Effekter av persistente organiske miljøgifter på immunrespons hos polarmåke

SPFO-Rapport: 918/2004
TA-nummer: 2062/2004
ISBN-nummer: 82-7666-212-9

Oppdragsgiver: Statens Forurensningstilsyn (SFT) Utførende forskningsinstitusjoner: Norsk Polarinstitutt (NP) og Norges Veterinærhøgskole (NVH)

Effekter av persistente organiske miljøgifter på immunrespons hos polarmåke

Rapport 918/2004



Hans Jørgen Larsen, Geir Wing Gabrielsen, Kjetil Sagerup

Desember 2004

Forord

Persistente organiske miljøgifter (POPer) er miljøgifter som brytes langsomt ned i næringskjeden. De er ofte fettløselige og konsentreres i organismens fettlagre (bioakkumulering). Hos dyr lavt i næringskjeden skjer opptaket av miljøgifter gjennom partikkelbundet POPer som spises, eller ved direkte opptak gjennom hud og gjeller. Opptaket av miljøgifter i dyr høyt i næringskjeden skjer hovedsakelig gjennom dietten. Siden miljøgiftene brytes sakte ned i organismene vil konsentrasjonen av POPer øke oppover i næringskjeden (biomagnifisering).

I arktiske områder akkumuleres POPer i marine næringskjeder. POPer er påvist med ulike konsentrasjoner i alle undersøkte arter av sjøfugl (Borgå et al., 2001; Macdonald et al., 1996; Muir et al., 1992). Polarmåke (*Larus hyperboreus*) er den mest tallrike av de store måkene i det arktiske marine økosystemet. De spiser hovedsakelig egg og kyllinger til ulike sjøfuglarter, polartorsk (*Boreogadus saida*), amfipoder og krabber (Barry et al., 1990; Lydersen et al., 1989). I Arktis har isbjørn (*Ursus maritimus*) og polarmåke de høyeste nivåene av POPer (Bernhoft et al., 1997; Gabrielsen et al., 1995; Mehlum et al., 1995; Norstrom et al., 1988).

POPer som DDT, PCB, klordan, toksafen, PBDE og flere andre opptrer i organismer som en blanding i forskjellig mengde- og sammensetningsforhold. Disse kan forårsake en rekke negative effekter i organismen. Det er blant annet påvist forstyrrelser i nerve- og hormonsystemet, redusert reproduksjon og forstyrrelse av immunsystemet (Tryphonas, 1994; Walker, 1990). I et stort antall laboratorieforsøk med dyr er det rapportert immuntoksiske effekter av POPer (Harper et al., 1993; Mayura et al., 1993; Tryphonas et al., 1991). Hos viltlevende dyr er det observert redusert immunforsvar (nedsatt cellulær immunitet) hos terner (*Sterna caspia*) og sildemåker (*Larus argentatus*) (Grasman et al., 1996).

Dette prosjektet har som mål å karakterisere effekten av POPer på immunresponsen (spesifikt nivåene av ulike immunglobulinene IgG og IgM) hos polarmåke. Videre er det gjort en evaluering av effekten knyttet til høy POP eksponering på generell immunkompetanse og sykdomsresistens (kapasiteten individet har til å respondere mot infeksjoner, vaksiner, kreftceller og andre ”non self” substanser). I dette prosjektet ble prøvemateriale fra Transport- og Effektprogrammets prosjekt ”Effects of persistent organic pollutants (POPs) on the immune response of glaucous gull (*Larus hyperboreus*)” benyttet. Det er påvist at polarmåkekyllinger eksponert for miljøgifter via dietten hadde nedsatt evne til å danne antistoffer mot influensavirus (Sagerup et al. 2001). En nærmere karakterisering av effekten av POPer på immunresponsen har ikke tidligere vært mulig fordi metodene for måling av IgG og IgM ikke har eksistert for polarmåker.

Tromsø, desember 2004

Prosjektleder: Geir Wing Gabrielsen, Norsk Polarinstitutt.
Prosjektmedarbeidere: Hans Jørgen Larsen, Norges veterinærhøgskole, Janneche Utne Skåre, Veterinærinstituttet og Kjetil Sagerup, Universitetet i Tromsø.

Innhold:

1. Sammendrag 4

2. Innledning 5

3. Materiale og metoder 6

3.1 Forsøksoppsett for eksponering av polarmåkekyllinger med persistente organiske miljøgifter 6

3.2 Metodeutvikling for å karakterisere immunglobuliner 7
3.1.1 Metodeutvikling og analyse av IgG hos polarmåkekyllinger 7
3.1.2 Metodeutvikling og analyse av IgM hos polarmåkekyllinger 7

4. Resultater og diskusjon 8

4.1 POP-nivåer hos polarmåkekyllinger 8

4.2 IgG hos polarmåkekyllinger 13

4.3 IgM hos polarmåkekyllinger 15

4.4 Bruk av resultatene i overvåking og videre studier 16

5. Referanser 17

1. Sammendrag

I denne rapporten beskrives metodeutviklingen for isolering og rensing av immunglobuliner fra polarmåke. Videre er det gjort analyser av hvordan persistente organiske miljøgifter (POPer) påvirker nivåene av immunglobuliner (IgG og IgM) i blodprøver fra polarmåkekyllinger.

Arbeidet er utført på polarmåke fordi den er en viktig art på toppen av næringskjeden i Arktis. Arten har en sirkumpolar utbredelse og er relativt tallrik. Populasjonen er anslått til mellom 7000 og 17000 hekkende par i Barentshavsregionen. Tidligere undersøkelser har vist at polarmåke har høye nivåer av POPer.

Prosjektet har resultert i reagenser for måling av IgG og IgM hos polarmåke. Arbeidet med reagensfremstilling for måling av IgA pågår fortsatt i laboratoriet.

Polarmåkekyllinger, som hadde fått diett med POPer, hadde signifikant lavere nivåer av både IgG og IgM i forhold til kontrollgruppen. Studiet viser derfor at eksponering med POPer nedsetter polarmåkekyllingers evne til å produsere immunglobulinene IgG og IgM. Dette, sammenholdt med at vi tidligere har vist at forsøksgruppen hadde nedsatt evne til å produsere spesifikke antistoffer mot influensa virus etter immunisering, er et alvorlig og viktig funn med hensyn til polarmåkenes helse. Resultatene viser at POP eksponering påvirker antistoffdannelse generelt noe som får betydning for fuglenes infeksjonsresistens. Våre resultater tyder derfor på at eksponeringen med naturlige mengder og sammensetning av POPer, gir en omfattende nedsatt immunrespons hos polarmåkekyllinger. Det er derfor rimelig å anta at eksponering med POPer nedsetter polarmåkens immunkompetanse og sykdomsresistens. Dette betyr at en kombinert effekt av miljøgifter og påvirkning fra sykdomsorganismer, kreftceller og andre ”non self” substanser kan føre til redusert helse og slik påvirke både reproduksjon og overlevelse.

Resultatene fra denne undersøkelsen er den første som viser effekt av eksponering med POPer under eksperimentelle betingelser på immunglobulinnivåer hos sjøfugl.

Rapporten er utarbeidet på oppdrag fra Statens forurensningstilsyn av Norges veterinærhøgskole og Norsk Polarinstitutt.

2. Innledning

Immunsystemet synes å være spesielt følsomt for eksponering av POPer. Eksperimentelle studier på dyr i laboratorium har avdekket at POPer har effekter både på det spesifikke immunsystem og på medfødt naturlig immunitet (Vos & Luster, 1989; Tryphonas, 1994). Det foreligger få rapporter om effekter på immunapparatet til arktiske pattedyr og fugl. Hos frittlevende isbjørn ble det funnet lave IgG (immunglobulin G) verdier i blod hos dyr med høye PCB nivåer (Bernhoft et al. 2000). De viktigste antistoffene i blod hører til IgG – proteinene. I et annet studium ble det vist at den negative korrelasjonen mellom PCBer og IgG nivåer var assosiert med nedsatt evne til å danne antistoffer (Lie et al. 2004). Det er også vist effekter av POPer på hematologi (blodets sammensetning av celler) og visse lymfocyttaktiviteter hos måker og terner (Grasman et al. 1996). Disse studiene omfattet ikke effekter på immunglobulin nivåer og antistoffdannelse (Fairbrother et al. 2004).

Dette prosjektet bygger på et prøvemateriale fremskaffet i forbindelse med prosjektet ”Effects of persistent organic pollutants (POPs) on the immune response of glaucous gull (*Larus hyperboreus*)”, prosjektnummer 4188 (MDs Transport- og Effektprogram, september 2000). Siden kommersielle reagenser for analyse av IgG ikke fungerte på polarmåke, måtte metodene for analyse av polarmåkenes immunglobuliner etableres. Det var derfor ikke mulig å inkludere immunglobulinmålinger på polarmåke i det opprinnelige prosjektet.

I arbeidet for denne rapporten inngår både metodeutvikling for karakterisering av immunglobuliner samt en analytisk del for å kvantifisere immunglobuliner i de foreliggende blodprøver. Mengden immunglobuliner ble deretter sammenholdt med den PCB eksponeringen polarmåkekyllingene var utsatt for.

Metodeutviklingsdelen av prosjektet omfattet:

1. Isolering og rensing av immunglobuliner fra polarmåke.
2. Fremstilling av antistoffer (analyse reagenser) mot immunglobuliner (IgG, IgM).
3. Etablering av metode for kvantifisering av immunglobuliner hos polarmåke.

Videre ble det reist to hovedproblemstillinger for arbeidet:

1. Påvirker dietten med og uten POPer evnen til å danne IgG i blod til polarmåkekyllinger?
2. Påvirker dietten med og uten POPer evnen til å danne IgM i blod til polarmåkekyllinger?

Vi bruker begrepene med og uten POPer (miljøgifter) for å skille mellom de to gruppene av polarmåkekyllinger. Gruppen med POPer (eksperimentgruppe) fikk måkeegg som kilde til miljøgiftene i tillegg til basisdiett. Gruppen uten POPer (kontrollgruppe) fikk hønseegg i tillegg til basisdiett. Basisdietten og hønseeggene inneholder svært lite miljøgifter (tabell 3 og 4). Kontrollgruppen (uten) hadde således lave konsentrasjoner av miljøgifter mens eksperimentgruppen hadde høye konsentrasjoner av miljøgifter.

Prosjekts mål var å karakterisere effekten av POPer på immunresponsen (spesifikt nivåene av ulike immunglobulinene IgG og IgM) hos polarmåkekyllingene, og evaluere effekten av høy POP eksponering på immunkompetanse og sykdomsresistens (kapasiteten individet har til å respondere mot infeksjoner, vaksiner, kreftceller og andre ”non self” substanser).

3. Materiale og metoder

3.1 Forsøksoppsett for eksponering av polarmåkekyllinger med persistente organiske miljøgifter

Materialet som inngår i dette arbeidet stammer fra et eksperimentelt forsøk med to grupper polarmåker gitt en diett etter klekking med (eksperimentgruppe, n = 19) og uten (kontrollgruppe, n = 18) POPer. Eksperimentell design, eksponering, immunisering (vaksinering), resultater fra POP-analyser og immunrespons målinger er beskrevet i detalj i sluttrapporten til prosjektet (Sagerup et al. 2001). Metoden gjengis derfor bare kort i denne rapporten.

Polarmåkeegg ble samlet inn på vestsiden av Spitsbergen, Nordenskioldskysten, og ruget ut i rugemaskin på feltstasjonen til Norsk Polarinstitutt i Ny-Ålesund i juni 1999. Annenhver kylling ble plassert i henholdsvis eksperiment- eller kontrollgruppe etter hvert som de klekket. Begge grupper av kyllinger ble plassert i samme innhengning, kun avskilt på alder de første ukene. Polarmåkekyllingene ble holdt ute under naturlig temperatur og lys. Fuglene var beskyttet mot vind og regn. Begge gruppene fikk nøyaktig samme behandling under forsøket for unngå feilkilder knyttet til design.

Vi antar at den største forskjellen mellom laboratoriestudiet og en naturlig situasjon var at de ble beskyttet mot en rekke stressfaktorer som variasjon i mattilgang, predatorpåvirkning, uroligheter som oppstår i en koloni og infeksjoner av makroparasitter (fisken vi foret med hadde vært frosset). Selv om forsøket ikke direkte kan sammenlignes med polarmåkekyllinger i naturen, mener vi at forsøkets design er egnet for å kunne måle eventuelle effekter fra miljøgifter.

Polarmåkekyllingene ble gitt en basisdiett bestående av polartorsk og sild, vann, vitaminer og enten måkeegg (eksperimentgruppe) eller hønseegg (kontrollgruppe). Kyllingene fikk egg fram til de var 26 dager gamle. De hadde da fått tre kg egg hver. Denne mengden måkeegg viste i et pilotstudium utført av Norsk Polarinstitutt i 1997 at polarmåkekyllinger fikk miljøgiftbelastning omtrent som i hos voksne polarmåker på Bjørnøya (Gabrielsen pers med.). Måkeeggene var fra artene svartbak (*Larus marinus*) og gråmåke (*Larus argentatus*). Måkeegg er en naturlig del av dietten til polarmåke og polarmåkekyllinger. Måkeegg ble valgt som kilde til POPer i stede for tekniske blandinger. Miljøgiftblandingen fuglene eksponeres for tilsvarer den fugler høyt i næringskjeden eksponeres for på Svalbard. Den har således blitt påvirket fysisk, kjemisk og biologisk gjennom prosesser i naturen, noe tekniske blandinger ikke har.

Blodprøver ble tatt av kyllingene ved 15 og 56 dager alder. Nivåene av miljøgifter ble analysert i 15 av prøvene ved 15 dagers alder og i alle 37 prøvene ved 56 dager. Årsaken til at ikke nivåene av miljøgifter ble målt alle blodprøvene ved 15 dagers alder er at det var vanskelig å få store nok blodprøver til både immunanalyser og miljøgiftanalyser av 15 dagers gamle polarmåkekyllinger. Ved denne alderen var gjennomsnittsvekten 400 gram. Det ble derfor prioritert å bruke blodprøvene til å måle immunglobuliner framfor miljøgifter. Immunglobuliner ble målt i alle prøvene.

Alle kyllingene ble immunisert ved 15 og 45 dagers alder med kommersielle vaksiner. Fra blodprøvene ble det målt antistoffproduksjon mot enkelte av disse antigenene. Analysene av

POPer ble utført ved Miljøtoksikologisk laboratorium ved Norges veterinærhøgskole. Analysene var basert på gasskromatografi av ekstrahert fett i blodprøvene.

3.2 Metodeutvikling for å karakterisere immunglobuliner

Den metodologiske delen av prosjektet omfatter isolering og rensing av immunglobuliner fra polarmåke, fremstilling av antistoffer (analyse reagenser) mot immunglobuliner (IgG, IgM) og etablering av metode for kvantifisering av immunglobuliner hos polarmåke.

3.1.1 Metodeutvikling og analyse av IgG hos polarmåkekyllinger

Det ble fremstilt polyklonalt kanin anti polarmåke IgG for kvantifisering av IgG hos polarmåke siden kommersielle antistoffer ikke kunne brukes på polarmåke. Polyklonalt antistoff betyr at kaninen har produsert mange ulike antistoffer (som inngår i reagensen) mot polarmåke IgG. Med utgangspunkt i polarmåke serum og plomme fra polarmåkeegg ble det fremstilt løsninger med IgG, basert på proteinfelling, gelfiltrering og ionebytting (Catty1998). Disse samt ubehandlet serum fra polarmåke ble benyttet til immunisering av kaniner, som da produserer polyklonalt antiserum mot polarmåke IgG. Karakterisering av kanin antiserum ble utført med immunelektroforese. For å oppnå nødvendig spesifisitet ble nye kaniner immunisert med immunpresipitat fra immunelektroforese. (Catty 1998). Etter fornyet karakterisering av antiseraenes spesifisitet (kun en presipitasjonslinje) ble serumuttak med ønsket titer (styrke) slått sammen til ”polyklonalt kanin anti polarmåke IgG” og lagret ved – 40 ˚C. Dette polyklonale kanin anti polarmåke IgG antiserum ble brukt for kvantifisering av IgG i blodprøver fra polarmåke ved hjelp av radial immundiffusjon (Catty 1998).
Det ble brukt sammenslått polarmåkeserum som standard og uttrykte konsentrasjonene foreløpig som diffusjonsenheter. Sammenslått polarmåkeserum antas å inneholde ca. 5 mg IgG/ml (5 diffusjonsenheter pr. ml, noe som vil bli verifisert når man har produsert nok renset IgG fra polarmåke).

3.1.2 Metodeutvikling og analyse av IgM hos polarmåkekyllinger

Vi har immunisert kaniner med rensede fraksjoner av immunglobuliner for produksjon av polyklonale antistoffer mot IgM. Karakterisering av disse antistoffene, som immuniseringen har resultert i, pågår og testmetodene utprøves. Renheten av disse reagensene er foreløpig ikke tilfredsstillende. Det er behov for nye immuniseringer for å få frem et rent polyklonalt kanin antiserum mot polarmåke IgM. Parallelt med dette arbeidet har vi også testet ulike kommersielle reagenser laget for å måle IgM hos høns, for å se om disse kan brukes til å måle IgM hos polarmåke. Vi har startet måling av IgM i polarmåkekyllingenes blod basert på kommersielle polyklonale sekundære antistoffer mot høns IgM (Goat-a-Chicken IgM (Fc), batch 5222, Nordic Immunological Laboratories), men dette arbeidet er ennå ikke fullført.

4. Resultater og diskusjon

4.1 POP-nivåer hos polarmåkekyllinger

POP konsentrasjonen i polarmåkekyllingene viste stor forskjell mellom gruppene ved 15 og 56 dagers alder, 1-veis ANOVA (tabell 1 og 2, figur 1 og 2). Ved dag 15 var POP konsentrasjonen 5,2 - 390 ganger høyere (for henholdsvis PCB-180 og DDT) i eksperimentgruppen enn i kontrollgruppen (figur 1). Gjennomsnittlig ∑9PCB var da 273 ng/g i eksperimentgruppen og 34 ng/g i kontrollgruppen. På dette tidspunktet (dag 15) ble immuniseringen startet. Ved slutten av forsøket (dag 56) var forskjellen i POP-nivåer i blodet mellom gruppene fremdeles stor. Gjennomsnittlig ∑9PCB var da 25 ng/g i eksperimentgruppen og 2,5 ng/g i kontrollgruppen. POP konsentrasjonen var da 1,7 – 175 ganger høyere (for henholdsvis PCB-101 og PCB-156) i eksperimentgruppen enn i kontrollgruppen (Figur 2).

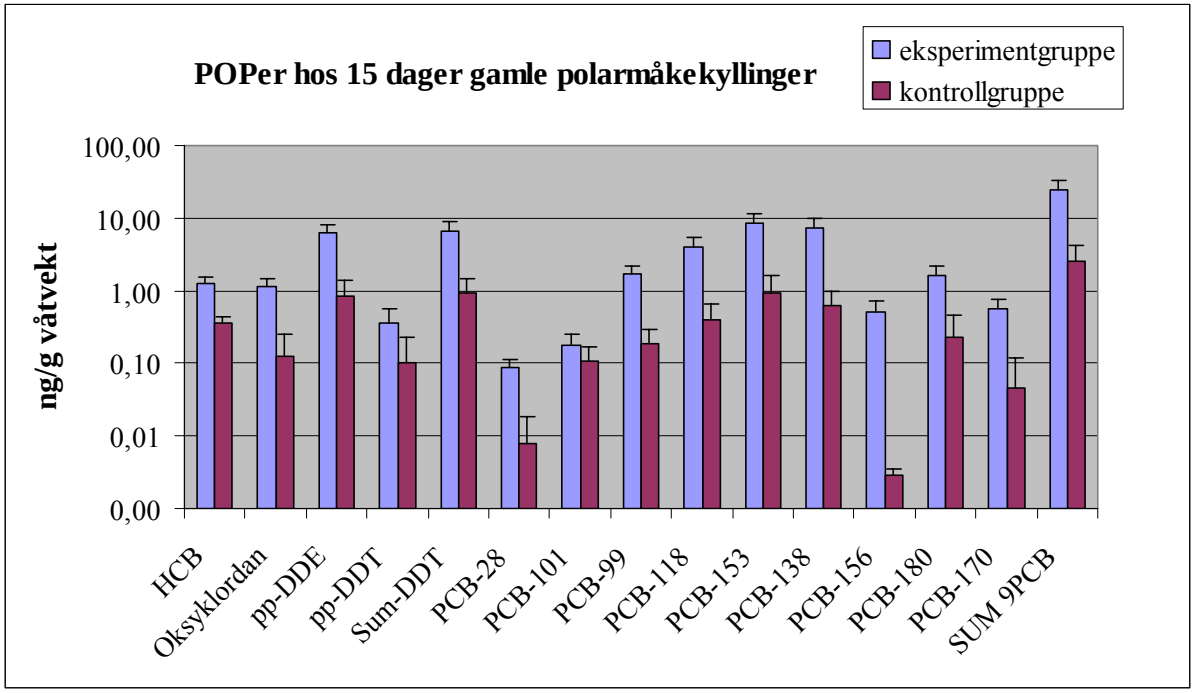
Miljøgiftnivåene gikk kraftig ned fra dag 15 til avslutning av forsøket på dag 56 (tabell 1 og 2, figur 1 og 2). Dette skyldes at kyllingene fikk egg i dietten frem til 26 dagers alder. Kyllingenes vekt økte med ca. 60 % fra dag 26 til avslutning av forsøket. Miljøgiftene blir derfor tynnet ut som et resultat av vektøkningen. I tillegg kan kyllingene metabolisere (omsette) eller utskille miljøgiftene. Omsetning og utskillelse av miljøgifter er faktorer som vi ikke har målt i dette studiet.

*Tabell 1: Konsentrasjoner av POPer (ng g-1 våtvekt i blod) ved 15 dagers alder i kontroll- og eksperimentgruppen. Forskjell mellom gruppene er testet ved 1-veis ANOVA. n.d. = not detected, noe som betyr at konsentrasjon av denne forbindelsen i prøven er lavere enn deteksjonsgrensen. * betyr p <0,01.*

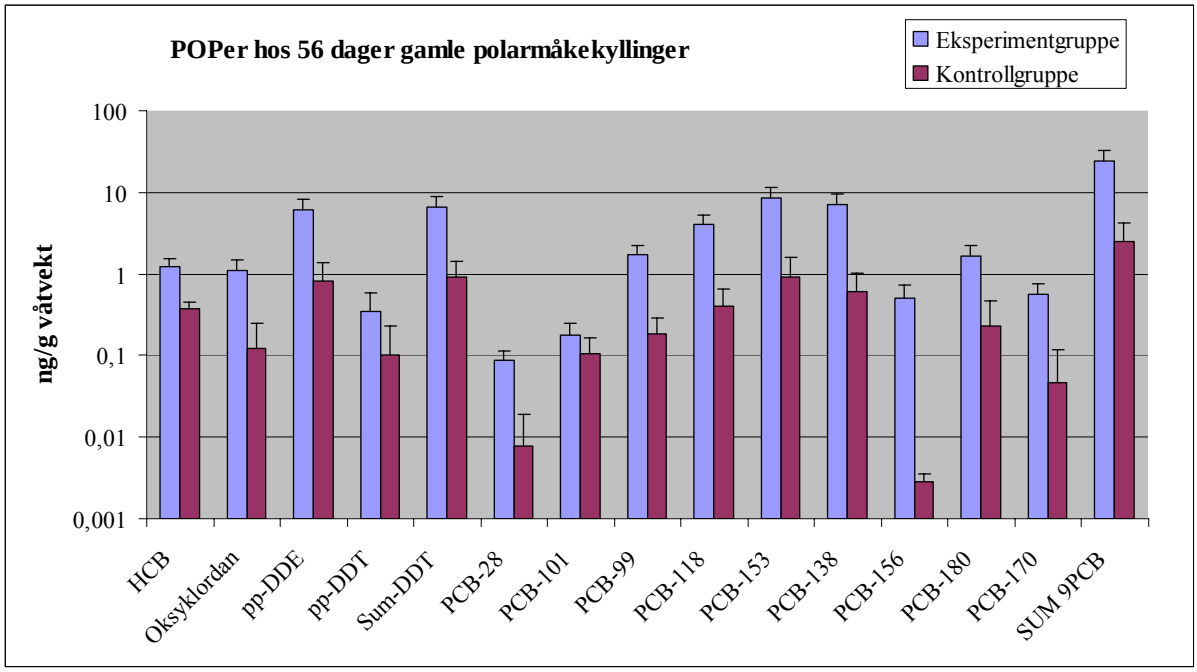
Navn	**15 dager gammel kontrollgruppe**			**15 dager gammel eksperimentgruppe**			**1 - veis ANOVA**	
	n	**Gj.snitt**	**SD**	**n**	**Gj.snitt**	**SD**	**F**	***p***
% FETT	6	0,797	0,17	9	0,796	0,16	0	0,99
HCB	6	1,383	0,63	9	10,532	2,95	55	*
Oksyklordan	6	1,608	1,32	9	9,577	3,61	26	*
pp'-DDE	6	11,250	9,55	9	72,447	26,00	30	*
pp'-DDT	6	0,011	-	9	4,293	1,83	-	-
∑ DDT	6	11,250	9,55	9	76,740	27,06	32	*
PCB-28	6	0,080	0,09	9	1,077	0,38	17	*
PCB-101	6	0,254	0,10	9	1,500	0,48	38	*
PCB-99	6	2,055	1,33	9	17,575	5,67	42	*
PCB-118	6	4,957	3,72	9	43,792	15,61	35	*
PCB-153	6	12,930	11,90	9	97,297	32,22	37	*
PCB-138	6	7,604	6,24	9	78,467	25,78	43	*
PCB-156	6	0,568	0,91	9	5,756	2,04	7	0,03
PCB-180	6	4,084	3,98	9	21,215	7,70	25	*
PCB-170	6	0,999	1,14	9	6,476	2,22	18	*
∑ 9 PCB	6	33,531	29,29	9	273,155	91,31	38	*

*Tabell 2: Konsentrasjoner av POPer (ng g-1 våtvekt i blod) ved 56 dagers alder i kontroll- og eksperimentgruppen. Forskjell mellom gruppene er testet ved 1-veis ANOVA. * betyr p <0,01.*

Navn	**56 dager gammel kontrollgruppe**			**56 dager gammel eksperimentgruppe**			**1 - veis ANOVA**	
	n	**Gj.snitt**	**SD**	**n**	**Gj.snitt**	**SD**	**F**	***p***
% FETT	18	0,580	0,11	19	0,572	0,13	0	0,84
HCB	18	0,368	0,08	19	1,248	0,30	142	*
Oksyklordan	18	0,123	0,12	19	1,116	0,36	77	*
pp'-DDE	18	0,824	0,56	19	6,149	2,15	104	*
pp'-DDT	18	0,100	0,13	19	0,352	0,22	7	0,02
∑ DDT	18	0,924	0,53	19	6,501	2,31	100	*
PCB-28	18	0,008	0,01	19	0,087	0,03	11	*
PCB-101	18	0,105	0,06	19	0,175	0,08	7	0,01
PCB-99	18	0,184	0,11	19	1,695	0,55	123	*
PCB-118	18	0,399	0,25	19	3,991	1,37	120	*
PCB-153	18	0,927	0,69	19	8,664	3,04	111	*
PCB-138	18	0,609	0,39	19	7,205	2,53	120	*
PCB-156	18	0,003	0,00	19	0,498	0,22	14	*
PCB-180	18	0,229	0,24	19	1,651	0,59	66	*
PCB-170	18	0,046	0,07	19	0,555	0,20	31	*
∑ 9 PCB	18	2,510	1,74	19	24,521	8,56	114	*



Figur 1: Forskjell i POP konsentrasjoner (ng g^{-1} våtvekt i blod) i henholdsvis eksperiment- og kontrollgruppe hos 15 dager gamle polarmåkekyllinger. Dataene er gjengitt i tabell 1. Y-aksen er i log10-skala for å kunne vise de lave verdiene i kontrollgruppen.



Figur 2: Forskjell i POP konsentrasjoner (ng g^{-1} våtvekt i blod) i henholdsvis eksperiment- og kontrollgruppe hos 56 dager gamle polarmåkekyllinger. Dataene er gjengitt i tabell 2. Y-aksen er i log10-skala for å kunne vise de lave verdiene i kontrollgruppen.

Analyse av dietten viste at polartorsk (tabell 3) og hønseeggene (tabell 4) inneholdt mye mindre POPer enn måkeeggene (412 ganger mer ∑33PCB i måkeeggene enn i hønseeggene, tabell 4). Eksperimentgruppen hadde ved 15 dagers alder et nivå av POPer som var svært likt det en finner hos frittlevende voksne polarmåker på Bjørnøya (Bustnes et al. 2004). Pesticidene HCB, oksyklordan og DDE og PCBene 101, 99, 118 og 138 hadde tilnærmet lik konsentrasjon, mens de stabile høyklorerte PCBene 153, 180 og 170 var representert med omtrent halve konsentrasjoner i forhold til de voksne individene fra Bjørnøya. Studiet fra Bjørnøya har analysert POPer i blod fra 110 polarmåker i 1997 og 101 polarmåker i 2001. Analysene ble utført på samme laboratorium som dette studiet. På bakgrunn av kontrollanalysen av dietten, POP belastning hos eksperimentgruppen og POP belastning i frittlevende polarmåker på Bjørnøya, konkluderer vi med at eksperimentgruppen i dette studiet var sammenlignbar med eksponering under naturlige forhold.

Tabell 3: Konsentrasjoner av POPer i homogenisert hel polartorsk. Tabellen angir gjennomsnitt og standardavvik av fire prøver i ng g^{-1} våtvekt.

Navn	**Gj.snitt**	**SD**
% FETT	4,43	2,37
HCB	2,84	0,99
oksy- klordan	0,48	0,18
pp'-DDE	1,28	0,50
PCB-28	0,21	0,08
PCB-52	0,52	0,22
PCB-101	0,55	0,19
PCB-99	0,58	0,25
PCB-118	0,49	0,20
PCB-153	0,54	0,21
PCB-138	0,42	0,11
PCB-180	0,34	0,08
PCB-170	0,14	0,04
∑ 9 PCB	3,78	1,26

Tabell 4: Konsentrasjoner av POPer i diett til kontroll- og eksperimentgruppen. Tabellen angir gjennomsnitt og standardavvik for to prøver av hønseegg og 4 prøver av måkeegg i ng g^{-1} våtvekt. n.d. = not detected, noe som betyr at konsentrasjon av denne forbindelsen i prøven er lavere enn deteksjonsgrensen.

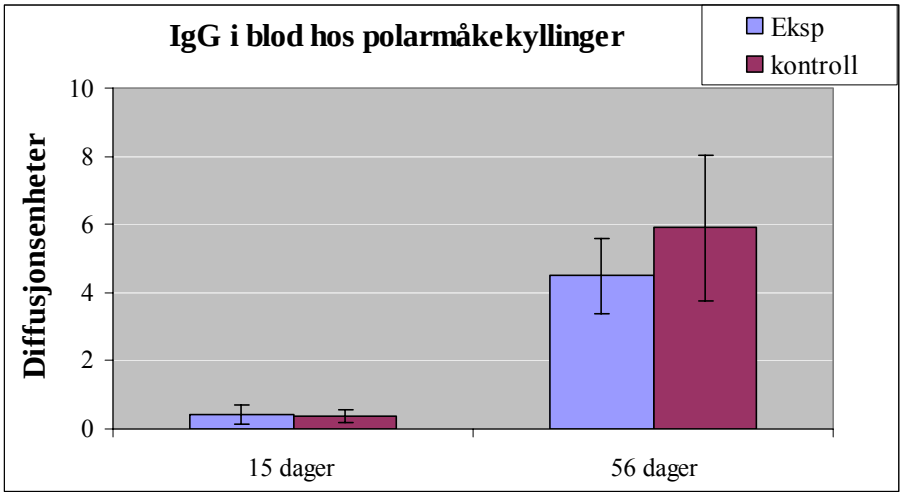
Navn	**Hønseegg, n = 2. 1x2 prøver fra homogen blanding av 10 egg.**		**Måkeegg, n = 4. 2x2 prøver fra homogen blanding av 400 egg.**	
	Gjennomsnitt	**SD**	**Gjennomsnitt**	**SD**
HCB	0,35	0,12	40,85	1,51
a-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
b-HCH	n.d.	n.d.	2,72	0,24
g-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
∑ HCH	n.d.	n.d.	2,72	0,24
oksy- klordan	n.d.	n.d.	34,31	2,11
trans- klordan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cis- klordan	n.d.	n.d.	5,88	0,53
trans- klordan	n.d.	n.d.	22,33	1,65
∑ klordan	n.d.	n.d.	62,53	3,72
pp'-DDE	0,40	0,02	279,57	11,09
op'-DDD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pp'-DDD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pp'-DDT	n.d.	n.d.	18,50	1,23
∑ DDT	0,40	0,02	298,07	10,06
Mirex	n.d.	n.d.	3,36	0,15
PCB-31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB-28	n.d.	n.d.	5,47	0,12
PCB-52 *	n.d.	n.d.	2,71	0,11
PCB-47	n.d.	n.d.	7,12	1,34
PCB-74	n.d.	n.d.	14,28	0,53
PCB-66	n.d.	n.d.	17,33	0,41
PCB-56	n.d.	n.d.	3,83	0,25
PCB-101	n.d.	n.d.	7,95	0,29
PCB-99	n.d.	n.d.	61,64	1,58
PCB-87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB-136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB-110	n.d.	n.d.	11,32	0,67
PCB-151	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB-149 *	n.d.	n.d.	5,39	0,91
PCB-118	n.d.	n.d.	141,70	4,08
PCB-114 *	n.d.	n.d.	3,74	0,39
PCB-153	0,61	0,07	309,10	14,86
PCB-105	n.d.	n.d.	47,74	1,58
PCB-141	n.d.	n.d.	0,44	0,02
PCB-137	n.d.	n.d.	9,44	0,49
PCB-138	0,47	0,05	254,46	11,34
PCB-187	n.d.	n.d.	24,15	5,11
PCB-183	n.d.	n.d.	15,07	3,24
PCB-128	n.d.	n.d.	67,77	2,07
PCB-156	n.d.	n.d.	17,89	0,63
PCB-157	n.d.	n.d.	5,94	0,31
PCB-180	1,69	0,38	73,23	10,85
PCB-170	n.d.	n.d.	21,02	2,79
PCB-199	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB-196	n.d.	n.d.	3,60	0,67
PCB-189	n.d.	n.d.	1,09	0,11
PCB-194	n.d.	n.d.	5,96	1,38
PCB-206	n.d.	n.d.	1,65	1,01
∑ 33 PCB	2,77	0,49	1141,02	56,31

4.2 IgG hos polarmåkekyllinger

Eksponeringen med POPer førte til signifikant lavere mengde totalt IgG sammenliknet med kontrollene 56 dager etter klekking (Student-t-test, tabell 5 og figur 4).

Tabell 5. Mengden (diffusjonsenheter) IgG i blod hos polarmåker som hadde fått en diett etter klekking med (eksperimentgruppe, n = 19) og uten (kontrollgruppe, n = 18) POPer. Standardavvik er oppgitt i parentes. Forskjell mellom gruppene er testet med student t-test.

Alder	**Serum IgG**	
	Eksperiment gruppe	Kontrollgruppe
15 dager	0,43 (0,271)	0,38 (0,194) ns
56 dager	4,50 (1,100)	5,901 (2,130) $p<0,01$



Figur 3. Mengden (diffusjonsenheter) IgG i blod hos polarmåker som hadde fått en diett etter klekking med (eksperiment, n = 19) og uten (kontroll, n = 18) POPer.

Etter klekking vil kyllingene få maternale antistoffer av IgG type (IgY) fra moren via eggeplommen. Hvor mye som overføres er ikke dokumentert hos måker. Det finnes heller ikke litteratur på om IgG eksisterer uten Fc-region (IgY(ΔFc)) hos polarmåke, slik som hos ender og gjess. De lave IgG verdiene ved 15 dagers alder kan vi ikke forklare. Det kan skyldes lite overført IgG eventuelt kombinert med rask reduksjon av maternale antistoffer hos polarmåke, eller langsomt opptak og fordeling i kroppen. Vi vet heller ikke om polarmåke har høy andel IgY(ΔF). Hos for eksempel skilpadder, ender og gjess, men ikke hos høns, finnes også en form IgY uten Fc-region (IgY(ΔF)) som ikke har de vanlige effektfunksjonene som er knyttet til Fc-regionen (komplementbinding, opsonisering). Disse "korte" immunglobulinene/antistoffene vil kunne "nøytralisere" antigener, og vil bli målt sammen med vanlig IgY med polyklonalt kanin anti polarmåke IgG serum på grunn av molekylets antigenstruktur. Om slike immunglobulinstrukturer finnes hos polarmåker er ikke klarlagt. Vi kjenner heller ikke til hvilken betydning disse måtte ha for maternal immunitet.

De maternale antistoffene fra moren vil bli forbrukt i løpet av noen uker, men vil bli erstattet av antistoffer polarmåkekyllingen produserer selv etter eksponering med miljømikrober (og etter immunisering). Kort tid etter immunisering vil det også bli dannet antistoffer av IgM klasse (primitive antistoffer). Dette er antistoffer som er godt egnet til å håndtere antigen tidlig i immunresponsen (eller infeksjonen). Disse antistoffene vil senere i immunsvaret bli "skiftet ut" med antistoffer av IgG klasse, som er best tilpasset mikrobeantigen. Kyllingene utsettes for mikrobeangrep kontinuerlig fra miljøet (i tillegg til immuniseringen) og derfor øker mengden IgG i blod frem til voksen alder hvor det oppstår en likevekt hos friske individer. Derfor utgjør IgG den største immunglobulinklassen i blod. De spesifikke antistoffene som måles i blod ved 56 dagers alder, på det tidspunkt spesifikke antistoffer mot influensa virus ble målt, er av IgG type.

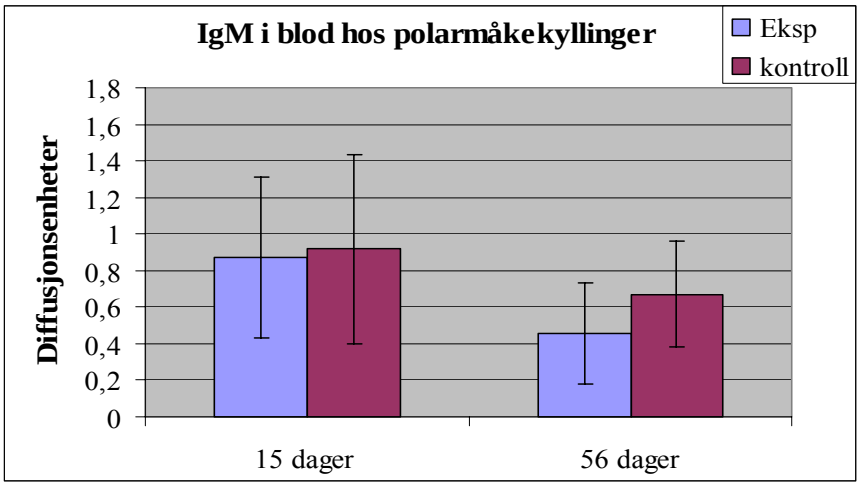
I dette studiet ble det funnet signifikant lavere mengde totalt IgG i eksperimentgruppen sammenliknet med kontrollgruppen ved 56 dagers alder. Dette er i samsvar med at det hos isbjørn er observert en negativ sammenheng mellom IgG nivåer og PCB nivåer (Bernhoft et al. 2000) og at denne negative korrelasjonen var assosiert med nedsatt evne til å danne antistoffer (Lie et al. 2004). Dette viser at eksponering med POPer påvirker antistoffdannelse generelt. Dette er et alvorlig funn med hensyn til polarmåkenes helse. Sammenholdt med nedsatt antistoffdannelse mot influensavirus (Sagerup et al. 2001), betyr dette at POP eksponering påvirker antistoffdannelse generelt og får betydning for fuglenes infeksjonsresistens. Om for eksempel POP eksponeringen kun påvirket det uspesifikke immunsystemet, som blant annet utgjør fagocytter og naturlige drepeceller i et førstelinjes forsvar mot mikrober, så ville miljømikrober lettere slippe igjennom barrierene. Dette ville ført til økt stimulering av det spesifikke immunsystem og derved til økt dannelse av antistoffer mot miljømikrobene. Hvis en slik mikrobebelastning fører til økt antistoffdannelse av betydning (stort omfang) vil også den totale mengden IgG kunne øke. Ved en slik ”begrenset” effekt av POP eksponering på immunapparatet ville IgG mengden faktisk kunne ha økt etter POP eksponering. Dersom POP eksponeringen, imidlertid, også rammer det spesifikke immunsystem i betydelig grad, vil også evnen til å danne antistoffer generelt kunne være redusert. Ved en slik eksponering vil IgG mengden i blod kunne avta i forhold til kyllinger som ikke eksponeres. Våre resultater tyder på at følgene av POP eksponeringen er omfattende fordi immunapparatet påvirkes både til nedsatt spesifikk antistoffdannelse (lavere antistofftiter mot influensa) og generelt nedsatt antistoffproduksjon som resulterer i lavere immunglobulin mengde i blod (lavere IgG konsentrasjon).

4.3 IgM hos polarmåkekyllinger

Analyse av IgM, basert på polyklonale sekundære antistoffer mot høns IgM, viste at eksperimentgruppen hadde signifikant lavere mengde totalt IgM sammenliknet med kontrollgruppen 56 dager etter klekking. Resultatene er gjengitt som diffusjonsenheter (sammenslått polarmåkeserum har ca. 2 mg IgM/ml tilsvarende 2 diffusjonsenheter) i tabell 6 og er illustrert i figur 5.

Tabell 6. Mengden (diffusjonsenheter) IgM i blod hos polarmåker som hadde fått en diett etter klekking med (eksperimentgruppe, n = 19) og uten (kontrollgruppe, n = 18) POPer. Standardavvik er oppgitt i parentes. Forskjell mellom gruppene er testet med student t-test.

Alder	**Serum IgM**	
	Eksperiment gruppe	Kontrollgruppe
15 dager	0,87 (0,442)	0,92 (0,517) ns
56 dager	0,46 (0,277)	0,67(0,290) $p<0,025$



Figur 4. Mengden (diffusjonsenheter) IgM i blod hos polarmåker som hadde fått en diett etter klekking med (eksperiment, n = 19) og uten (kontroll, n = 18) POPer.

IgM respons utgjør et viktig antistoffsvar av betydning tidlig i en infeksjon. Selv om IgM molekylene ikke er skreddersydd til å passe til en "ny" mikrobe, greier IgM likevel på grunn av mange bindingssteder å binde seg til mikrobeantigen. Derfor vil antistoffer av IgM type være viktig ved alle "nye" infeksjoner. I de første leveukene danner kyllingene antistoffer av IgM type mot miljømikrober de eksponeres for. Derfor er det høyt nivå av IgM antistoffer ved 15 dagers alder. Like etter immunisering vil også antistoffer av IgM klasse dominere. Disse "primitive antistoffer" vil etter hvert bli "skiftet ut" med antistoffer av IgG klasse. Forsøket viser at det er en negativ effekt av eksponering på IgM nivåer ved 56 dager. Det indikerer at polarmåkekyllingenes evne til å danne antistoffer av IgM type også er nedsatt i dette forsøket, selv om det ikke er forskjell mellom gruppene 15 dager etter klekking. Resultatet understreker derfor at POP eksponering påvirker immunapparatet i betydelig grad og reflekterer at immunsuppresjonen (nedsatt immunrespons) berører store deler av antistoffproduksjonen.

4.4 Bruk av resultatene i overvåking og videre studier

Prosjektet har resultert i reagenser for måling av polarmåke IgG som også kan brukes til å måle spesifikke antistoffer mot miljømikrober (for eksempel med ELISA test), smittestoff eller ulike antigener som polarmåkene er immuniser med. Slike analyser vil være viktige i et overvåkningsarbeid. For å kunne vurdere nytten av å bruke kvantifisering av IgG og/eller spesifikke antistoffer mot definerte miljømikrober i forbindelse med overvåkning av miljøgiftbelastning, må man måle IgG og spesifikke antistoffer hos frittlevende polarmåker og sammenholde dette med miljøgiftbelastningen.

Reagensene vil også kunne anvendes for måling av maternal immunitet (måling av IgG i eggeplomme eller i blod til nyklekkede kyllinger). Det er i denne sammenheng viktig å fremskaffe normalverdier for overføring av maternale antistoffer hos polarmåke. Videre er det viktig å finne ut hvilke konsentrasjoner som oppnås på ulike tidspunkt etter klekking, om polarmåke har IgY(ΔF) og hvilken betydning disse har hos polarmåke. Registrering av maternale antistoffer vil kunne sammenholdes med IgG nivåer hos voksne frittlevende måker og POPer nivå. Dersom avvikende IgG – og antistoffnivåer i egg er assosiert med høye POPer nivåer, kan en mulig fremtidig overvåkningsmetode bli å måle IgG og POPer i egg fra ulike kolonier, eventuelt kombinert med måling av visse maternale antistoffer i egg mot miljømikrober (definerte "markører"). Dette kan skje uten å måtte fange polarmåker for blodprøver.

Immuniseringsarbeidet på kaniner for å produsere egne polyklonale antistoffer mot IgM og IgA bør fortsette. Dette metodearbeidet pågår fremdeles i laboratoriet. Så snart metodene er etablert vil vi gå i gang med kvantifisering av IgA og IgM. Resultatene fra polyklonale antistoffer mot IgM skal kontrollere IgM målingene som nå er fremskaffet ved bruk av kommersielle reagenser hos høns. Måling av IgA gjøres for å dokumentere i hvilken grad slimhinneimmunitet er påvirket av POP eksponering. Dette er viktig for å kunne forstå helheten og omfanget av den nedsatt immunresponsen vi her har vist.

I fremtidig overvåkning kan markører innen immunologi si noe om hvordan fuglene takler stresset fra den kombinerte effekten av miljøgifter og de naturlige sykdomsorganismene de er utsatt for.

5. Referanser

Barry, S.J. and Barry, T.W. (1990) Food habits of glaucous gulls in the Beaufort Sea. *Arctic*, **43**, 43-49.

Bernhoft, A., Wiig, Ø. and Skaare, J.U. (1997) Organochlorines in polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Environmental Pollution*, **96**, 1-16.

Bernhoft, A., Skaare, J. U., Wiig, Ø., Derocher, A. E., and Larsen, H. J. S. (2000). Possible immunotoxic effects of organochlorines in polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* **59**, 561-574.

Borgå, K., Gabrielsen, G. and Skaare, J. (2001) Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, **113**, 187-198.

Bustnes, J.O., Hanssen, S. A., Folstad, I. Erikstad, K.E., Hasselquist, D. and Skaare, J.U. (2004) Immune Function and Organochlorine Pollutants in Arctic Breeding Glaucous Gulls. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**, 530-541.

Catty D. (1998) Antibodies Volume I, a practical approach. IRL Press Limited.

Fairbrother, A., Smits, J., Grasman, K.A. (2004) Avian Immunotoxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health B **7***, 105-137.

Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U., Polder, A. and Bakken, V. (1995) Chlorinated hydrocarbons in glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) in the southern part of Svalbard. *Science of the Total Environment*, **160/161**, 337-346.

Grasman, K.A., Fox, G.A., Scanlon, P.F. and Ludwig, J.P. (1996) Organochlorine-associated immunosuppression in prefledgling Caspian terns and herring gulls from the Great lakes: An Ecoepidemiological study. *Environmental Health Perspective Supplement*, **104**, 829-842.

Harper, N., Connor, K. and Safe, S. (1993) Immunotoxic potencies of polychlorinated biphenyl (PCB), Dibenzofuran (PCDF) and Dibenzo-p-dioxin (PCDD) congeners in C57BL/6 and DBA/2 Mice. *Toxicology*, **80**, 217-227.

Lie, E., Larsen, H. J. S., Larsen, S., Johansen, G.M., Derocher, A., Lunn, N. F., Norstrom, R. J., Wiig, Ø., Skaare, J. U. (2004) Does high organochlorine (OC) exposure impair the resistance to infection in polar bears (*Ursus maritimus*)? Part I: Effect of OCs on the humoral immunity. *Journal of Toxicology and Environmental Health A **67***, 555-582.

Lydersen, C., Gjertz, I. and Weslawski, J.M. (1989) Stomach contents of autumn- feeding marine vertebrates from Hornsund, Svalbard. *Polar Record*, **25**, 107-114.

Macdonald, R.W. and Bewers, J.M. (1996) Contaminants in the arctic marine environment: priorities for protection. *ICES Journal of Marine Science*, **53**, 537-563.

Mayura, K., Spainhour, C., Howie, L., Safe, S. and Phillips, T. (1993) Teratogenicity and immunotoxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in c57bl/6 mice. *Toxicology*, **77**, 123-131.

Mehlum, F. and Daelemans, F.F. (1995) PCBs in Arctic seabirds from the Svalbard region. *Science of the Total Environment*, **160/ 161**, 441-446.

Muir, D.C.G., Wagemann, R., Hargrave, B.T., Thomas, D.J., Peakall, D.B. and Norstrom, R.J. (1992) Arctic marine ecosystem contamination. *Science of the Total Environment*, **122**, 75-134.

Norstrom, R.J., Simon, M., Muir, D.C.G. and Schweinsburg, R.E. (1988) Organochlorine Contaminants in Arctic Marine Food Chains: Identification, Geographical Distribution, and Temporal Trends in Polar Bears. *Environmental Science and Technology*, **22**, 1063-1071.

Sagerup, K., Gabrielsen, G.W., Larsen, H.J. and Skaare J.U. (2001) Effects of persistent organic pollutants (POPs) on the immune response of glaucous gull (*Larus hyperboreus*) - Method development for immunological studies on glaucous gull.

Experimental immunotoxicological study with glaucous gull chicks. Final report for project number 4188 to the effects program http://www.npolar.no/transeff/Effects/Default.htm

Tryphonas, H., Luster, M., White, K., Naylor, P., Erdos, M., Burleson, G., Germolec, D., Hodgen, M., Hayward, S. and Arnold, D. (1991) Effects of PCB (Aroclor-1254) on nonspecific immune parameters in rhesus (*Macaca-mulatta*) monkeys. *International Journal of Immunopharmacology*, **13**, 639-648.

Tryphonas, H. 1994. Immunotoxicity of polychlorinated-biphenyls - Present status and future considerations. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 11:149-162.

Vos, J. G., and Luster, M. I. 1989. Immune alterations. In *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins, and Related Products*, eds. R. D. Kimbrough and A. D. Jensen, 2nd ed., pp. 295-322. Amsterdam: Elsevier.

Walker, C. (1990) Persistent pollutants in fish-eating sea birds - bioaccumulation, metabolism and effects. *Aquatic Toxicology*, **17**, 293-324.

Statens forurensningstilsyn (SFT)
Postboks 8100 Dep, 0032 Oslo
Besøksadresse: Strømsveien 96

Telefon: 22 57 34 00
Telefaks: 22 67 67 06
E-post: postmottak@sft.no
Internett: www.sft.no

Utførende institusjon Norsk Polarinstitutt	Kontaktperson SFT Linn Bryhn-Jacobsen	ISBN-nummer

	Avdeling i SFT	TA-nummer

Oppdragstakers prosjektansvarlig Geir Wing Gabrielsen	År 2004	Sidetall	SFTs kontraktnummer 6003104

Utgiver Norsk Polarinstitutt	Prosjektet er finansiert av Statens forurensningstilsyn og Norsk Polarinstitutt

Forfattere
Hans Jørgen Larsen, Geir Wing Gabrielsen og Kjetil Sagerup

Tittel
Effekter av persistente organiske miljøgifter på immunrespons hos polarmåke

Sammendrag
Prosjektet har resultert i reagenser for måling av IgG hos polarmåke. Det foreligger også reagenser for måling av IgM. Arbeidet med reagensfremstilling for måling av IgA pågår fremdeles i laboratoriet.

Resultatet av analysen viste at eksponeringen med naturlige mengder og sammensetning av miljøgifter (POPer) til polarmåkekyllinger førte til signifikant lavere mengde totalt IgG og IgM sammenliknet med kontrollene 56 dager etter klekking. Dette, sammen med redusert respons mot influensavirus (vaksine), er et alvorlig og viktig funn med hensyn til polarmåkenes helse. Resultatene viser at POP eksponering påvirker antistoffdannelse generelt noe som får betydning for fuglenes infeksjonsresistens. Våre resultater tyder derfor på at den eksponeringen av POPer som polarmåkekyllinger blir utsatt for i arktisk kan gir en omfattende immunsuppresjon (nedsatt immunrespons) og dermed nedsatt sykdomsresistens.

4 emneord Polarmåke, Arktis, Miljøgifter, Immunsystemet	4 subject words Glaucous gull, Arctic, Contaminants, Immune system