre (partikulær (mitokondriell), mikrosomal og cytosol), uavhengig av innsamlingssted eller år. Den prosentvise fordeling av Cd mellom de tre fraksjonene partikulær: mikrosomal: cytosol var omtrent som 13: 3: 84. Det var imidlertid ikke like åpenbare overensstemmelser mellom fordelingene i lever hos de forskjellige gruppene (tabell 6). Mens forholdet for ryper fra Kongsvoll felt i 1991 var omtrent det samme som for nyreprøvene, hadde Kongsvoll-ryper i 1990 et vesentlig høyere Cd-innhold i den mikrosomale fraksjonen og lavere i cytosolfraksjonen. Rypene fra Åmotsdalen hadde derimot et redusert Cd-nivå i den partikulære fraksjonen, mens nivået i den mikrosomale fraksjonen var noe forhøyet (tabell 6).

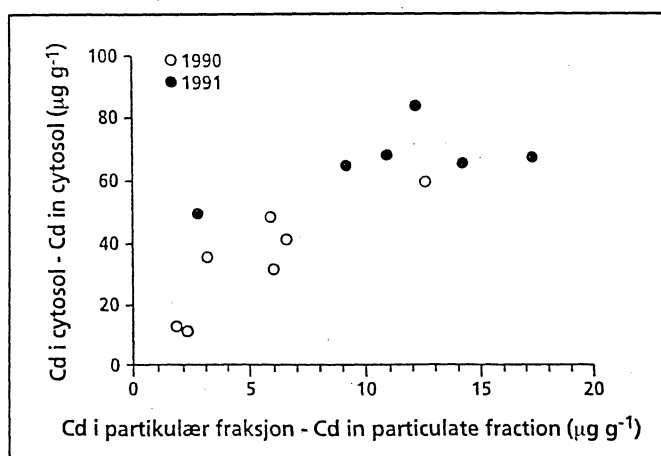
Tabell 6. Gjennomsnittlig innhold av Cd (mg kg⁻¹ (vv)) i ulike subcellulære fraksjoner i nyre og lever hos lirype fra Kongsvoll og Åmotsdalen i 1990 og 1991. Prosent fordeling vises i parentes.- Average content of Cd (mg kg⁻¹ (ww)) in different subcellular fractions in liver and kidneys of willow ptarmigan from Kongsvoll and Åmotsdalen in 1990 and 1991. Percent distribution in parenthesis.

Område/area	antall/number	nyre/kidneys			
		partikulær	mikrosomal	cytosol	totalt
Kongsvoll-90	7	5,51 (13,5)	1,13 (2,8)	34,43 (83,7)	40,71
Kongsvoll-91	6	11,30 (13,8)	3,25 (4,0)	67,13 (82,2)	81,68
Åmotsdal-90/91	8	1,56 (12,7)	0,45 (3,7)	10,26 (83,6)	12,27
		lever/liver			
	antall/number	partikulær	mikrosomal	cytosol	totalt
Kongsvoll-90	8	0,60 (11,5)	0,69 (13,3)	3,91 (75,2)	5,20
Kongsvoll-91	6	0,88 (7,4)	0,34 (2,8)	10,71 (89,8)	11,93
Åmotsdal-90	4	0,08 (3,4)	0,16 (6,8)	2,12 (89,8)	2,36

En sammenligning av Cd-innhold i nyreprøver viste et signifikant høyere innhold av Cd i alle subcellulære fraksjoner i rype innsamlet på Kongsvoll både i 1990 og 1991 enn i rype fra Åmotsdalen (t-tester, $p < 0,05$) (tabell 6). Videre var Cd-innholdet i nyreprøver fra Kongsvoll signifikant høyere for samtlige subcellulære fraksjoner i 1991 enn i 1990 (t-tester, $p < 0,05$).

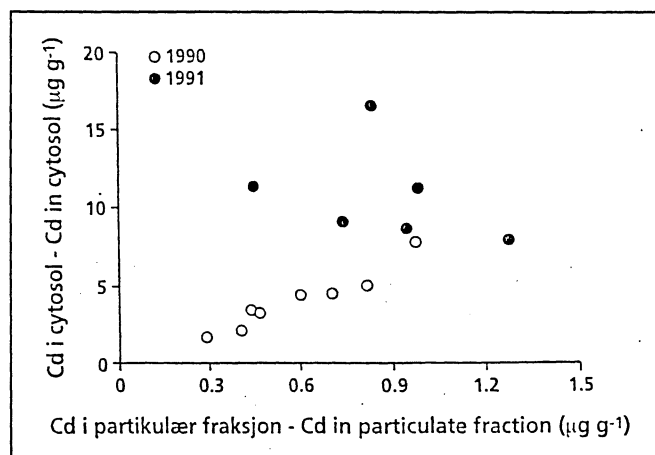
Cd-innhold i leverprøvene viste signifikant variasjon mellom områder og år i den partikulære fraksjonen (ANOVA, $F = 13,98$, $df = 2$, $p < 0,001$) og i cytosol fraksjonen (ANOVA, $F = 16,37$, $df = 2$, $p < 0,001$). Det ble ikke påvist noen signifikant variasjon i den mikrosomale fraksjonen (ANOVA, $F = 2,90$, $df = 2$, $p = 0,09$). En sammenligning av nivå i leverprøver innen område (Kongsvoll), men mellom 1990 og 1991 viste et signifikant høyere nivå i cytosol fraksjonen i 1991 enn i 1990 (t-test, $t = 4,98$, $df = 12$, $p < 0,001$), mens det ikke ble funnet forskjeller mellom 1990 og 1991 i den partikulære og mikrosomale fraksjon (t-tester, $p > 0,05$) (tabell 6).

Både i 1990 og 1991 var det en lineær positiv sammenheng mellom Cd-innhold i partikulær fraksjon og Cd-innhold i cytosol i nyre fra rype fra Kongsvoll (figur 6). Denne sammenheng var bare statistisk signifikant i 1990 ($r = 0,882$, $df = 5$, $p < 0,01$), men ikke i 1991 ($r = 0,633$, $df = 4$, $p > 0,05$). Hvis vi tester totalmaterialet for 1990 og 1991 sammen finner vi også en signifikant positiv korrelasjon ($r = 0,830$, $df = 11$, $p < 0,01$). Videre var det høyere nivåer av Cd i både partikulær fraksjon og cytosol i nyre fra rypene innsamlet på Kongsvoll i 1991 sammenlignet med de som ble innsamlet i 1990 (tabell 6, figur 6). Det kan virke som om økningen av Cd i cytosol-fraksjonen begynner å flate ut i området 60-80 ppm, mens innholdet i den partikulære fraksjonen ikke synes å ha en tilsvarende øvre grense (figur 6).



Figur 6. Sammenhengen mellom innhold av Cd i partikulær fraksjon og cytosol i nyre fra liryper skutt på Kongsvoll.-
Relationship between content of Cd in the particulate fraction and the cytosol in kidneys of willow ptarmigan shot at Kongsvoll.

I lever ble det funnet en lineær positiv sammenheng mellom Cd-innhold i partikulær fraksjon og Cd-innhold i cytosol i rype innsamlet på Kongsvoll i 1990 ($r = 0,971$, $df = 6$, $p < 0,01$) (figur 7). For rype innsamlet samme sted i 1991, var imidlertid forholdet mellom Cd i partikulær fraksjon og cytosol endret og det var ingen lineær sammenheng mellom Cd-innholdet i de to fraksjonene ($p > 0,05$). Selv om en sammenslåing av materialet for de to årene indikerer en positiv sammenheng var ikke denne statistisk signifikant ($r = 0,524$, $df = 12$, $p > 0,05$). Det ble funnet større mengder Cd i cytosol ved samme konsentrasjon av Cd i partikulær fraksjon i 1991 sammenlignet med 1990 (figur 7).



Figur 7. Sammenhengen mellom innhold av Cd i partikulær fraksjon og cytosol i lever fra liryper skutt på Kongsvoll.-
Relationship between content of Cd in the particulate fraction and the cytosol in livers of willow ptarmigan shot at Kongsvoll.

3.3.2 Metallotionein i relasjon til Cd-innhold

I tråd med tidligere resultater fra Kongsvoll ble det funnet høye Cd-verdier i såvel lever som nyre fra liryper, og nivåene fra Essand var som forventet signifikant lavere enn disse både for lever og nyre (t-test, hhv. $t = 4,77$, $df = 18$, $p < 0,001$ og $t = 5,34$, $df = 18$, $p < 0,001$) (tabell 7). Det ble ikke funnet signifikante variasjoner i Cd-innhold i nyre fra liryper fra Kongsvoll skutt høsten, vinteren og våren 1993-1994 (ANOVA, $F = 0,149$, $df = 2$, $p > 0,05$). Som forventet ble det derimot funnet variasjon gjennom sesongen i Cd-innhold i lever hos Kongsvoll-ryper, med de laveste verdiene om høsten og de høyeste om våren (tabell 7). Denne variasjonen var imidlertid ikke statistisk signifikant (ANOVA, $F = 3,06$, $df = 2$, $p = 0,07$).

Som forventet ble det funnet signifikant høyere MT-nivå i nyre enn i lever i totalmaterialet (Parvis t-test, $t = 6,23$, $df = 33$, $p < 0,001$). For totalmaterialet ble det også funnet en signifikant sammenheng mellom MT-nivå i lever og nyre (figur 8) ($MT_{nyre} = 1,805 \times MT_{lever} + 0,60$, $r^2 = 0,56$, $F = 41,19$, $n = 34$, $p < 0,001$). Det ble funnet store og signifikante variasjoner av MT i såvel lever (ANOVA,

Tabell 7. Gjennomsnittlig innhold av Cd (mg kg^{-1} (tv)) i nyre og lever hos voksne liryper fra Kongsvoll og Essand i 1993-1994. Antall prøver angis i parentes.- Average content of Cd (mg kg^{-1} (dw)) in liver and kidneys in adult willow ptarmigan from Kongsvoll and Essand in 1993-1994. Sample size in parenthesis.

Område/area	nyre/kidneys		
	september-93	februar-94	mai-94
Kongsvoll	254,9 (9)	233,7 (10)	244,9 (6)
Essand	-	78,2 (10)	-
	lever/liver		
	september-93	februar-94	mai-94
Kongsvoll	23,4 (9)	38,8 (10)	42,0 (6)
Essand	-	12,2 (10)	-

F = 29,98, df = 2, $p < 0,001$) som nyre (ANOVA, F = 9,73, df = 2, $p < 0,001$) gjennom sesongen for liryper fra Kongsvoll, og som forventet var variasjonen størst i lever (tabell 8). Det var ingen signifikante forskjeller i MT-nivå hverken i lever eller nyre for ryper fra Kongsvoll skutt i september og februar (t-tester, $p > 0,05$). Som forventet var det imidlertid et økt MT-innhold i både lever og nyre i ryper skutt i mai sammenlignet med nivået i totalmaterialet for september og februar (t-test, lever: $t = 6,09$, df = 22, $p < 0,001$; nyre: $t = 3,00$, df = 23, $p < 0,05$) (tabell 8). Som forventet var det også signifikante forskjeller i MT-innhold i både lever og nyre mellom de to områdene, med de klart høyeste verdiene i ryper fra Kongsvoll (t-test, lever: $t = 2,59$, df = 18, $p < 0,05$; nyre: $t = 2,94$, df = 18, $p < 0,01$) (tabell 8).

For totalmaterialet var det en signifikant lineær sammenheng mellom Cd- og MT-nivå i både lever og nyre (hhv. $r^2 = 0,40$, F = 22,39, n = 35, $p < 0,001$ og $r^2 = 0,39$, F = 20,34, n = 34, $p < 0,001$).

En sammenstilling av resultatene fra Cd-analysene og de tilsvarende MT-analysene fra individuelle liryper er vist gjennom en lineær regresjonsanalyse i tabell 9. Mens det ikke ble påvist signifikante sammenhenger mellom Cd og MT i lever fra liryper innsamlet på Kongsvoll i september og februar, ble det derimot påvist en signifikant sammenheng for ryper innsamlet i mai (tabell 9, figur 9). For liryper innsamlet ved Essand ble det påvist en signifikant sammenheng mellom Cd og MT også for februar-ryper (tabell 9, figur 10).

For nyrevevet var bildet noe anderledes ved at det ble funnet signifikante sammenhenger mellom Cd og MT for liryper innsamlet i september på Kongsvoll, men ikke for liryper innsamlet i februar og mai (tabell 9, figur 11). I ryper

Tabell 8. Gjennomsnittlig innhold av metallotionein-ekvivalenter ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) i nyre og lever hos voksne liryper fra Kongsvoll og Essand i 1993-1994. Antall prøver angis i parentes.- Average content of metallothionein equivalents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in liver and kidneys in adult willow ptarmigan from Kongsvoll and Essand in 1993-1994. Sample size in parenthesis.

Område/area	nyre/kidneys		
	september-93	februar-94	mai-94
Kongsvoll	1,77 (9)	1,20 (10)	3,40 (6)
Essand	-	0,58 (10)	-
	lever/liver		
	september-93	februar-94	mai-94
Kongsvoll	0,29 (8)	0,48 (10)	1,49 (6)
Essand	-	0,20 (10)	-

fra Essand ble det imidlertid funnet en signifikant sammenheng mellom Cd og MT også i nyre (tabell 9, figur 12).

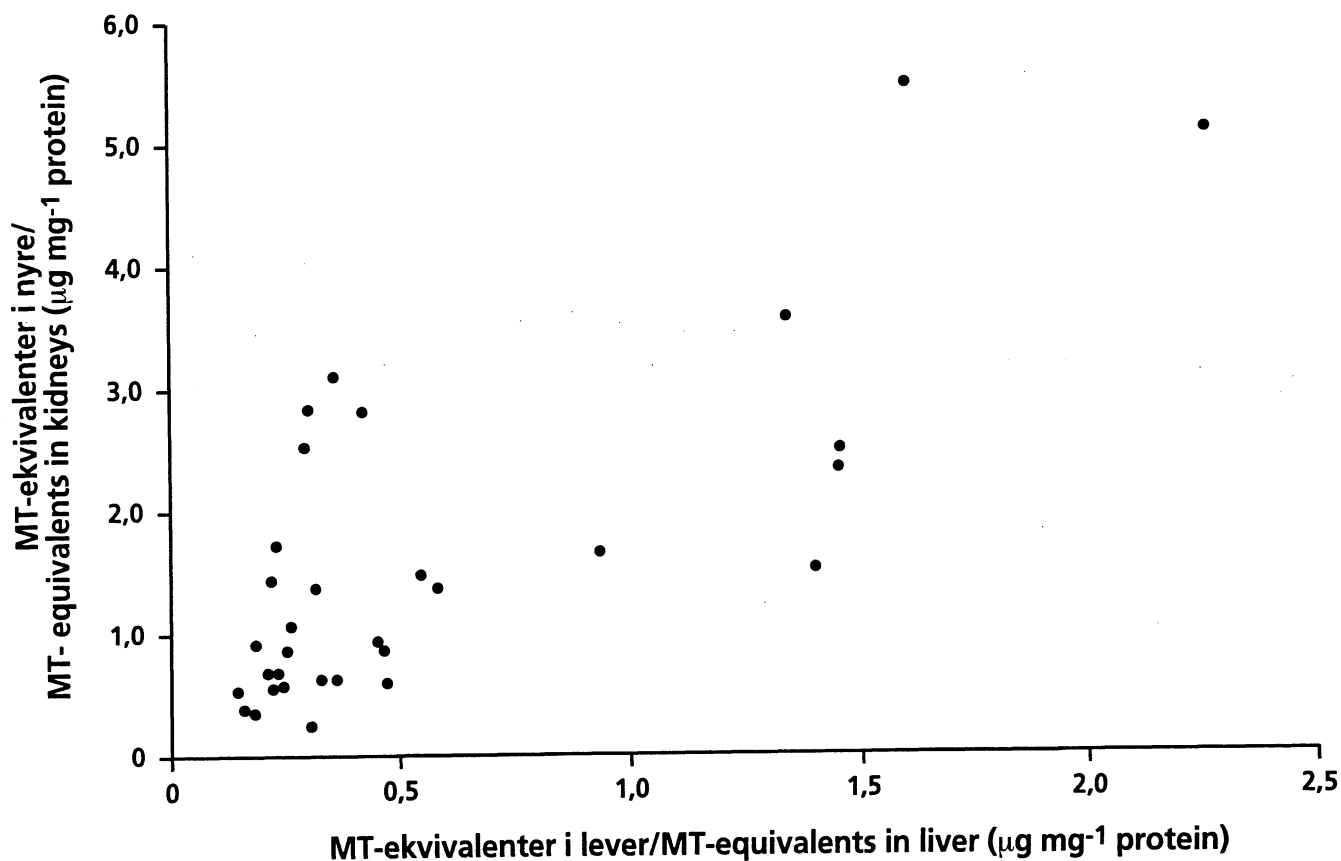
3.4 Diskusjon

3.4.1 Cellulær fordeling av Cd

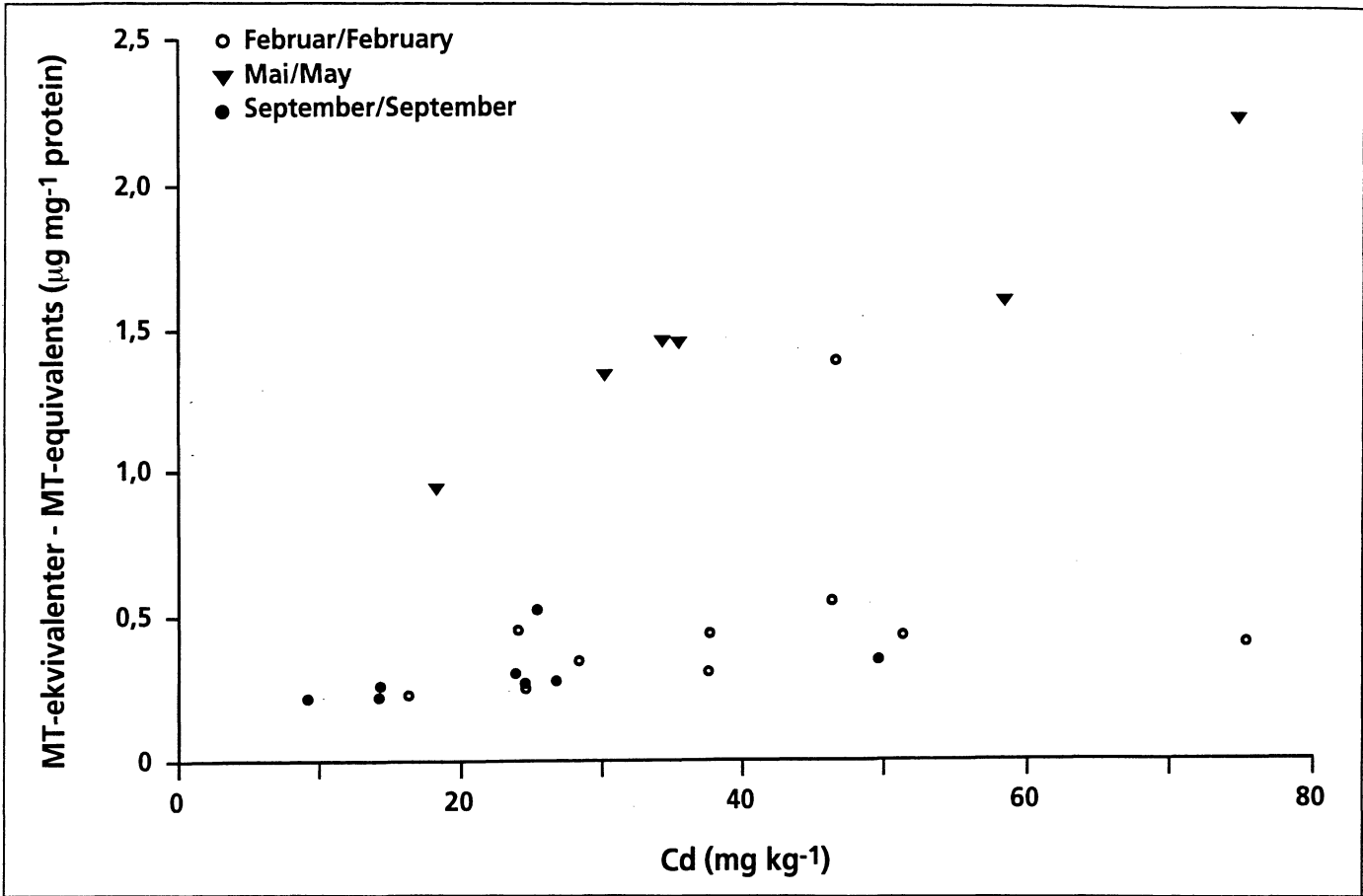
Som forventet var Cd-innholdet høyere i liryper fra Kongsvoll enn i liryper fra Åmotsdalen. Det viste seg også å være en konsistent forskjell mellom de forskjellige subcellulære fraksjonene når det gjaldt nyrevev uavhengig av år og lokalitet, mens bildet var mer varierende mhp lever. Vi vet fra tidligere undersøkelser at Cd-innholdet i nyre hos voksne liryper er relativt stabilt gjennom sesongen, mens Cd-innholdet i lever varierer (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Cd-innholdet i lever synes derfor å være mer påvirket av Cd-innholdet i næringen i perioden like før fuglen avlives (Myklebust 1992) og responderer raskere på en akutt Cd-belastning (Scheuhammer 1987). Levera har derfor en mer labil Cd-situasjon sammenlignet med nyrene som ikke viser tilsvarende endringer over kort tid (Scheuhammer 1987, Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Forskjellen i fordelingsmønster mellom de tre subcellulære fraksjonene i lever og nyre kan derfor skyldes at Cd-situasjonen endrer seg kontinuerlig i levera, mens vi har en mer stabil fordeling i nyrene.

Tabell 9. Cd-innhold (mg kg^{-1} (tv)) i lever og nyre i relasjon til metallothionein-ekvivalenter ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) hos voksne liryper fra Kongsvoll og Essand.- Regression statistics of Cd-content (mg kg^{-1} (dw)) in liver and kidneys in relation to metallothionein-equivalents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in adult willow ptarmigan from Kongsvoll and Essand.

Område Area	Måned month	Organ tissue	R ²	F	P	Antall number
Kongsvoll	9	Lever/Liver	0,19	1,38	0,29	8
«	2	«	0,09	0,79	0,40	10
«	5	«	0,90	36,28	0,004	6
Essand	2	«	0,43	6,06	0,04	10
Kongsvoll	9	Nyre/Kidneys	0,53	8,06	0,03	9
«	2	«	0,32	3,80	0,09	10
«	5	«	0,37	2,33	0,20	6
Essand	2	«	0,59	11,61	0,009	10



Figur 8. Sammenhengen mellom metallothionein-ekvivalenter i lever og nyre i liryper.-Relationship between metallothioneine equivalents in livers and kidneys of willow ptarmigan.



Figur 9. Sammenhengen mellom innhold av Cd i lever og metallothionein-ekvivalenter i liryper skutt i perioden september - mai på Kongsvoll.- Relationship between content of Cd in livers and metallothioneine equivalents in willow ptarmigan shot during September - May at Kongsvoll.

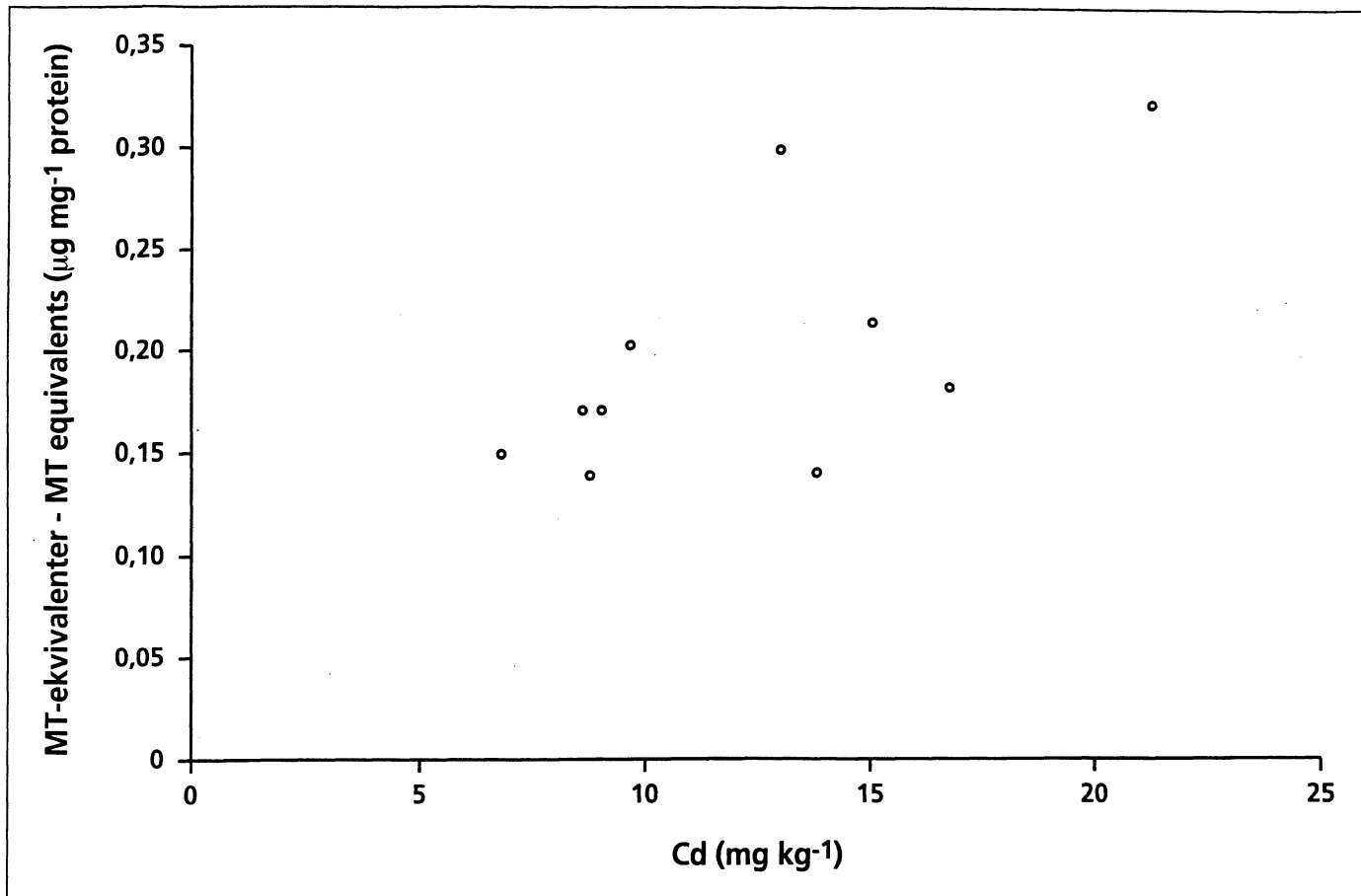
Det ble funnet en lineær sammenheng mellom Cd i partikulær og cytosol fraksjon i nyre i liryper fra Kongsvoll både i 1990 og i 1991. Dette kan igjen sannsynligvis forklares ved at det normalt er en stabil Cd-situasjon i nyrene (Scheuhammer 1987, Myklebust 1892, Pedersen & Myklebust 1993). Verdiene i 1991 lå klart høyere enn i 1990 og det kan det se ut som om nivåene i cytosol begynner å flate ut ved 60-80 ppm, mens nivåene i partikulær fraksjon fortsetter å øke. Dette kan indikere at nivået i cytosolfraksjonen begynner å nærme seg en metning. Ved å sammenligne resultatene fra en lineær regresjonsanalyse med en kurvetilpasset regresjonsanalyse (logaritmisk) får vi hhv. $r^2 = 0,70$ og $r^2 = 0,77$, noe som også indikerer en utflating når cytosol fraksjonen overstiger 60-80 ppm. Tilsvarende metning av bindingsevnen for Cd i cytosol (hovedsakelig til proteinet metallothionein) har blitt observert for pattedyr, og har der blitt relatert til nyreskade (Fowler 1991). Det kan imidlertid også ha inntruffet skader på et tidligere tidspunkt siden Cd også kan bindes til høymolekylære cytosoliske proteiner ved en eventuell metning av MT (såkalt "spill-over").

I lever fant vi en lineær sammenheng mellom Cd i partikulær og cytosol fraksjon i 1990, men ikke i 1991. Generelt var innholdet av Cd i ryper fra Kongsvoll høyere i 1991 enn i 1990 både lever og nyre. Siden Cd-innholdet i lever synes å

være mer direkte påvirket av Cd-innholdet i næringen og responderer raskere på en akutt Cd-belastning, kan det tenkes at Cd-innholdet i næringen i perioden før rypene ble skutt i 1991 hadde et høyere Cd-innhold enn i 1990. Det er også mulig å tenke seg at et forskjellig lever/nyre-forhold mhp Cd i de to årene kan gi opphav til forskjeller i forholdet mellom subcellulære fraksjoner. Det viste seg imidlertid at dette forholdet var svært likt i 1990 ($x = 0,17$) og 1991 ($x = 0,15$). Generelt sett er det sannsynlig at det ved høyere belastninger vil foregå en endring spesielt i lever slik at fordelingen av Cd i de forskjellige fraksjonene forskyves.

3.4.2 Metallothionein i relasjon til Cd-innhold

Cd-målingene både i lever og nyre fra Kongsvoll og Essand var i samsvar med tidligere målinger fra de samme lirytepopulasjonene både når det gjaldt Cd-nivå og endringer gjennom sesongen (Kålås & Lierhagen 1992, Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Forholdet mellom Cd-nivå i lever og nyre var også i samsvar med tidligere undersøkelser og med resultatene i kap. 2; ca 10 ganger høyere nivå i nyre enn i lever ($Cd_{\text{lever}} = 0,126 \times Cd_{\text{nyre}} + 2,97$).



Figur 10. Sammenhengen mellom innhold av Cd i lever og metallothionein-ekvivalenter i liryper skutt ved Essand i Tydal.-
Relationship between content of Cd in livers and metallothioneine equivalents in willow ptarmigan shot at Essand in Tydal.

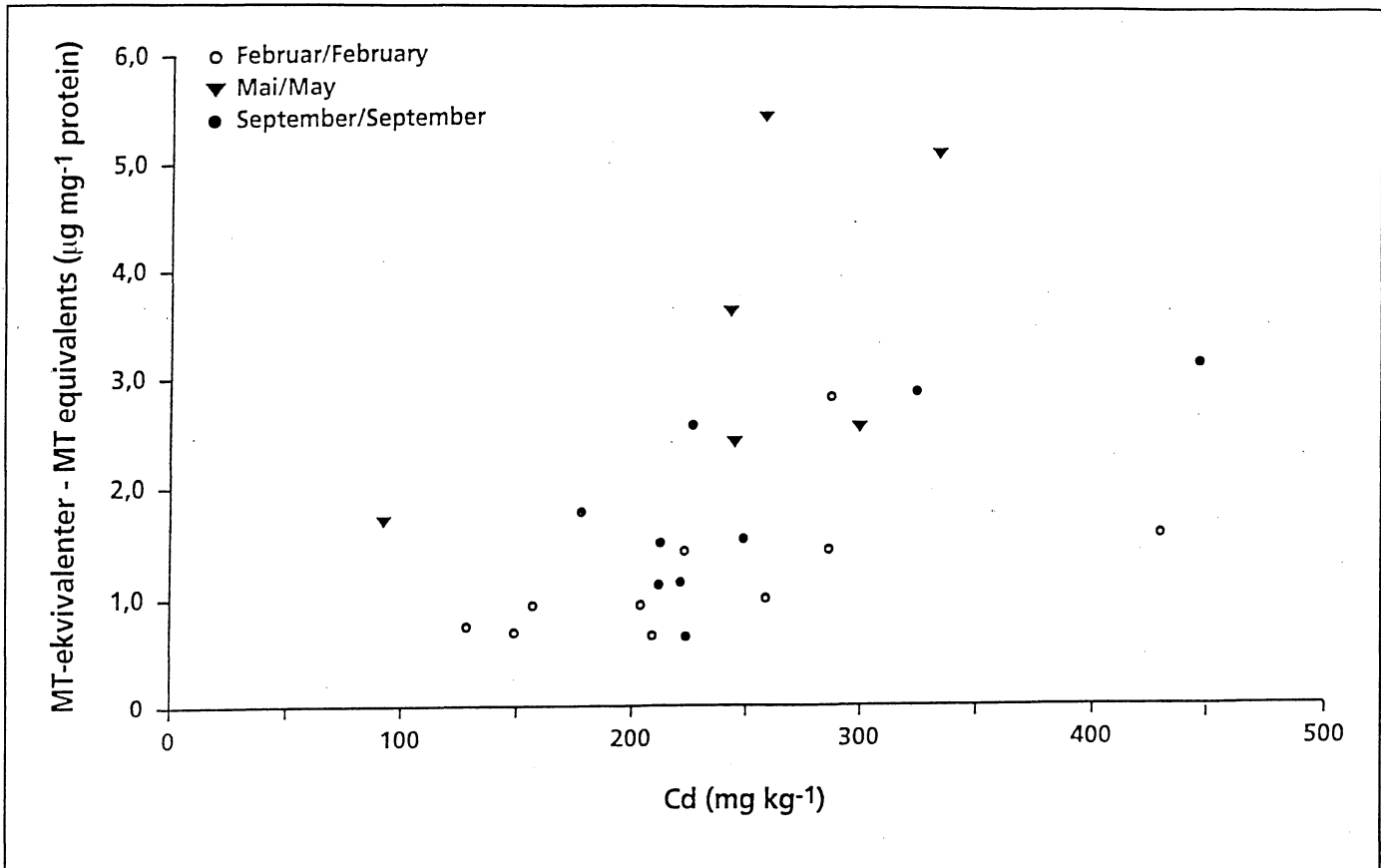
Cd-konsentrasjoner i nyre hos rypene fra Kongsvoll er svært høye i forhold til det som er beskrevet for andre fuglearter, også sjøfugl (Elliott et al. 1992). Det er også et høyere nyre:lever-forhold enn for andre arter, både fugl innsamlet i felt (Elliott et al. 1992) og fugl som er belastet under eksperimentelle betingelser (Scheuhammer & Templeton 1990). Normalt ligger dette forholdet på 2-3 ganger høyere akkumulasjonsrate i nyre enn i lever (Scheuhammer & Templeton 1990).

Innledningsvis ble det presentert fire prediksjoner når det gjaldt forholdet mellom MT og Cd i relasjon til område, organ og sesong. I tråd med vår første prediksjon ble det funnet et høyere MT-nivå i nyre enn i lever for totalmaterialet. Tidligere undersøkelser har indikert at nyret bare har ca 35 % av leveras evne til å syntetisere MT som respons på en gift Cd-belastning (Sendelbach & Klaassen 1988, Scheuhammer & Templeton 1990). På bakgrunn av dette skulle en forvente at nyret, som i lirype har 10 ganger høyere Cd-nivå enn lever, skulle ha 3-4 ganger høyere MT-nivå enn lever. Det ble også funnet en signifikant sammenheng mellom de to organene, men slik at MT-nivået i nyre bare var 2 ganger nivået i lever. Dette betyr enten at nyret hos ryper bare har 20 % av leveras evne til å syntetisere MT eller at andre MT-induserende

faktorer (f.eks. Zn, Cu,) bidrar vesentlig i denne prosessen (Scheuhammer & Templeton 1990).

I tråd med vår andre prediksjon hadde rypene fra Kongsvoll (høybelastet område) et signifikant høyere MT-nivå i både lever og nyre enn rypene fra Essand (lavbelastet område). Dette viser at ryper som utsettes for en stor Cd-belastning er i stand til å respondere på denne gjennom å produsere en økende mengde av MT. Dette er i overensstemmelse med tidligere undersøkelser (Brown et al. 1977).

Våre prediksjoner om variasjon i MT-innhold gjennom sesongen ble også oppfylt ved at vi fant det høyeste MT-nivå både i lever og nyre i mai og at variasjonen gjennom sesongen var størst i lever. Den store variasjonen i MT-nivå i lever skyldes sannsynligvis i første rekke den store sesongmessige variasjonen i Cd-innhold som også er funnet tidligere (Myklebust 1992, Pedersen & Myklebust 1993). Selvom det ikke ble funnet signifikante endringer gjennom sesongen i Cd-nivå i nyre, ble det høyeste MT-nivået allikevel målt i mai-ryper. I lever var det som forventet en klar sammenheng mellom topp i Cd-nivå i mai sammenfallende med topp i MT-nivå. På bakgrunn av dette kan vi si at økningen av MT fram mot mai bare delvis skyldes den økte akkumuleringen av Cd. Mens økningen i Cd-nivå i dette



Figur 11. Sammenhengen mellom innhold av Cd i nyre og metallotionein-ekvivalenter i liryper skutt i perioden september - mai på Kongsvoll.- Relationship between content of Cd in kidneys and metallothioneine equivalents in willow ptarmigan shot during September - May at Kongsvoll.

materialet var ca 5-10 % fra februar til mai var økningen i MT-innhold henholdsvis 280 % for nyre og 310 % for lever. Det ville være nærliggende å tenke seg at den store økningen i MT i mai skyldes en kombinasjon av økt Cd-nivå og andre MT-induserende metaller f.eks. sink og kobber. Det er vist at spesielt Zn er et svært potent MT-induserende metall (Scheuhammer & Templeton 1990). Tidligere undersøkelser av liryper på Kongsvoll har dessuten vist at Zn når sin høyeste verdi i både lever og nyre i ryper innsamlet i mai (Myklebust 1992). Dette synes imidlertid ikke å være tilfelle i vårt materiale da det ikke kan påvises signifikante variasjoner i Zn- eller Cu-innhold gjennom sesongen hverken i lever eller nyre. Den formidable økningen i MT-innhold både i lever og nyre må derfor tilskrives andre faktorer.

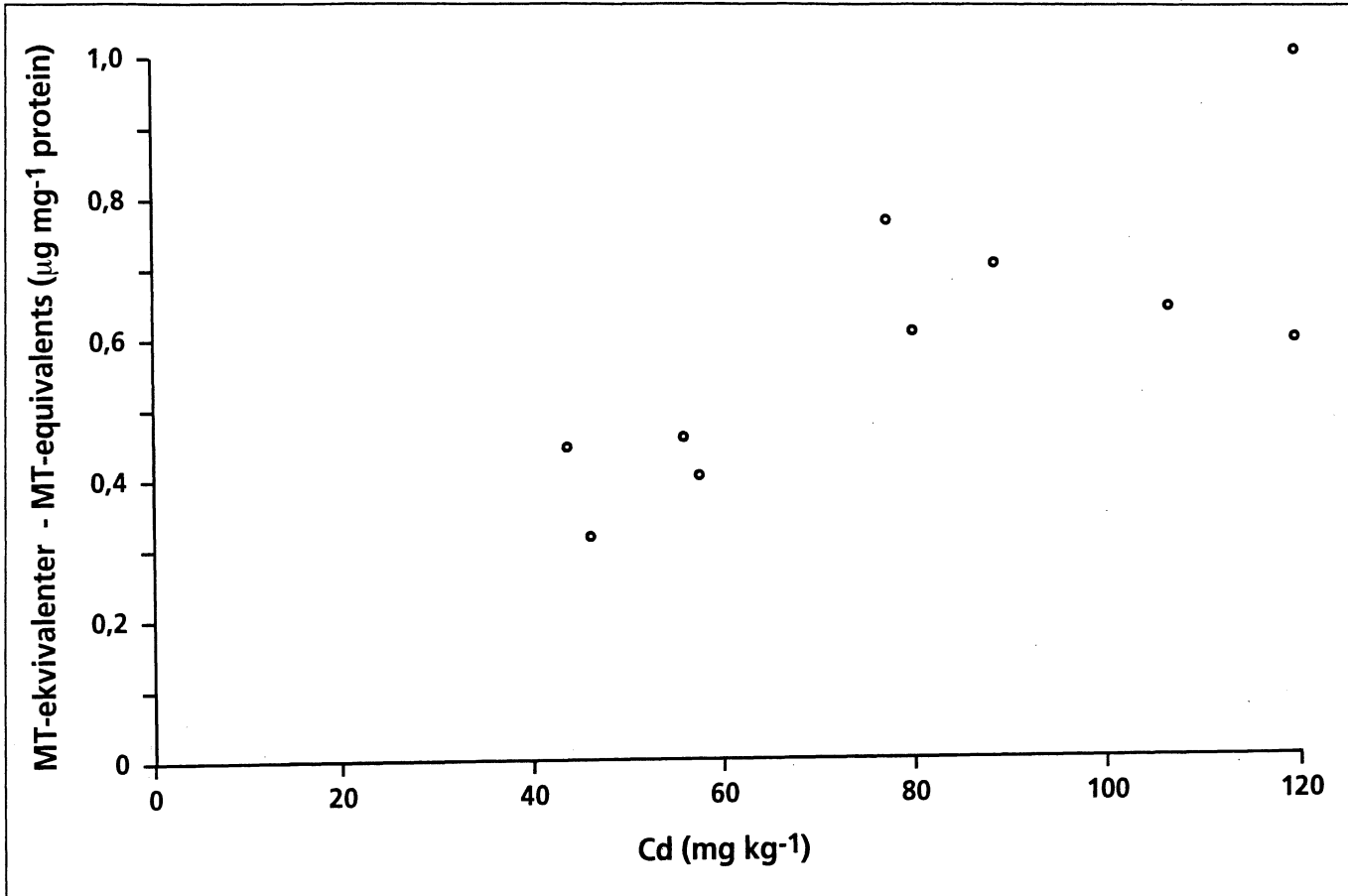
Det ble ikke funnet signifikante sammenhenger mellom Cd/MT-nivå i både nyre og lever i alle måneder i de to områdene. Det synes allikevel å være en gjennomgående bedre sammenheng mellom Cd- og MT-nivå i nyre enn i lever innen område og måned, med unntak av Kongsvoll-materialet fra mai. Det er også verdt å poengtere at for rypene fra Essand, som viste signifikante sammenhenger mellom Cd/MT-nivå både i nyre og lever var r^2 -verdiene hhv 0,59 og 0,43. Dette er i samsvar med resultater fra tidligere laboratorieforsøk på latterduer *Streptopelia risoria*, som

viser at Cd er best korrelert med MT i nyre. For lever oppnås den beste korrelasjonen med Zn, mens Cd kommer som nummer to (Scheuhammer & Templeton 1990). Også undersøkelser av frittlevende tresvaler *Tachycineta bicolor* viser at den beste sammenhengen mellom MT og metall-nivå i lever oppnås med Zn og ikke Cd (Louis et al. 1993).

Evnen til å produsere MT, og på den måten motvirke et metalls toksiske virkning, bygger på en fysiologisk respons i organismen. Denne evnen kan vi dele opp i to komponenter; respons og kapasitet. Responsen kan vi undersøke ved å teste hvor mye MT som syntetiseres av en viss mengde Cd, noe vi kan beregne på grunnlag av regresjonsstatistikken. En slik sammenligning av responsen mellom Kongsvoll og Essand kan gjøres i nyre fra liryper skutt i februar, som for begge områder har en rimelig god, om enn ikke signifikant, sammenheng mellom Cd/MT-nivå. Denne beregningen viser at rypene fra Essand akkumulerer 1 MT-ekvivalent for hver 166 ppm Cd, mens rypene fra Kongsvoll akkumulerer 1 MT-ekvivalent for hver 193 ppm Cd. Fordi sammenhengen mellom Cd/MT-nivå i Kongsvoll-ryperne ikke er statistisk signifikant kan vi ikke konkludere med at Essand-ryperne har en sterkere respons på Cd enn Kongsvoll-ryper. Resultatet indikerer sannsynligvis en relativt lik respons i de to lirypepopulasjonene.

Produksjonskapasiteten for en slik respons har imidlertid normalt en underliggende genetisk basis (Mulvey & Diamond 1991). Denne undersøkelsen viser at liryper responderer på økt Cd-belastning gjennom økt produksjon av MT. Det er likevel grunn til å tro at produksjonskapasiteten er mindre i dyr som normalt er tilpasset lave Cd-belastninger enn dyr som er tilpasset høye belastninger. Liryperne på Kongsvoll har trolig vært utsatt for høye Cd-belastninger i mange generasjoner og vi kan derfor forvente at det gjennom naturlig seleksjon har blitt utviklet mekanismer som gjør at skader i organer forårsaket av Cd

ikke oppstår eller reduseres. En nærmere undersøkelse av disse forhold vil være svært interessant, og av stor betydning for vurderingen av eventuelle negative effekter av økt Cd-belastning p.g.a. langtransportert forurensning til forskjellige områder. Det synes imidlertid ikke som om det er nådd en grense for syntesen av MT hverken i lever eller nyre hos rypere som er undersøkt her, selv ikke for rypene fra Kongsvoll. Dette er i overensstemmelse med observasjonene til Elliott et al. (1992), som ikke fant noen avflating av MT-nivåene i nyre hos sjøfugl, selv ved svært høye Cd-belastninger.



Figur 12. Sammenhengen mellom innhold av Cd i nyre og metallothionein-ekvivalenter i liryper skutt ved Essand i Tydal. - Relationship between content of Cd in kidneys and metallothioneine equivalents in willow ptarmigan shot at Essand in Tydal.

4 Sammenstilling av delresultater

Normalt overføres svært lite Cd fra indre organer til muskelvevet (Lande 1977, Hulse et al. 1980, Dmowski 1993), og selv ved svært høye Cd-konsentrasjoner i lever og nyre ligger muskelverdiene lavt. For liryper er dette også funnet både i denne undersøkelsen (kap.2) og tidligere (Myklebust 1992). Muskelverdiene fra Kongsvoll og Singsås/Essand ligger her på 1-2 ‰ av nyreverdiene, mens muskelverdiene i ryper fra Sirdal/Lund skutt i april ligger på 6 ‰ av nyreverdiene. Dette relativt høye muskelnivået kan skyldes at rypene i perioden før felling hadde stort inntak av Cd-rik næring. Selv om materialet bare består av 5 ryper ligger leververdiene, som bedre gjenspeiler Cd-inntaket i perioden umiddelbart før rypene ble skutt, relativt høyt. En annen mulig forklaring er at ryper som kommer fra dette området tidligere har vært tilpasset svært lave Cd-nivå gjennom begrenset tilgang på vier med høyt Cd-innhold. Dette kan ha ført til en dårligere utviklet evne til å binde Cd enn rypepopulasjoner hvor høyt inntak av vier/Cd har vært seleksjonskraften bak utvikling av evne/kapasitet til produksjon av f.eks. metallotionein. Selv om Cd-belastningen fortsatt er relativt lav sammenlignet med f.eks. Kongsvoll, har området gjennom de siste tiårs belastning i form av langtransportert forurensning blitt eksponert for økende mengder av Cd. Det kan allikevel tenkes at liryperpopulasjonen i området ennå ikke har utviklet tilstrekkelig produksjonskapasitet mhp MT for å ta hånd om Cd i samme grad som f.eks. ryper fra Kongsvoll.

I dette materialet kunne vi ikke påvise negative effekter på hverken hjerne eller nyrevev forårsaket av Pb-belastning. Imidlertid er ofte høyt inntak av Pb i kombinasjon med høyt inntak av Cd koblet til morfologiske endringer i nyrevev, men våre lokaliteter representerte ingen slik kombinasjon. Det ble allikevel dokumentert endringer i nyrevev i liryper fra Kongsvoll (høy Cd, lav Pb), som vi finner det rimelig å anta skyldes den høye Cd-belastningen.

Selv om vi ikke kunne finne indikasjoner på begrensninger i evnen til å produsere MT hverken i lever eller nyre, selv ved svært høye Cd-belastninger slik som på Kongsvoll, ble det funnet indikasjoner på at Cd-nivået i cytosol fraksjonen flatet ut ved 60-80 ppm. Hvorvidt dette er riktig er allikevel noe usikkert og en klargjøring av dette forhold krever at vi foretar analyse av subcellulær fordeling av Cd i ryper med svært høy Cd-belastning.

En eventuell metning av bindingsevnen for Cd i cytosol har tidligere blitt relatert til nyreskade (Fowler 1991). Det er derfor mulig at vi i ryper fra Kongsvoll ser effekter av svært høy Cd-belastning som fører til stagnasjon i videre akkumulering i cytosol fraksjonen i nyrevevet og over tid resulterer i vevsendringer. Den høye Cd-belastningen i liryper i dette området ser imidlertid ut til å være et naturlig fenomen forårsaket av en høy andel vier (*Salix* spp.) i føden og er ikke forårsaket av forurensning (Myklebust 1992, Myklebust

et al. 1993). Liryperne har derfor blitt eksponert for høye Cd-belastninger gjennom mange generasjoner og vi ville forvente at det gjennom naturlig seleksjon var utviklet mekanismer som gjorde at skader i organer forårsaket av Cd reduseres i størst mulig grad (Pedersen et al. 1992). Slike mekanismer kan f.eks. være redusert inntak av vier eller utvikling av toleranse eller avgiftingsmekanismer som reduserer Cd's giftvirkning. Syntetisering av metallotionein er opplagt en avgiftingsmekanisme som rypene har tatt i bruk, men MT-produksjonen er tydeligvis ikke tilstrekkelige til å hindre potensielt skadelige effekter av Cd-akkumulering i nyret. Allikevel kan et slikt system bli opprettholdt dersom kostnadene i form av reduksjon av "fitness" på grunn av nyreskader forårsaket av høyt inntak av vier er mindre enn økningen i "fitness" på grunn av de næringskvaliteter vier har sammenlignet med annen vegetasjon f.eks. bjørk *Betula pubescens*. Kostnaden av de aktuelle nyreskadene er trolig relativt lave sett i relasjon til liryper's korte levetid (2-3 år) (Pedersen et al. upubl.).

Vi kan avslutningsvis konkludere at svært mange av de parametre som her er undersøkt viser forholdsvis klare lineære sammenhenger f.eks. Cd-lever/nyre, Pb-lever/nyre, Cd-nyre/muskel, MT-lever/nyre osv. Vi vil forvente at en eventuell belastningseffekt vil påvirke fordelingsmønsteret mellom organer og cellulære fraksjoner som avviker fra det normale lineære forholdet ved at en terskelverdi nås. Vi finner ingen slik terskelverdi i; i) lever/nyre-forholdet hverken for Cd eller Pb; ii) nyre/muskel-forholdet for Cd; eller iii) Cd/MT-forholdet hverken i lever eller nyre. Vi finner derimot; i) indikasjoner på en terskelverdi for Cd i cytosol i nyrevev og ii) fokale proliferasjoner av bindevev i nyret i liryper fra Kongsvoll. Dette kan indikere at liryper fra områder med spesielt høy Cd-belastning, selvom denne er naturlig, får problemer med å håndtere dette slik at skader unngås.

5 Sammendrag

Tidligere undersøkelser på såvel lirype som fjellrype har vist til dels høyt innhold av Cd i lever og nyre fra fugler felt i de sørlige delene av landet, noe som indikerer en påvirkning fra langtransporterte forurensninger. Senere undersøkelser har også vist til dels svært høye verdier av Cd i ryper fra andre deler av landet og har dokumentert forhøyede konsentrasjoner av Pb i ryper fra de sørligste delene av Norge. Dette er toksiske stoff som ved forhøyet inntak kan virke negativt inn på rypenes overlevelse og reproduksjon, og som også kan overføres til mennesker.

Her presenterer vi først data som belyser forskjeller mellom akkumulering av Cd og Pb i nyre, lever, brystmuskel og hjerne fra lirype. Videre viser vi resultater som belyser forholdet mellom belastningsnivå av Pb og Cd, og eventuelle skader (histologiske endringer) i de organ som forventes å være mest sensitive for tungmetaller (nyre og hjernevev). Til slutt presenterer vi resultater fra en undersøkelse av forekomster av metallotioneiner (MT) (avgiftningmekanisme) i lever- og nyrevev fra liryper som har blitt eksponert for forskjellig naturlig Cd-belastning.

Forskjeller mellom organer i akkumulering av Cd og Pb.

Det er kjent at konsentrasjoner av Cd i nyre hos lirype er 7-10 ganger høyere enn i lever, mens brystmuskel hos lirype har svært lave Cd-konsentrasjoner. For Pb er dette forholdet ikke klarlagt. Videre finnes det ingen dokumentasjon av belastningsgrad av disse tungmetallene i hjernevev hos rype, en vevstype som er særlig utsatt ved akkumulering av tungmetaller.

For å undersøke om forhøyet inntak av Cd og Pb i lirype medfører økt innhold av disse metallene i muskel og hjernevev er det undersøkt for sammenhenger mellom Cd og Pb konsentrasjoner i nyre, lever, muskel og hjernevev.

Vi finner en klar sammenheng mellom Pb-konsentrasjoner i nyre og i lever, og samtidig en noenlunde lik akkumulering av Pb i disse to organene. Videre viser vi at det innen det aktuelle belastningsnivået for Pb (lever < 8 mg kg⁻¹, tørrvekt (tv)) overføres svært lite Pb til muskel og hjernevev.

For Cd finner vi, som tidligere dokumentert, en betydelig høyere akkumulering i nyre enn i lever (> 10 x) og en klar sammenheng mellom Cd-innhold i nyre og i lever. Videre finner vi en klar sammenheng mellom høyt Cd-innhold i nyre og forhøyet Cd-innhold i muskel. Muskelverdiene er imidlertid relativt lave (< 1 mg kg⁻¹ (tv)), selv ved meget høye Cd-konsentrasjoner i nyret (450 mg kg⁻¹ (tv)), og de fleste muskelverdiene ligger i størrelsesordenen 1-2 % av nyreverdiene. Vi måler et betydelig lavere Cd-innhold i hjernevev enn i muskel (< 0.1 mg kg⁻¹ (tv)). Imidlertid finner vi også for dette organet en sammenheng med høyest Cd-innhold i hjerne i området med høyest Cd-belastning i nyre.

Den lave akkumuleringen av Cd og Pb i muskelvev medfører at det økte optaket av Pb i ryper fra de sørligste delene av

landet og det høye innhold av Cd i flere deler av Norge, har små kostholdsmessige konsekvenser for mennesker.

Cd og Pb og histologiske endringer i nyrevev

Høyt inntak av Pb og Cd kan medføre morfologiske endringer i nyrevev (Pb og Cd) og hjernevev (Pb) som dersom det blir omfattende nok kan virke negativt inn på overlevelse og reproduksjon. Eksempler på slike endringer i nyrevev er flekkvis dødt vev i de proximale tubuli, oppsvulmede mitokondrier, endringer i tubulicellenes cytoplasma og bindevevsdannelse i interstitiene. Syrefaste inklusjoner i proksimale tubuli i nyre er et eksempel på en spesifikk effekt av Pb

For å undersøke om det høye inntaket lirype i enkelte områder har av Cd og Pb medfører histologiske endringer i organer som er følsomme for tungmetaller, er liryper fra områder med forskjellig grad av Cd og Pb belastning undersøkt. Her inngår prøver fra Sirdal/Lund, Rogaland og Vest-Agder fylker (høy Pb, lav Cd), Kongsvoll, Sør-Trøndelag fylke (høy Cd, lav Pb) og Singsås/Essand, Sør-Trøndelag fylke (lav Pb, lav Cd).

Denne undersøkelsen viser at langtids lavdoseeksponering av liryper for Pb som gir Pb-belastninger i lever og nyre i området 4 - 6 mg kg⁻¹ (tv), ikke medfører vevsendringer i nyre og hjerne som kan dokumenteres med lysmikroskopi. At vi ikke kan dokumentere slike effekter i hjernevev er ikke uventet med bakgrunn i de svært lave konsentrasjoner av Pb vi her har funnet, selv ved relativt høye konsentrasjoner av dette tungmetallet i nyre og lever.

For individer fra området med høyest Cd-belastning (nyre: 178 - 446 mg kg⁻¹ (tv)) dokumenterer vi regelmessige forandringer i nyret i form av bindevevsdannelse i interstitiene i samtlige fugler (fokale proliferasjoner av bindevev), og vi finner det rimelig å anta at det høye omfanget av slike endringer i liryper fra Kongsvoll skyldes deres høye inntak av Cd.

Cd og produksjon av metallotioneiner

I vev hvor en finner akkumulering av Cd synes dette alt vesentlig å være bundet til lavmolekylære, sulfohydroksylrike proteiner, de såkalte metallotioneiner (MT). Alle typer vev kan trolig syntetisere MT, men denne kapasiteten synes å variere fra vev til vev. Hos pattedyr er det vist at lever, nyre og milt har den høyeste kapasiteten for å syntetisere MT. Det er vist at MT også har evne til å binde flere andre metaller (Zn, Cu, Hg) og dette proteinet er sannsynligvis viktig for detoksifisering og lagring av flere toksiske metaller.

For å undersøke om forskjellig grad av naturlig Cd-belastning medfører forskjeller i MT-innhold i lever og nyre hos lirype ble det samlet inn fugler fra Kongsvoll (naturlig høybelastet) og Essand (naturlig lavbelastet). På bakgrunn av kjente forhold mellom MT/Cd-nivå og av tidligere undersøkelser på lirype som viser sesongmessige variasjoner i Cd-innhold, spesielt i lever, vil vi forvente at; i) MT-nivået i nyre er høyere enn i lever; ii) MT-nivået i lever og nyre er høyere i liryper fra et naturlig høybelastet område enn i et lavbelastet område; iii)

MT-nivået i lever og nyre er høyere om våren enn ellers i sesongen i liryper fra samme lokalitet; og iv) MT-nivået gjennom sesongen er mer stabilt i nyre enn i lever.

Vi finner høye Cd-verdier i såvel lever som nyre i lirype fra Kongsvoll, og nivåene fra Essand var som forventet signifikant lavere enn disse for begge typer vev. I tråd med dette ble det også funnet signifikante forskjeller i MT-innhold i både lever og nyrevæv mellom de to områdene, med de klart høyeste verdiene i ryper fra Kongsvoll.

Videre finner vi en signifikant sammenheng mellom MT-nivå i lever og nyre med et nyrenivå som var omtrent det dobbelte av levernivået. I materialet fra Kongsvoll ble det funnet store og signifikante variasjoner av MT i såvel lever som nyre gjennom sesongen, og som forventet var variasjonen størst i lever. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i MT-nivå hverken i lever eller nyre for ryper fra Kongsvoll skutt i september og februar, men MT-innholdet i begge organer økte i ryper skutt i mai.

Vi finner også en signifikant lineær sammenheng mellom Cd- og MT-nivå i både lever og nyre, mens en oppsplitting av materialet på sesong og område ga en varierende grad av signifikans. I liryper fra Essand ble det funnet signifikante sammenhenger mellom Cd og MT i begge organer, mens liryper fra Kongsvoll bare hadde signifikante sammenhenger i nyre i september-materialet og i lever i mai-materialet.

Resultatene viser at MT i liryper kan være en viktig mekanisme for detoksifisering av Cd, og at høybelastede populasjoner kan "svare" på belastningen ved å øke MT-produksjonen. Det er imidlertid også klart at andre metaller, kanskje i første rekke Zn, kan bidra i vesentlig grad til MT-produksjon, slik at den direkte sammenhengen mellom Cd/MT-forholdet ikke blir like entydig. Selv om liryperne fra Kongsvoll har til dels svært høye Cd-nivå er det lite som indikerer at de har nådd en grense for syntese av MT i hverken lever eller nyre.

6 Summary

Previous studies of both willow ptarmigan and rock ptarmigan have sometimes shown a high content of Cd in the livers and kidneys of birds killed in southern parts of Norway, indicating impact from long-range atmospheric transport of pollutants. More recent studies have also shown Cd values which are sometimes extremely high in ptarmigan from other parts of the country and have also revealed increased concentrations of Pb in ptarmigan from southernmost Norway. These are toxic substances which, with excessive intake, may negatively affect the survival and reproduction of the ptarmigan, and can also be transferred to people.

Here we are presenting data which throw light on differences between the accumulation of Cd and Pb in ptarmigan kidneys, liver, pectoral muscle and brain. Results are also reported which illustrate the relationship between the loads of Pb and Cd and possible damage (histological changes) in those organs which can be expected to be most sensitive to heavy metals (kidney and brain tissues). Finally, results are presented from a study of the occurrence of metallothioneines (MT) (detoxifying mechanisms) in liver and kidney tissues from willow ptarmigan that have been exposed to various natural loads of Cd.

Differences between organs in accumulation of Cd and Pb

It is known that concentrations of Cd in willow ptarmigan kidneys is 7-10 times higher than in liver, and their pectoral muscle have extremely low concentrations. The situation for Pb has not been clarified. Nothing is known concerning the quantity of these heavy metals in ptarmigan brain tissue, a type of tissue that is particularly at risk when heavy metals accumulate.

To find out whether increased intakes of Cd and Pb by willow ptarmigan result in increased contents of these metals in muscle and brain tissues, the relationship between Cd and Pb concentrations in kidney, liver, muscle and brain tissues was studied.

A clear connection was found between Pb concentrations in kidneys and livers, and a simultaneous, approximately equivalent accumulation of Pb in these two organs. In addition, it was shown that within the relevant load level for Pb (liver < 8 mg kg⁻¹, dry weight (dw)) extremely small quantities of Pb are transferred to muscle and brain tissues.

For Cd it was found, as previously shown, that substantially more accumulation took place in kidneys than in livers (> 10 x) and there was a clear relationship between their Cd contents. Moreover, a clear relationship was found between a high Cd content in kidneys and an increased content of Cd in muscles. The muscle values are, however, relatively low (< 1 mg kg⁻¹ (dw)), even with a very high Cd concentration in the kidney (450 mg kg⁻¹ (dw)) and most muscle values are

around 1-2 % of kidney values. Significantly less Cd was found in brain tissue than in muscle ($< 0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ (dw)}$). However, here, too, it was found that the highest Cd content in brain tissue occurred in the area having the highest Cd loads in kidney.

The low accumulation of Cd and Pb in muscle tissue results in the increased intakes of Pb in ptarmigan from southern parts of the country and the high content of Cd in several parts of Norway having little nutritional consequence for people.

Cd and Pb, and histological changes in kidney tissue

High intakes of Pb and Cd can result in morphological changes in kidney tissue (Pb and Cd) and brain tissue (Pb) which, if sufficiently severe, may have a negative effect on survival and reproduction. Such changes in kidney tissue include patches of dead tissue in the proximal tubuli, swollen mitochondria, changes in the cytoplasm of the tubuli cells and formation of connective tissue in the interstitia. Acid-resistant inclusions in proximal tubuli in kidneys are an example of a specific effect of Pb.

To find out whether the high intake of Cd and Pb by willow ptarmigan in certain areas leads to histological changes in organs which are sensitive to heavy metals, willow ptarmigan from areas with different Cd and Pb loads have been investigated. Samples have been studied from Sirdal/Lund astride the county border of Rogaland and Vest-Agder (high Pb, low Cd), Kongsvoll in Sør-Trøndelag (high Cd, low Pb) and Singsås/Essand in Sør-Trøndelag (low Pb, low Cd).

This study showed that long-term, low-dose exposure of willow ptarmigan to Pb, giving Pb loads in livers and kidneys in the range of $4\text{--}6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ (dw)}$, did not result in tissue changes in kidneys and brains that could be proved by light microscopy. That we were unable to prove such effects in brain tissue is not unexpected considering the extremely low concentrations of Pb found, even when relatively high concentrations of Pb were found in kidneys and livers.

Every individual from Kongsvoll, the area with the highest Cd load (kidney: $178\text{--}446 \text{ mg kg}^{-1} \text{ (dw)}$), showed consistent changes in their kidneys in the shape of formation of connective tissue in the interstitia (focal proliferations of connective tissue), and it is reasonable to assume that the high incidence of such changes in these willow ptarmigan results from their high intake of Cd.

Cd and production of metallothioneines

Where accumulation of Cd is found in tissue, this seems to be largely bound to low-molecular, sulphohydroxyl-rich proteins, so-called metallothioneines (MT). All types of tissue can probably synthesise MT, but this capacity seems to vary from tissue to tissue. In mammals, it has been shown that liver, kidneys and spleen have the highest capacities for synthesising MT. It has, furthermore, been shown that MT is also capable of binding several other metals (Zn, Cu, Hg)

and this protein is probably important for detoxifying and storing several toxic metals.

To find out whether different levels of natural Cd loads result in differences in the content of MT in livers and kidneys of willow ptarmigan, birds were collected from Kongsvoll (natural high load) and Essand (natural low load). Considering the already established relationship between levels of MT and Cd, and the previous investigations of willow ptarmigan which have shown seasonal variations in Cd contents, especially in livers, it was expected that i) the MT level in kidneys would be higher than in livers, ii) the MT level in livers and kidneys would be higher in willow ptarmigan from an area with a natural high load than from one with a natural low load, iii) the MT level in livers and kidneys would be higher in spring than other seasons in willow ptarmigan from the same locality, iv) the MT level through the year would be more stable in kidneys than in livers.

High Cd values were found in both livers and kidneys in willow ptarmigan from Kongsvoll, and the levels from Essand were, as expected, significantly lower than these for both types of tissue. In keeping with this, significant differences in MT contents were found in both liver and kidney tissues between these two areas, the substantially highest values being in willow ptarmigan from Kongsvoll.

In addition, a significant relationship was found between the MT level in livers and kidneys, the level in kidney being approximately double that in liver. In the samples from Kongsvoll, large and significant variations in MT were found in both livers and kidneys through the year and, as expected, the variation was greatest in livers. Significant differences in MT levels were not found in either livers or kidneys for willow ptarmigan shot at Kongsvoll in September and February, but the MT content in both organs increased in willow ptarmigan shot in May.

A significant linear relationship was also found between the Cd and MT levels in both livers and kidneys, but a breakdown of the material into seasons and areas gave a varying degree of significance. In willow ptarmigan from Essand, significant relationships between Cd and MT were found in both organs, whereas Kongsvoll willow ptarmigan only showed significant relationships in kidneys in samples from September and in livers from May samples.

The results show that MT in willow ptarmigan may be an important mechanism for detoxifying Cd, and that populations which experience high loads may "answer" to the loads by increasing their MT production. It is, however, also obvious that other metals, perhaps primarily Zn, can substantially contribute to the MT production, so that the direct relationship between Cd and MT is not always equally obvious. Even though some Kongsvoll willow ptarmigan contain extremely high levels of Cd there is little to indicate that they have reached a limit for synthesis of MT in either their liver or their kidneys.

7 Litteratur

- Barton, J.C., Conrad, M.E., Harrison, L. & Nuby, S. 1978. Effect of calcium on the absorption and retention of lead. - *J. Lab. Clin. Med.* 91: 366-376.
- Birkhead, M. Luke, B. & Mann, S. 1982. Intra cellular localization of lead in tissues of the mute swan *Cygnus olor*. - *Tissue & Cell* 14: 691-701.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. - *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brady, F.O., Webb, M. & Mason, R. 1982. Zinc and copper metabolism in neonates: Role of metallothionein in growth and development. - I: Foulkes, E.C., red. *Biological roles of metallothioneins*. Elsevier North Holland, New York.
- Brdicka, R. 1933. Polarographic studies with the presence of cobalt salts in 20 amoniacal solutions of ammonium chloride. - *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5,20: 112-118.
- Brown, D.A., Bawden, C.A., Chatel, K.W. & Parsons, T.R. 1977. The wildlife community of Iona Island jetty, Vancouver, B.C., and heavy-metalpollution effects. - *Environ. Conserv.* 4: 213-216.
- Burger, J. & Gochfeld M. 1988. Effects of lead on growth in young herring gulls (*Larus argentatus*). - *J. Toxicol. Environ. Health.* 25: 227-236.
- Cain, B.W., Sileo, L. Franson, J.C. & Moore J. 1983. Effects of dietary cadmium on mallard *Anas platyrhynchos* ducklings. - *Environ. Res.* 32: 286-297.
- Canover, W.J. & Iman R.L. 1981. Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. - *Am. Stat.* 35: 124-132.
- Cherian, M.G. & Goyer, R.A. 1978. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. A mini-review. - *Life Sci.* 23: 1-10.
- Chishti, M.A. & Rotkiewicz, T. 1993. Hepatic and renal ultrastructural changes in cockerels exposed to cadmium chloride and subsequent interactions with organophosphate insecticide. - *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 12: 35-45.
- Clausen, B. & Wolstrup, C. 1979. Lead poisoning i game from Denmark. - *Danish Rev. Game Biol.* 11: 1-22.
- Coleman, M.E., Elder, R.S., Basu, P. & Koppenaal, G.P. 1992. Trace metals in edible tissues of livestock and poultry. - *J. AOAC International* 75: 615-625.
- DeMent, S.H., Chisolm, J.J., Eckhaus, M.A. & Strandberg J.D. 1987. Toxic lead exposure in the urban rock dove. - *J. Wildl. Disease* 23: 273-278.
- Dicheva, L. & Stanchev, K. 1988. Effect of lead on the histological structures of duodenum, liver and kidneys of chicks. - *Anim. Sci.* 25: 99-105.
- Dmowski, K. 1993. Lead and cadmium concentration of passerine birds (starling) during their migration through a zinc smelter area. - *Acta Ornithologica* 28: 1-9.
- Eisler, R. 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. - *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85,1.2: 46 pp.
- Eisler, R. 1988. Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. - *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85,1.14: 134 pp.
- Elinder, C.-G. & Nordberg, M. 1985. Metallothionein. - I: Friberg, L., Elinder, C.-G., Kjellström, T. & Nordberg, G.F., red. *Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1:65-80.
- Elliott, J.E., Scheuhammer, A. M., Leighton, F.A. & Pearce, P.A. 1992. Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 63-73.
- Espelien, I.S. 1993. Genetiske effekter av tungmetaller på pattedyr. En kunnskapsoversikt. - *NINA Utredning* 051: 1-49.
- Flick, D.F., Kraybill, H.F. & Dimitroff, J.M. 1971. Toxic effects of cadmium: a review. - *Environ. Res.* 4: 71-85.
- Fowler, B.A., Grandley, R.E., Akkerman, M., Lipsky, M.M. & Smith, M. 1991. Proximale tubule cell injury. - I: Klaasen, C.D. & Suzuki, K.T., red. *Metallothionein in biology and medicine*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 311-321.
- Fox, M.R.S., Jacobs, R.M., Jones, A.O.L., Fry, B.E. & Stone, C.L. 1980. Effects of vitamin C and iron on cadmium metabolism. - *Ann. New York Acad. Sci.* 355: 249-261.
- Garcia, M.T.A. & Vazquez, I.C. 1988. Effects of atmospheric lead upon the liver and kidney of pigeons from the city of Madrid Spain. - *Environ. Technol. Lett.* 9: 227-238.
- Gjerstad, K.O. & Hanssen, I. 1984. Experimental lead poisoning in willow ptarmigan. - *J. Wildl. Manag.* 48: 1018-1022.
- Goyer, R.A. 1986. Toxic effects of metals. - I: Klassen, C.D., Amdur, M.O., Donull, J., red. *Casarett and Doull's toxicology*. Macmillan Publishing Company, New York, 582-435.
- Harper, D.G.C. 1994. Some comments on the repeatability of measurements. - *Ringling & Migration* 15: 84-90.
- Havera, S.P., Wood, S.G. & Georgi, M.M. 1992. Blood and tissue parameters in wild mallards redosed with lead shot. - *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 238-245.
- Herredsvella, H. & Munkejord, Aa. 1988. Ryper i Sørvest-Norge er kadmiumforgiftet. - *Vår fuglefauna* 11: 75-77.
- Hirai, M., Kawamoto, T & Kodama, Y. 1991. Toxic effects of ingested lead shots in domestic fowls. - *Biol. Trace Elem. Res.* 30: 291-307.
- Hulse, M., Mahoney, J.S., Schroder, G.D., Hacker, C.S. & Pier, S.M. 1980. Environmentally acquired lead, cadmium, and manganese in the cattle egret, *Bubulucus ibis*, and the laughing gull, *Larus atricilla*. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9: 65-78.
- Hunter, B. & Wobeser, G. 1980. Encephalopathy and peripheral neuropathy in lead poisoned mallard ducks. - *Avian Dis.* 24: 169-178.
- Kägi, J. H.R. & Schäffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. - *Biochem.* 27: 8509-8515.
- Kendall, R.J. & Scanlon, P.F. 1981. Chronic lead ingestion and nephropathy in ringed turtle dove *Streptopelia risoria*. - *Poult. Sci.* 60: 2028-2032.

- Kendall, R.J. & Scanlon, P.F. 1982. Toxicology of ingested lead acetate in ringed turtle dove *Streptopelia risoria*. - Environ. Pollut. Ser. A 27: 255-262.
- Kendall, R.J. & Scanlon, P.F. 1985. Histology and ultrastructure of kidney tissue from ringed turtle doves that ingested lead. - J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 6: 85-96.
- Kendall, R.J., Scanlon P.F. & Veit H.P. 1983. Histologic and ultrastructural lesions of mourning doves *Zenaida macroura* poisoned by lead shot. - Poult. Sci. 62: 952-956.
- Koller, L.D. & Kovacic, S. 1974. Decreased antibody formation in mice exposed to lead. - Nature 250: 148-150.
- Kålås, J.A. & Lierhagen, S. 1992. Terrestrisk naturovervåking. Metallbelastninger i lever fra hare, orrfugl og lirype i Norge. - NINA Oppdragsmelding 137: 1-74.
- Kålås, J.A., Ringsby, T.H. & Lierhagen, S. 1995. Metals and selenium in wild animals from Norwegian areas close to Russian nickel smelters. - Environ. Monit. Assess. 36:251-270.
- Lande, E. 1977. Heavy metal pollution in Trondheimsfjorden, Norway, and the recorded effects on the fauna and flora. - Environ. Pollut. 12: 187-198.
- Lin, L.-R. & Huang, P.C. 1990a. Pigeon metallothionein consists of two species. - Biochem. Biophys. Acta. 1037: 248-255.
- Lin, L.-Y. & Huang, P.C. 1990b. Complete homology in metallothionein from two genera of ducks and their hybrids. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 168: 182-187.
- Louis, V.L.St., Breebart, L., Barlow, J.C., Klaverkamp, J.F. 1993. Metal accumulation and metallothionein concentrations in tree swallow nestlings near acidified lakes. - Environ. Toxicol. Chem. 12: 1203-1207.
- Lücker, E., Gerbig, C. and Kreuzer, W. 1993. Distribution of Pb and Cd in the liver of the mallard - direct determination by means of solid sampling ZAAZ. - Fresenius J. Anal. Chem. 346: 1062-1067.
- Marlowe, M. 1986. Exposure to metal pollutants and behavioral disorders in children: a review of the evidence. - Rev. Environ. Health 1-4: 85-117.
- McGowan, C. & Donaldson, W.E. 1987. Lead effects in the chick during selenium deficiency. - Comp. Biochem. Physiol. 88C: 23-25.
- Mulvey, M. & Diamond, S.A. 1991. Genetic factors and tolerance acquisition in populations exposed to metals and metalloids. - I: Newman, M.C. & McIntosh, A.W. (red.). Metal ecotoxicology: Concepts and applications. Lewis publishers, Chelsea, Michigan. s. 301-321.
- Mudge, G.P. 1983. The incidence and significance of ingested lead pellet poisoning in British wildfowl. - Biol. Conserv. 27: 335-372.
- Myklebust, I. 1992. Akkumulering av kadmium i lirype, *Lagopus lagopus* på Dovrefjell. - Hovedfagsoppgave, Zoologisk Institutt, AVH, Univ. i Trondheim.
- Myklebust, I., Nybø, S., Kålås, J.A. & Pedersen, H.C. 1993. Cadmium accumulation in willow ptarmigan (*Lagopus L. lagopus*) and rock ptarmigan (*L. mutus*) in Central Norway. - Science Tot. Environ., Supl. 1993: 135-139.
- Narbaiz, R., Marino, I. & Sarkar, K. 1985. Lead-induced early lesions in the brain of the chick embryo. - Teratology 32: 389-396.
- Nicholson, J.K. 1981. The comparative distribution of zinc, cadmium and mercury in selected tissues of the herring gull (*Larus argentatus*). - Comp. Biochem. Physiol. 68C: 91-94.
- Nicholson, J.K., Kendall, M.D. & Osborn, D. 1983. Cadmium and mercury nephrotoxicity. - Nature 304: 633-635.
- Nybø, S. 1991. Terrestrisk naturovervåking. Tungmetaller og aluminium i pattedyr og fugl. - DN-notat 1991-9.
- Olafson, R.W. & Olsson, P.-E. 1994. Electrochemical detection of 20 metallothionein. - Meth. Enzymol. 205, part B, 205-213.
- Pedersen, H.C. & Nybø, S. 1990. Effekter av langtransportert forurensning på terrestriske dyr i Norge. En statusrapport med vekt på SO₂, NO₂ og tungmetaller. - NINA Utredning 5: 1-54.
- Pedersen, H.C. & Myklebust, I. 1993. Age-dependent accumulation of cadmium and zinc in the liver and kidneys of Norwegian Willow Ptarmigan. - Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51: 381-388.
- Pedersen, H.C., Nygård, T., Myklebust, I. & Sæther, M. 1991. Metallbelastninger i lirype. - NINA Oppdragsmelding 71: 1-18.
- Pedersen, H.C., Myklebust, I., Nygård, T., & Sæther, M. 1992. Akkumulering og effekter av kadmium i lirype. - NINA Oppdragsmelding 152: 1-27.
- Rabinowitz, M.B., Wang, J.-D. & Soong W.-T. 1992. Apparent threshold of lead's effects on child intelligence. - Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48: 688-695.
- Rao, P.V.V.P., Jordan, S.A., Bhatnagar, M.K. 1989a. Ultrastructure of kidney of ducks exposed to methylmercury, lead, and cadmium in combination. - J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 9: 19-44.
- Rao, P.V.V.P., Jordan, S.A., Bhatnagar, M.K. 1989b. Combined nephrotoxicity of methylmercury, lead, and cadmium in pekin ducks: metallothionein, metal interactions and histopathology. - J. Toxicol. Environ. Health 26: 327-348.
- Richards, M.P. & Cousins, R.J. 1975. Mammalian zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 64:1215-1223.
- Richardson, M.E., Fox, M.R.S. & Fry, B.E. 1974. Pathological changes produced in Japanese quail by ingestion of cadmium. - J. Nutr. 104: 323-338.
- Rocke, T.E. & Samuel, M.D. 1991. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. - J. Wildl. Dis. 27: 1-9.
- Rowland, R.D. & Bray, D.J. 1980. Cadmium retention in chicks: effects of calcium, vitamin D₃ and zinc. - Poult. Sci. 59: 1657.
- Scheuhammer, A.M. 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: A review. - Environ. Poll. 46: 263-295.
- Scheuhammer, A.M. & Templeton, D.M. 1990. Metallothionein production: similar responsiveness of avian liver and kidney to chronic cadmium administration. - Toxicol. 60: 151-159.

- Schulz, L.-C. 1991. Pathologie der haustiere, Teil I & II. - Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Sendelbach, L.E. & Klaassen, C.D. 1988. Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein. - Toxicol. Appl. Pharmacol. 92: 95-
- Shartzer, K.L., Kage, K., Sobieski, R.J. & Andrews, G.K. 1993. Evolution of avian metallothionein: DNA sequence analyses of turkey metallothionein gene and metallothionein cDNAs from pheasant and quail. - J. mol. Evol. 36: 255-262.
- Steinnes, E., Røyset, O., Vadset, M. & Johansen, O. 1993. Atmosfærisk nedfall av tungmetaller i Norge. Landsomfattende undersøkelse i 1990. - SFT Rapport 523/93: 1 - 36.
- Vesselinova, A., Bohorov, O., Stanchev, K. & Lazarov, Y. 1985. Morphologic changes in birds offered cadmium with the feed. - Vet. Med. Nauki 22: 26-31.
- Webb, M. & Cain, K. 1982. Functions of metallothionein.- Biochem. Pharmacol. 31: 351-372.
- Whitehead, C.J., Prashad, D.N. & Blackburn R.O. 1988. Cadmium-induced changes in avian renal morphology. - Experientia 44: 193-198.
- Wojcik, W. 1980. Estimation of contamination of small game by heavy metals in the region of copper works. - Ekol. Pol. 28: 601-614.
- Wren, C.D., Nygård, T. & Steinnes, E. 1994. Willow ptarmigan (*lagopus lagopus*) as biomonitor of environmental metal levels in Norway. - Environ. Pollut. 85: 291-295.

Naturens tålegrenser

Oversikt over utgitte rapporter

- 1 Nygård, P.H. [1989]. Forurensningers effekt på naturlig vegetasjon; en litteraturstudie. - Norsk institutt for skogforskning (NISK), Ås.
- Uten nr.
Jaworowski, Z. 1989. Pollution of the Norwegian Arctic: A review. - Norsk polarinstitutt (NP) Rapportserie nr.55. Oslo.
- 2 Henriksen, A., Lien, L. & Traaen, T.S. 1990. Tålegrenser for overflatevann. Kjemiske kriterier for tilførsler av sterke syrer. - Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapp. O-89210.
- 3 Lien, L., Henriksen, A., Raddum, G. & Fjellheim, A. 1989. Tålegrenser for overflatevann. Fisk og evertebrater. Foreløpige vurderinger og videre planer.- Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapp. O-89185.
- 4 Bølviken, B. & medarbeidere 1990. Jordforsuringstatus og forsuringfølsomhet i naturlig jord i Norge. - Norges geologiske undersøkelse (NGU). NGU-rapport 90.156. 2 bind (Bind I: Tekst, Bind II: Vedlegg og bilag).
- 5 Pedersen, H.C. & Nybø, S. 1990. Effekter av langtransporterte forurensninger på terrestriske dyr i Norge. En statusrapport med vekt på SO₂, NO_x og tungmetaller. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Utredning 5.
- 6 Frisvoll, A.A. 1990. Moseskader i skog i Sør-Norge. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 18.
- 7 Muniz, I.P. & Aagaard, K. 1990. Effekter av langtransportert forurensning på ferskvannsdyr i Norge; virkninger av en del sporelementer og aluminium. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Utredning 13.
- 8 Hesthagen, T., Mack Berger H. & Kvenild, L. 1992. Fiskestatus i relasjon til forsuring av innsjøer. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Forskningsrapport 32.
- 9 Pedersen, U., Walker, S.E. & Kibsgaard, A. 1990. Kart over atmosfærisk avsetning av svovel- og nitrogenforbindelser i Norge. - Norsk institutt for luftforskning (NILU) OR: 28/90.
- 10 Pedersen, U. 1990. Ozonkonsentrasjoner i Norge. - Norsk institutt for luftforskning (NILU). OR: 28/29.
- 11 Wright, R.F., Stuanes, A., Reuss, J.O. & Flaten, M.B. 1990. Critical loads for soils in Norway. Preliminary assessment based on data from 9 calibrated catchments. - Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapp. O-89153.
- 11b
Reuss, J.O. 1990. Critical loads for soils in Norway. Analysis of soils data from eight Norwegian catchments. - Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapp. O-89153.
- 12 Amundsen, C.E. 1990. Bufferprosent som parameter for kartlegging av forsuringfølsomhet i naturlig jord. - Univ. i Trondheim, AVH (stensil).
- 13 Flatberg, K.I., Foss, B., Løken, A. & Saastad, S.M. 1990. Moseskader i barskog. - Direktoratet for naturforvaltning (DN), notat (under trykking).
- 14 Frisvoll, A.A. & Flatberg, K.I. 1990. Moseskader i Sør-Varanger. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 55.
- 15 Flatberg, K.I., Bakken, S., Frisvoll, A.A. & Odasz, A.M. 1991. Moser og luftforurensninger. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 69.
- 16 Mortensen, L.M. 1991. Ozonforurensning og effekter på vegetasjonen i Norge. - Norsk landbruksforsk. 5:235-264.
- 17 Wright, R.F., Stuanes, A.O. & Frogner, T. 1991. Critical Loads for Soils in Norway Nordmoen. - Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapport O-89153.
- 18 Pedersen, H.C., Nygård, T., Myklebust, I. & Sæther, M. 1991. Metallbelastninger i lirype. - Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 71.
- 19 Lien, L., Raddum, G.G. & Fjellheim, A. 1991. Tålegrenser for overflatevann evertebrater og fisk. Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapport O-89185,2.
- 20 Amundsen, C.E. 1992. Sammenligning av parametre for å bestemme forsuringfølsomhet i jord. (NGU)- rapport 91.265.
- 21 Bølviken, B., Nilsen, R., Romundstad, J. & Wolden, O. 1992. Surhet, forsuringfølsomhet og lettløselige basekationer i naturlig jord fra Nord-Trøndelag og sammenligning med tilsvarende data for Sør Norge. NGU- rapport 91.250.
- 22 Sivertsen, T. & medarbeidere. 1992. Opptak av tungmetaller i dyr i Sør-Varanger. Direktoratet for naturforvaltning, DN-notat 1991-15. 53s.
- 23 Lien, L., Raddum, G.G. & Fjellheim, A. 1992. Critical loads for acidity to freshwater. Fish and invertebrates. Norwegian Institute for Water Research (NIVA), rapport O-89185,3 .
- 24 Fremstad, E. 1992. Virkninger av nitrogen på heivegetasjon. En litteraturstudie. Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 124.
- 25 Fremstad, E. 1992. Heivegetasjon i Norge, utbredelseskart. Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 188.
- 26 Flatberg, K.I. & Frisvoll, A. 1992. Undersøkelser av skader hos to sigdmoser i Agder. Norsk institutt for naturforskning (NINA) Oppdragsmeld. 134.

- 27 Lindstrøm, E.A. 1992. Tålegrenser for overflatevann. Fastsittende alger. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90137/E-90440, rapport-2.
- 28 Brettum, P. 1992. Tålegrenser for overflatevann. Planteplankton. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90137/E-90440, rapport-3.
- 29 Brandrud, T.E., Mjelde, M. 1992. Tålegrenser for overflatevann. Makrovegetasjon. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90137/E-90440, rapport-1.
- 30 Mortensen, L.M. & Nilsen, J. 1992. Effects of ozone and temperature on growth of several wild plant species. Norwegian Journal of Agricultural Sciences 6:195-204.
- 31 Pedersen, H.C., Myklebust, I., Nygård, T. & Sæther, M. 1992. Akkumulering og effekter av kadmium i lirype. Norsk institutt for naturforskning (NINA), Oppdragsmeld.152.
- 32 Amundsen, C.E. 1992. Sammenligning av relativ forsuringfølsomhet med tålegrenser beregnet med modeller i jord. Norges geologiske undersøkelse. NGU-rapport 92.294.
- 33 Frogner, T., Wright, R.F. Cosby, B.J., Esser, J.M., Håøya, A.-O. & Rudi, G. 1992. Map of critical loads for coniferous forest soils in Norway. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90147.
- 34 Henriksen, A., Lien, L., Traaen, T.S. & Taubøll, S. 1992. Tålegrenser for overflatevann - Kartlegging av tålegrenser og overskridelser av tålegrenser for tilførsler av sterke syrer. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-89210.
- 35 Lien, L., Henriksen, A. & Traaen, T.F. 1993. Tålegrenser for sterke syrer på overflatevann - Svalbard. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90102.
- 36 Henriksen, A., Hesthagen, T., Berger, H.M., Kvenild, L. & Taubøll, S. 1993. Tålegrenser for overflatevann - Sammenheng mellom kjemisk kriterier og fiskestatus. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-92122.
- 37 Odasz, A.M., Øiesvold, S., & Vange, V. 1993. Nitrate nutrition in *Racomitrium lanuginosum* (Hedw.) Brd., a bioindicator of nitrogen deposition in Norway (in prep).
- 38 Espelien, I.S. 1993. Genetiske effekter av tungmetaller på pattedyr. En kunnskapsoversikt. Norsk institutt for naturforskning (NINA), Utredning (in prep).
- 39 Økland, J. & Økland, K.A. 1993. Database for bioindikatorer i ferskvann - et forprosjekt. Laboratorium for ferskvannøkologi og innlandsfiske (LFI), Zoologisk Museum, Oslo. Rapport nr. 144, 1993.
- 40 Aamlid, D. & Skogheim, I. 1993. Nikkel, kopper og andre metaller i multer og blåbær fra Sør-Varanger, 1992. Norsk institutt for skogforskning. Skogforsk rapport (in prep).
- 41 Kålås, J.A., Ringsby, T.H. & Lierhagen, S. 1993. Metals and radiocesium in wild animals from the Sør-Varanger area, North Norway. Norsk institutt for naturforskning (NINA), Oppdragsmelding 212.
- 42 Fløisand, I. & Løbersli, E. (red.) 1993. Tilførsler og virkninger av lufttransporterte forurensninger (TVLF) og naturens tålegrenser. Sammendrag av foredrag og postere fra møte i Stjørdal, 15. - 17. februar 1993. Norsk institutt for luftforskning (NILU), OR 17/93.
- 43 Henriksen, A. & Hesthagen, T. 1993. Critical load exceedance and damage to fish populations. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-89210.
- 44 Lien, L., Henriksen, A. & Traaen, T.S. 1993. Critical loads of acidity to surface waters, Svalbard. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-90102.
- 45 Løbersli, E.; Johannessen, T. & Olsen, K.V. (red.) 1993. Naturens tålegrenser Referat fra seminar i 1991 og 1992. Direktoratet for naturforvaltning (DN), notat 1993-6.
- 46 Bakken, S. 1993. Nitrogenforurensning og variasjon i nitrogen, protein og klorofyllinnhold hos barskogmosen blanksigd (*Dicranum majus*) (in prep).
- 47 Krøkje, Å. 1993. Genotoksisk belastning i jord. Effekstudier, med mål å komme fram til akseptable grenser for genotoksisk belastning fra langtransportert luftforurensning. Direktoratet for naturforvaltning (DN). Utredning for DN 1994-2.
- 48 Fremstad, E. 1994. Heigråmose (*Racomitrium lanuginosum*) som biomonitor på nitrogenforurensning. Norsk institutt for naturforskning (NINA). Oppdragsmelding 239.
- 49 Nygaard, P.H. & Ødegaard, T.H. 1993. Effekter av nitrogengjødsling på vegetasjon og jord i skog. Norsk institutt for skogforskning (NISK), Skogforsk (in prep).
- 50 Fløisand, I. og Johannessen, T. (red.) 1994. Langtransporterte luftforurensninger. Tilførsler, virkninger og tålegrenser. Sammendrag av foredrag og postere fra møte i Grimstad, 7.-9.3.94. Norsk institutt for luftforskning NILU OR: 17/94
- 51 Kleivane, L. Skåre, J.U. & Wiig, Ø. 1994. Klorerte organiske miljøgifter i isbjørn. Forekomst, nivå og mulige effekter. Norsk Polarinstitut (in prep)
- 52 Lydersen, E., Fjeld, E. & Andersen, T. 1994. Fiskestatus og vannkjemi i norske innsjøer. Norsk institutt for vannforskning (NIVA) OR-93172
- 53 Schartau, A.K.L. (red.) 1994. Effekter av lavdose kadmiumbelastning på litorale ferskvanns-populasjoner og -samfunn. Norsk institutt for naturforskning (NINA) Forskningsrapport (in prep)
- 54 Mortensen, L. (1994). Variation in ozone sensitivity of *Betula pubescens* Erh. from different sites South Norway. Direktoratet for naturforvaltning (DN). Utredning for DN, Nr. 1994-6.

- 55 Mortensen, L. (1994). Ozone sensitivity of *Phleum alpinum* L. from different locations in South Norway. Direktoratet for naturforvaltning (DN). Utredning for DN, Nr. 1994-7.
- 56 Frogner, T., Wright, R.F., Cosby, J.B. and Esser, J.M. (1994). Maps of critical loads and exceedance for sulfur and nitrogen to forest soils in Norway. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-91147.
- 57 Flatberg, K.I. & Frisvoll, A.A. (1994). Moseskader i Agder 1989-92. Norsk institutt for naturforskning (NINA). Oppdragsmelding 298.
- 58 Hesthagen, T. & Henriksen, A. (1994). En analyse av sammenhengen mellom overskridelser av tålegrenser for overflatevann og skader på fiskebestander. Norsk institutt for naturforskning (NINA). Oppdragsmelding 288.
- 59 Skåre, J.U., Wiig, Ø. & Bernhoft, A. (1994). Klorerte organiske miljøgifter; nivåer og effekter på isbjørn. Norsk Polarinstitutt Rapport nr. 86 -1994.
- 60 Tørseth, K. & Pedersen, U. 1994. Deposition of sulphur and nitrogen components in Norway. 1988-1992. Norsk institutt for luftforskning (NILU) (in prep).
- 61 Nygaard, P.H. 1994. Virkning av ozon på blåbær (*Vaccinium myrtillus*), etasjehusmose (*Hylocomium splendens*), furumose (*Pleurozium schreberi*) og krussigd (*Dicranum majus*), Skogforsk 9/94.
- 62 Henriksen, A. & Lien, L. 1994. Tålegrenser for overflatevann: Metode og usikkerheter. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-94122.
- 63 Hilmo, O. & Larssen, H.C. 1994. Morfologi hos epifyttisk lav i områder med ulik luftkvalitet. ALLFORSK Rapport 2.
- 64 Wright, R.F. 1994. Bruk av dynamiske modeller for vurdering av vann- og jordforsuring som følge av redusert tilførsel av sur nedbør. Norsk institutt for vannforskning (NIVA). O-94112.
- 65 Hesthagen, T., A. Henriksen & Kvenild, L. 1994. Overskridelser av tålegrenser for overflatevann og skader på fiskebestander i norske innsjøer med spesiell vekt på Troms og Finnmark. Norsk institutt for naturforskning (NINA), Oppdragsmelding 298.
- 66 Solli, I.M.S., Flatberg, K.I.F. & Söderström, L. 1994. Blanksigd og luftforurensningsstudier (in prep)
- 67 Stuanes, A. & Abrahamsen, G. 1995. Utredning om kunnskapsgrunnlaget for definisjon av tålegrenser i skog. Rapport Skogforsk (in prep).
- 68 Ogner, G. 1995. Tålegrenser for skog i Norge med hensyn til ozon. Aktuelt fra Skogforsk 3-95.
- 69 Thomsen, M., Nellemann, C. Frogner, T., Henriksen A., Tomter, S. & Mulder, J. 1995. Tilvekst og vitalitet for granskog sett i relasjon til tålegrenser og forurensning. Norsk institutt for skogforskning (NISK) (in prep)
- 70 Tomter, S. M. & Esser, J. 1995. Kartlegging av tålegrenser for nitrogen basert på en empirisk metode. Norsk institutt for jord- og skogkartlegging (NIJOS). Rapport nr 10/95.
- 71 Pedersen, H.C. (red.). 1995. Kadmium og bly i lirype: akkumulering og cellulære effekter. Norsk institutt for naturforskning (NINA). Oppdragsmelding 387.
- 72 Bakken, S. & Flatberg, K.I.F. 1995. Effekter av økt nitrogendeposisjon på ombrotrof myrvegetasjon. En litteraturstudie. ALLFORSK Rapport 3.
- 73 Sogn, T.A., Stuanes, A.O. & Abrahamsen, G. 1995: Akkumulering av nitrogen - en kritisk parameter for beregning av tålegrenser for nitrogen i skog. Rapport Skogforsk (in prep).
- 74 Nygaard, P.H. & Eldhuset, T. 1995. Forholdet mellom basekationer og aluminium i jordløsning som kriterium for tålegrenser i skogsjord. Norsk institutt for skogforskning (NISK). Rapport Skogforsk (in prep).
- 75 Mortensen, L. 1993. Effects of ozone on growth of several subalpine plant species. Norw. J. Agric. Sci. 7: 129-138.
- 76 Mortensen, L. 1994. Further studies on the effects of ozone concentration on growth of subalpine plant species. Norw. J. Agric. Sciences 8:91-97.

Henvendelser vedrørende rapportene rettes til utførende institusjon

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0639-0

387

NINA
OPPDRAKS-
MELDING

NINA Hovedkontor
Tungasletta 2
7005 TRONDHEIM
Telefon: 73 58 05 00
Telefax: 73 91 54 33

NINA
Norsk institutt
for naturforskning